

LA FILOSFERA DE *EUCALYPTUS VIMINALIS* (MYRTACEAE) IV: ESTRUCTURA, DINAMICA Y DESARROLLO DE LA COMUNIDAD FUNGICA*

Por DANIEL CABRAL¹ y MARTA COLLANTES²

Summary *Phyllosphere of Eucalyptus viminalis* IV: Structure, dynamic and development of the fungal community. Data of frequency from the fungal community of the phyllosphere and subcommunities of the phylloplane and endophylle of *E. viminalis* were subjected to cluster and correspondence analysis in order to analyse their seasonal variations and the influence of the physiological conditions of the leaves. Community and subcommunity structure were studied using diversity index, species strategies and mycelial density measured with SEM. Statistic analysis showed that the phylloplane depends on climate changes; the endophylle depends on the physiological conditions of the leaf; whereas the whole phyllosphere community was mainly influenced by climate. However, mycelial density of the phylloplane indicates that physiological conditions of the leaf is also an important factor in that microhabitat. The study of strategies is a simple and fast technique resulting in conclusions similar to those obtained by multivariate analysis.

INTRODUCCION

El microhábitat de la hoja recibe el nombre de filosfera (Last, 1955), que en sentido amplio (Carroll *et al.*, 1977) incluye el entorno de la hoja, su superficie o filoplane (Kerling, 1958) y los tejidos internos, que nosotros denominaremos endofilo. Con los trabajos de Last (1955) y Ruinen (1956), comienza el estudio sistematizado de los microorganismos no patógenos de la filosfera.

La flora microbiana del filoplane está constituida principalmente por bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Ruinen, 1961). El control biológico natural de las enfermedades vegetales en este microhábitat parece estar relacionado con la acción antagónica de los saprófitos para con los patógenos (Blakeman & Fokkema, 1982).

La mayoría de los organismos no patógenos que colonizan el endófilo pertenecen al grupo de los hongos filamentosos, en particular Ascomycetes y Deuteromycetes. Existen pocos registros de la presencia de bacterias o levaduras endofíticas (Jacobs *et al.*, 1985). Carroll *et al.* (1977) sugieren que la presencia de endófitos podría tener una

función de protección contra la infección de patógenos activos mediante efectos de antagonismo; permitir la reabsorción de sustancias orgánicas y minerales de los lixiviados foliares y participar en la distribución de nutrientes antes de la caída de la hoja. Carroll y Carroll (1978) postulan que los endófitos podrían actuar disminuyendo la palatabilidad de los tejidos para los insectos fitófagos. Desde entonces se ha acumulado información que parece indicar que los endófitos fúngicos, que presentan una amplia distribución en el reino vegetal, conforman una asociación mutualista, cuyo efecto más destacado sería el incremento de las defensas de la planta contra el ataque de herbívoros (Carroll, 1986, 1988; Clay, 1986, 1988).

Las asociaciones más estudiadas en este aspecto son las de los endófitos de los pastos. En *F. arundinacea* Schreb. y *L. perenne* L. se aislaron alcaloides de las plantas y de los cultivos de los endófitos, que parecen ser los responsables, tanto de las enfermedades que afectan al ganado, conocidas como festucosis o pie de festuca, y temblequeo del ganado o ryegrass stagger respectivamente, como de la resistencia de las plantas a las plagas (Porter *et al.*, 1979; Gallagher, 1981).

En un trabajo previo (Cabral, 1985) se estudió la distribución de frecuencias de las especies más representativas de la filosfera de *Eucalyptus viminalis* Labill., en función de los cambios estacionales y los estados fisiológicos de la hoja. Los objetivos de este trabajo son: analizar los resultados de frecuencia de las especies de la comunidad fúngica de la

* Publicación número 36 del PRHIDEB (CONICET). Programa de Hongos que Intervienen en la Degradación Biológica.

¹ Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires, Argentina.

² CEVEG (CONICET). Serrano 665. (1414), Buenos Aires, Argentina.

filosfera y de las subcomunidades del filoplano y endófilo de un modo global, esto es, con la consideración de la totalidad de las especies asociadas a cada microhábitat, en función de las estaciones del año y tipo de hoja; utilizar la densidad de micelio como otro parámetro para evaluar las variaciones en el filoplano, y estudiar la diversidad específica y la distribución de estrategias de las especies en dichos microhábitats, en función de los parámetros señalados.

MATERIAL Y METODO

Ordenamiento y clasificación de los datos

En un trabajo previo (Cabral, 1985), se estudió la comunidad fúngica de la filosfera de *E. viminalis* por medio de dos técnicas de aislamiento: lavado seriado y esterilización superficial. A partir de los datos de porcentaje de frecuencia obtenidos para cada especie en las cuatro estaciones del año y en los diferentes estados fisiológicos de la hoja en el árbol (tipos de hoja: J, jóvenes; M, maduras; Sn, senescentes y Se, secas), se construyeron dos matrices de frecuencia de aparición de las especies. Una correspondiente a los organismos aislados por lavado seriado, considerados epífilos (subcomunidad del filoplano), y la otra a los aislados por esterilización superficial, considerados endófilos (subcomunidad del endófilo). Dichas matrices están incluidas en Cabral (1985), como Tablas 1 y 2 respectivamente y constan de 15 censos por 35 y 18 variables (especies), respectivamente.

Para el análisis global de la comunidad fúngica de la filosfera, se construyó una tercera matriz que incluye la totalidad de las especies aisladas por ambas técnicas. Para su elaboración se seleccionó el valor más alto de frecuencia de cada especie para los valores correspondientes al mismo tipo de hoja y estación del año de las dos matrices señaladas anteriormente. De este modo se pretendió obtener la frecuencia que cada especie hubiera tenido si los organismos epífilos y endófilos hubieran podido ser aislados de la misma submuestra. El tamaño final de la matriz es de 15 censos por 42 variables (Tabla 1). Como en las dos matrices anteriores se indican en cada censo el número total de especies presentes y la frecuencia acumulada. En este caso se agregó la estrategia con que cada especie fue asignada en Cabral (1985) según se detalla más adelante. Los datos de las tres matrices se agruparon con el método WPGM (Sokal y Sneath, 1963) usando como medida de similitud el índice de Czekanowsky (Clifford y Stephenson, 1979) y se ordenaron con el método de análisis de correspondencia (Benzecri, 1976), procesados en una IBM

370 del Centro de Cómputos de Análisis de Sistemas de la UBA.

Diversidad

Para cada uno de los estados de la comunidad en cada matriz, se calculó el índice de diversidad de Shannon-Wiener (Whittaker, 1975). Los resultados se representan gráficamente.

Densidad de micelio en el filoplano

Se calculó mediante el uso de fotografías con microscopio electrónico de barrido (MEB). Debido a las características de la técnica el análisis estuvo restringido al componente epífilo de la comunidad de la filosfera.

Las muestras de hojas se colectaron al azar según su estado fisiológico (tipo de hoja), que corresponden a los detallados anteriormente. Se realizó un muestreo por estación del año, en la primera semana de los meses de agosto y noviembre de 1981 y enero y mayo de 1982. Dicho muestreo no se realizó simultáneamente con el análisis florístico. No obstante, se observaron mínimas diferencias climáticas generales entre ambos muestreos (ver Fig. 1 y cfr. con Fig. 1 en Cabral, 1985). Los datos climáticos fueron obtenidos de la Estación Experimental INTA San Pedro, Provincia de Buenos Ai-

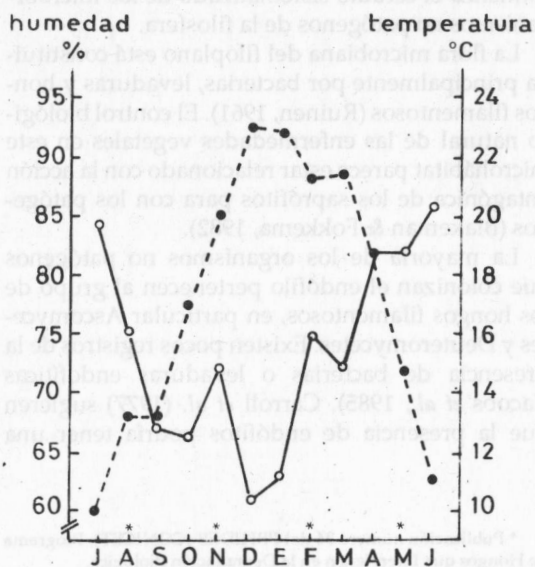


Fig. 1.-- Temperatura media mensual y humedad relativa media mensual agosto de 1981 a mayo de 1982. * mes de muestreo. ●---● humedad. ○—○ temperatura.

res. El signo + en la Fig. 1 indica los meses en los cuales se realizaron los muestreos. Sin embargo, debido a que estos se llevaron a cabo durante la primera semana de cada mes, se considera que la comunidad esta más influida por las condiciones que prevalecieron en el mes previo.

En el laboratorio se extrajeron, al azar, 6 hojas de las muestras de cada tipo. De cada una se cortaron, al azar, dos submuestras de 4 x 4 mm, que se deshidrataron en una serie de etanol. Una de las submuestras de cada hoja se montó sobre la cara adaxial, y la otra sobre la abaxial. De cada una se tomó, al azar, una fotografía con MEB a 1200 aumentos, sobre la cual se midió con ayuda de un curvimetro, el largo total (en cm) de las hifas fotografiadas sobre el filopiano. Cuando éstas formaban cordones en las depresiones estomáticas, el largo de cada hifa se estimó midiendo el perímetro del estoma y contando el número de hifas que componían el cordón. Para conocer el área fotografiada y el largo de las hifas en la misma unidad, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{tamaño en cm} \times 10.000}{1200 \text{ (aumento)}} = \text{tamaño en } \mu\text{m}$$

Los resultados se expresaron en mm de micelio por mm² de hoja y fueron tratados estadísticamente con un análisis de la varianza de dos factores no balanceados con el programa MGLH (SYSTAT) 1986, y se estudiaron los efectos simples (Winer, 1971). Se examinaron las diferencias entre cada par de medias por el método de mínima diferencia significativa (m.s.d.). Las hojas J no se consideraron en este análisis debido a que en la mayor parte de los casos no se registró micelio, lo cual podría interferir en el método estadístico. Al resto de los datos se aplicó la transformación $Y = \sqrt{x + 0,5}$ para cumplimentar las suposiciones del análisis.

Espectros de estrategias

Mueller-Dombois (1984) propone, del mismo modo que en los estudios de comunidades de plantas superiores, el uso de diagramas o espectros de estrategias, para el análisis de la estructura de las comunidades fúngicas en función del nicho que ocupan las especies integrantes. Nosotros adaptamos dicha propuesta al estudio de la comunidad fúngica de la filosfera, con el objeto de analizar los cambios que sufre su estructura en función de los tipos de hoja y estaciones del año, en términos de nicho.

Según las técnicas de aislamiento utilizadas en el estudio de la comunidad, las especies fúngicas

presentan dos tipos de estrategias en función de su ubicación en el sustrato. Estas se denominaron epífila y endofila. Dada las características de las estructuras vegetales, estas estrategias implican no solo una ubicación diferente en el microhábitat, sino una relación con el hospedante y un tipo de nutrición también diferente.

En Cabral (1985) se asignó a las especies otras tres categorías de estrategias en función de la frecuencia de aparición y su permanencia en los diferentes tipos de hojas (Leben, 1965; Dickinson, 1976; Pugh, 1980). Según éstas, las especies se denominaron: ruderales (Ru); residentes específicas (Re) y residentes inespecíficas (Ri). Una cuarta categoría correspondiente a las especies saprófitas primarias (Sp), no se pudo adjudicar a ninguna de las entidades aisladas. La asignación de estas categorías para cada especie se indica en la Tabla 1.

La combinación de las tres últimas categorías señaladas con el tipo de estrategia epífila o endofila, da un total de seis posibles estrategias de vida para las especies fúngicas de la filosfera de *E. viminalis*.

Para cada una de ellas se procedió a realizar la suma de los valores de frecuencia correspondiente a las especies con igual combinación de estrategias. Los resultados se graficaron en forma de barras de frecuencia en un diagrama o espectro de estrategias, para cada tipo de hoja y estación del año. En el mismo gráfico se incluye el número de especies que contribuyen a cada una de las categorías.

RESULTADOS

Clasificación y ordenamiento

Los resultados de la clasificación y ordenamiento de los datos de frecuencia de cada una de las tres matrices analizadas: subcomunidad del filopiano (componente epífila); subcomunidad del endofilo (componente endofilo); y comunidad de la filosfera (ambas subcomunidades), se grafican en las Figs. 2, 3 y 4. En la Fig. 2 A, se muestra el resultado de la clasificación de los censos de la subcomunidad epífila en cuatro diferentes tipos de hojas y cuatro estaciones del año. Los dos censos con mayor similitud corresponden a las hojas J y Sc de otoño que, junto con las hojas M y Sn de la misma estación conforman un grupo bien diferenciado, con similitudes mayores que 85%. Este grupo tiene gran similitud con los estados de la subcomunidad fúngica sobre hojas M, Sn y Sc de invierno, a los que se une con valores superiores a 75%. Con excepción de las hojas M de primavera, que está relacionado con el grupo señalado anteriormente, los censos sobre los diferentes tipos de hojas en

Tabla 1.-- Frecuencia del total de especies aisladas por ambas técnicas. Esta tabla se confeccionó combinando las tablas 1 y 2 de Cabral (1985). Para cada especie, en cada censo, se eligió la frecuencia más alta obtenida en una de las dos técnicas de aislamiento. Ep: especie epifila; En: especie endofila; Ru: especie ruderal; R: especie residente; i: especie inespecífica; e: especie específica

Estación				Estadíos	Otoño				Invierno				Primavera				Verano			
Estrategias			Especies		J	M	Sn	Sc	J	M	Sn	Sc	J	M	Sn	Sc	J	M	Sn	Sc
					J	M	Sn	Sc	J	M	Sn	Sc	J	M	Sn	Sc	J	M	Sn	Sc
Ep	R	i	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	90	93,5	76,6	93,3													
Ep	Ru	--	<i>Nigrospora oryzae</i> (Berk. & Br.) Petch.	3,3				85	90	100	20	75	90	95	35	70	85	100		
Ep	R	i	<i>Fusarium</i> sp.	3,3	6,6	6,6	6,6	5				5								
Ep	R	i	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) de Vries									10		5						
				93,3	93,3	93,3	96,6	65	80	65	20	40	5	40	20		10	15		
Ep	R	i	<i>Pseudodiplodia</i> sp.	3,3		3,3	10													
Ep	Ru	--	<i>Penicillium</i> sp.		6,6		6,6		5											
Ep	R	i	<i>Epicoccum nigrum</i> Link	56,6	33,3	36,6	66,6									5		5		
Ep	R	i	<i>Phoma</i> sp. PH 1	3,3	6,6	6,6	13,3	40	45	65	20	45	35	20			5	5		
Ep	R	i	<i>Microsphaeropsis callista</i> (H. Syd.)	10	10	10	6,6	10	5								15	10		
Ep	Ru	--	<i>Pestalotiopsis oxyanthi</i> (Thuen.) Stey.		3,3	10														
Ep	Ru	--	Ascomycete no identificado		3,3							10		5			5	10		
Ep	Ru	--	<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedijn				3,3	5								25			5	
Ep	Ru	--	<i>Ascochyta</i> sp.				3,3									5				
En	R	e	<i>Macrophoma smilacina</i> (Berk.) Berlese & Vogl.				13,3				5	10	5							
							10													
Ep	Ru	--	<i>Phoma</i> sp. PH 2					35	20	5		10	50	25	30	10	15	10		
En	R	e	<i>Coccomyces martiniae</i> Hansf.		26,6	50	3,3	5						5						
Ep	Ru	--	<i>Mycosphaerella</i> sp.					75	90	70		15	70	5		55	30	10		
Ep	Ru	--	Sphaeropsidales 8					25	10											
En	R	e	<i>Coniothyrium</i> sp.	10	76,6	33,3	3,3	5												
								40	35	5	55	35	30		30	75	85	35		

En	R	e	Micelio estéril GRN	23,3	10			5	40	20	5	35	10	10		10	10	5
Ep	Ru	--	Sphaeropsidales 9					5	5									
Ep	Ru	--	Periconia sp.					5										
Ep	Ru	--	Cladosporium herbarum (Pers.) Link ex S.F. Gray					5										
En	R	e	Zoellneria eucalypti (Berk.) Dennis	3,3	30	56,6	10		5	5								
En	Ru	--	Phoma sp. PH 3					15	5									
Ep	Ru	--	Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Sacc.						5		5							
Ep	Ru	--	Sphaeropsidales 4											5		5		5
Ep	Ru	--	Leptosphaeria sp.						5	15								
Ep	Ru	--	Phoma sp. PH 4							10								
Ep	Ru	--	Sphaeropsidales 7							10								
Ep	Ru	--	Sphaeropsidales 6							5								
Ep	Ru	--	Arthrimum sp.							5								
Ep	Ru	--	Pleospora sp.							5								
Ep	Ru	--	Sphaeropsidales 1							10								
Ep	Ru	--	Sordaria sp.															5
En	Ru	--	Drechslera dematioidea (Bubák & Wróbl.) Subram.															5
En	Ru	--	Aureobasidium pullulans (De Bary) Arnaud			3,3												
En	Ru	--	Pseudoseptoria sp.			3,3								5				
En	Ru	--	Chrysosporium sp.				3,3											
En	Ru	--	Ascomycete no identificado (Nectriaceae)										5			5		
En	Ru	--	Sphaeropsidales 2											15				
Número total de Especies				10	14	16	16	16	14	14	14	14	11	14	5	8	11	16
Frecuencia total				276,4	416,1	422,7	329,5	435	460	370	235	310	310	270	120	235	270	235

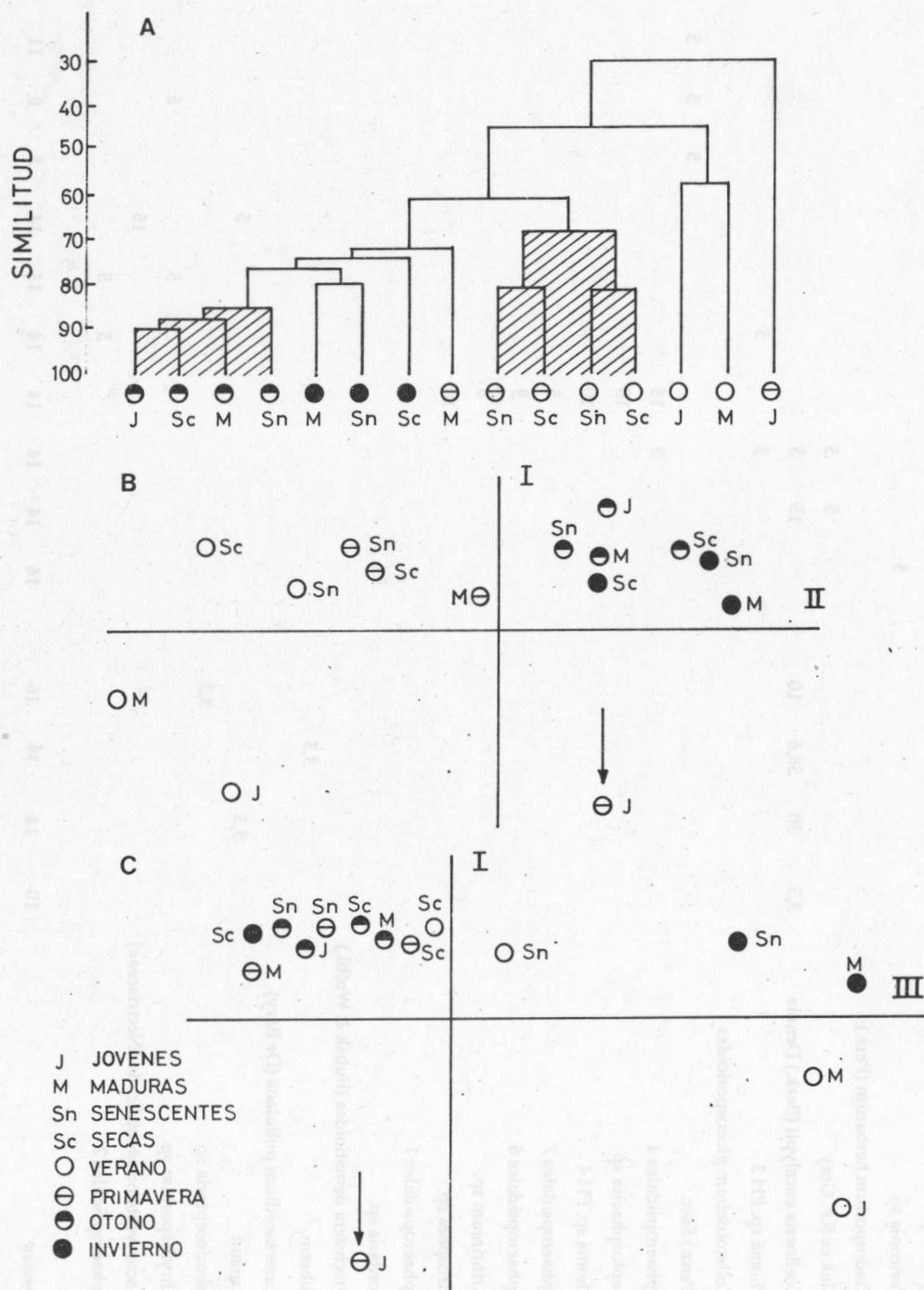


Fig. 2.-- Análisis multivariado de los 15 censos correspondientes a la subcomunidad epifila. A: Dendrograma producido por W.P.G.M. B: Ordenamiento según los ejes I y II por AN.FA.CO. C: Ordenamiento según los ejes I y III por AN.FA.CO.

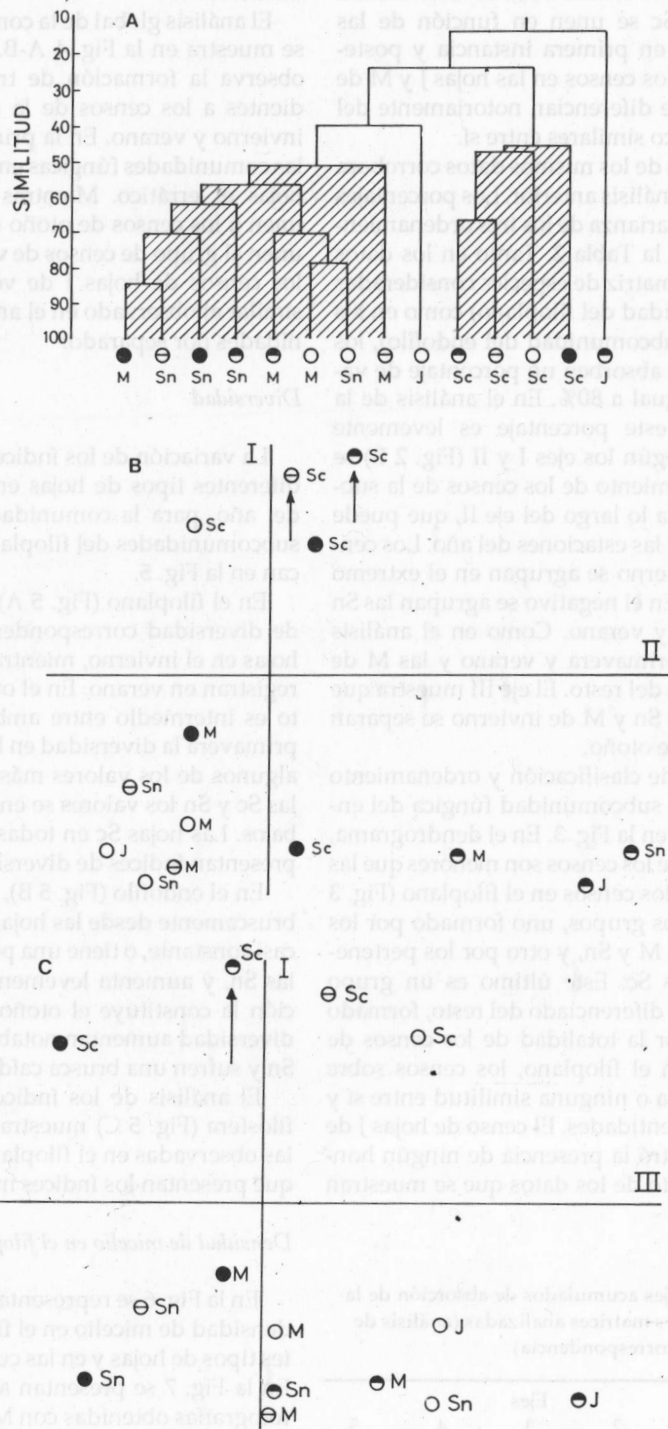


Fig. 3.-- Análisis multivariado de los 14 censos correspondientes a la subcomunidad endofila. A: Dendrograma producido por W.P.G.M. B: Ordenamiento según los ejes I y II por AN.FA.CO. C: Ordenamiento según los ejes I y III por AN.FA.CO.

verano y primavera, se diferencian notoriamente del resto. Mientras los censos de la subcomunidad sobre hojas Sn y Sc se unen en función de las estaciones del año en primera instancia y posteriormente entre sí, los censos en las hojas J y M de ambas estaciones se diferencian notoriamente del resto sin ser tampoco similares entre sí.

El ordenamiento de los mismos datos corrobora lo observado en el análisis anterior. Los porcentajes de absorción de la varianza de los tres ordenamientos se muestran en la Tabla 2. Tanto en los datos provenientes de la matriz de especies consideradas epifilas (subcomunidad del filoplano) como en los de las endofilas (subcomunidad del endofilo), los cinco primeros ejes absorben un porcentaje de varianza cercano o igual a 80%. En el análisis de la comunidad total, este porcentaje es levemente menor (74,48%). Según los ejes I y II (Fig. 2 B) se observa un ordenamiento de los censos de la subcomunidad epifila a lo largo del eje II, que puede correlacionarse con las estaciones del año. Los censos de otoño e invierno se agrupan en el extremo positivo del eje II. En el negativo se agrupan las Sn y S de primavera y verano. Como en el análisis anterior, las J de primavera y verano y las M de verano se segregan del resto. El eje III muestra que los censos de hojas Sn y M de invierno se separan netamente de los de otoño.

Los resultados de clasificación y ordenamiento de los censos de la subcomunidad fúngica del endofilo se muestran en la Fig. 3. En el dendrograma, las similitudes entre los censos son menores que las encontradas entre los censos en el filoplano (Fig. 3 A). Se observan dos grupos, uno formado por los censos en las hojas M y Sn, y otro por los pertenecientes a las hojas Sc. Este último es un grupo homogéneo y muy diferenciado del resto, formado exclusivamente por la totalidad de los censos de hojas Sc. Como en el filoplano, los censos sobre hojas J guarda poca o ninguna similitud entre sí y con el resto de las entidades. El censo de hojas J de primavera no mostró la presencia de ningún hongo. El ordenamiento de los datos que se muestran

en las Figs. 3 B y 3 C, corroboran lo observado por clasificación.

El análisis global de la comunidad de la filosfera se muestra en la Fig. 4 A-B. En ambos análisis se observa la formación de tres grupos correspondientes a los censos de la comunidad en otoño, invierno y verano. En la primavera, la afinidad de las comunidades fúngicas en los diferentes tipos de hojas es errático. Mientras en algunos casos se unen a los censos de otoño e invierno, en otros se unen al grupo de censos de verano. La similitud de los censos de hojas J de verano y primavera es similar al observado en el análisis de las subcomunidades por separado.

Diversidad

La variación de los índices de diversidad en los diferentes tipos de hojas en las cuatro estaciones del año, para la comunidad de la filosfera y las subcomunidades del filoplano y endofilo, se grafican en la Fig. 5.

En el filoplano (Fig. 5 A), los valores más altos de diversidad corresponden a todos los tipos de hojas en el invierno, mientras que los más bajos se registran en verano. En el otoño el comportamiento es intermedio entre ambas estaciones, y en la primavera la diversidad en las hojas J y M alcanzan algunos de los valores más altos, en tanto que en las Sc y Sn los valores se encuentran entre los más bajos. Las hojas Sc en todas las estaciones del año presentan índices de diversidad similares.

En el endofilo (Fig. 5 B), la diversidad aumenta bruscamente desde las hojas J a las M, se mantiene casi constante, o tiene una pequeña disminución en las Sn, y aumenta levemente en las Sc. La excepción la constituye el otoño, donde los índices de diversidad aumentan notablemente hacia las hojas Sn y sufren una brusca caída en las hojas secas.

El análisis de los índices de diversidad en la filosfera (Fig. 5 C) muestra tendencias similares a las observadas en el filoplano. Las hojas Sc son las que presentan los índices más semejantes.

Densidad de micelio en el filoplano

En la Fig. 6 se representan los valores medios de densidad de micelio en el filoplano, en los diferentes tipos de hojas y en las cuatro estaciones del año. En la Fig. 7 se presentan algunos ejemplos de las fotografías obtenidas con MEB.

Del análisis de varianza surge que los factores (tipo de hoja y estación del año) interactúan (Tabla 3), por lo que solo pueden estudiarse los efectos simples. La comparación de medias (Tabla 4) indica que para cada tipo de hoja, la densidad de mico-

Tabla 2.-- Porcentajes acumulados de absorción de la varianza de las tres matrices analizadas (análisis de correspondencia)

	1	2	Ejes 3	4	5
Epifilo	36.343	51.831	62.441	71.943	79.621
Endofilo	37.143	53.402	64.249	73.210	80.952
Filosfera	27.320	44.207	55.897	66.101	74.486

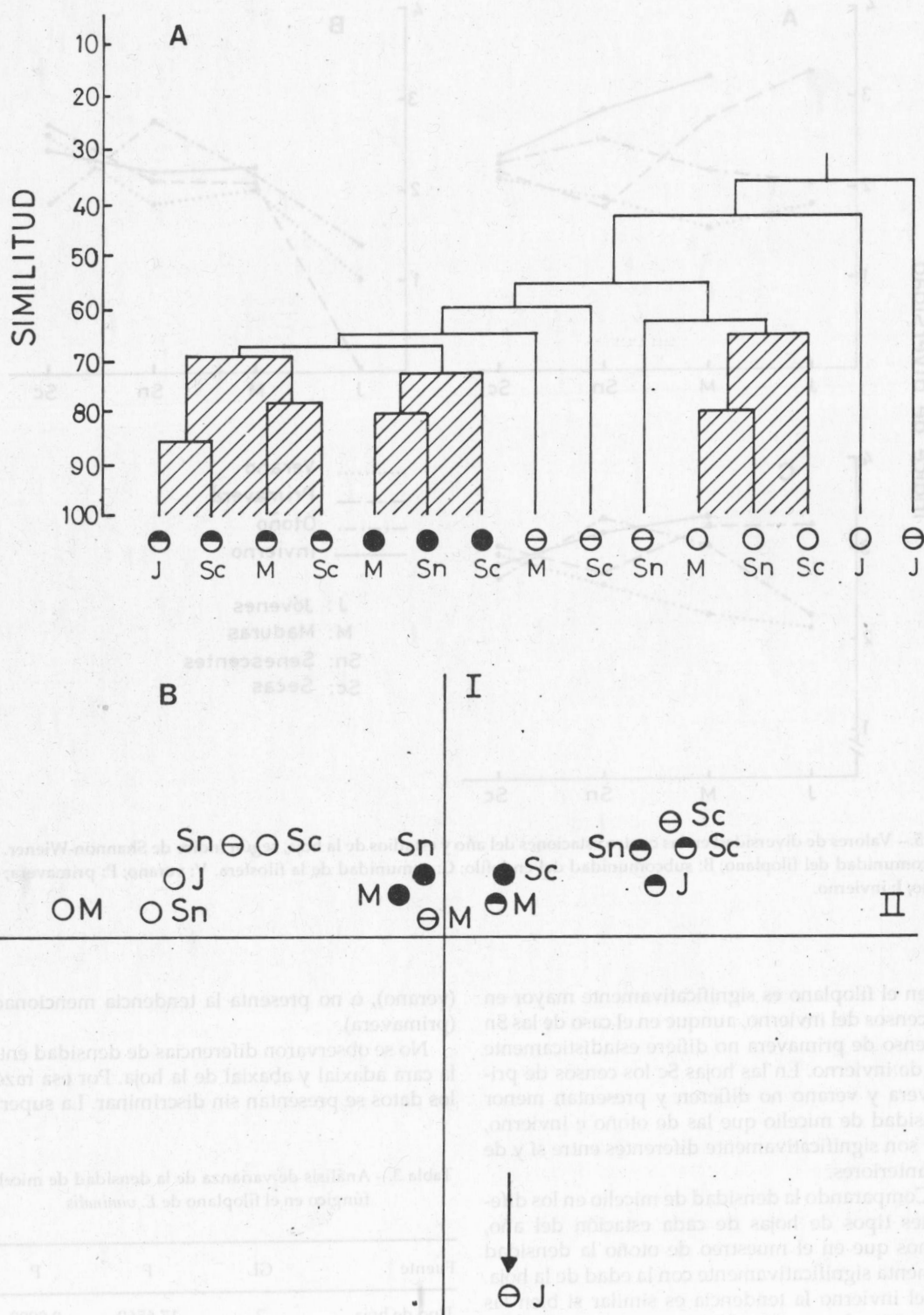


Fig. 4.-- Análisis multivariado de los 15 censos correspondientes a la comunidad de la filosfera (Tabla 1). A: Dendrograma producido por W.P.G.M. B: Ordenamiento según los ejes I y II.

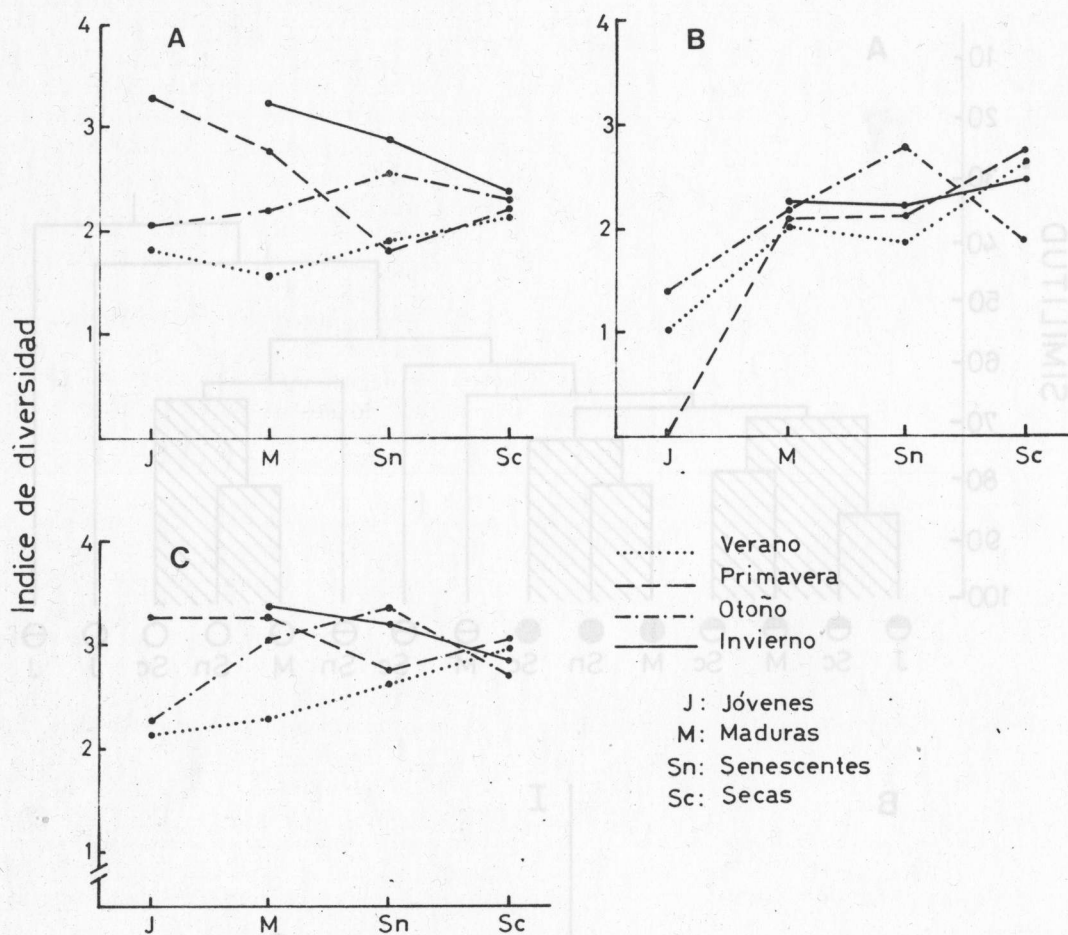


Fig. 5.-- Valores de diversidad en las cuatro estaciones del año y estadios de la hoja, según índice de Shannon-Wiener. A: subcomunidad del filoplano; B: subcomunidad del endofilo; C: comunidad de la filosfera. V: verano; P: primavera; O: otoño; I: invierno.

lio en el filoplano es significativamente mayor en los censos del invierno, aunque en el caso de las Sn el censo de primavera no difiere estadísticamente del de invierno. En las hojas Sc los censos de primavera y verano no difieren y presentan menor densidad de micelio que las de otoño e invierno, que son significativamente diferentes entre sí y de las anteriores.

Comparando la densidad de micelio en los diferentes tipos de hojas de cada estación del año, vemos que en el muestreo de otoño la densidad aumenta significativamente con la edad de la hoja. En el invierno la tendencia es similar si bien las hojas M y Sn no difieren estadísticamente. En las otras dos estaciones la densidad en los distintos tipos de hojas, o bien no difiere estadísticamente

(verano), o no presenta la tendencia mencionada (primavera).

No se observaron diferencias de densidad entre la cara adaxial y abaxial de la hoja. Por esa razón los datos se presentan sin discriminar. La superfi-

Tabla 3.-- Análisis de varianza de la densidad de micelio fúngico en el filoplano de *E. viminalis*

Fuente	GL	F	P
Tipo de hoja	2	17.6560	0.0000
Estación	3	23.4410	0.0000
Tipo x Estación	6	5.707	0.0000

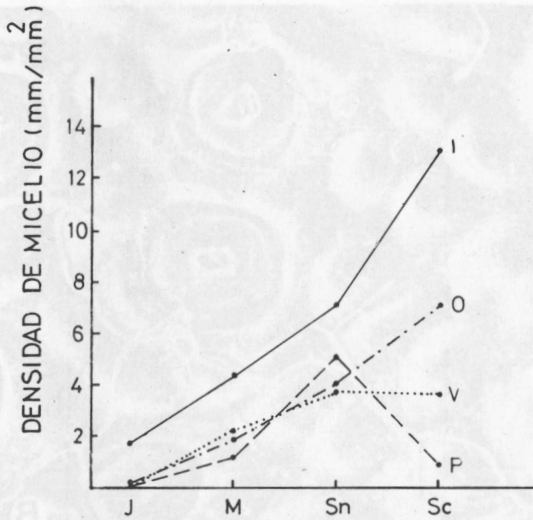


Fig. 6.-- Valores medios de densidad de micelio en el filopiano medidos por medio de fotografías con M.E.B., en las 4 estaciones del año y tipos de hoja.

cie de la hoja es glabra y su cutícula prácticamente lisa. La mayor concentración de micelio se localiza en las áreas entre nervaduras (cfr. Figs. 7 A, B y C con D), muchas veces concentrado en las depresiones del borde de los estomas (Fig. 7 C).

Análisis de los espectros de estrategia

En los diagramas de la Fig. 8 se representa la estructura de la comunidad en términos de estrate-

Tabla 4.-- Comparación de medias de densidad de micelio fúngico en el filopiano de *E. viminalis*. Las líneas unen las estaciones del año o tipo de hoja cuyas medias no difieren estadísticamente. Están ordenados de izquierda a derecha en función de los valores crecientes de densidad de micelio de sus medias. ($P < 0,005$)

	Tipo de hoja			
	P	O	V	I
Madura	P	O	V	I
Senescente	V	O	P	I
Seca	P	V	O	I

	Estación del año		
	M	Sn	Sc
Invierno	M	Sn	Sc
Primavera	Sc	M	Sn
Verano	M	Sc	Sn
Otoño	M	Sn	Sc

gia, para los diferentes tipos de hoja y estaciones del año.

Los valores más altos corresponden, en términos generales, al componente Ri de la comunidad, seguido por el Re. Con pocas excepciones, los organismos con estrategia Ru contribuyen con bajos valores de frecuencia a la estructura de la comunidad en sus diferentes estados.

Los Re y Ri se corresponden exactamente con la estrategias endofila y epifila, respectivamente, por tal razón en este esquema de estrategias no existe ningún componente con las combinaciones: epifito Re o endofito Ri. Los Ru están representados en ambas estrategias, aunque con preeminencia de epifilos. Debido a esta correspondencia, las variaciones estacionales y con el tipo de hoja se corresponden con los análisis previos de las dos subcomunidades. En otoño e invierno se alcanzan los valores más altos de frecuencia de los organismos pertenecientes a las diferentes combinaciones de estrategia de vida. Pero mientras en otoño el aumento general está dado por los valores alcanzados por los organismos con estrategia Ri o epifilos, en invierno disminuyen, pero aumentan los valores alcanzados por los Re o endofilos.

Las variaciones en función del tipo de hoja presentan como característica más sobresaliente el aumento de Re en las hojas maduras y senescentes, y el brusco aumento de los Ri en las hojas secas, acompañado por una disminución de los Re.

Las hojas jóvenes presentan marcadas diferencias en su estructura en función de las estrategias de vida, en las tres estaciones analizadas. Mientras en primavera se registra el mayor valor de Ru de todo el análisis, en verano y otoño es mínimo. Por otra parte, en esta última estación es donde se registran los valores más altos de Ri.

DISCUSION

La clasificación y ordenamiento de datos se utiliza ampliamente en estudios fitosociológicos pero se aplica en menor medida en descripciones de comunidades fúngicas. Los trabajos de López, 1983, 1988 y Blumenfeld, 1986, son algunos ejemplos de su aplicación en micosociología realizados en nuestro país. Los resultados de la aplicación de estas técnicas a los datos de frecuencia de especies presentado en este trabajo, confirman las observaciones a nivel poblacional del trabajo previo (Cabral, 1985). La subcomunidad del filopiano sufre variaciones de su estructura en concordancia con los factores climáticos, en tanto que la subcomunidad del endofilo es más dependiente del tipo de hoja. No obstante, el estudio de la densidad de micelio indica que este último factor también tiene

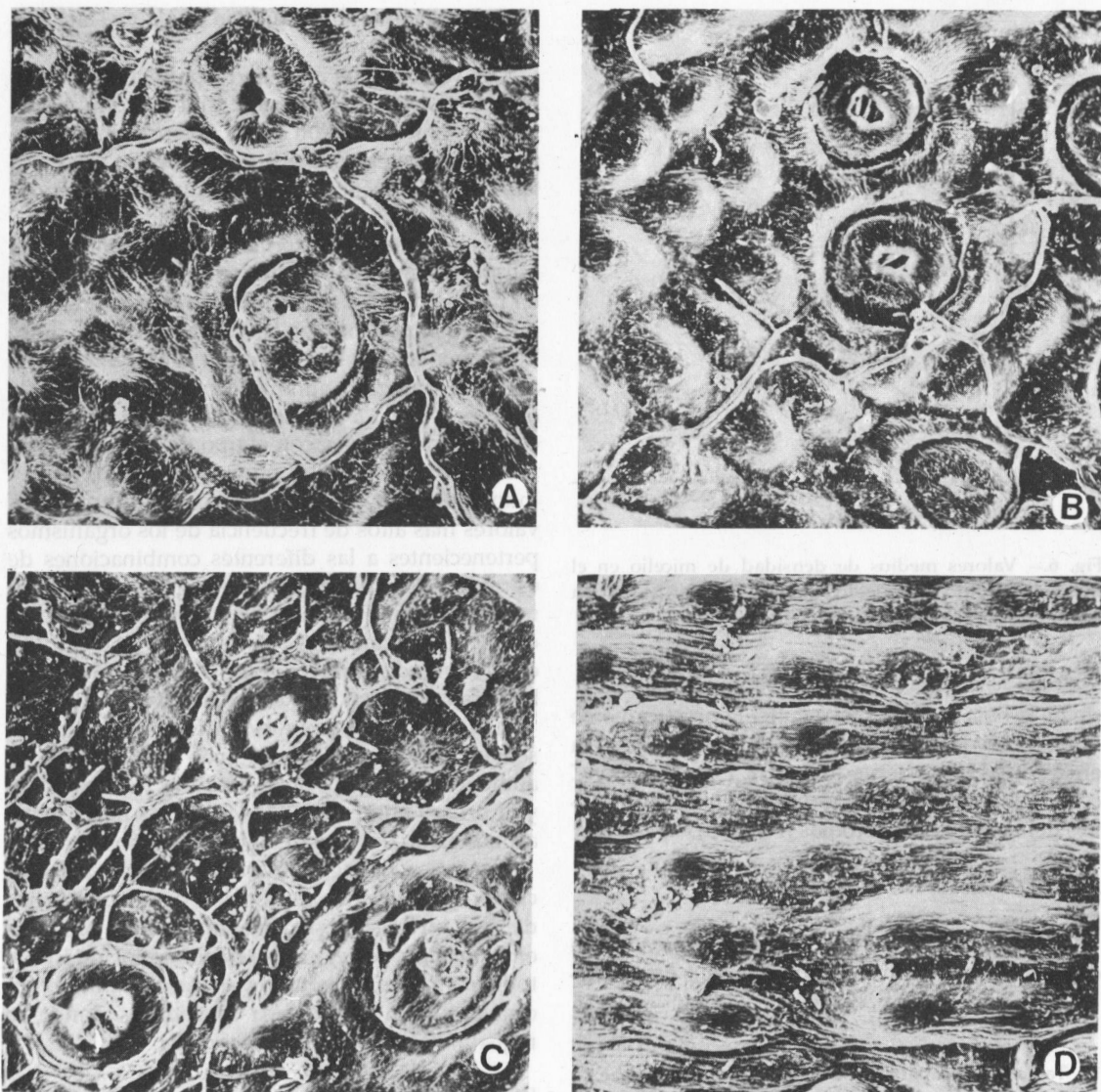


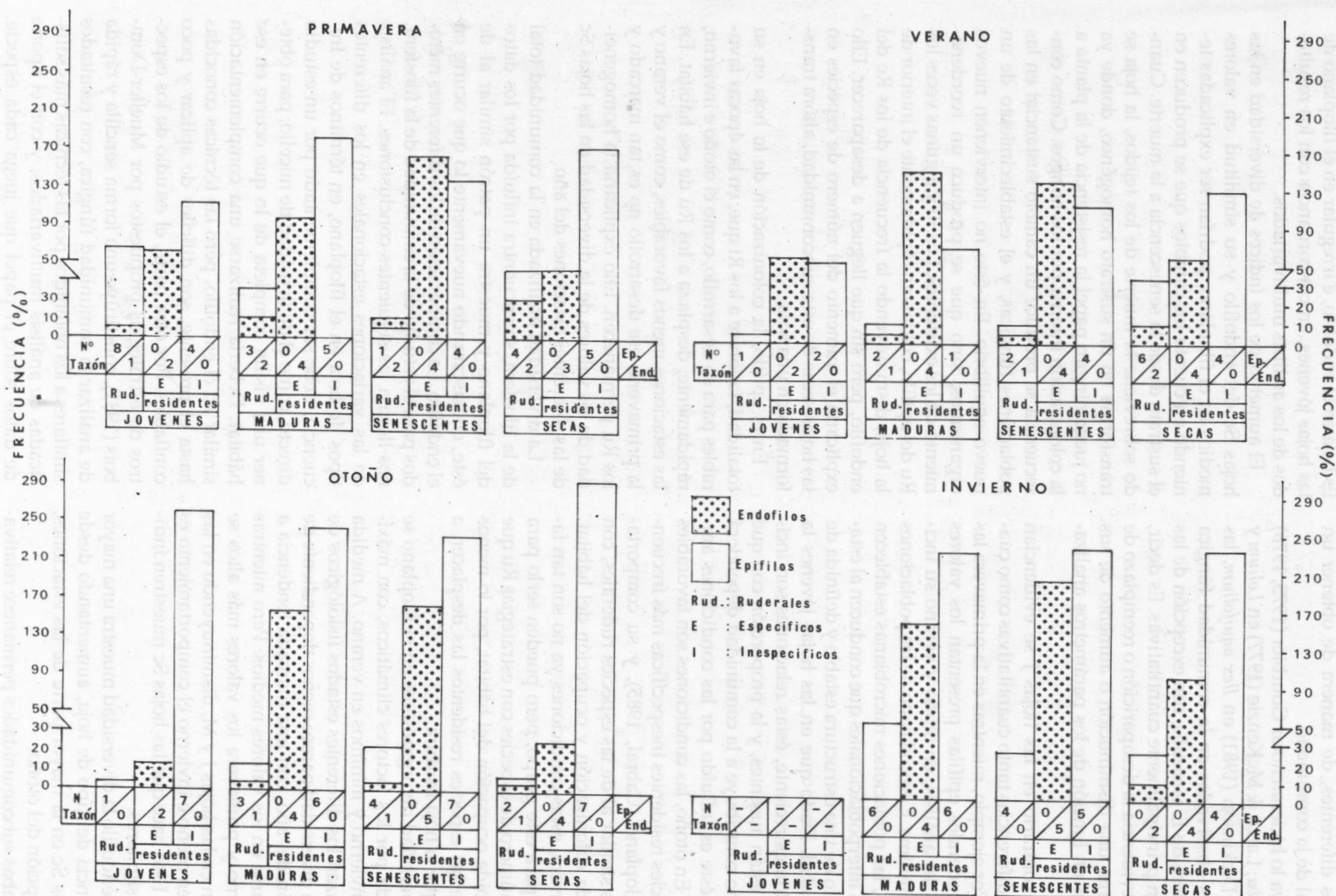
Fig. 7.-- Fotografías con MEB de la superficie de la hoja. A: hoja madura, cara adaxial, 1200 X. B: hoja senescente, cara adaxial, 1200 X. C: hoja seca, cara abaxial, 1200 X. Las hifas se disponen preferentemente en la depresión del estoma. D: hoja senescente, cara adaxial sobre vena principal.

importancia en la estructura y desarrollo de la subcomunidad del filoplano.

El análisis de la comunidad de la filosfera muestra una dependencia casi exclusiva de los factores climáticos. Es decir, que en un análisis global de la comunidad queda enmascarada la dependencia del tipo de hoja que tiene la subcomunidad del endofilo. Por lo tanto, se justifica el análisis por separado de ambas comunidades si se quiere cono-

cer con detalle y profundidad el funcionamiento de la comunidad.

Por lo señalado anteriormente podemos concluir que, la elección de un análisis global o por separado de las subcomunidades que integran la filosfera, dependerá de los objetivos del trabajo que se encare. Pero que, en cualquiera de los casos, es necesario confrontar los resultados obtenidos a partir de diferentes técnicas y de la medición de



parámetros diferentes, de manera de obtener un cuadro real de la comunidad.

Como ya lo hicieron notar Gournier (1975, 1976) en *Abies alba*; Latch & McKenzie (1977) en *Lolium* y Mishra & Dickinson (1981) en *Ilex aquifolium*, las variaciones observadas en la comunidad fúngica de la filosfera de *E. viminalis*, con excepción de las hojas J, son principalmente cuantitativas. Es decir, que no se evidencia la desaparición o reemplazo de especies sino una disminución o aumento de sus frecuencias en función de los parámetros analizados.

Por el contrario en las hojas J se evidencian marcadas diferencias tanto cuantitativas como cualitativas. Por ejemplo, mientras en la primavera las especies ruderales epifilas presentan los valores más altos del análisis, en otoño y verano su incidencia es mínima. Como el resto de las poblaciones biológicas, las poblaciones microbianas establecen relaciones interpopulacionales que conducen al establecimiento de una estructura estable y definida de la comunidad. Dado que en las hojas jóvenes la colonización es reciente, estas relaciones son incipientes o están ausentes, y la proporción con que cada grupo contribuye a la comunidad dependerá de como éste es influido por las condiciones ambientales. En otoño, las condiciones son favorables a las especies residentes inespecíficas más frecuentes del filoplano (Cabral, 1985), y su comportamiento es similar al de las especies ruderales, con una rápida colonización y ocupación del hábitat. En primavera, estas condiciones ya no son tan favorables para este grupo, pero pueden serlo para un gran número de especies con estrategias Ru que hacen rápida ocupación del hábitat, por lo menos hasta que las especies residentes las desplacen a medida que la hoja madura.

La diversidad de organismos en el filoplano se ve influida por los factores climáticos, con máximos en invierno y mínimos en verano. A medida que avanzan los diferentes estados fisiológicos de la hoja, la diversidad parece menos dependiente de la estación del año, con una marcada tendencia a estabilizarse en los valores medios. Pero mientras en invierno y primavera los valores más altos se presentan en las hojas J y M, disminuyendo en las Sn y Sc, en otoño e invierno el comportamiento es opuesto. Esto hace que las hojas Sc muestren índices muy similares.

En el endofilo la diversidad muestra una mayor dependencia del tipo de hoja, aumentando desde las J a las Sc en la mayor parte de las estaciones, con excepción del otoño.

En ambas subcomunidades permanece relativamente estable en las hojas maduras y senescentes.

Es baja en el endofilo, e irregular en el filoplano de las hojas jóvenes, en concordancia con los resultados de los análisis multivariados.

El aumento de los índices de diversidad en las hojas Sc del endofilo y su similitud en valores medios en el filoplano, podrían ser explicadas teniendo en cuenta los cambios que se producen en el sustrato desde la senescencia a la muerte. Cuando sobreviene la muerte de los tejidos, la hoja se transforma en un sustrato homogéneo, donde ya no juega ningún papel la resistencia de la planta a la colonización interna por los hongos. Como consecuencia se produce un cambio sustancial en las poblaciones fúngicas, y el establecimiento de un nuevo equilibrio. En éste no intervienen nuevos organismos, sino que se produce un reordenamiento de los existentes. Los Ri y algunas veces los Ru del epifilo, colonizan rápidamente el interior de la hoja, disminuyendo la frecuencia de los Re del endofilo, pero sin que lleguen a desaparecer. Ello explicaría el aumento del número de especies en las hojas secas de esta subcomunidad, ahora transformada en una sola.

En el epifilo, la colonización de la hoja en su totalidad, favorece a los Ri que, en las épocas favorables para su desarrollo, como el otoño e invierno, rápidamente, desplaza a los Ru de ese hábitat. En las estaciones menos favorables, como el verano y la primavera, ese desarrollo no es tan marcado y los Ru permanecen. Ello explicaría la homogeneidad de los valores de la diversidad en las hojas Sc de las diferentes estaciones del año.

La diversidad analizada en la comunidad total de la filosfera, se encuentra influida por los datos del filoplano y muestra un patrón similar al de éste, enmascarando nuevamente lo que ocurre en el endofilo. La comparación de los diferentes métodos para el estudio de la comunidad de la filosfera, nos lleva a las siguientes conclusiones. El análisis de las variaciones estacionales en los diferentes tipos de hoja en el filoplano, en términos de frecuencia, debe ser complementado por un estudio directo, como el de densidad de micelio, para obtener una visión completa de lo que ocurre en ese hábitat. Debería realizarse una complementación similar en el endofilo, pero las técnicas conocidas hasta el presente, son difíciles de aplicar y poco confiables. Por otra parte, el estudio de los espectros de estrategias propuestos por Mueller-Dombois (1981), constituye una forma sencilla y rápida de analizar la comunidad fúngica, con resultados similares a los obtenidos por las técnicas más sofisticadas de análisis multivariados, y con el aporte de datos sobre el papel que juega cada especie. Estas ventajas lo transforman en una herramienta

particularmente útil para el estudio de este tipo de comunidades.

A diferencia de lo que ocurre en otros vegetales (Pugh y Buckley, 1971; Breeze y Dix, 1981), no se encontraron diferencias en cuanto a los valores de densidad de micelio en el filoplane de las caras adaxial y abaxial de las hojas. Este resultado podría estar relacionado con la semejanza morfológica entre ambas superficies foliares. En otros casos, la presencia de rugosidades, verrugas, tricomas u otras estructuras en alguna de las dos caras, generalmente la abaxial, parece ser uno de los factores que incide sobre la mayor densidad de micelio en esa cara de la hoja (Last y Warren, 1972; Dickinson, 1976; Baker *et al.*, 1979). Otro factor podría ser la posición de la hoja. En *E. viminalis* ésta se dispone en forma lateral en lugar de dorsiventral, por lo tanto las dos caras no presentan diferencias en cuanto a la incidencia de algunos de los factores climáticos más importantes para el desarrollo del micelio como la lluvia, rocío, temperatura e irradiación solar entre otros.

La técnica de MEB nos permitió también observar las características de la distribución del micelio sobre la superficie de la hoja. Pesante (1963), Friend (1965), Dickinson (1967) y Pugh y Buckley (1971), señalan que la mayor concentración de organismos epífilos se encuentra sobre las nervaduras principales de la hoja. En nuestro estudio, el micelio está prácticamente ausente en las nervaduras y se localiza en las áreas entre nervaduras, en coincidencia con las observaciones de Baker *et al.* (1979).

CONCLUSIONES

La comunidad fúngica de la filosfera de *E. viminalis* se ve afectada por ambos factores analizados, estación del año y tipo de hoja. El invierno se presenta como la estación más favorable para el desarrollo fúngico donde se registran los valores más altos de frecuencia acumulada, densidad y diversidad. El verano como el más desfavorable, con una marcada tendencia a la disminución de esos valores. Las especies del filoplane son las que más contribuyen a esta tendencia, en tanto que las del endofilo sufren cambios menores.

En términos generales los valores de frecuencia y densidad de micelio aumentan en función del tipo de hoja, desde las hojas jóvenes a las muertas en el árbol. La diversidad, sin embargo, sufre una disminución en este último tipo de hoja. A estos cambios contribuyen en mayor medida los hongos del endofilo.

Es evidente una relación estrecha con los factores climáticos que imperan en el área de estudio.

Las condiciones de alta humedad relativa y temperaturas benignas del invierno y otoño, parecen ser las más apropiadas para el desarrollo de los hongos de la filosfera de *E. viminalis*.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor quiere expresar su profundo agradecimiento al Dr. J. E. Wright por su constante e incansable apoyo y guía, pero, sobre todo, por su capacidad por transmitir su propio entusiasmo por la micología. A la firma FILASTO S.A. y en particular a los Ings. Agr. W. Barret y J. Spinetto por facilitarnos el acceso a las plantaciones donde se realizaron los muestreos. Al Director de la Estación Experimental del INTA de San Pedro, Ing. Ag. M. Lozada, por facilitarnos los datos meteorológicos. A la Lic. Beatriz Gonzalez, FCEyN, UBA, por la realización del análisis de varianza.

BIBLIOGRAFIA

- BAKER, G. E., P. H. DUNN & W. S. SAKAI. 1979. Fungus communities associated with leaf surfaces of endemic vascular plants in Hawaii. *Mycologia*, 71: 272-292.
- BENZECL, J. P. 1976. *L'analyse des données. II-L'analyse des correspondances*. Dunod. (Ed.), Paris. 616 p.
- BREEZE, E. M. & N. J. DIX. 1981. Seasonal analysis of the fungal community on *Acer platanoides* leaves. *Trans. Br. mycol. Soc.* 77 (2): 321-328.
- BLAKEMAN, J. P. & N. J. FOKKEMA. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Ann. Rev. Phytopathol.* 20: 167-192.
- BLUMENFELD, S. N. 1986. Estudio ecológico de Basidiomycetes xilófilos en plantaciones de *Pinus elliotii* y *Pinus taeda* de la Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 24 (3-4): 261-281.
- CABRAL, D. 1985. Phyllosphere of *Eucalyptus viminalis*: Dynamics of Fungal Populations. *Trans. Br. mycol. Soc.* 85 (3): 501-511.
- CARROLL, G. C. 1986. The biology of the endophytism in plants with particular reference to woody perennials. En: *Microbiology of the Phyllosphere*. Fokkema, N. J. & J. van Heuvel (Eds.). Cambridge, University Press. Cambridge.
- 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69 (1): 1-9.
- E. M. MULLER & B. C. SUTTON. 1977. Preliminary studies on the incidence of needles endophytes in some European conifer. *Sydowia* 29: 87-103.
- & F. E. CARROLL. 1978. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. *Canad. J. Bot.* 56: 3034-3043.
- CLAY, K. 1986. Grass endophytes. En: *Microbiology of the Phyllosphere*. N. J. Fokkema & J. van Heuvel (Eds.). Cambridge University Press. Cambridge.
- 1988. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* 69 (1): 10-16.
- CLIFFORD, H. T. & W. STEPHENSON. 1975. *An Introduction to Numerical Classification*. Academic Press, New

- York.
- DICKINSON, C. H. 1967. Fungal colonization of *Pisum* leaves. *Canad. J. Bot.* 45: 915-927.
- 1976. Fungi on the aerial surfaces of higher plants. En: *Microbiology of Aerial Plant Surfaces*. Dickinson, C. H. & T. F. Preece (Eds.). Academic Press. London. 669 p.
- FRIENDS, R. J. 1965. A study of sooty mould on lime tree (*Tilia vulgaris*). *Trans. Br. Mycol. Soc.* 48 (3): 367-370.
- GALLAGHER, R. T., E. P. WHITE & P. H. MORTIMER. 1981. Ryegrass staggers isolations of potent neurotoxins lolitrem A and lolitrem B from staggers-producing pastures. *New Zealand Veterinary Journal* 29: 189-190.
- GOURBIER, F. 1974. Les champignons microscopiques liés aux aiguilles de sapin (*Abies alba* Mill.). I-Premiers resultats. *Bull. Soc. Mycol. Fr.* 90: 89-96.
- 1975. Les champignon microscopiques liés aux aiguilles de sapin (*Abies alba*). III-Microflore des aiguilles vivantes. *Bull. Soc. Mycol. Fr.* 91: 429-441.
- JACOBS, M. J., W. M. BUGBEE & D. A. GABRIELSON. 1985. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. *Canad. J. Bot.* 63: 1262-1265.
- KERLING, L. C. P. 1958. De microflora ap het van *Beta vulgaris*. *Tijdschr. Plantenziekten* 64: 402-410.
- LAST, F. T. 1955. Seasonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves. *Trans. Br. mycol. Soc.* 38: 221-239.
- & R. C. WARREN, 1972. Microbios no parásitos colonizadores de hojas vivas: su forma y funciones. *Endeavour* 31: 143-150.
- LATCH, G. C. M. & E. H. Mc KENZIE. 1977. Fungal flora of ryegrass swards in Wales. *Trans. Br. mycol. Soc.* 68 (2): 181-184.
- LEBEN, C. 1965. Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. *Annual Review of Phytopathology* 3: 209-230.
- LOPEZ, S. E. 1983. Sucesión fúngica en madera de *Eucalyptus viminalis* (Myrtaceae). I. Basidiomycetes sobre árbol vivo y troncos en estiba. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 22 (1-4): 21-39.
- 1988. Sucesión fúngica en madera de *Eucalyptus viminalis* (Myrtaceae). II. Basidiomycetes sobre tocones. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 25 (3-4): 425-448.
- MISHRA, R. R. & C. H. DICKINSON. 1981. Phylloplane and litter fungi of *Ilex aquifolium*. *Trans. Br. mycol. Soc.* 77 (2): 329-337.
- MUELLER-DOMBOIS, D. 1981. Ecological Measurements and Microbial Populations. En: *The Fungal Community*. Wicklow, D. T. & G. C. Carroll. (Eds.) Marcel Dekker, Inc. New York, Basel.
- PESANTE, A. 1963. Considerazione sa una fumagine d'aspetto inconsueto. *Boll. Lab. Spar. Oss. Fitopatol.* 26 (2): 19-26.
- PORTER, J. K., C. W. BACAN & J. D. ROBBINS. 1979. Ergosine, ergosinine and chanoclavine I from *Epichloe typhina*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 27: 595-598.
- PUGH, G. J. F. 1980. Strategies in fungal ecology. *Trans. Br. mycol. Soc.* 75 (1): 1-14.
- & N. G. BUCKLEY. 1971. The leaf surface as a substrate for colonization by fungi. En: *Ecology of Leaf Surface Micro-organisms*. Preece, T. F. & C. H. Dickinson (Eds.). Academic Press, London. 640 p.
- RUINEN, J. 1956. Occurrence of *Beijerinckia* species in the "phyllosphere". *Nature* (London) 177: 220.
- 1961. The Phyllosphere. I-An ecological neglected milieu. *Plant and Soil* XV (2): 81-109.
- SOKAL, R. R. & P. A. SNEATH. 1963. *Principles of Numerical Taxonomy*. W. H. Freeman and Co. San Francisco. 338 p.
- WHITTAKER, R. H. 1975. *Communities and Ecosystems*. Mac Millan. New York.
- WINER, B. J. 1971. *Statistical Principles in Experimental Design*. McGraw-Hill Book Company, New York.