



Endofitos fúngicos en *Juncus imbricatus* var *chamissonis*: identificación de los patrones de colonización

Ana Menéndez, María Delia Bertoni y Daniel Cabral

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Resumen

Se describen los patrones de colonización de las especies endofíticas más frecuentes en hojas y tallos de *Juncus imbricatus* var *chamissonis* (perenne), utilizando microscopía óptica, previa clarificación y tinción del material vegetal. La especie fúngica más frecuente fue *Pleospora* aff *togwotiensis*. Este endofito inicialmente ocupa la cámara subestomática, extendiéndose luego entre las células del mesofilo. En un segundo patrón, la colonización se restringe a células epidérmicas aisladas, con características similares a las de otros endofitos fúngicos encontrados en *Juncus effusus* var *pacificus*, *Pseudotsuga menziesii* y *Fagus sylvatica*. Se describe un tercer patrón de colonización donde el micelio se restringe a la cámara subestomática.

Palabras clave

Endofitos, *Juncus*, *Pleospora* aff *togwotiensis*, Patrones de colonización

Fungal endophytes in *Juncus imbricatus* var *chamissonis*: identification of colonization patterns

Summary

Colonization patterns corresponding to individual endophytic species were observed in asymptomatic leaves and culms of *Juncus imbricatus* var *chamissonis*, a perennial plant. The presence of the fungi within the host was demonstrated by light microscopy after the cleaning and staining of tissues. The main endophytic species, *Pleospora* aff *togwotiensis*, was found colonizing the substomatal chamber and growing intercellularly between mesophyll cells. In a second colonization pattern, an unknown fungus was restricted to a single host epidermal cell, showing similar characteristics to other fungal taxa observed on *Juncus effusus* var *pacificus*, *Pseudotsuga menziesii* and *Fagus sylvatica*. A third colonization pattern, where the mycelium is confined to the substomatal chamber, was also described.

Key words

Endophytes, *Juncus*, *Pleospora* aff *togwotiensis*, Colonization patterns

El término endófito define, en un sentido amplio, a todos aquellos organismos que viven dentro de otros organismos [1]. Sin embargo, se utiliza comúnmente para aquellos hongos que viven asintóticamente dentro de una planta hospedante [2,3] y establecen con ella una asociación de tipo mutualista, basada en la adquisición, por parte de las plantas, de mecanismos químicos de defensa contra el ataque de herbívoros [4-7]. A cambio de esto el hongo obtendría nutrientes y protección dentro de los tejidos vegetales.

Estas asociaciones mutualistas entre hongos y estructuras fotosintéticas fueron denominadas por Lewis [8] "micófilas" como un equivalente del término "micorrizas".

La técnica más usual para evidenciar la presencia de endófitos es la esterilización superficial del tejido

vegetal y la posterior siembra en un medio de cultivo adecuado [9,10]. Mediante este procedimiento es posible conocer la composición de especies y su distribución entre los distintos órganos de la planta, pero es insuficiente para caracterizar el tipo de relación existente entre cada endofito y su hospedante. Para ello son necesarios datos adicionales acerca de las características ecológicas del hongo, la producción de metabolitos tóxicos, el desarrollo y grado de extensión de las colonizaciones, así como también de los mecanismos relacionados con la penetración de los tejidos.

El patrón de colonización de los endofitos ha sido estudiado en sistemas típicos tales como *Acremonium-Lolium* y *Acremonium-Festuca* [11,12], o *Rhizoctonia parkeri* Sherw.-*Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco [13]. En 1993, Cabral y cols. [3] describieron los patrones de colonización y la distribución de los endofitos más frecuentemente hallados en especies del género *Juncus* del hemisferio norte.

En un estudio sobre la composición de la comunidad fúngica endofítica en tres especies de *Juncus* del hemisferio sur [14], se encontró que los dos hospedantes perennes estudiados presentaban pocas especies endofíticas en alta frecuencia, mientras que el anual contenía una gran variedad de especies y con frecuencias muy bajas. Las especies endofíticas más frecuentemente encontradas

Dirección para correspondencia:

Dra. Ana Menéndez
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la
Universidad de Buenos Aires, Departamento de
Ciencias Biológicas, 4º piso, Pab. II, Ciudad
Universitaria (1428), Cap. Fed. Argentina
Fax: +541 864 2525
E-mail: anamen@bg.fcen.uba.ar

Aceptado para publicación el 24 de abril de 1996

en el hospedante perenne *J. imbricatus* Laharpe var *chamissonis* (Kunth) Buch. fueron: *Pleospora* aff. *togwotiensis* Wehm., *Alternaria* spp, *Coniochaeta* spp y *Stagonospora* spp [14]. En el presente estudio se procedió a localizar y caracterizar morfológicamente los mecanismos de penetración y los patrones de colonización más frecuentes en dicho hospedante. Se intentó asimismo asignar taxonómicamente dichos patrones a algunas de las especies endofíticas mencionadas anteriormente.

MATERIALES Y MÉTODOS

El muestreo se realizó tomando al azar 10 ejemplares de *Juncus imbricatus* var *chamissonis* de una población ubicada en los alrededores del Pabellón II de la Ciudad Universitaria de la UBA (Buenos Aires, Argentina), en agosto de 1986. Esta población es la misma que aquella donde se realizó el muestreo para el trabajo citado con anterioridad [14].

Para estudiar los diferentes patrones de colonización se practicaron cortes superficiales a mano alzada en forma tangencial a hojas y tallos, utilizando una hoja de afeitar. Los segmentos de parénquima y epidermis obtenidos, de aproximadamente 1 x 0,3 cm, se clarificaron por ebullición en lactofenol-etanol (1:2 v/v) durante 10 a 15 min y se dejaron en reposo toda la noche a temperatura

ambiente [15]. Una parte de los segmentos clarificados fueron teñidos con azul de Tripán en lactofenol 0,05% durante 45 min en estufa a 60°C [16], el resto se teñió con fucsina ácida verde de malaquita [17] y se flameó o se dejó reposar 24 h. El exceso de colorante se eliminó pasando los segmentos teñidos por lactofenol. Este material fue montado en lactofenol para su observación directa en el microscopio óptico. Los endofitos fueron fotografiados en un microscopio Nikon Microphot-FX (Japón).

Segmentos del hospedante, que presentaban alta proporción de un tipo determinado de colonización, fueron esterilizados superficialmente en una secuencia de alcohol 50% durante 1 min; NaOCl (80g/dm³)-H₂O, 2:1 de 3 a 5 min; alcohol 50% 1 min. Se incubaron en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 15 días con observaciones diarias. Los micelios y/o estructuras de reproducción obtenidos fueron identificados *in situ*.

RESULTADOS

Se hallaron básicamente tres patrones de colonización diferentes, dos intercelulares (A y C) y uno intracelular (B).

Denominamos A al patrón más frecuente. El endofito inicia su penetración a partir de la germinación de una espora multicelular (Figura 1A). La hifa germinativa

crece en forma aparentemente errática hasta introducirse por el poro estomático y penetrar en la cámara subestomática. Varias esporas pueden penetrar un mismo estoma (Figura 1B); todas las células de la espora pueden germinar aunque no lo hacen al mismo tiempo e incluso dos hifas germinativas de una espora pueden penetrar por un mismo estoma (Figura 1C). Una vez allí, la hifa se divide para dar células globosas, redondeadas, presentando el aspecto de un collar (Figuras 1D y 1E) y con frecuencia llenando toda la cámara subestomática. Las células distales se adelgazan y comienzan a crecer intercelularmente en el mesófilo (Figura 1F). Una vez completada la germinación, la espora queda vacía.

Un segundo patrón de colonización, al que denominamos de tipo B, se presentó con una frecuencia menor a la del tipo A. En este caso el endofito es intracelular y se restringe al interior de una única célula epidérmica. La penetración se manifiesta por la presencia, en la pared externa de las células epidérmicas del hospedante, de un poro y un canal de penetración. Este último se conecta con una célula fúngica globosa o vesicular en el interior de la célula (Figuras 2A y 3A). A partir de ésta se desarrolla una hifa formada por células delgadas y cilíndricas (Figuras 2C y 3C). Estas estructuras fúngicas intracelulares toman una coloración azul de Tripán. En la mayoría de los casos, las células epidérmicas aparecen necróticas, con el orificio de penetración rodeado de una zona anular más densa (papila), sin que se observe desarrollo de hifas

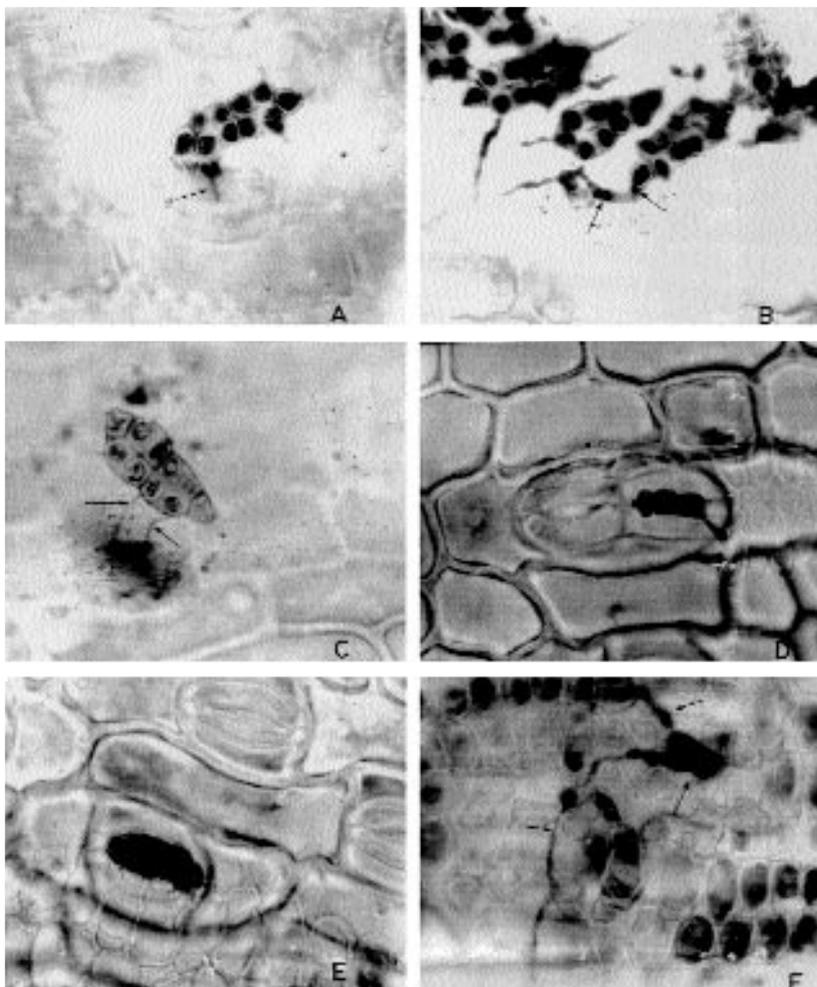


Figura 1. Patrón de colonización A. A: inicio de la penetración de un estoma por la hifa germinativa de una ascospora. Hifa germinativa (a) atravesando el ostiolo; B y C: ascosporas germinando sobre un estoma. Las flechas señalan hifas germinativas penetrando por el ostiolo; D: micelio de cuatro células alojado en la cámara subestomática; E: micelio en forma de collar, constituido por cinco células globosas; F: micelio fúngico creciendo intercelularmente en el parénquima (1000X).

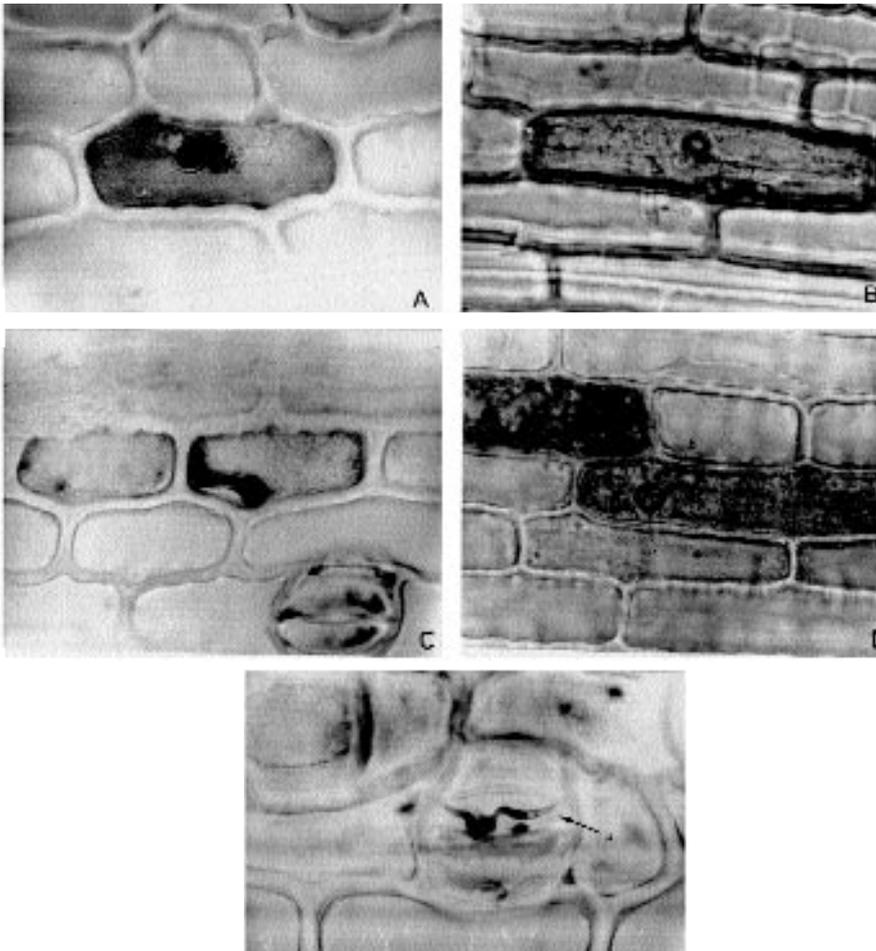


Figura 2. A-D, patrón de colonización B. A: célula epidérmica con dos orificios de penetración; B: desarrollo de micelio en el interior de una célula epidérmica. La pared celular se observa más oscura con respecto a las vecinas y el micelio no se ha teñido; C: célula epidérmica colonizada; D: célula epidérmica mostrando una colonización no exitosa. a: orificio de penetración, b: papila. Obsérvese la tonalidad más oscura de esta célula y de la superior izquierda; E: patrón de colonización C, hifas en el interior de la cámara subestomática (a) (1000X).

intracelulares (Figura 2D). No obstante, algunas células con papilas presentaron micelio en su interior (Figura 3B), aunque éste no se tiñó con azul de Tripán (Figura 2B).

Un tercer patrón de colonización, con una frecuencia inferior a los anteriores, fue denominado patrón C (Figura 2E). En este caso, el endofito presenta un desarrollo restringido a la cámara subestomática. Las hifas son delgadas, con células cilíndricas, y se diferencian del tipo A porque no llenan la cámara subestomática, no adquieren forma de collar y su desarrollo no se extiende intercelularmente hacia el mesófilo.

Los segmentos de tallo y hoja con una alta proporción de infecciones de tipo A, cultivados en cámara húmeda, desarrollaron ascomas de *Pleospora* aff *togwotiensis*. Por otra parte, en los segmentos con el patrón C de colonización se observaron surgiendo de los ostíolos de los estomas, conidióforos y conidios característicos del género *Alternaria*. Por último, en el material con el patrón B de colonización no se registró crecimiento fúngico alguno.

DISCUSIÓN

Los resultados parecerían indicar que el patrón A de colonización corresponde a la especie *Pleospora* aff *togwotiensis*, dado que primero se observaron esporas germinando sobre la superficie de la hoja que coinciden morfológicamente con las ascosporas de la especie mencionada; segundo, de los segmentos del hospedante cultivados en cámara húmeda desarrollaron ascomas correspondientes a esta especie. Por otra parte, esta especie fue la más frecuentemente aislada de *J. imbricatus* var *chamissonis* [14].

No fue posible identificar con precisión la especie que coloniza intracelularmente las células epidérmicas del hospedante, cuyo patrón denominamos B. Sin embargo, podríamos asociarlo con el género *Stagonospora*, ya que éste fue aislado del mismo hospedante [14] y su patrón de colonización es similar al hallado en *J. effusus* L. var *pacificus* Fern. & Wieg. (perenne), cuyo agente causal es *Stagonospora innumerosa* Sacc. [3]. En ambos casos se observa la presencia de papilas, orificios de penetración y colonizaciones abortadas y, cuando exitosas, confinadas a una única célula epidérmica. Este patrón de colonización es compartido por endofitos de especies arbóreas tales como *Rhabdocline parkeri* sobre *Pseudotsuga menziesii* [13], *Discula umbrinella* (Berk. et Broome Sutton) en *Fagus sylvatica* L. [18] y *D. quercina* (Westend.) Arx non (Cooke) Sacc., hom. illeg. sobre hojas de roble [19]. La similitud de los patrones entre los endofitos que producen colonizaciones intracelulares localizadas permite suponer que representan un grupo ecológica y fisiológicamente diferenciado de los

endofitos intercelulares sistémicos, característicos de los pastos. La presencia de halos en la pared de las células y la formación de papilas es una característica de colonizaciones abortadas o no exitosas. Ride [20] observó dichas estructuras cuando hongos no patogénicos penetran en las células epidérmicas de hojas de trigo. Estas estructuras formarían parte de una reacción por parte de la planta destinada a retardar la colonización del hospedante hasta la senescencia de las hojas.

Finalmente, el patrón de colonización C podría estar asociado con *Alternaria* spp dado que los segmentos del hospedante, cultivados en cámara húmeda, desarrollaron estructuras de este género y sus características coinciden con la colonización de *Alternaria alternata* (Fr.: Fr) Keissl observada por O'Donnel y Dickinson [21] sobre *Phaseolus*, y por Cabral et al. [3] sobre *J. effusus* var *pacificus*. Según estos últimos, este patrón de colonización parecería corresponder al de hongos saprofitos de tipo oportunista, que suelen ser aislados con frecuencias relativamente altas, dada la protección contra la esteriliza-

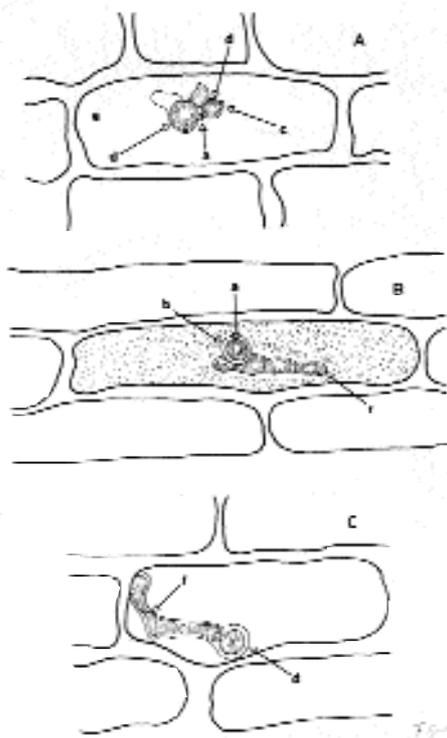


Figura 3. A, B y C: dibujos interpretativos de las figuras 2A, 2B y 2C, respectivamente. a: orificio de penetración; b: papila; c: canal que atraviesa la pared de la célula epidérmica; d: célula globosa o vesicular en el interior de la célula epidérmica; e: célula epidérmica; f: micelio fúngico en el interior de la célula epidérmica.

ción superficial que les provee su ubicación dentro de la cámara subestomática.

El hongo *Pleospora* aff *togwotiensis* parecería llenar algunos de los requisitos propuestos por Carroll [22] para ser considerado un endofito en simbiosis mutualista con *J. imbricatus* var *chamissonis* dado que: 1) su desarrollo es intercelular, no habiéndose observado células necróticas o dañadas en los lugares de infección sobre la epidermis, ni en su penetración entre las células del parénquima; 2) su transmisión sería de tipo "lateral", es decir, a través de esporas que se propagan por el viento o el agua y germinan sobre la superficie de la hoja penetrando a través de los estomas; 3) aparece con una frecuencia predominante sobre los demás endofitos y produce infecciones localizadas.

Carroll [22] ha señalado que, con frecuencia, los endofitos son especies que pertenecen al mismo género que otras especies de características patógenas, las cuales colonizan el mismo hospedante u hospedantes relacionados. Esta evidencia la utiliza además para sostener la teoría de que los endofitos han evolucionado a partir de hongos patógenos de plantas. Un ejemplo de esto son las especies *Lophodermium pinastri* (Schrad. ex Hook) Chevall. y *L. conigenum* Hiltzer, endofíticas de pinos, las cuales comparten el mismo género con el patógeno *Lophodermium seditiosum* Minter, Staley & Millar [23]. De la misma manera, dentro del género *Pleospora* encontramos especies patógenas [24] coexistiendo con especies con características de endofitos como *Pleospora* aff *togwotiensis*.

En nuestro caso, no podemos descartar la posibilidad de que *Pleospora* aff *togwotiensis* sea un patógeno en etapa de latencia. Estudios posteriores de tipo químico y ecológico sobre el género *Juncus* y sus endofitos podrán aportar datos que contribuyan a clarificar estos aspectos.

Agradecemos a la Dra. Susana Martínez sus valiosas sugerencias para la redacción del manuscrito. Este trabajo fue financiado con fondos del PRIHDE (publicación n° 59).

Bibliografía

- Wennström A. Endophyte-the misuse of an old term. *Oikos* 1994;71:535-536.
- Petrini O. Fungal endophyte of tree leaves. En Andrew JH, Hirano SS (Eds.) *Microbial ecology of leaves*. New York, Springer Verlag, 1991: 179-197.
- Cabral D, Stone JK, Carroll GC. The internal mycobiota of *Juncus* spp: microscopic and cultural observations of infections patterns. *Mycol Res* 1993;97:367-376.
- Carroll GC. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 1988;69:2-9
- Carroll GC. Fungal associates of woody plants as insect antagonists in leaves and stems. En: Barbosa P, Krischik VA, Jones CG (Eds.). *Microbial mediation of herbivore-plant interactions*. New York, John Wiley and Sons, 1991:253-271.
- White JF, Cole GT. Endophyte-host associations in forage grasses. III. *In vitro* inhibition of fungi by *Acremonium coenophialum*. *Mycologia* 1985;77:487-489.
- Clay K. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* 1988;69:10-16.
- Lewis DH. Evolutionary aspects of mutualistic associations between fungi and photosynthetic organisms. En: Rayner ADM, Brasier CM, Moore D (Eds.). *Evolutionary biology of the fungi*. Cambridge, Cambridge University Press, 1987:465.
- Fisher PJ, Punithaligam E. *Stagonospora pteridicola* sp. nov., a new endophytic coelomycete in *Pteridium aquilinum*. *Mycol Res* 1993;97:661-664.
- Petrini O, Fisher PJ. Occurrence of fungal endophytes in twigs of *Salix fragilis* and *Quercus robur*. *Mycol Res* 1990;94:1077-1080.
- Hinton DM, Bacon CW. The distribution and ultrastructure of the endophyte of toxic tall fescue. *Can J Bot* 1985;63:36-42.
- Siegel MR, Jarlfors V, Latch GCM, Johnson MC. Ultrastructure of *Acremonium coenophialum*, *Acremonium lolii* and *Epichloë typhina* endophytes in host and nonhost *Festuca* and *Lolium* species of grasses. *Can J Bot* 1987;65:2357-2367.
- Stone JK. Fine structure of latent infections by *Rhizoctonia parkeri* on Douglas-fir, with observations on uninfected epidermal cells. *Can J Bot* 1988;66:45-54.
- Menendez A, Bertoni MD, Cabral D. Comparative study of occurrence of fungal endophytes in *Juncus* species from Argentina. *Nova Hedwigia* 1995;60: 583-588
- Rohringer R, Kin WK, Samborski DJ, Howes NK. Calcofluor: an optical brightener for fluorescence microscopy of fungal parasite in leaves. *Phytopathology* 1977;67:808-810.
- Hayman DS. Endogone spore numbers in soil and vesicular-arbuscular mycorrhiza in wheat as influenced by season and soil treatment. *Trans Br Mycol Soc* 1970;54:53-63.
- Alexander MP. A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. *Stain Technol* 1980;50:13-18.
- Viret O. Infection of beech leaves by the endophyte *Discula umbrinella* (Berk. et Br.) Morelet (teleomorph: *Apiognomonium errabunda* (Rob.) Höhn.) and ultrastructural study. Dissertation ETH Zürich No.10073: Zürich, Switzerland, 1993.
- Wilson D. On endophyte-insect-plant interactions. Ph.D. Thesis, University of Oregon: Eugene, Oregon, USA, 1992.
- Ride JP. The effect of induced lignification on the resistance of wheat cell walls to fungal degradation. *Physiol Plant Path* 1980; 15:187-196.
- O'Donnell J, Dickinson CH. Pathogenicity of *Alternaria* and *Cladosporium* isolates on *Phaseolus*. *Trans Br Mycol Soc* 1980; 74:335-342.
- Carroll GC. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: Fokkema NJ, Van der Heuvel J (Eds.). *Microbiology of the Phyllosphere*. Cambridge, Cambridge University Press, 1986:205-222.
- Minter DW, Staley JM, Millar CS. Four species of *Lophodermium* on *Pinus sylvestris*. *Trans Br Mycol Soc* 1978;71:295-301.
- Farr DF, Bills GF, Chamuris GP, Rossman AY. *Fungi on plants and plant products in the United States*. St. Paul, Minnesota, The American Phytopathological Society, 1989:1252.