

# *Phyllosticta* spp, ENDÓFITAS Y PATÓGENAS DE NARANJO

## *Phyllosticta* spp, ENDOPHITES AND ORANGE PATHOGENS

Noemí del Valle Bejarano<sup>1\*</sup> y Leonor Carrillo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fitopatología. <sup>2</sup>Microbiología Agrícola. FCA UNJu. Alberdi 47. San Salvador de Jujuy. Jujuy. Argentina.

\*Autor para correspondencia:  
noemibejarano@fca.unju.edu.ar

Período de Publicación:  
Septiembre 2023

Historial:  
Recibido: 22/06/2023  
Aceptado: 24/08/2023

### RESUMEN

Las plantas suelen ser colonizadas endofíticamente por diversos hongos, algunos de ellos durante todo o parte de su ciclo de vida se encuentran en los tejidos vegetales, sin manifestarse de forma alguna. Se ha encontrado que en diversos hospedantes las especies fúngicas pueden comportarse como endófitas o patógenas según el tipo de interacción que establezcan con el hospedante o con otros microorganismos colonizadores de los tejidos vegetales. La interacción entre especies patógenas y endófitas puede ser de competencia o antagonismo debido a la producción de toxinas y metabolitos secundarios como se ha observado en especies de *Phyllosticta*. El objetivo del trabajo fue estudiar las interacciones entre las especies de *Phyllosticta* endófitas y patógenas que colonizan naturalmente las hojas de naranjo dulce en lotes comerciales de la provincia de Jujuy. Para ello en otoño se tomaron muestras de hojas asintomáticas correspondientes a la brotación más antigua se conservaron a 4°C hasta aislamiento y cultivo en laboratorio y muestras de frutos con síntomas de mancha negra. De las especies de *Phyllosticta* aisladas se realizaron repiques y obtención de cultivos monosporicos para determinaciones morfológicas, pruebas de patogenicidad, de competencia y análisis de polimorfismos de los fragmentos de restricción de la región ITS del ADNr. Se aisló como endófita, *P. capitalensis* y como patógena, *P. citricarpa*. En las pruebas de competencia realizadas entre las ellas se pudo determinar competencia, a favor de *P. capitalensis*.

**Palabras clave:** citrus, endófitos, hongos, interacciones

### SUMMARY

Plants are usually endophytically colonized by various fungi, some of which are found in plant tissues during all or part of their life cycle, without manifesting themselves in any way. It has been found that in

various hosts, fungal species can behave as endophytes or pathogens depending on the type of interaction they establish with the host or with other microorganisms that colonize plant tissues. The interaction between pathogenic and endophytic species can be of competition or antagonism due to the production of toxins and secondary metabolites, as has been observed in *Phyllosticta* species. The objective of the work was to study the interactions between endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species that naturally colonize sweet orange leaves in commercial orange tree plots in the province of Jujuy. For this purpose, in autumn, samples of asymptomatic leaves corresponding to the oldest sprouting and fruits with black spot symptoms were taken. Monosporic cultures were obtained from the *Phyllosticta* isolated for morphometric determinations, pathogenicity and competition tests and analysis of polymorphisms of the restriction fragments of the ITS region of the rDNA. *P. capitalensis*, was isolated as an endophyte and *P. citricarpa* as a pathogen. In the competition tests carried out between them, it was possible to determine competition, in favour of the endophyte strain.

**Keywords:** citrus, endophytes, fungi, interactions

## INTRODUCCIÓN

Los hongos endófitos durante todo o parte de su ciclo de vida se encuentran en los tejidos vegetales, sin manifestarse de forma alguna, estableciendo una relación mutualista en la cual la planta provee nutrientes y los hongos algún tipo de defensa contra patógenos, insectos o tolerancia a factores extremos (Abello & Kelemu, 2006; Sieber, 2007, Yan et al, 2019).

La composición de la comunidad endofítica, varía en función del hospante y de las condiciones ambientales, se interrelacionan en un equilibrio armónico y la pérdida de ese equilibrio afecta el comportamiento de los integrantes de la comunidad, pueden establecerse entonces condiciones para que hongos oportunistas manifiesten su potencial patogénico (Rodríguez et al, 2009).

Las relaciones ecológicas que se establecen entre los endófitos fúngicos y sus hospedantes, pueden ser: simbiosis mutualista, antagonismo o pueden comportarse como patógenos débiles cuando la planta está debilitada. Sin embargo, se ha estudiado que los endófitos logran también ejercer muchos mecanismos ofensivos contra fitopatógenos de las plantas huésped, como, por ejemplo: inducción a resistencia, micoparasitismo, antibiosis y competición (Latz et al., 2018).

Los hongos endofíticos pueden ayudar a sus plantas hospedantes a adaptarse al estrés abiótico y promover el crecimiento de las mismas a través de la biosíntesis de hormonas vegetales y la adquisición de nutrientes (Mouza & Raizada., 2013).

Muchos de los estudios dirigidos a hongos endófitos y su potencial para control biológico, se han enfocado en las interacciones microbianas de estos hongos, que pueden desempeñar un papel importante en el inicio de la producción de metabolitos secundarios (Segaran & Sathiavelu, 2019; Caruso et al., 2020), algunos de los cuales inhiben la colonización de otros hongos fitopatógenos (Rojas et al., 2020).

La producción de metabolitos secundarios por parte de los hongos endófitos los convierte en una

fuerza biológica oculta de gran diversidad química, capaces de proporcionar recursos bioactivos inexplorados y candidatos para posibles aplicaciones de control biológico (De Silva et al., 2019; Ikram et al., 2019; Rana et al., 2019).

La biodiversidad de hongos endófitos presentes en una planta puede determinar interacciones de diferentes tipos, por la producción de toxinas y/o metabolitos secundarios, entre los hongos aislados como endófitos en hojas de cítricos se encuentran *G. mangiferae* y *Lasiodiplodia theobromae* (Bejarano et al., 2009) Muñoz Guerrero, J. (2021).

En cítricos también se informan como endófitos a *Xylaria* spp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria alternata*, *Nigrospora sphaerica*, *Nodulisporium* sp; *Sporomiella minima*, *Fusarium* sp. (Durán et al., 2005), *A. citri*; *A. tenuissima*, *Aspergillus* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium* sp; *Curvularia lunata*, *Fusicocum* spp.; *Microdochium* sp.; *Nigrospora oryzae*, *Penicillium digitatum*, *Ramichloridium* sp., *Spiropes* sp., *Trichoderma* sp., *Ulocladium* sp., *Wardomyces*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Diplodina* sp, *Dothiorella* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis citri*, *Guignardia citricarpa* *Mycosphaerella citri*, *Daldinia* sp., *Chaetomium globosum*, *Biscogniauxia* sp. (Wright et al., 1998), algunos de ellos en su estado latente, por ser patógenos en este hospedante.

La mayoría de los aislamientos endofíticos presentan capacidad degradadora de los componentes estructurales de las plantas, confirmando que son capaces de pasar a un estilo de vida saprofítica. Muy pocos pueden ser considerados patógenos latentes en base a la capacidad de producir metabolitos fitotóxicos y pectinasas. Se encontraron especies fúngicas capaces de producir metabolitos con actividad antimicrobiana frente a patógenos, y a su vez con toxicidad leve o no tóxica para la planta. Esta fuente de metabolitos secundarios con algún tipo de bioactividad es importantes para la selección de cepas antagonistas aplicables en el control biológico de enfermedades y plagas (Tiscornia, 2012).

El género *Guignardia* incluye especies que pueden comportarse como endófitas o patógenas según el hospedante (Baayen et al. 2002). *Guignardia citricarpa* [anamorfo *Phyllosticta citricarpa* (Mc Alpine) Van der Aa] causa la enfermedad de follaje y de frutos conocida como 'mancha negra de los cítricos' que afecta a *Fortunella* sp., *Poncirus* sp., *Citrus. sinensis*, *C. reticulata*, *C. aurantifolia*, *C. limón*, *C. paradisi* y *Citrus* spp., está sujeta a la legislación fitosanitaria de la Unión Europea y los EE.UU (Kotzé 2000; Alcoba et al., 2000; EPPO 2020), *G. mangiferae* A.J. Roy (anamorfo *P. capitalensis* P. Henn), especie no cuarentenaria de distribución cosmopolita, aislada además como endofítica en cítricos (Baayen et al., 2002; Glienke et al., 2002), patógeno en otros hospedantes y en limón fue hallada como patógena causando el Moteado de los cítricos y la Mancha rojiza (Peres et al., 2007; Baldassari et al., 2008; Fogliata et al. 2011).

En plantas de la familia *Anacardiaceae* se han obtenido cepas endófitas del género *Guignardia*, productora de Ácido guignárdico un compuesto con una potente actividad antimicrobiana. El taxol, otro compuesto con un importante potencial biotecnológico para la industria farmacéutica, es producido *in vitro* en grandes cantidades por la especie patógena *G. citricarpa* (Kumaran et al., 2008).

Se ha demostrado que *G. mangifera* y *G. citricarpa* poseen diferentes habilidades para producir enzimas hidrolíticas, especialmente pectinasas, sugiriendo que estas enzimas pueden tener distintos roles durante la interacción del patógeno y del endófito con la planta (Romão et al., 2011).

Estudios basados en análisis multigénico de diversas líneas de *Phyllosticta* sp. y *Guignardia* sp. endófitas y patógenas aisladas de diferentes hospedantes sugieren que *P. capitalensis* y *G. mangiferae* son especies genéticamente distintas y que los aislados endófitos provenientes de diferentes hospedantes anteriormente llamados *G. mangiferae* deben ser correctamente llamados *P. capitalensis* (Glienke et al., 2011).

En naranjo *C. sinensis* se determinó como especie fúngica endófito dominante a *C. gloeosporioides*, con actividad antagonista frente al patógeno *P. citricarpa*, no así frente al endófito *Phyllosticta capitalensis* (P.

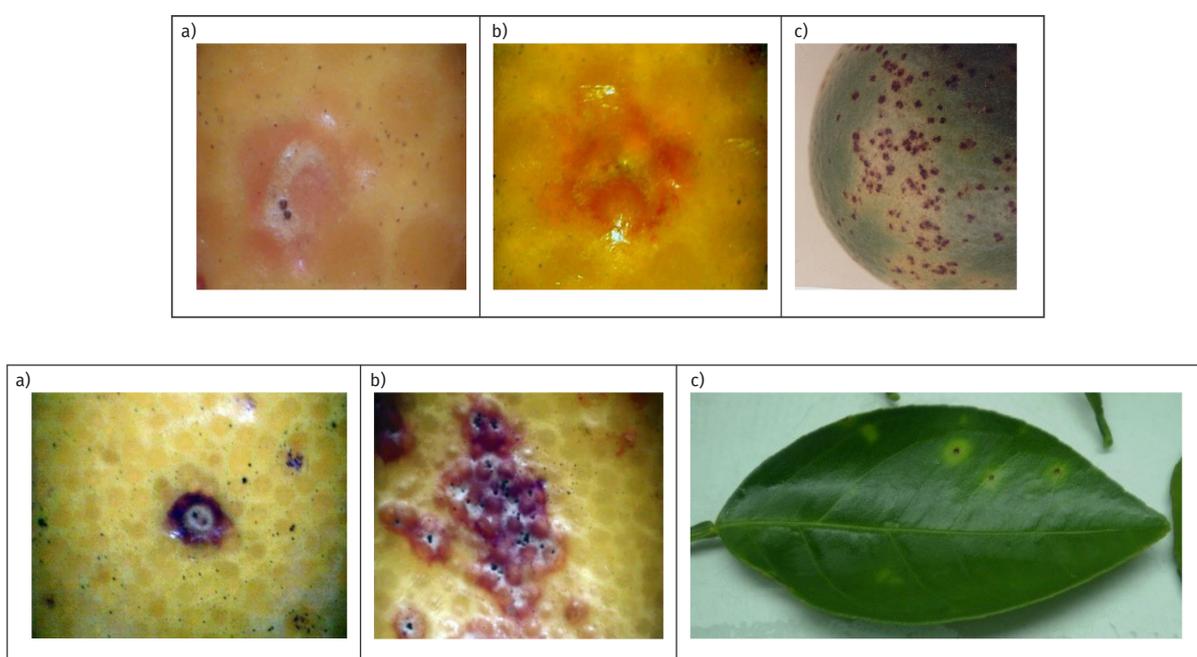
hennings) Van Der Aa (Bejarano & Carrillo 2016; Bejarano; 2017)

El objetivo del trabajo fue aislar y caracterizar las especies de *Phyllosticta* patógenas y endófitas que colonizan naturalmente al naranjo dulce en plantaciones comerciales de la provincia de Jujuy y determinar el resultado de su interacción.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1) Muestreo

Durante el otoño en diferentes localidades de la zona citrícola de Jujuy de lotes comerciales, se recolectaron muestras de 50 hojas asintomáticas de naranjo dulce correspondientes a la brotación más antigua de cada árbol y frutos con síntomas de mancha negra.



**Figura 1.** Diferentes tipos de síntomas de 'mancha negra' en naranjo dulce, utilizados para obtener aislamientos de *Guignardia* a y b) síntomas pecosos en frutos, c) síntomas de falsa melanosis en frutos, d) síntomas típicos en frutos, e) síntomas virulentos en frutos, f) síntomas en hojas.

### 2) Aislamientos y cultivos

En laboratorio las hojas se lavaron y desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% y alcohol 70%. Se cortaron trozos de 1 cm<sup>2</sup>, 5 de ellos fueron transparentados en KOH 10%, el resto se desinfectó con alcohol 70%, durante un minuto dos veces y finalmente se enjuagaron dos veces en agua destilada estéril, durante dos minutos cada vez. Los trozos se sembraron en placas con agar zanahoria (AZ, 80 gr de glucosa y 200 gr de zanahoria/lit); a las 72- 96 hs se iniciaron las observaciones, de las colonias desarrolladas se realizaron subcultivos en agar papa dextrosa (APD) 27 °C + - 2 °C durante 7 días.

Para el aislamiento de las lesiones de los frutos (Figura 1, a, b, c, d, e) se tomó una muestra del parénquima interglandular necrosado. Se sembraron en una caja de Petri con agar papa glucosa (APG). En el caso de las lesiones de hojas (Figura 1, f), se cortaron con un bisturí, se desinfectaron en alcohol 70% durante 1 minuto, se enjuagaron con agua destilada estéril, se secaron bajo flujo laminar y se sembraron en placas de Petri con APG, se incubaron a 27 ± 1°C hasta la aparición de colonias típicas de *Phyllosticta*

spp., que luego se repicaron nuevamente en idéntico medio para obtener cultivos puros.

### 3) Caracterización morfológica

La identificación se realizó en base a las características culturales macro y micromorfológicas de las colonias desarrolladas en subcultivos en APG después de 14 días de incubación, de acuerdo a los métodos corrientes en micología.

### 4) Caracterización molecular de cepas de *Phyllosticta* spp., aisladas de *C. sinensis*

Para la diferenciación entre *P. citricarpa* y *P. capitalensis*, de las colonias de 14 días se realizaron cultivos monospóricos en agar agua (AA). Los conidios germinados después de 24 hs, a 27 °C + - 2°C, fueron transferidos en APD e incubados 14-20 días a 27°C + - 2°C, de estos cultivos monospóricos se extrajo el ADN, para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se trabajó con los cebadores para el ITS1 y el ITS2, GCF3/GCR7 para Gc y GCF2/GCR4 para Gm. Estos amplifican las secuencias espaciadoras internas al transcripto (ITS) del gen del ARN ribosomal EPPO, 2020; Hidalgo & Pérez, 2010; Rodrigues et al, 2004.

### 5) Evaluación de patogenicidad de *P. capitalensis* y *P. citricarpa* en agar avena (AO)

Todos los aislados obtenidos de *Phyllosticta* spp. fueron caracterizados en medio agar avena (AO: 30 gr de avena arrollada y 15 gr/lt de agua destilada). Se transfirieron discos de 6 mm de diámetro de la zona de activo crecimiento micelial de las colonias cultivadas durante 14 días en APG. Se hicieron 3 siembras para cada aislamiento y se incubaron en oscuridad a 24 ± 2 °C, se consideró como resultado positivo la presencia de halo amarillo en el borde de las colonias para diferenciar los aislamientos de *Phyllosticta* patogénicos de los endofíticos en las 3 repeticiones (Baayen et al 2002; Baldassary et al, 2008; Wickert et al, 2009; 2014).

### 6) Interacciones in vitro entre *P. capitalensis* y *P. citricarpa*

Se realizaron pruebas de cultivos duales en placas de APG, entre las colonias de *Phyllosticta* sp. endofitas y patógenas, para evaluar interacciones (Bell et al, 1982).

Para evaluar el efecto antibiótico, se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC) a los siete días,  $PIC = [(C1-C2) / C1] \times 100$ ; C1= medida del diámetro de la colonia control; C2 = diámetro de la colonia del patógeno en los tratamientos de cultivos duales. Las placas fueron incubadas a 27 ± 1 °C. El diseño fue completamente aleatorizado con cuatro replicas por cepa de antagonista y un control absoluto del patógeno, a los 7 y 14 días de incubación a se midieron dos diámetros ortogonales de las colonias desarrolladas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1) Muestreo

Durante 2010-2012, se tomaron muestras de naranjo dulce de 24 lotes comerciales de 10 localidades del área citrícola de Jujuy (Tabla 1).

**Tabla 1.** Sitios de muestreo

Provincia	Localidad	Latitud	Longitud
Jujuy	Fraile Pintado	-23°59'09"	- 64° 47'27"
	Chalican	-23° 55' 26"	- 64° 50' 37"
	Palmasola	-24°00'73"	-64°20'29"
	Cerro La Lumbre	-24°00'33"	- 64°20'52"
	Puesto Nuevo	-23°54'48"	- 64°17'27"
	Real de los Toros	-24°58'04"	- 64°19'22"
	Sauce Guacho	-24°16'62"	- 64°38'58"
	Yuchán	-23° 56' 15"	-64° 51' 47"
	El Pongo	-24° 20' 15"	- 65°05'22"
	Yuto	-23° 38' 39"	- 64° 27' 54"

**2) Aislamientos y cultivos**

Se obtuvieron 81 aislamientos de *Phyllosticta* spp. (Tabla 2) de acuerdo a los resultados obtenidos previamente por otros investigadores en la región y en otras áreas cítricas (Baayen et al., 2002; Glienke et al, 2002 Kotzé 2000; Alcoba et al, 2000; EPPO 2020). Las colonias de *Phyllosticta* spp. fueron mantenidos en una colección en medio APG a 15°C, para realizar las siguientes observaciones y una cepa a (-20°C) en papel de filtro, en el Laboratorio de Diagnóstico de Enfermedades de las Plantas de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Jujuy.

**Tabla 2.** Aislamientos de *Phyllosticta* spp. obtenidos de *C. sinensis*, categorizados por órgano, tejido y para las muestras sintomáticas tipo de síntoma de la enfermedad de donde fueron aisladas.

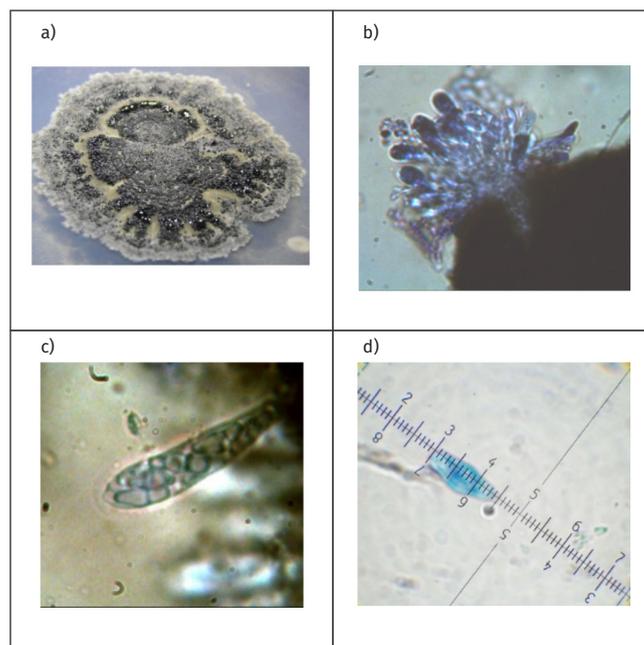
Organo	Tejido utilizado para el aislamiento y cultivo	Tipo de síntoma de mancha negra	Cepas de <i>Phyllosticta</i> spp.
Frutos	Sintomático	Típico	13
Frutos	Sintomático	Pecoso	20
Frutos	Sintomático	Virulento	8
Frutos	Sintomático	Falsa melanosis	11
Hojas	Sintomático	Típico	2
Hojas	Asintomáticas	-	27
Total			81

### 3) Caracterización morfológica

Los aislados de *Phyllosticta* spp. obtenidos fueron diferenciados por sus características morfológicas y culturales en dos grupos *P. capitalensis* y *P. citricarpa*, tal como reportan otros autores (Baayen et al., 2002; Glienke et al, 2002 Kotzé 2000; Alcoba et al, 2000; Wickert et al, 2009; Glienke et al, 2011).

El diámetro promedio (5,35 cm) de las colonias tipo *P. capitalensis* a los 14 días de incubación a  $27 \pm 1$  °C en APG fueron significativamente superiores a los de *P. citricarpa*, (2,71 cm) (ANOVA:  $F=339$ ,  $p \leq 0,0001$ ; Tuckey,  $p < 0,05$ ), la cepa endófito siempre superó a la patógena, resultados consistentes con los presentados en otras zonas cítricas del mundo (Baayen et al 2002, Baldassari et al, 2008; Hidalgo Góngora & Perez, 2010).

Las colonias de *P. capitalensis* obtenidas de los aislamientos en APG, a los 15 días a  $27 \pm 1$ , fueron de apariencia esponjosa granulosa color verde oliváceo, con bordes más claros, luego de los 20 días oscurecieron tornándose negras (Figura 2); presentaron invaginaciones en los bordes, que hacen a las colonias profundamente lobuladas, de color uniforme o con sectores de diferentes tonos de borde ondulados que se deben a diferentes estados de desarrollo de la colonia. Se pudieron apreciar que las colonias pueden desarrollar estromas de peritecios ascendentes con ascas y ascosporas desde el día  $14 \pm 2$ , simultáneamente se desarrollaron estructuras anamórficas con producción de conidios, mientras que otras para el mismo período y condiciones de incubación formaron estromas sin diferenciación de peritecios.



**Figura 2.** Colonias de *P. capitalensis* en APG 27°C, obtenidas de hojas asintomáticas a) a los 15 días de incubación, b) peritecios liberando ascas 250X, c) ascas con ascosporas 400X, d) ascospora 1000X.

Se pudo observar que *P. capitalensis* se comportó como un hongo homotálico autocompatible, a diferencia de otros ascomicetos cuya reproducción sexual ocurre por tipos de cruzamiento o "mating types". La compatibilidad entre individuos haploides depende de los genes del locus MAT, que existen como dos alelos alternos Mat1-1 y Mat1-2 (Conde-Ferráez, 2007), en este sistema sólo las líneas genéticamente opuestas son capaces de cruzarse produciendo ascosporas, este es el caso de *P. citricarpa*, una especie heterotálica auto-incompatible, en las placas no se observó el estado sexual, sólo el asexual y el espermogónico (Wang et al., 2013; 2014).

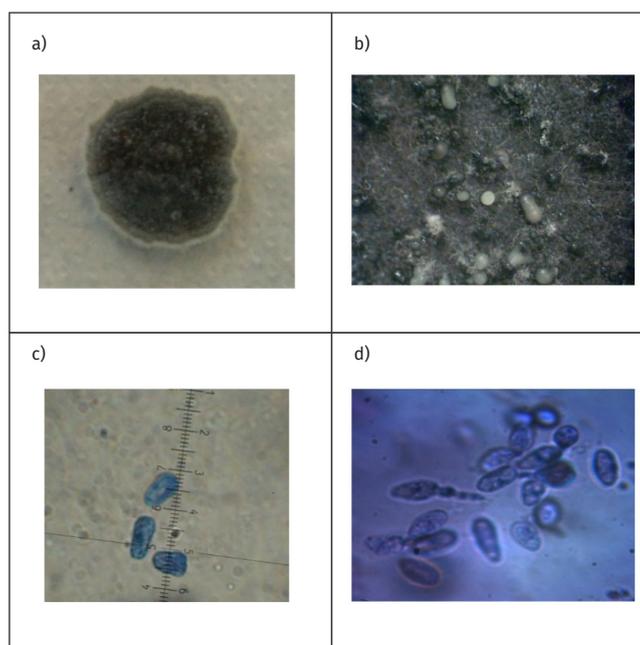
La reproducción sexual de *P. capitalensis* se desarrolló *in Vitro* luego de  $12 \pm 2$  días de incubación a

25 ± 2°C, se formaron peritecios piriformes ascendentes de 140 ± 26 µm x 111,4 ± 21,6 µm, de color pardo oscuro a negro, con ostiolo circular, ascas de cilíndricas a clavadas, ocho ascosporas, aseptadas, hialinas, multigutuladas, cilíndricas ensanchadas en la parte media, de 13,9 ± 1,17 µm x 5,2 ± 0,51 µm. En las placas pueden coexistir conidios y ascosporas.

Las colonias de *P. citricarpa* fueron más compactas que las de *P. capitalensis*, cupuliformes granulosas por la formación de picnidios, con escaso micelio aéreo; rodeado de un pigmento amarillo en APG que se puede observar también al reverso de la colonia. Se observaron colonias que mostraron sectores con diferentes tonos de grises, debido a diferentes estados de desarrollo de la colonia.

La morfología de las colonias desarrolladas, coinciden con la descrita por numerosos autores para ambas especies (Baayen *et al*, 2002, Baldassari *et al*, 2008; Hidalgo Góngora & Perez, 2010).

Los picnidios desarrollados en APG fueron globosos, inmersos, de color pardo oscuro a negro, paredes con múltiple capas de células, cuello ascendente de 52 x 27 µm, ostiolo circular, las picnidiosporas de forma ovoide a piriformes, hialinas, aseptadas, multigutuladas, con ápice levemente plano y un apéndice incoloro, con punta aguda y fina, y base truncada, unicelulares y alargadas, las desarrolló a los 10-14 días, estas características se corresponden con las de *P. capitalensis*, mientras que en las colonias tipo *P. citricarpa* los picniostromas iniciaron su desarrollo desde que desde los 7 días de incubación.



**Figura 3.** Colonia de la cepa 155 en APG 27°C, obtenida de síntoma falsa melanosis de mancha negra a) luego de 20 días de incubación, b) picnidios exudando cirros de conidios 45X, c y d) conidióforos y conidios 450X.

Las dimensiones promedio de los conidios: ancho (4,87- 5,64 µm, largo 10,35-10,12 µm y espesor de la capa mucilaginosa 1,7-2,9 µm) respectivamente fueron los esperadas para *P. capitalensis* como para *P. citricarpa*, con diferencias significativas en ancho (ANOVA F=40,5, p≤0,0001; Tuckey, p<0,05), largo (ANOVA F=10,29, p≤0,0017; Tuckey, p<0,05) y espesor de la capa mucilaginosa (ANOVA F=142,9 p≤0,0001; Tuckey, p<0,05) estos resultados justifican la separación de las cepas en dos grupos.

#### 4) Interacción entre *Phyllosticta* spp. en *C. sinensis*

Las 81 cepas de *Phyllosticta* spp. aisladas de naranjo dulce de la zona de estudio, desarrolladas en agar avena (AO) a 24 ± 2 °C en oscuridad, se evaluaron a los 7, 14 y 21 días, para determinar la formación de halo amarillo alrededor de las colonias, si lo hicieron en las tres repeticiones se reconocieron como

AO + y si no lo hicieron como AO -, en los casos en los que una repetición presentaba reacción diferente, la cepa fue registrada como dudosa.

### 5) Caracterización molecular de cepas de *Phyllosticta* spp., aisladas de *C. sinensis*

De la colección de cepas de *Phyllosticta* spp. obtenidas en ese trabajo se seleccionaron para caracterización molecular un grupo de cepas que presentaron características morfológicas y culturales de *P. capitalensis* y *P. citricarpa*.

En la amplificación con los primers (GCF2 y GCR4), las cepas que mostraron bandas específicas de 210 pb fueron las de morfología compatible con *P. capitalensis*, obtenidas de tejido foliar asintomático, de patogenicidad negativa, resultados esperados para cepas endofíticas. Aunque dos de ellas fueron obtenidas desde los tejidos sintomáticos de la enfermedad mancha negra, lo que demuestra la coexistencia de ambas especies, e indica infecciones simultáneas propias de los endófitos de transmisión aérea, resultados semejantes los obtuvieron otros autores (Glienke et al 2002; Rodrigues et al, 2004; Baldassari et al, 2008; Meyer et al 2012).

Los aislados de macro y micro morfología compatible con *P. citricarpa* amplificaron con los primers GCF3/GCR7, fueron obtenidos de síntomas de mancha negra, mostraron reacción positiva en la prueba de patogenicidad en AO. Sólo una cepa obtenida de estos síntomas presentó una reacción dudosa en AO y tampoco amplificó con este primer.

Se comprobó la correlación entre la falta de producción de pigmento amarillo en la reacción en agar avena de las colonias y la amplificación con los primers (GCF2 y GCR4) para *P. capitalensis* resultados coincidentes con los obtenidos por otros autores, quienes afirman la correspondencia entre ambos métodos para la separación de las cepas endofíticas y patógenas de *Phyllosticta*, (Baayen et al 2002; Rodrigues, et al, 2004; Baldassary et al, 2008; Wickert et al, 2009; Meyer et al, 2012).

De las 81 cepas de *Phyllosticta* obtenidas, 33 fueron identificadas como *P. capitalensis*, 47 como *P. citricarpa* y 1 *Phyllosticta* sp, Tabla 3.

**Tabla 3.** Aislamientos de *Phyllosticta* spp. obtenidos de *C. sinensis*, caracterizados morfológicamente, molecularmente y patogénicamente, categorizados por órgano, tejido de donde fueron aislados.

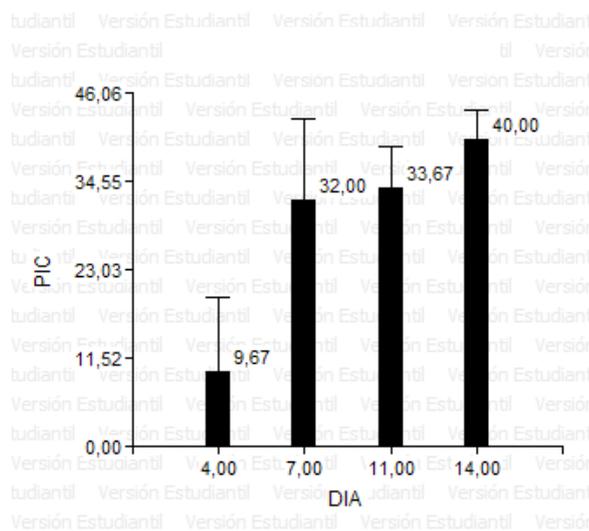
Organo	Tejido utilizado para el aislamiento y cultivo	Tipo de síntoma de mancha negra	Frecuencia de aislamientos de <i>P. capitalensis</i>	Frecuencia de aislamientos de <i>P. citricarpa</i>	Frecuencia de aislamientos <i>Phyllosticta</i> sp
Frutos	Sintomático	Típico	1/13	12/13	-
Frutos	Sintomático	Pecoso	1/20	19/20	-
Frutos	Síntomático	Virulento	2/8	6/8	-
Frutos	Síntomático	Falsa melanosis	3/11	8/11	-
Hojas	Sintomático	Típico	1/2	1/2	-
Hojas	Asintomáticas	-	25/27	1/27	1/27
Total			33	47	1

Se pudo verificar la presencia simultánea de ambas especies en *C. sinensis*, tal como se ha encontrado en este y otros hospedantes cítricos y coexistiendo en los mismos tejidos. Esta explicación es soportada en los aislamientos obtenidos tanto en este trabajo como en los de otros autores, donde se recuperaron numerosos patógenos de un mismo tejido, lo que indica que tienen actividades o requerimientos comunes y posibilidad de interactuar entre ellos y con el hospedante (Glienke et al 2002; Rodríguez et al, 2004; Baldassari et al, 2008).

Las características morfológicas, culturales, tasa de crecimiento de *Phyllosticta* spp. aisladas de *C. sinensis*, se correlacionaron con los resultados en AO y la caracterización por ITS-PCR, en coincidencia con los trabajos consultados en la bibliografía.

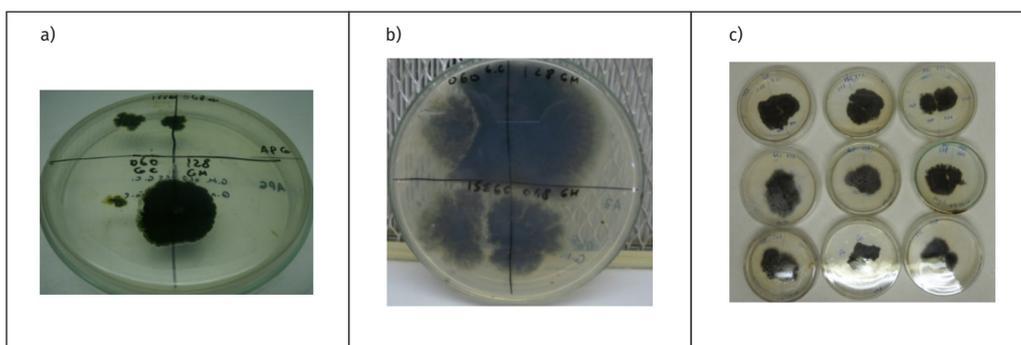
**6) Evaluación de interacciones in vitro entre *P. capitalensis* y *P. citricarpa***

*Phyllosticta capitalensis* (Pc) endófito en naranjo, demostró actividad inhibitoria in vitro frente a *G. citricarpa* (Gc) (Figura 4), coincidente con trabajos realizados por otros autores. Esto la posiciona como candidata para futuros estudios de alternativas de lucha biológica.



**Figura 4.** Inhibición del crecimiento en cm de las colonias de *P. citricarpa* (Gc) - *P. capitalensis* (Pc), en cultivos duales en APG a 27±1°C, a los 4, 7, 11 y 14 días.

Se puede observar que a los 14 días de interacción Pc – Gc, se presentan diferencias significativas en los PIC (ANOVA F=68,7, p<0,0001; Tuckey, p<0,05), continúa el mismo comportamiento que el observado a los 11 días de incubación (Figura 5 a). al día 14 se pudo verificar la interacción entre (Gc) y (Pc) día 21 (Figura 5 b y c).



**Figura 5.** Interacciones en cultivos duales desarrollados en APG a 27°C ± 1°C. a) *P. capitalensis*- *G. citricarpa* en APG a 27°C ±1°C al día 14; b y c) día 21.

## CONCLUSIONES

En *C. sinensis* no se encontró a *Phyllosticta capitalensis* causando síntomas directamente atribuidos a ella, se comportó como un hongo homotético endofítico, que se encuentra en el follaje de *C. sinensis*, colonizando el tejido parenquimático, acompaña al hospedante sin fructificar en él, hasta la senescencia de las hojas, cuando se desarrollan peritecios y/o picnidios.

*P. capitalensis* se la pudo aislar en muy baja frecuencia de corteza de frutos desde lesiones de la enfermedad llamada mancha negra, siempre acompañando al patógeno agente causal de la enfermedad *P. citricarpa*.

La evaluación de patogenicidad realizada en AO, confirma el comportamiento endofítico de *P. capitalensis* en *C. sinensis*, por lo que su presencia en tejido sintomático se debe a colonizaciones simultáneas con la especie patógena *P. citricarpa* con la que comparte hábitat junto con diversos hongos, debido a la transmisión horizontal, común entre las especies patógenas y endófitas arbóreas.

La existencia de colonizaciones simultáneas en los tejidos de las plantas, puede determinar diferencias en el resultado neto de las interacciones. La presencia de una especie endófita en un tejido sintomático no necesariamente la constituyen en el patógeno causal, tal como lo establece Koch en sus postulados, pero su presencia puede ser determinante en el resultado de la interacción patógeno-hospedante, ya que sus metabolitos se constituyen en el primer ambiente en el cual se desarrolla la enfermedad.

Los resultados de las interacciones in vitro de *P. citricarpa* con *P. capitalensis*, demuestran el papel mutualista de esta última con *C. sinensis*. Se pudo comprobar un mejor desempeño de *P. capitalensis*, en la competencia in vitro, frente a *P. citricarpa*, lo que determina una ventaja a la especie endófita en las plantas cítricas. Esta característica la posicionan como un potencial agente para el biocontrol en los programas de manejo integrado de la mancha negra de los cítricos, aprovechando la afinidad que tiene esta especie con el hospedante.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alcoba N, Vigiani A, Bejarano N, Alvarez S, Serrano M & Bonillo M. (2000) Mancha Negra de los Cítricos. Epidemiología y Control, S S Jujuy,.
- Abello, J. F., & Kelemu, S. (2006). Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 7(2), 55-57.
- Baayen R, Bonants P, Verkley G, Carroll G, Van Der AA H, Weerd M, ...,& Azevedo J. (2002). Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*), Phytopathology. 92: 88-92.
- Baldassari E, Wickert & De Goes A. (2008). Pathogenicity, Colony Morphology and Diversity of Isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* Isolated from Citrus spp. European Journal of Plant Pathology, 120(2):103-110. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-007-9182-0>
- Bell D K, Wells H D, & Markaman CR. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* spp. against six fungal pathogens. Phytopathology, 72: 379-382.
- Bejarano N, Catacata J, & Albarracin M. (2009). *Guignardia mangiferae* un endófito en naranjo *Citrus sinensis*. Agraria. IV: 37-41.
- Bejarano, N.D., & Carrillo, L. (2016). Fungal Endophytes in Sweet Orange *Citrus sinensis* (L.) Osbeck in Jujuy-Argentina. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences*, 4.

- Bejarano N. (2017), *Guignardia mangiferae* en *Citrus sinensis*, sus interacciones con endófitos fúngicos foliares. FCN. UNSa
- Caruso, G., Golubkina, N., Tallarita, A., Abdelhamid, M. T., & Sekara, A. (2020). Biodiversity, ecology, and secondary metabolites production of endophytic fungi associated with amaryllidaceae crops. *Agriculture (Switzerland)*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/agriculture10110533>
- Conde-Ferráez L. (2007). El locus MAT (mating-type) de los ascomicetos: su evolución, estructura y regulación. *Revista iberoamericana de micología*, 24(2), 95-99.
- De Silva, N. I., Brooks. S., Lumyong. S., & Hyde. K. D. (2019). Use of endophytes as biocontrol agents. *Fungal Biology Reviews*. 33 (2): 133-148. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.10.001>
- Durán E, Ploper D, Ramallo J, Piccolo-Grandi R, Hupper-Giancoli A, & Azevedo J., (2005). The foliar fungal endophytes of Citrus limon in Argentina, *Can. J. Bot.*, vol. 83, pp. 350-355.
- EPPO. (2020). EPPO PM 7/017 (3) *Phyllosticta citricarpa* (formerly *Guignardia citricarpa*). Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/017(3). EPPO Bulletin, England, 50:440-461.
- Fogliata G, Muñoz L, Rojas A, & Ploper D. (2011). Eficacia de tres estrobirulinas para el control de la mancha rojiza (*Guignardia mangifera* y Mancha negra (*Guignardia citricarpa*) en frutos de limón, en Tucumán República Argentina. *Revista industrial y agrícola de Tucumán*. versión On-line ISSN 1851-3018 Rev. Ind. Agric. Tucumán, 88 (1), 37- 45. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-30182011000100005&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-30182011000100005&lng=es&tlng=es).
- Glienke-Blanco C, Aguilar-Vildoso C I, Vieira M L C, Barroso P A &, Azevedo J L. (2002). Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. *Genetics and Molecular Biology*, 25: 251-255.
- Glienke C, Pereira O, Stringari D, Fabris J, Kava-Cordeiro V, Galli-Terasawa L,...&, Crous P. (2011). Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species with reference to those associated with citrus black spot. *Persoonia*, 26:47-56.
- Hidalgo-Góngora E, Pérez V.(2010) Diferenciación morfológica, cultural y biológica de *Guignardia citricarpa* y *G. mangiferae* en frutos cítricos de Cuba. *Fitosanidad*, 14:141-152,
- Ikram, M., Ali, N., Jan, G., Jan, F. G., & Khan, N. (2019). Endophytic Fungal Diversity and their Interaction with Plants for Agriculture Sustainability Under Stressful Condition. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 11(2), 115–123. <https://doi.org/10.2174/2212798410666190612130139>
- Kotzé J M. (2000). Black Spot. In LW Timmer, SM Grinsey, JH Graham (eds) *Compendium of Citrus Diseases*, 2<sup>o</sup> ed, American Phytopathological Society Pres, St. Paul Minnesota, pp. 23-25.
- Kumaran, R. S., Muthumary, J., & Hur, B. K. (2008). Taxol from *Phyllosticta citricarpa*, a leaf spot fungus of the angiosperm *Citrus medica*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 106(1), 103-106.
- Latz, M. A., Jensen, B., Collinge, D. B & Jørgensen, H. J. (2018). Endophytic fungi as biocontrol agents: elucidating mechanisms in disease suppression, *Plant Ecology & Diversity*, DOI: 10.1080/17550874.2018.1534146
- Meyer L, Jacobs R, Kotzé J M, Truter M, Korsten L.(2012). Detection and molecular identification protocols for *Phyllosticta citricarpa* from citrus matter. *South African Journal of Science*, 108(3-4): 53-59.
- Mousa, W. K., & Raizada, M. N. (2013). The Diversity of Anti-Microbial Secondary Metabolites Produced by Fungal Endophytes: An Interdisciplinary Perspective. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00100>

[org/10.3389/fmicb.2013.00065](https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00065)

- Muñoz Guerrero, J. (2021). Hongos Endófitos de Lima Tahití (*Citrus citris* x *latifolia*) y su Utilidad en el Biocontrol de *Colletotrichum acutatum* Causante de Antracnosis. Bucaramanga : Universidad de Santander, 2021.
- Peres, N. A., Harakava, R., Carroll, G. C., Adaskaveg, J. E., & Timmer, L. W. (2007). Comparison of Molecular Procedures for Detection and Identification of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae*. *Plant disease*, 91(5), 525–531. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-5-0525>.
- Rana, K. L., Kour, D., Sheikh, I., Yadav, N., Yadav, A. N., Kumar, V., ... Saxena, A. K. (2019). Biodiversity of Endophytic Fungi from Diverse Niches and Their Biotechnological Applications. Multi-Stage and Multi-Time Scale Feedback Control of Linear Systems with Applications to Fuel Cells, 105–144. doi:10.1007/978-3-030-03589-1\_6. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-03589-1\\_6](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-03589-1_6)
- Rodríguez, K. F., Sieber, T. N., Grünig, C. R., & Holdenrieder, O. (2004). Characterization of *Guignardia mangiferae* isolated from tropical plants based on morphology, ISSR-PCR amplifications and ITS1-5.8S-ITS2 sequences. *Mycological research*, 108(Pt 1), 45–52. <https://doi.org/10.1017/S0953756203008840>
- Rodríguez, R. J., White, J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: Diversity and functional roles: Tansley review. *New Phytologist*. 182: 314–330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
- Romão, A. S., Spósito, M. B., Andreote, F. D., Azevedo, J. L. D., & Araújo, W. L. (2011). Enzymatic differences between the endophyte *Guignardia mangiferae* (Botryosphaeriaceae) and the citrus pathogen *G. citricarpa*. *Genetics and Molecular Research*, 10(1), 243–252.
- Rojas, E. C., Jensen, B., Jørgensen, H. J. L., Latz, M. A. C., Esteban, P., Ding, Y., and Collinge, D. B. (2020). Selection of fungal endophytes with biocontrol potential against *Fusarium* head blight in wheat. *Biological Control*, 144. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104222>
- Segaran. G., & Sathiavelu. M. (2019). Fungal endophytes: A potent biocontrol agent and a bioactive metabolites reservoir. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101284>
- Sieber T. (2007). Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews*, 21 (2): 75–89
- Tiscornia S. (2012). Comunidades de hongos endófitos de *Myrtaceae* neotropicales: evaluación de la producción de enzimas y metabolitos bioactivos. PhD Thesis. Universidad de la Republica. <http://www.bib.fcien.edu.uy/files/etd/resumen/uy24-16024R.pdf>.
- Wang N, Rollins J A y Dewdney M M. (2013). Characterization of the mating-type locus (MAT) of *Guignardia citricarpa*, the fungal causal agent of citrus black spot. *Phytopathology*, 103(6):156–156.
- Wang N Y, Zhang K, Rollins J A y Dewdney, M. M. (2014) Characterization of mating-type (MAT) loci of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen and *G. mangiferae*, the ubiquitous endophyte. *Phytopathology*, 104(11): 126–126.
- Wickert E, De Goes A D, Lemos E G D M, Souza A D, Silveira E L, Pereira, F D y Rinaldo D. (2009) Relações filogenéticas e diversidade de isolados de *Guignardia* spp. oriundos de diferentes hospedeiros nas regiões ITS1–5, 8S–ITS2. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31(2), 360–380.
- Wickert A, Souza R, Pereira L, Kishi E, Lemos y De Goes A. (2014) Molecular and Pathogenic Study of

*Guignardia* spp. Isolates Associated to Different Hosts. *Advances in Microbiology*, 4(2): 116-125. doi:[10.4236/aim.2014.42016](https://doi.org/10.4236/aim.2014.42016).

Wright J, Johnson G, & Hyde K., (1998). Studies on the endophytic mycota of Citrus spp., Proceeding of international workshop holdat Chiang Mia, Thailand, ACIAR Proceedings Series, 80: 167-173.

Yan, L., Zhu, J., Zhao, X., Shi, J., Jiang, C., & Shao, D. (2019). Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09713-2>