

COMPARACIÓN DE TÉCNICAS PARA EL AISLAMIENTO Y RECUENTO DE LEVADURAS Y HONGOS DIMÓRFICOS DEL FILOPLANO DE *NOTHOFAGUS PUMILIO*

MARIO MUÑOZ¹, MARTÍN MOLINÉ¹ y DIEGO LIBKIND^{1,*}

Summary: Comparison of techniques for isolation and enumeration of yeast and yeast like fungi from *Nothofagus pumilio* phylloplane. The phylloplane is an important habitat for microorganisms. This study aimed to test different methods for the isolation of yeasts and dimorphic fungi from the phylloplane of *Nothofagus pumilio*, the dominant tree species in Patagonia. The tested methods included printing on agar, vertical agitation on water, with the addition of surfactant compounds (Tween 80) or abrasive material (sand), maceration and ultrasound treatment. A method that combines the vertical agitation, with application of ultrasound was established as the most appropriated for the isolation and enumeration. With this method it was determined that the density of yeasts and dimorphic fungi in the phylloplane of *N. pumilio* ranged between 10 and 10³ colony forming units per cm², values between 10 and 100 times lower than those observed for other tree species. Also, the dimorphic fungi *Aureobasidium pullulans* was determined as the dominant fungal species in this environment.

Key words: *Aureobasidium*, high altitudes, Lenga, yeasts, Patagonia.

Resumen: El filoplano es un importante hábitat de microorganismos. Este trabajo tuvo como objetivo probar distintos métodos para el aislamiento de levaduras y hongos dimórficos del filoplano de *Nothofagus pumilio*, la especie arbórea dominante de Patagonia. Los métodos probados fueron la impresión sobre medio sólido, agitación vertical con agua durante distintos tiempos, con la adición de surfactante (Tween 80) o abrasivos (arena); macerado y ultrasonido. Se estableció un método que combina la agitación vertical con la aplicación de ultrasonido como metodología apropiada para el aislamiento y recuento. Con este método se determinó que la densidad de levaduras y hongos dimórficos en el filoplano de *N. pumilio* osciló entre las 10 y 10³ unidades formadoras de colonias sobre cm², valores entre 10 y 100 veces inferiores a los observados para otras especies arbóreas. También se estableció al hongo dimórfico *Aureobasidium pullulans* como la especie dominante de este ambiente.

Palabras clave: *Aureobasidium*, Alta montaña, Lenga, Levaduras, Patagonia.

INTRODUCCIÓN

La superficie de las hojas, también conocida como filoplano, constituye la interfase biosfera-atmósfera más grande de nuestro planeta, con un área aproximada de 10⁹ Km² y representa un importante reservorio de las poblaciones microbianas totales del mundo (Phaff & Starmer, 1987; Kowalchuk *et al.*, 2010). El filoplano posee las condiciones

necesarias para el desarrollo de diversos tipos de microorganismos, incluyendo levaduras (en sentido amplio: hongos con predominio de fase unicelular) y hongos dimórficos (aquellos que alternan estadios unicelulares con estadios con hifas o pseudohifas). Distintas especies de levaduras y hongos dimórficos fitopatógenos, han sido identificadas y estudiadas en el filoplano debido a su impacto económico sobre los cultivos agrícolas (Leben, 1965; Morris, 2001; Damm *et al.*, 2008). Sin embargo, existen pocos estudios que identifiquen y/o estudien las características de comunidades naturales de hongos epífitos. En las últimas décadas se ha visto un renovado interés en la biodiversidad de hongos saprófitos, debido a su rol en el ciclo de nutrientes

¹ Laboratorio de Microbiología Aplicada y Biotecnología, INIBIOMA: Universidad Nacional del Comahue – CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas). Bariloche, Argentina. *email: diego.libkind@gmail.com

y regulación de los tamaños poblacionales de microorganismos patógenos (Windels & Lindow, 1985; Fokkema, 1991; Andrews, 1992; Lindow & Leveau, 2002).

La principal especie arbórea de los bosques de los Andes es *Nothofagus pumilio* (lenga), un árbol decíduo de zonas frías y por lo general de altura (Cabrera, 1971; Martínez-Pastur *et al.*, 2000). Tiene hojas caducas, coriáceas y lustrosas de unos 4 cm de largo por 2 de ancho (Dimitri & Milano, 1950). Los bosques de *N. pumilio* constituyen el 25% y 4% de la superficie forestal nativa en Argentina y Chile respectivamente, constituyendo uno de los más importantes tipos de bosques en ambos países (Gonzalez *et al.*, 2006).

Esta especie posee una amplia distribución altitudinal y latitudinal, variando desde árboles de unos 30 m al pie de la montaña, a arbustos achaparrados en el límite altitudinal superior, donde soportan cortas estaciones de crecimiento, bajas temperaturas, elevados vientos y gran exposición a la luz solar (Premoli & Mathiasen, 2011).

La mayoría de los estudios de levaduras y hongos dimórficos del filoplano, han sido realizados en Norteamérica y Europa, sobre especies arbóreas con características foliares distintas a las de las especies arbóreas de Patagonia. Por esto resultó necesario para iniciar el estudio de la diversidad fúngica del filoplano de *N. pumilio*, analizar la eficacia de los métodos de aislamiento recomendados por la bibliografía.

Una característica determinante en el método de aislamiento a emplear, es cuan fuerte es la adhesión existente entre las levaduras y hongos dimórficos a la superficie de la hoja, la cual es requisito para una exitosa colonización (Andrews & Harris, 2000). En este contexto se plantean como objetivos de este trabajo, la comparación de diferentes técnicas de aislamiento de levaduras y hongos dimórficos, a fin de permitir el primer análisis de la abundancia fúngica del filoplano de *N. pumilio* y poder establecer la especie dominante en este ambiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de muestreo y toma de muestras

El presente estudio fue realizado en el mes de diciembre de 2008, en el cerro Otto (San Carlos de Bariloche, Provincia de Río Negro, Argentina), el

cual posee una altura máxima de 1405 msnm, con una precipitación media anual de 800 mm (Conti, 1998). Los muestreos se realizaron a 1340 msnm, donde predominan los bosques de *N. pumilio* con cubierta discontinua (Puntieri *et al.*, 2001).

Los árboles de los cuales se tomaron las muestras pertenecían a un mismo grupo, localizado en la ladera sur del cerro y se encontraban cubiertos por pisos de vegetación superiores. Se colectaron hojas sanas, utilizando pinzas desinfectadas con alcohol 70% V/V y colectadas en bolsas de polietileno estériles. En el laboratorio se desinfectó la cara abaxial de las hojas, mediante un hisopo con alcohol 70% V/V (estudios previos permitieron la puesta a punto de este trabajo de desinfección, el cual no afecta las levaduras y hongos dimórficos a cuantificar). Las hojas fueron distribuidas al azar para la aplicación de los distintos métodos.

Técnicas de aislamiento

Se compararon 6 métodos de aislamiento de levaduras y hongos dimórficos y se determinó la cantidad de unidades formadoras de colonias por unidad de área de superficie foliar (UFC/cm²) (Rose, 1975). Para los métodos 2-6 se sembró 100 µl del extracto acuoso en medio MYP agar (Extracto de malta 7 g L⁻¹; extracto de levadura 0,5 g L⁻¹; peptona de soja 2,5 g L⁻¹ y agar 15 g L⁻¹).

1. Aislamiento por impresión de superficie foliar: se frotó la cara adaxial de cada hoja contra la superficie del medio de cultivo MYP agar con una espátula de Drigalski. Dicho procedimiento se realizó durante 3, 5 y 10 min utilizando 1 hoja para cada placa y 3 placas para cada tiempo.
2. Aislamiento por agitación vertical: Las hojas fueron colocadas en tubos de ensayo ($\Phi = 16$ mm) conteniendo volúmenes de 2, 3, 5 y 10 mL de agua destilada estéril. Los distintos tubos se agitaron durante 10 min en agitador vertical, *vortex* CK-Tech V1-2. El ensayo se realizó por triplicado.
3. Aislamiento por agitación vertical con agente abrasivo (arena): se agregó 2 g de arena lavada estéril a 3 tubos conteniendo 8 hojas en 3 mL de agua destilada. Los tubos se agitaron durante 10 min y se sembraron 3 placas de MYP agar por tubo.
4. Aislamiento por agitación vertical con surfactante (Tween 80): Se prepararon 3 tubos de ensayo conteniendo 4 hojas en 2 mL de una solución de

Tween 80 al 0,05% V/V. Los tubos se agitaron durante 10 min y se sembraron 3 placas.

5. Aislamiento por maceración: Los distintos tubos utilizados en los protocolos de agitación vertical y agitación vertical con Tween 80 se mantuvieron durante 24 hs a 5°C. Transcurrido ese período los tubos se agitaron durante 3 min para homogeneizar la muestra y se procedió a sembrar en medio sólido. Se sembraron 3 placas provenientes de la agitación vertical con agua durante 10 min y 3 de la agitación vertical con Tween 80.
6. Aislamiento por sonicación: 6 tubos, cada uno de los cuales contenía 3 hojas sumergidas en 3mL de agua destilada estéril, fueron agitados verticalmente durante 10 min tras lo cual se procedió a la siembra en placa (MYP agar) de 100 μ L, para recuento de unidades formadoras de colonias (UFC). Luego los tubos fueron sonicados de a pares en un baño ultrasónico (Ultrasonik 28X NEY) durante 2 y 10 min. Cada par de tubos, recibió una potencia distinta de sonicación, para el primer par fue de 96 Watts (W), para el segundo de 128W y para el tercero de 160W. La frecuencia de sonicación se mantuvo constante en 45 KHz. A los 2 y 12 minutos de sonicación se sembraron alícuotas del extracto en MYP agar de todos los tubos para recuento de UFC.

Las placas de cultivo fueron incubadas a 20°C en oscuridad durante 3 a 7 días. Se registró el número de UFC por placa mediante observación con lupa Olympus ZXZ-90. Las colonias obtenidas fueron clasificadas por su morfología; color, textura, brillo, tipo de borde, viscosidad y tamaño, en grupos denominados morfotipos (Lebaron *et al.*, 1998).

En una primera instancia se comparó las distintas modalidades de cada método y se seleccionó la que permitió los mayores recuentos de levaduras y hongos dimórficos. Este valor fue utilizado posteriormente para la comparación entre métodos.

Determinación de la superficie foliar

Las hojas fueron digitalizadas con escáner (HP1410) y la superficie fue determinada con el software SigmaScan Pro5, esto permitió referenciar el número de UFC registrado a la superficie foliar utilizada, formato en el que se expresan todos los resultados.

Análisis estadísticos

Se utilizó el análisis estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis, Análisis de variancia en rangos de una vía con un $\alpha=0,05$ y como test a posteriori, se aplicó el método de comparaciones múltiples de Dunn's. En las comparaciones de dos muestras, se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney Rank Sum. En el caso particular del método 6, se utilizó el test de Wilcoxon para comparar la estimación de densidad antes y después de los procesos de sonicación. Los análisis se realizaron con el software SigmaPlot Versión 11.0.

RESULTADOS

Los distintos métodos de aislamiento aplicados en este trabajo, comparados mediante el test de Kruskal-Wallis, mostraron diferencias significativas en su capacidad de desprender levaduras y hongos dimórficos de la superficie de las hojas ($p=0,03$). Los resultados más destacados se muestran en la Fig. 1.

El método de impresión aplicado sobre medio sólido durante 3, 5 y 10 min, produjo 12,35; 14,89 y 12,02 UFC/cm² respectivamente, no existiendo diferencias significativas entre los 3 tiempos ($p=0,76$) según el test de Kruskal-Wallis. Se utilizó el mayor valor obtenido mediante este método en la recuperación de levaduras y hongos dimórficos, es decir 14,89 UFC/cm² correspondiente a la aplicación de este método durante 5 minutos, para compararlo con los demás métodos. Las comparaciones múltiples de Dunn's muestran que la impresión fue el menos efectivo para el aislamiento de levaduras y hongos dimórficos del filoplano diferenciándose significativamente de la agitación vertical utilizando sólo agua destilada, la que presentó valores de $67,12 \pm 34,48$ UFC/cm² ($p=0,02$), agitación vertical con arena ($p=0,003$) y de la maceración ($p=0,019$).

El agregado de arena a la agitación vertical (Método 3) no produjo cambios significativos en el recuento de UFC/cm² ($p=0,213$) según el test de Mann-Whitney. Se obtuvieron recuentos menores a los observados para agitación vertical, con una media de $34,96 \pm 1,72$ UFC/cm². La adición de arena a los tubos donde fueron agitadas las hojas, produjo daños en la superficie de éstas y liberación de clorofila al agua.

El agregado de Tween 80 permitió obtener un recuento absoluto mayor al método de agitación vertical, con un promedio de $96,97 \pm 130,35$ UFC totales/cm², sin embargo el aumento observado no fue estadísticamente significativo.

El método de maceración no produjo cambios significativos en la densidad estimada de levaduras y hongos dimórficos. Cuando se aplicó maceración a hojas en agua destilada, la densidad estimada aumentó de $67,12 \pm 34,48$ a $137,14 \pm 96,15$ UFC/cm² ($p=0,67$) mientras que cuando se aplicó sobre las hojas tratadas con Tween 80, las densidades estimadas disminuyeron de $96,97 \pm 130,35$ a $64,46 \pm 62,35$ ($p=0,7$)

La combinación de agitación vertical con procesos de sonicación a 96, 128 y 160 W durante 2 y 12 min no produjo cambios significativos en el promedio de UFC/cm² según el test de Wilcoxon. Sin embargo la mayor cantidad de UFC y el mayor incremento porcentual con respecto a sólo agitación vertical, se obtuvo con la aplicación de 96W durante 12 min. La aplicación de potencias superiores a 96 W resultó en menores recuentos de levaduras y hongos dimórficos. A 160 W se puede observar una disminución en la cantidad de levaduras y hongos dimórficos recuperados, al pasar de 2 min a 12 min de sonicación.

Mediante la aplicación de todas estas técnicas se logró el aislamiento de numerosas colonias, a las cuales fue posible clasificar en 48 morfotipos. De todos los morfotipos, el más abundante correspondió en sus características al de la especie *Aureobasidium pullulans*, siguiendo la descripción morfológica de Zalar *et al.* (2008).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Eficiencia de los métodos de aislamiento

El método tradicional de aislamiento de microorganismos del filoplan, consistente en agitar la muestra, en ocasiones sonicarla y diluir la suspensión resultante (Vinovarova & Babjeva, 1987; Robbs *et al.*, 1989; de Jager *et al.*, 2001; Buck & Burpee, 2002; Fonseca & Inácio, 2006). De los distintos métodos utilizados en este trabajo, la sonicación de 3 hojas a 96 W en volúmenes de 3 mL de agua (3 veces menor al utilizado comúnmente) (de Jager *et al.*, 2001) y con un inóculo de 100 µl sin realizar diluciones decimales (5 a 10 veces mayor al utilizado habitualmente) (de Jager *et al.*, 2001; Inácio *et al.*, 2002; Fonseca & Inácio, 2006), fue el más efectivo para aislar levaduras de *N. pumilio*. Se propone este método para estudios

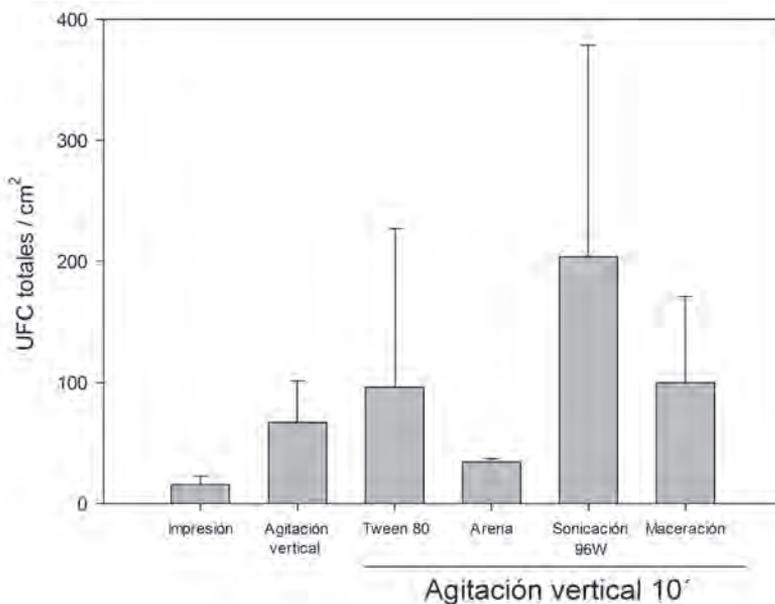


Fig. 1: UFC totales/cm² obtenidas por las distintas técnicas de aislamiento. La potencia del proceso de sonicación fue registrada en Watts (W).

posteriores que evalúen la diversidad y abundancia de microorganismos en este ambiente.

El método de impresión, permitió obtener un número de levaduras y hongos dimórficos inferior al alcanzado con las otras técnicas. Este método requirió del empleo de mayor cantidad de tiempo y fueron frecuentes la generación de grietas sobre el medio agarizado, las que dificultaron el crecimiento y el recuento de las unidades formadoras de colonia. Por otra parte se observó que con este protocolo se aisló mayor número de hongos con micelio, los cuales, al poseer una mayor velocidad de crecimiento que las levaduras y hongos dimórficos, previenen su desarrollo y/o ocultan su presencia. Por estas razones el método de impresión es desaconsejado para la caracterización de levaduras y hongos dimórficos en medio de cultivo MYP agar.

La adición del surfactante Tween 80, de arena como agente abrasivo y de un periodo de maceración, tampoco permitió aumentar la cantidad de levaduras y hongos dimórficos aislados y presentaron efectos que podrían resultar negativos. Gunasekera *et al.*, (1997), de Jager *et al.*, (2001) y Deak (2003), incrementaron sus estimaciones de levaduras de filoplano al utilizar Tween 80 como surfactante, sin embargo en este trabajo la adición de Tween 80 no produjo cambios. Por otra parte el Tween 80

produjo abundante espuma en los tubos agitados, la cual afectó la homogeneidad de la muestra. El agregado de arena redujo las estimaciones de las densidades de levaduras y hongos dimórficos sobre las hojas y además produjo daño sobre su superficie que se observó por la liberación de clorofila al sobrenadante. Las plantas producen y acumulan distintas sustancias antimicrobianas con actividad biológica como alcaloides, cumarinas, fenoles, flavonas y taninos (Wagner *et al.*, 1985). Es posible que el daño celular producido con este método haya ocasionado la liberación de compuestos de la hoja que pueden afectar el desarrollo de los hongos en el medio de cultivo lo que permitiría explicar las menores densidades estimadas, observadas en estas condiciones. El método de maceración duplicó la densidad estimada de levaduras y hongos dimórficos, al ser aplicado sobre hojas con agua destilada. Cuando se aplicó la maceración sobre hojas tratadas con Tween 80 se observó una disminución del 30% en la estimación de levaduras y hongos dimórficos, es posible que la exposición de estos microorganismos al producto Tween 80 durante 24 hs produzca una disminución de su viabilidad, sin embargo las concentraciones utilizadas en este estudio son consideradas inocuas para este tipo de organismos (Link, 2000).

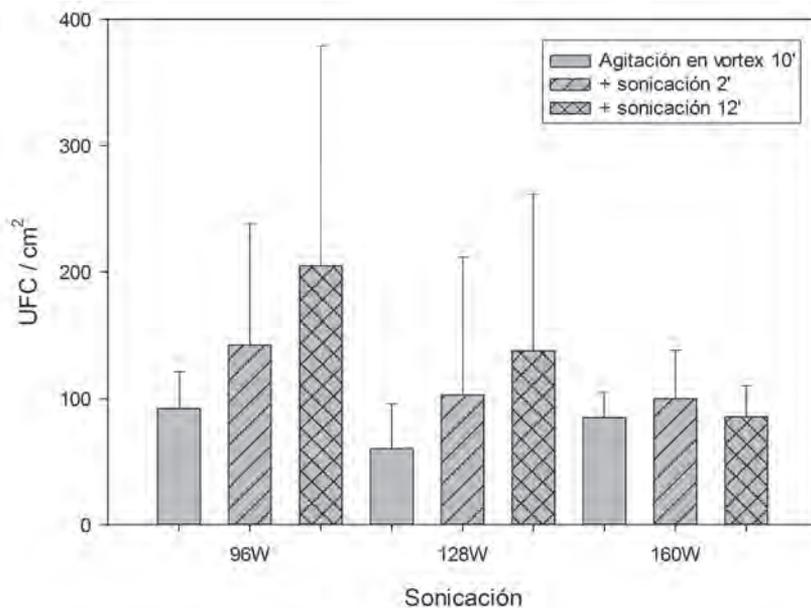


Fig. 2: Comparación de los distintos tiempos e intensidades de sonicación, como métodos de aislamiento de levaduras y hongos dimórficos, a partir de hojas de *N. pumilio*.

Los métodos que combinaron la agitación vertical por 10 min y sonicación a 96W y 128W por otros 12 min, fueron 2 veces más eficientes en la liberación de levaduras y hongos dimórficos del filoplano, con respecto al método de agitación vertical. Es importante destacar que el aumento de potencia produjo menores estimaciones de densidad, lo cual puede ser resultado de una reducción en la viabilidad de las células, ocasionada por el proceso de sonicación. Algunos autores indican que la sonicación de hongos dimórficos y levaduras, en elevadas intensidades y potencias resulta un método efectivo para ocasionar la lisis celular (Picard *et al.*, 1992; Yeates *et al.*, 1998). Sobre el filoplano existen especies pertenecientes a diferentes grupos filogenéticos, las cuales pueden presentar diferentes susceptibilidades al proceso de sonicación. Por esta razón se propone la utilización de un procedimiento con sonicación máxima de 96W durante 12 min, como la estrategia que permite estimar de forma más efectiva, la abundancia de levaduras y hongos dimórficos, mientras que se sugieren tiempos menores para una mejor estimación de la diversidad.

Determinación de la especie dominante

El análisis de morfotipos, realizado según Zalar *et al.* (2008) permitió establecer que sobre el filoplano de los *N. pumilio* del cerro Otto, *Aureobasidium pullulans* es la especie dominante, representando el 60% de los aislamientos (El 40% restante de los aislamientos, será identificado molecularmente en estudios posteriores). *Aureobasidium pullulans* es un hongo dimórfico perteneciente a la familia Dothioraceae, dentro del subfilum Pezizomycotina, la cual comprende hongos principalmente asociados con plantas (de Hoog, 1997). La inclusión de los hongos dimórficos como objeto de estudio, resulta importante para una mejor comprensión del ambiente de filoplano ya que muchas veces la representatividad de este grupo y en particular de la familia Dothioraceae es subestimada, por su exclusión en la mayoría de los estudios (Inácio *et al.*, 2002; Fonseca & Inácio, 2006). Esta especie ya ha sido citada sobre el filoplano de *N. antarctica* en turberas de la provincia de Tierra del Fuego donde también resultó ser la especie dominante (Searles *et al.*, 2001).

Rol ecológico de la adhesión de las células

En este trabajo se determinó que las levaduras

y hongos dimórficos se encuentran fuertemente adheridos al filoplano de *N. pumilio* y que la fortaleza de esta adhesión es similar entre todas las especies. Por esta razón métodos con distinto nivel de agresividad, recuperaron las mismas proporciones entre los tipos de levaduras y hongos dimórficos. Si bien la adhesión de las células fúngicas, es requisito para una exitosa colonización del filoplano, como para cualquier otra superficie (Andrews & Harris, 2000), existe una gran controversia acerca de la fortaleza de esta adhesión. Andrews & Buck (2002) determinaron que la unión de las especies adaptadas al ambiente de filoplano, resulta principalmente de tipo temporal y que la mayoría de las células pueden ser fácilmente removidas por el lavado de las hojas, por lo cual su habilidad para adherirse no pareciera jugar un rol importante en la colonización de la hoja y si lo haría la capacidad de desprenderse y migrar para una rápida recolonización. Por el contrario numerosos estudios ofrecen evidencia a favor de una fuerte adhesión entre el hongo y el filoplano. Una fuerte adhesión, le evita al hongo ser arrastrado por el agua de lluvia o viento (Epstein & Nicholson, 1997). La adhesión entre el hongo y la superficie de la planta permite al hongo dimórfico o la levadura establecer interacciones químicas que aseguran la compatibilidad. También facilita la interacción química entre la planta y el hongo (Jones & Epstein, 1990) e induce el tigmotropismo y la tigmodiferenciación (Epstein *et al.*, 1987; Kuo & Hoch, 1996, Chaky *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las levaduras y hongos dimórficos asociados al filoplano de *N. pumilio* son capaces de adherirse fuertemente. Algunos autores sugieren que esto puede ser una respuesta a las inclemencias climáticas o ser parte de un proceso de reconocimiento entre las levaduras y hongos dimórficos y la especie arbórea.

Diferencias con otros ambientes de filoplano y posibles explicaciones

La densidad de levaduras y hongos dimórficos determinada sobre el filoplano de *N. pumilio* mediante el método de aislamiento más efectivo, es hasta dos órdenes de magnitud menor que la registrada por otros autores en otras especies vegetales (Tabla 1). Especies vegetales en condiciones consideradas iguales o más hostiles que la cima del cerro Otto, presentan mayores densidades de levaduras y hongos dimórficos en sus

Tabla 1: Comparación de la densidad de levaduras y hongos dimórficos del filoplano de *N. pumilio* con el de otras especies a nivel mundial.

Especie	País	Cantidad/cm ²	Género dominante	Referencias
<i>N. pumilio</i>	Argentina	10 ³ -10 ⁴	<i>Aureobasidium</i>	Presente trabajo
<i>Malus</i> spp.	Nueva Zelanda	10 ⁴ -10 ⁵	<i>Cryptococcus</i> - <i>Rhodotorula</i>	Pennycook & Newhook, 1981.
Gramíneas de estepa	Rusia	10 ⁵ -10 ⁶	<i>Aureobasidium</i>	Vinovarova & Babjeva, 1987
<i>Mangifera indica</i>	Sudáfrica	10 ⁴ -10 ⁵	<i>Cryptococcus</i>	de Jager <i>et al.</i> , 2001.
<i>Ananas comosus</i>	Brasil	10 ³ -10 ⁴	<i>Cryptococcus</i> - <i>Rhodotorula</i>	Robbs <i>et al.</i> , 1989.
<i>Agrostis palustris</i>	USA	10 ⁴ -10 ⁵	<i>Cryptococcus</i>	Buck & Burpee, 2002.

*Se compara la densidad de levaduras y hongos dimórficos sobre la superficie de toda la hoja, se considero que en *N. pumilio* la densidad de estos microorganismos es 2.5 veces superior en la cara abaxial (que en este caso fue isopada con etanol 70%) que en la adaxial. Esto se desprende de análisis previos y concuerda con los resultados obtenidos por Pennycook & Newhook, (1981).

filoplanos. Esto permite pensar que la baja densidad de estos microorganismos podría ser resultado de características intrínsecas de la hoja de *N. pumilio*. Existen poblaciones bacterianas en hojas de leguminosas y cucurbitáceas que pueden alcanzar densidades de 10⁷ células/cm², en tanto que en hojas de cítricos y coníferas cultivadas en ambientes similares pueden alcanzar poblaciones máximas de 10³ células/cm² (Lindow *et al.*, 1978; Lindow, 1982). Una de las características intrínsecas de la hoja de *N. pumilio* puede ser la producción de flavonoides particulares de este género, siendo conocido que estos compuestos poseen un rol antimicrobiano (Cushnie & Lamb, 2005). Los flavonoides pueden generar adicionalmente una disminución en la herbivoría por parte de insectos (Rousseaux *et al.*, 2004), una de las principales vías de dispersión de levaduras y hongos dimórficos. También un exudado de nutrientes particular, en la hoja de *N. pumilio*, puede ser uno de los factores que determinan la baja abundancia de estos microorganismos (Dik *et al.*, 1991; Wilson & Lindow 1994).

Otra explicación para la baja abundancia de levaduras y hongos dimórficos sobre el filoplano del *N. pumilio* puede originarse en la capacidad de adherencia a la superficie de las hojas, lo cual en períodos de fuertes vientos y precipitaciones resulta una ventaja, que sin embargo limita la colonización de estos filoplanos en el periodo de brotación de las hojas, constituyendo una comunidad con migración limitada (Kinkel *et al.* 1989; Kinkel 1997; Hughes, 1990). En este sentido Kinkel *et al.* (1989),

determinaron que *Aureobasidium pullulans*, la especie dominante en este trabajo, posee migración limitada sobre las hojas de manzana y que sus densidades aumentaban en gran medida cuando inoculaba las hojas recién salidas de las yemas.

El presente trabajo sienta las bases metodológicas para el estudio de la superficie de las hojas en especies pertenecientes al género *Nothofagus*, ubicadas en Patagonia. Se establece a *Aureobasidium pullulans* como la especie dominante en este ambiente. Asimismo se plantean nuevos interrogantes sobre el equilibrio existente entre la capacidad de adherirse y dispersarse por parte de las levaduras y hongos dimórficos del filoplano.

BIBLIOGRAFÍA

- ANDREWS, J. H. 1992. Biological control in the phyllosphere. *Annu Rev Phytopathol.* 30: 603-635.
- ANDREWS, J. H. & R. F. HARRIS. 2000. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annu Rev Phytopathol.* 38: 145-180.
- ANDREWS, J. H. & J. W. BUCK. 2002. Adhesion of yeasts to leaf surfaces. In: LINDOW, S. E., E. L. HECHT-POINAR & V. J. ELLIOTT (eds.), *Phyllosphere microbiology*, pp. 53-65. APS, St Paul.
- BUCK, J. W. & L. L. BURPEE. 2002. The effects of fungicides on the phylloplane yeast populations of creeping bentgrass. *Can. J. Microbiol.* 48: 522-529.
- CABRERA, A. L. 1971. Fitogeografía de la Republica Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 14: 1-42.
- CHAKY, J., K. ANDERSON, M. MOSS & L. VILLANCOURT. 2001. Surface hydrophobicity

- and surface rigidity induce spore germination in *Colletotrichum graminicola*. *Phytopat.* 91: 558-564.
- CONTI, H. 1998. Características climáticas de la Patagonia. In: CORREA, M. (eds.), *Flora Patagónica*, pp. 31-47. *Colecc. Ci. Ins. Nac. Tecnol. Agropecu.* 8.
- CUSHNIE, T. T. P. & A. J. LAMB. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicro. Ag.* 26: 343-356.
- DAMM, U., G. J. M. VERKLEY, P. W. CROUS, P. H. FOURIE, A. HAEGI & L. RICCIONI. 2008. Novel *Paraconiothyrium* species on stone fruit trees and other woody hosts. *Persoonia* 20: 9-17.
- DE HOOG, G. S. 1997. Significance of fungal evolution for the understanding of their pathogenicity, illustrated with agents of phaeohiphomyces. *Mycoses* 40: 5-8.
- DE JAGER, E. S., F. C. WEHNER, & L. KORSTEN. 2001. Microbial ecology of the mango phylloplane. *Microb. Ecol.* 42: 201-207.
- DEAK, T. 2003. Detection, enumeration and isolation of yeasts. In: BOEKHOUT, T. & V. ROBERT (eds.), *Yeasts in food: beneficial and detrimental aspects*, pp. 39-68. Behr, Hamburg.
- DIMITRI, M. J. & V. A. MILANO. 1950. Fagáceas. Las plantas cultivadas en la República Argentina. Ministerio de agricultura y ganadería, Buenos Aires. Vol. 54: 1-40.
- DIK, A. J., FOKKEMA, N. J. & J. A. VAN PELT. 1991. Consumption of aphid honeydew, a wheat yield reduction factor by phyllosphere yeast under field conditions. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 97: 209- 232.
- EPSTEIN, L., L. B. LACETTI, R. C. STAPLES & H. C. HOCH. 1987. Cell substratum adhesive protein involved in surface contact responses of the bean rust fungus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 30: 373-388.
- EPSTEIN, L. & R. L. NICHOLSON. 1997. Adhesion of spores and hyphae to plant surfaces. In: CARROLL, G. & P. TUDZYNSKI (eds.), *The Mycota, vol V. Plant relationships, part A*, pp. 58-62. Springer, Berlin.
- FOKKEMA, N. J. 1991. The phyllosphere as an ecologically neglected milieu: a plant pathologist's point of view. In: ANDREWS, J. H. & HIRANO, S. S. (eds.), *Microbial ecology of leaves*, pp. 3-18 Springer, New York.
- FONSECA, A. & J. INÁCIO. 2006. Phylloplane yeasts. In: ROSA, C. A. & P. GABOR. (eds.). *The Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, pp. 263-302. Springer-Verlag.
- GONZALEZ, M. E., C. DONOSO, P. OVALLE & G. MARTINEZ-PASTUR. 2006. Lenga, roble blanco, leñar, roble de Tierra del Fuego. In: DONOSO, C. (eds.), *Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina*, pp. 486-500. Marisa Cuneo Ediciones, Valdivia.
- GUNASEKERA, T.S., N. D. PAUL & P. G. AYRES. 1997. Response of phylloplane yeast to UV-B (290-320nm) radiation: interspecific differences in sensitivity. *Mycol. Res.* 101: 779-785.
- HUGHES, T. P. 1990. Recruitment limitation, mortality, and population regulation in open systems: a case study. *Ecology* 71: 12-20.
- INÁCIO, J., P. PEREIRA, M. DE CARVALHO, A. FONSECA, M. T. AMARAL-COLLACS & I. SPENCER-MARTINS. 2002. Estimation and diversity of phylloplane mycobiota on selected plants in a Mediterranean type ecosystem in Portugal. *Microb. Ecol.* 44: 344-353.
- JONES, M. J. & L. EPSTEIN. 1990. Adhesion of macroconidia to the plant surface and the virulence of *Nectria haematococca*. *App. Environ. Microbiol.* 56: 3772-3778.
- KINKEL, L. L., J. H. ANDREWS & E. V. NORDHEIM. 1989. Fungal immigration dynamics and community development on apple leaves. *Microb. Ecol.* 18: 45-58.
- KINKEL, L. L. 1997. Microbial population dynamics on leaves. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 327-347.
- KOWALCHUK, G., E. YERGAU, J. LEVEAU, A. SESSITSCH & M. BAILEY. 2010. Plant-associated Microbial communities. In: WEN-TSO, L. & J. JANSSON (eds.), *Environmental Molecular Microbiology*, pp: 131-148. Caister Academic Press, New York.
- KUO, K. C. & HOCH H. C. 1996. Germination of *Phyllosticta ampelicida* picnidiospores: prerequisite of adhesion to the substratum and the relationship of substratum wettability. *Fung. Genet. Biol.* 20: 18-29.
- LEBARON, P., J. F. GHIGLIONE, J. F. FAJON, C. BATAILLER & P. NORMAND. 1998. Phenotypic and genetic diversity within a colony morphotype. *FEMS Microbiol. Lett.* 160: 137-143.
- LEBEN, C. 1965. Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 3: 209-230.
- LINDOW, S. E., D. C. ARNY, & C. D. UPPER. 1978. Distribution of ice nucleation active bacteria on plants in nature. *App. Env. Microb.* 36: 831-838.
- LINDOW, S. E. 1982. Population dynamics of epiphytic ice nucleation active bacteria on frost sensitive plants and frost control by means of antagonistic bacteria. In: Li, P. H., & A. SAKAI. (eds). *Plant Cold Hardiness*, pp. 395-416. Academic Press, New York.
- LINDOW, S. E. & J. H. J. LEVEAU. 2002. Phyllosphere microbiology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 238-243.
- LINK, A. 2000. Effect of non ionic surfactants on dissolution of polycyclic aromatic hydrocarbons from coal tar. *J. Hazard. Toxic and Radioac. Waste* 78: 2-4.

- MARTINEZ-PASTUR, G., J. CELLINI, P. PERI, R. VUKASOVIC, & C. FERNÁNDEZ. 2000. Timber production of *Nothofagus pumilio* (Poepp *et* Endl.) Krasser forests by a shelter wood system in Tierra del Fuego (Argentina). *For. Ecol. Manage.* 134: 153-162.
- MORRIS, C. E. 2001. Phyllosphere. In: BOEKHOUT, T. & V. ROBERT (eds.), *Encyclopedia of life sciences*, pp. 246-253. Nature Publishing Group, London.
- PHAFF, H. J. & W. T. STARMER. 1987. Yeasts associated with plants, insects and soils. In: ROSE, A.H. & J. S. HARRISON (eds.), *The Yeasts I: Biology of Yeasts*, pp.123-179. Academic Press, London.
- PICARD, C., C. PONSONNET, E. PAGET, X. NESME, & P. SIMONET. 1992. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2717-2722.
- PREMOLI, A. C. & P. MATHIASSEN. 2011. Respuestas ecofisiológicas adaptativas y plásticas en ambientes secos de montaña: *Nothofagus pumilio*, el árbol que acaparó los Andes australes. *Ecol. Austral.* 21: 251-269.
- PUNTIERI, J., C. BRION, D. BARTHÉLÉMY & M. SOUSA. 2001. Variación en el tamaño y la composición de las yemas de *Nothofagus pumilio* y *Nothofagus dombeyi* (Fagaceae). *Darwiniana.* 39: 1-10.
- ROBBS, P. G., A. N. HAGLER, & L. C. MENDONÇA-HAGLER. 1989. Yeasts associated with a pineapple plantation in Rio de Janeiro, Brasil. *Yeast.* 5: 485-489.
- ROSE, A. H. 1975. Growth and handling of yeast. In: PRESCOTT, D. M. (ed.), *Methods Cell Biol.*, pp. 1-16. American Society for Cell Biology. New York.
- ROUSSEAUX, M. C., R. JULKUNEN-TIITTO, P. S. SEARLES, A. L. SCOPEL, P. J. APHALO & C. L. BALLARÉ. 2004. Solar UV-B radiation affects leaf quality and insect herbivory in the southern beech tree *Nothofagus antarctica*. *Oecologia* 138: 505-512.
- SEARLES, P. S., B. KROPP, S. D. FLINT & M. M. CALDWELL. 2001. Influence of solar UV-B radiation on peatland microbial communities of southern Argentina. *New Phytol.* 152: 213-221.
- VINOVAROVA, M. E. & I. P. BABJEVA. 1987. Yeast fungi in steppe communities (en ruso). *Vestn Moskv Univ. Ser. Pochvoved.* 2: 43-48.
- WAGNER, H., H. HIKINO & N. R. FARNSWORTH. 1985. *Economic and medicinal plant research*. Academic Press, New York.
- WILSON, M. & S. E. LINDOW. 1994. Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4468-4477.
- WINDELS, C. E. & S. E. LINDOW. 1985. Biological control on the phylloplane. In: WILLIAMS & WILKINS (eds.), *Phylloplane environment*, pp. 254-273. APS, St. Paul.
- YEATES, C, M. R. GILLINGS, A. D. DAVISON, N. ALTAVILLA & D. A. VEAL. 1998. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biological Procedures Online* 1: 40-47.
- ZALAR, P., C. GOSTINCAR, D. S. DE HOOG, V. URSIC, M. SUDHADHAM & N. GUNDE-CIMERMAN. 2008. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Stud. Mycol.* 61: 21-38.

Recibido el 19 de marzo de 2012, aceptado el 28 de septiembre de 2012.

