

**CATASTRO DE HONGOS ENDOFITOS MICELIALES CULTIVABLES EN HOJAS
DE LA HIERBA MARINA *Thalassia testudinum* EN PLAYA BUYÉ, CABO ROJO,
PUERTO RICO**

Por

Selimar Malavé Vega

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

Biología

**UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2006**

Aprobado por:

Carlos A. Muñoz, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Carlos J. Santos, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Sandra L. Maldonado Ramírez, Ph.D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Mildred Zapata, Ph.D.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Lucy Bunkley-Williams, Ph.D.
Director de Departamento

Fecha

ABSTRACT

Endophytic fungi live inside plant tissues without any external manifestation. As reported previously, they play an important role in the vegetal tissues they inhabit. A study of the fungal endophytes of *Thalassia testudinum* in Playa Buyé, Cabo Rojo, Puerto Rico, was conducted to isolate and identify the cultivable micelial endophytes associated to healthy leaves of this seagrass, which is the most common and abundant in the Caribbean. The plant serves as habitat for marine organisms and as food for marine turtles. Two samplings were performed: one in July and another in December 2004. Leaves were surface sterilized in 0.5% sodium hypochlorite solution and rinsed twice in distilled water. Fragments of the sterilized leaves (apex, center and base) were placed in Marine Agar and incubated for a week at 25°C. *Aspergillus fumigatus* (38.3%), *Curvularia brachyspora* (12.8%), *Aspergillus flavus* (10.6%), *Cladosporium oxysporum* (10.6%), *Fusarium* sp. (8.5%), *Acremonium* sp. (4.3%), *Cladosporium* sp. (2.1%), *Cladosporium cladosporioides* (2.1%), *Curvularia pallescens* (2.1%), *Penicillium janthinellum* (2.1%), *Aspergillus ustus* (2.1%), *Botrytis* sp. (2.1%) and an unidentified morphotype (2.1%) were isolated. This is the first report of micelial endophytes associated to healthy leaves of *T. testudinum* in Puerto Rico. *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ustus* and *Cladosporium oxysporum* are reported as endophytes for the first time.

RESUMEN

Los hongos endofitos crecen internamente en los tejidos vegetales sin manifestación externa alguna. Estudios previos demuestran que éstos tienen un rol importante en los tejidos vegetales que habitan. Se realizó un estudio sobre hongos endofitos asociados a *Thalassia testudinum* en Playa Buyé, Cabo Rojo, Puerto Rico, para aislar e identificar endofitos miceliales cultivables en hojas sanas de esta hierba marina, que es la más común y abundante en el Caribe. La planta sirve de hábitat para organismos marinos y es fuente de alimentos para las tortugas marinas. Se realizaron dos muestreos, uno en julio y otro en diciembre 2004. Las hojas fueron esterilizadas en una solución de hipoclorito de sodio (0.5%) y enjuagues con agua destilada. Los fragmentos de tejido esterilizado (ápice, centro y base) se colocaron en Agar Marino y se incubaron a 25°C por una semana. Se aisló a *Aspergillus fumigatus* (38.3%), *Curvularia brachyspora* (12.8%), *Aspergillus flavus* (10.6%), *Cladosporium oxysporum* (10.6%), *Fusarium* sp. (8.5%), *Acremonium* sp. (4.3%), *Cladosporium* sp. (2.1%), *Cladosporium cladosporioides* (2.1%), *Curvularia pallescens* (2.1%), *Penicillium janthinellum* (2.1%), *Aspergillus ustus* (2.1%), *Botrytis* sp. (2.1%) y un morfotipo no identificado (2.1%). Este es el primer informe sobre hongos endofitos miceliales cultivables asociados a hojas sanas de *T. testudinum* en Puerto Rico. *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ustus* y *Cladosporium oxysporum* son reportados como endofitos por primera vez.

© Selimar Malavé Vega 2006

DEDICATORIA

A mi padre, Efraín Malavé, ya que desde el cielo siempre me envió su bendición y la fuerza para continuar y realizar mis metas. A mi madre, Antonia M. Vega, por su amistad, apoyo y compañía incondicional. Sus oraciones me ayudaron a continuar y no mirar atrás. A mi hermano Carlos E. Malavé por estar siempre conmigo y por confiar en mí.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todas las personas que confiaron en mí y me brindaron todo su apoyo durante la realización de esta investigación. Primeramente a Dios por darme la salud, fortaleza y el intelecto necesario para continuar día a día.

Al Departamento de Biología del Recinto Universitario de Mayagüez por brindarme las facilidades de laboratorio para poder trabajar. A mi consejera de tesis, Dra. Sandra L. Maldonado Ramírez, gracias por darme la oportunidad de trabajar con usted, por confiar en mis capacidades, por su compañía y ayuda incondicional en los muestreos. Siempre estuvo disponible para escucharme y darme consejos tanto en el plano académico como en el personal. A su esposo, Hernán Torres, por su orientación y colaboración imprescindible en el diseño experimental y los muestreos.

A los miembros de mi comité, los doctores Carlos J. Santos y Carlos A. Muñoz, gracias por formar parte de mi comité graduado, sus sugerencias y por el tiempo dedicado a la corrección de mi tesis.

Al Departamento de Recursos Naturales y Ambientales por otorgarme el permiso de investigación científica (DRNA: 04-IC-045) para la colección de *T. testudinum* en Playa Buyé, Cabo Rojo, P.R. Se agradece al Dr. Ernesto O. Riquelme por sus recomendaciones en la elaboración del diseño experimental y asesoría en la aplicación de las pruebas estadísticas.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio por toda su ayuda en este trabajo, por su compañía y por el tiempo compartido. A mi amiga Gloriner Morell por toda su ayuda, apoyo y por siempre estar conmigo. A los muchachos, Luis Ortiz, Gualberto Rosado y Juan Quevedo por

ayudarme con la documentación fotográfica y por toda su cooperación. A Carlos Virella por su apoyo. A mis compañeras graduadas y amigas, Jessica Ruperto y Bárbara Sánchez, por hacerme compañía y darme terapia en momentos de mucha tensión.

A la Sra. Carolyn Rivera, técnica del laboratorio de micología, por su ayuda en la identificación de algunos organismos y por sus sabios consejos tanto a nivel profesional como personal.

Al Sr. José Almodóvar, técnico del Centro de Microscopía del Departamento de Biología-RUM, por su dedicación y asistencia en la toma de fotos de microscopía de Nomarski y electrónica de rastreo.

Para finalizar, a mi familia quienes siempre están conmigo y me dan la fortaleza y el motivo para continuar luchando exitosamente en mi vida profesional y personal.

TABLA DE CONTENIDO

ABSTRACT.....	ii
RESUMEN.....	iii
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
TABLA DE CONTENIDO.....	viii
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Hongos en el medio ambiente.....	3
2.2 Hongos endofitos y su importancia.....	3
2.3 Hongos endofitos en plantas de ambientes terrestres.....	5
2.3.1 Estudios sobre hongos endofitos en Puerto Rico.....	5
2.3.2 Estudios sobre hongos endofitos en otros países.....	6
2.4 Hongos endofitos aislados de ambientes marinos.....	8
2.5 Hierbas marinas.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1 Época y lugar de muestreo.....	12
3.2 Colección de muestras.....	13
3.3 Procesamiento del tejido vegetal.....	13

3.4 Recuperación de hongos endofitos cultivables.....	16
3.5 Identificación de hongos endofitos miceliales cultivables.....	16
3.6 Microscopía.....	18
3.7 Claves taxonómicas.....	18
3.8 Análisis estadístico de los datos.....	18
4. RESULTADOS.....	20
4.1 Tasas de infección total y por muestreo.....	20
4.2 Tasas de infección por sección del tejido muestreado.....	20
4.3 Hongos endofitos miceliales cultivables recuperados.....	22
4.4 Caracterización de los hongos endofitos miceliales cultivables aislados.....	26
5. DISCUSIÓN.....	47
5.1 Tasas de infección total y por muestreo.....	47
5.2 Tasas de infección por sección del tejido muestreado.....	47
5.3 Hongos endofitos miceliales cultivables recuperados.....	48
6. CONCLUSIONES.....	53
7. RECOMENDACIONES.....	54
LITERATURA CITADA.....	55
APÉNDICE A – Pradera de <i>Thalassia testudinum</i>.....	61
APÉNDICE B – Hongos endofitos aislados.....	62
APÉNDICE C – Análisis estadístico de los datos.....	63
APÉNDICE D - Definiciones de términos.....	65

LISTA DE TABLAS

Tablas	Páginas
Tabla 1. Hongos endofitos aislados y tasa de infección por sección de la hoja y por muestreo.....	21
Tabla 2. Frecuencia relativa de géneros y morfotipo aislados durante los muestreos.....	24

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Páginas
Figura 1. Anatomía de <i>T. testudinum</i>	11
Figura 2. Área de muestreo, praderas de <i>T. testudinum</i> sumergidas, en Playa Buyé, Cabo Rojo, P.R.....	12
Figura 3. Secciones de hoja sana de <i>T. testudinum</i> : ápice (A), centro (C) y base (B).....	15
Figura 4. Tasa de infección por sección de tejido incubado en cada muestreo.....	22
Figura 5. Frecuencia relativa de las especies identificadas en ambos muestreos.....	25
Figura 6. Características morfológicas de <i>Botrytis</i> sp.....	27
Figura 7. Características morfológicas de <i>Cladosporium</i> sp.....	29
Figura 8. Características morfológicas de <i>Cladosporium cladosporioides</i>	30
Figura 9. Características morfológicas de <i>Cladosporium oxysporum</i>	32
Figura 10. Características morfológicas de <i>Acremonium</i> sp.....	33
Figura 11. Características morfológicas de <i>Fusarium</i> sp.....	35
Figura 12. Características morfológicas de <i>Penicillium janthinellum</i>	37
Figura 13. Características morfológicas de <i>Curvularia pallescens</i>	39
Figura 14. Características morfológicas de <i>Curvularia brachyspora</i>	40
Figura 15. Características morfológicas de <i>Aspergillus ustus</i>	42
Figura 16. Características morfológicas de <i>Aspergillus fumigatus</i>	43
Figura 17. Características morfológicas de <i>Aspergillus flavus</i>	45
Figura 18. Características morfológicas de morfotipo 1.....	46

1. INTRODUCCIÓN

Las hierbas marinas son angiospermas adaptadas a vivir en ambientes salinos (Durako, 1988; García, 1990) de hojas alargadas y raíces y rizomas extensos (Fonseca, 1992). Éstas sirven de hábitat y alimento para muchas especies marinas, estabilizan sedimentos y evitan la erosión de las costas (Durako, 1988; García, 1990). Debido a su importancia en el ecosistema marino se han realizado proyectos de restauración tanto en Estados Unidos como en Puerto Rico (Fonseca, 1992; Reyes, 1998).

Las praderas de hierbas marinas representan uno de los ecosistemas marinos más comunes en Puerto Rico. *Thalassia testudinum* Banks & Soland. ex Koenig, *Syringodium filiforme* Kützing, *Halodule wrightii* Ascherson, *Halophila decipiens* Ostenfeld y *Ruppia maritima* Linnaeus representan las especies de hierbas marinas en Puerto Rico, siendo *T. testudinum* la más común y abundante en el Caribe. Sus hojas anchas de hasta 2cm forman ramilletes de 3 a 7 hojas (García, 1990). En las hojas de *Thalassia* se han encontrado minerales nutritivos esenciales tales como calcio, fósforo, potasio y magnesio, los cuales hacen de este tejido vegetal una fuente de alimento potencial para muchos organismos marinos (Vicente et al., 1978).

Asociados a *Thalassia* podemos encontrar una gran diversidad de organismos (García, 1990). *Labyrinthula* (Labyrinthulomycota) es un protista patógeno responsable de controlar la densidad de las praderas de esta hierba marina y de reducir su razón fotosintética provocando un alza en su índice de mortalidad (Durako y Kuss, 1994; Vergeer y den Hartog, 1994). Sin embargo, se ha confirmado que *T. testudinum* produce un metabolito secundario

bioactivo (glucósidos de flavona sulfatados) contra dicho microorganismo y contra hongos marinos zoospóricos (Jensen et al., 1998). *Lindra thalassiae* es otro patógeno asociado a manchas necróticas en las hojas de *T. testudinum*, donde éste produce sus cuerpos fructíferos (Calzada, 1988).

Wilson (1998) documentó por primera vez la presencia de hongos endofitos en *T. testudinum*, *Halodule bermudensis* y *Syringodium filiforme*. Se presume que estos hongos establecen una relación mutualista con la planta (Faeth, 2002). Hasta el momento no se ha determinado el rol de las especies endofitas en *T. testudinum* ni en el ecosistema donde habitan. En Puerto Rico, se han realizado varios estudios preliminares sobre la micoflora endofítica asociada a *T. testudinum*. Sin embargo, este estudio representa el primer estudio estacional (comparando verano e invierno) relacionado a la presencia de hongos endofitos miceliales cultivables en tejido foliar de *T. testudinum* en el Caribe.

Los objetivos principales de esta investigación consistieron en: 1) identificar los hongos endofitos miceliales cultivables aislados de las hojas de *T. testudinum*, 2) realizar el primer catastro de hongos endofitos miceliales cultivables asociado al tejido interno sano de hojas de *T. testudinum* en Puerto Rico y 3) relacionar la presencia de la micoflora endofítica con la época del año y la sección de tejido muestreado.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Hongos en el medio ambiente

Los hongos son organismos eucariotas heterótrofos, que tienen un rol importante en el medio ambiente. Son responsables de la descomposición de materia orgánica, la producción de antibióticos, micotoxinas y diversos compuestos bioactivos. Muchos son patógenos de plantas y animales y algunas especies sirven de alimento para los seres humanos. Los hongos son capaces de establecer relaciones simbióticas con otros organismos, asociándose al tejido vegetal como patógenos o endofitos (Alexopoulos et al., 1996). Un hongo fitopatógeno es aquel que causa lesiones y sintomatología en los tejidos vegetales (Ulloa y Hanlin, 2000), causando daños considerables a los cultivos agrícolas e influyendo negativamente a la economía (Gold et al., 2001). En contraste, un hongo endofito es aquel que habita en los tejidos vegetales sin causar daño (Petrini, 1991; Lodge y Cantrell, 1995; Wilson, 1995; Macarthur y McGee, 2000; Carlile, 2001; Faeth, 2002).

2.2 Hongos endofitos y su importancia

Se ha documentado la presencia de uno o más endofitos habitando diversas especies de plantas (Strobel y Daisy, 2003), formando una relación mutualista donde la planta le ofrece albergue y nutrientes al hongo, mientras éste provee resistencia contra herbívoros, insectos, hongos patógenos, enfermedades y sequía (Lodge y Cantrell, 1995; Alexopoulos, 1996; Carlile, 2001; Clay y Schardl, 2002). Esta resistencia de la planta puede relacionarse a la producción de toxinas y metabolitos secundarios por algunas especies endofíticas (Lodge y Cantrell, 1995; Clay y Schardl, 2002; Faeth, 2002). Se ha demostrado que algunos de estos

metabolitos secundarios (aminas, amidas, derivados de indol, esteroides y terpenoides, entre otros) tienen efectos antimicrobiales (Tan y Zou, 2001; Strobel y Daisy, 2003). Por ejemplo, *Phomopsis* produce fomosicalasina, un metabolito con acción inhibitoria contra *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* y *Candida tropicales* (Horn et al., 1995). Especies de *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Phoma* y *Phomopsis* son endofitos productores de taxanos, componentes de la droga anticáncer taxol (Caruso et al., 2000). Otro endofito, *Gliocladium* sp., asociado a *Eucryphia cordifolia*, produce compuestos contra *Pythium ultimum* y *Verticillium dahliae* (Stinson et al., 2003).

Se ha comprobado que *Epichloë* en la hierba *Brachypodium sylvaticum* es capaz de producir metabolitos contra el herbívoro *Spodoptera frugiperda*. En este estudio se utilizó un grupo control (no infectado) y uno experimental (infectado con el endofito) de *B. sylvaticum*. Se determinó que las larvas que infectaron el grupo control tenían una tasa de mortalidad menor en comparación a las larvas del grupo experimental, debido a la síntesis de toxinas capaces de afectar negativamente a las larvas. Estos hallazgos sugieren que la resistencia de la planta a *S. frugiperda in vitro* pudiera ser similar con cualquier otro herbívoro *in vivo* (Brem y Leuchtman, 2001).

La diversidad de hongos endofitos asociados a especies vegetales está relacionada con la edad de las hojas, localidad (ambientes terrestres o ambientes acuáticos) y clima de la planta ya sea en zonas templadas o tropicales (Fröhlich et al., 2000; Macarthur y McGee, 2000; Arnold y Herre, 2003). Se han aislado endofitos de plantas en zonas templadas (Lodge et al, 1996; Schulthess y Faeth, 1998; Arnold et al., 2006), zonas tropicales (Lodge et al., 1996; Menéndez et al., 1997; Suryanarayanan et al., 2003; Arnold y Herre, 2003; Salgado y

Cepero, 2005), de ambientes terrestres (Lodge, 1996; Menéndez et al., 1997; Schulthess y Faeth, 1998; Suryanarayanan et al., 2003; Arnold y Herre, 2003; Salgado y Cepero, 2005; Arnold et al., 2006) y de ambientes marinos (Mehdi y Saifullah, 1992; Wilson, 1998; Höller et al., 2000).

2.3 Hongos endofitos en plantas de ambientes terrestres

Varias especies de endofitos pueden ser aisladas de una misma planta, demostrando que no necesariamente hay especificidad entre los hongos endofitos y un género hospedero en particular (Petrini, 1986). Asimismo, han aislado endofitos de diversas familias de plantas, por ejemplo, Sapotaceae, Orchidaceae, Poaceae y Arecaceae, entre otras (Lodge et al., 1996; Bayman et al., 1997; Schulthess y Faeth, 1998; Marshall et al., 1999).

2.3.1 Estudios sobre hongos endofitos en Puerto Rico

En Puerto Rico, se han realizado pocos estudios relacionados a hongos endofitos. Lodge et al. (1996) lograron aislar endofitos de un 90-95% de los pedazos de hojas y peciolas de *Manilkara bidentata* (Sapotaceae). Veintidós especies endofitas fueron identificadas (79-88% de los aislados), entre ellas *Xylaria* sp., *Colletotrichum crassipes*, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. y *Trichoderma* sp. *Chaetomium sphaerale* fue únicamente aislado de los peciolas. Los investigadores demostraron que la frecuencia de especies varía de acuerdo al tejido foliar estudiado (hoja *versus* peciolo) (Lodge et al., 1996).

Bayman et al. (1997) aislaron endofitos de hojas y raíces de siete especies de *Lepanthes* (Orchidaceae) del Bosque Nacional del Caribe y Bosque Carite, recuperando con

mayor frecuencia los géneros *Xylaria* y *Rhizoctonia*. En este estudio se determinó que la variedad endofítica por planta fue mayor en comparación a la variedad endofítica total por las especies de plantas. La micoflora endofítica en *Lepanthes* presentó diferencias dentro de una misma región de la planta, entre las regiones de una misma planta y entre las especies de plantas estudiadas (Bayman et al., 1997).

Espola (2005) logró aislar hongos endofitos de las hojas de *Thrinax morrisii* (Arecaceae). De un total de 513 hongos obtenidos de los discos de hojas, 49.1% fueron asociados a algún género o morfotipo, 9.9% resultó en micelios estériles y 41% no crecieron luego de ser subcultivados. Se identificaron los géneros *Annellolacinia* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp. y *Pithomyces maydicus*. Este estudio constituye el primer reporte del género *Annellolacinia* como endofito (Espola, 2005).

Vega et al. (2006) recuperaron más de 700 aislados de endofitos de diferentes plantaciones de café en Puerto Rico (68), México (119), Hawaii (240) y Colombia (281), siendo los más comunes *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Xylaria* sp. y otros hongos entomopatógenos como *Acremonium* sp., *Beauveria* sp., *Cladosporium* sp. y *Paecilomyces* sp. La diversidad de géneros fue similar entre las plantaciones; pero su rol en los tejidos de la planta de café aún es desconocido.

2.3.2 Estudios sobre hongos endofitos en otros países

Se han realizado diversos estudios relacionados a hongos endofitos en diferentes países. Menéndez et al., (1997) identificaron tres patrones de colonización de endofitos (dos intercelulares y uno intracelular) en ejemplares de *Juncus imbricatus* var *chamissonis* en

Buenos Aires, Argentina. A partir de cortes de tejido de hojas y tallos se pudo determinar que *Alternaria* sp. y *Pleospora togwotiensis* colonizan intercelularmente mientras que *Stagonospora* sp. coloniza intracelularmente (Menéndez et al., 1997). Para 1999, Marshall et al., demostraron la presencia endofítica de *Neotyphodium* sp. y *Acremonium* sp. en poblaciones de *Triticum* sp. en Turquía. Estos endofitos son capaces de afectar la ecología y distribución de especies de *Triticum* y pudieran ser responsables del control de herbívoros en dichas plantas (Marshall et al., 1999).

Estudios realizados en palmas del género *Licuala*, de la región de Australia, demostraron la presencia de los géneros *Xylaria*, *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis* y *Verticillium* en el tejido vegetal. En el estudio se aisló un mayor número de endofitos del ápice de los peciolo en comparación con los aislados de la base de los peciolo, lo cual sugiere que los endofitos en *Licuala* sp. entran a través de la hoja hasta el peciolo (Fröhlich et al., 2000). Canon y Simmons (2002) aislaron de doce especies de árboles del Bosque Iwokrama en Guyana un total de sesenta y cuatro endofitos de 2520 muestras. *Colletotrichum* sp., *Nodulisporium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp. y micelio estéril fluctuaron entre los de mayor frecuencia (Canon y Simmons, 2002).

En la Isla de Barro Colorado en Panamá, se estudió la colonización por endofitos de acuerdo al hábitat y a la edad de las hojas de *Theobroma cacao* (Malvaceae), resultando sin diferencia significativa la incidencia de endofitos de acuerdo al hábitat, pero con mayor frecuencia de estos en hojas maduras (Arnold y Herre, 2003). De hojas de esta misma planta se logró aislar una alta diversidad de endofitos como *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp. y *Xylaria* sp. (Arnold et al., 2003).

Salgado y Cepero (2005) trabajaron con la micoflora endofítica de *Rosa hybrida* en Bogotá, Colombia. De quinientos sesenta fragmentos de las hojas sanas utilizadas se recuperaron 92 endofitos, de los cuales 41 fueron denominados como micelio estéril, 31 fueron identificados hasta géneros y 20 no fueron identificados. Los géneros aislados en mayor frecuencia fueron *Acremonium* sp., *Cladosporium* sp., *Nigrospora oryzae*, *Xylaria* sp., *Phoma* sp., *Aureobasidium* sp., *Chaetomium globosum*, *Gliocladium virens* y micelio estéril.

2.4 Hongos endofitos aislados de ambientes marinos

Al igual que en plantas terrestres también se pueden encontrar hongos endofitos asociados a plantas marinas o de ambiente costero. En la región de Pakistan, aislaron 14 especies endofitas de hojas sanas del mangle negro (*Avicennia marina*). Estas especies incluyen *Alternaria maritima*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sulfuris*, *Aureobasidium pullulans*, *Bispora* sp., *Botrytis* sp., *Cladosporium* sp., *Humicola* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Phoma* sp., *Pythium* sp. y *Rhizopus* sp. (Mehdi y Saifullah, 1992). Wilson aisló endofitos de las hierbas marinas *Thalassia testudinum*, *Halodule bermudensis* y *Syringodium filiforme* en Bermuda por primera vez en el 1998. Se seleccionaron cuatro lugares de muestreo y se tomaron muestras en los meses de mayo 1996, marzo 1997 y agosto 1997 de las tres hierbas marinas para comparar la incidencia de endofitos entre las hierbas marinas, áreas de muestreo y época de los muestreos. Se aislaron once especies de hongos y una bacteria. De *T. testudinum* se recuperaron en mayor frecuencia *Penicillium sclerotiorum*, *Sporobolomyces holsaticus* y *Aspergillus granulosis* (mayo 1996); *Aspergillus niger* (marzo 1997) y *Candida utilis* y *Aspergillus granulosis* (agosto 1997). De *S. filiforme* se recuperó

con mayor incidencia *Tridentaria carnivora* y *Candida utilis* en marzo 97 y de *H. bermudensis* se recuperó *Penicillium sclerotium* en mayo 1996 y *Candida utilis* en agosto 1997. Se determinó que algunos endofitos tienen la tendencia de invadir una especie de hierba marina en particular y que son más abundantes cuando la temperatura del agua es mayor (Wilson, 1998). Maldonado et al. (2003) han documentado la presencia de *Aspergillus* sp., *A. carneus*, *A. flaviceps*, *A. niveus*, *Penicillium* sp., *Acremonium* sp. y *Nigrospora* sp., entre otros, asociados a *T. testudinum* en las playas de Lajas y Cabo Rojo, Puerto Rico (Maldonado et al., 2003).

2.5 Hierbas marinas

Las hierbas marinas son angiospermas adaptadas para vivir completamente sumergidas en el mar que proveen importantes hábitats para organismos marinos en las costas del trópico (Reyes, 1998). Consideradas productores primarios, sirven de refugio y fuente de alimento para otros organismos ya sean animales, algas, hongos o bacterias, estabilizan los sedimentos y reducen la erosión de las costas (Durako, 1988; García, 1998; Devlin, 1999). Se pueden reproducir asexualmente por extensión apical del rizoma (manteniéndose en la misma región) y por reproducción sexual mediante semillas (con la cual pueden colonizar nuevas regiones) (Fonseca, 1992; García, 1990). Estas especies representan un grupo de plantas terrestres que invadió en tiempos remotos el ambiente marino. En Puerto Rico, las praderas de hierbas marinas incluyen *Thalassia testudinum*, *Syringodium filiforme*, *Halodule wrightii*, *Halophila decipiens* y *Ruppia maritima* (García, 1990). *T. testudinum* (Hydrocharitaceae), la hierba marina de mayor abundancia en el Caribe,

conocida como hierba de tortuga, ya que sirve de alimento para las tortugas marinas (Vicente et al., 1978; García, 1990). Presenta hojas anchas de hasta 2cm, no diferenciadas del peciolo y rizomas subterráneos de $\frac{1}{2}$ cm de ancho, de los cuales se originan las raíces. Las hojas viejas rodean las hojas nuevas formando un envainado (Figura 1) (García, 1990). La especie forma comunidades complejas donde encontramos grandes cantidades de organismos asociados como algas, invertebrados, protozoarios, corales, crustáceos, camarones, peces, caracoles, erizos, estrellas y pepinos de mar, entre otros (García, 1990). Debido a su importancia en el ecosistema, se han realizado esfuerzos para su restauración en los Estados Unidos, implantando técnicas de cultivo para el desarrollo de propágulos, el uso de fertilizantes, el monitoreo constante y el reemplazo de especies en áreas que se han destruido (Fonseca, 1992).

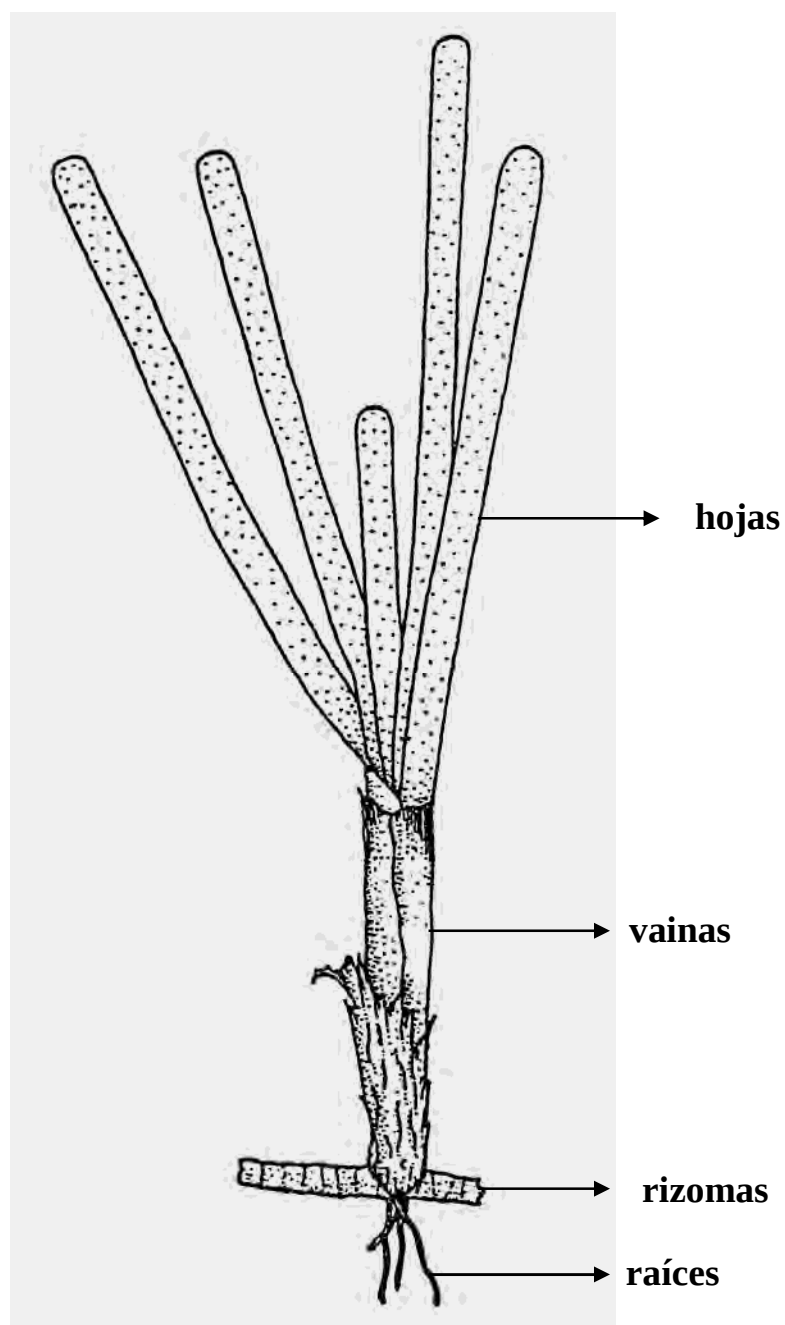


Figura 1. Anatomía de *T. testudinum*. Modificado por Phillips (1982).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Época y lugar de muestreo

Se realizaron dos muestreos durante esta investigación. El primer muestreo (M1) fue en julio 2004 (época de verano) y el segundo muestreo (M2) fue en diciembre 2004 (época de invierno). Se delimitó un área de estudio de 30m² en Playa Buyé en Cabo Rojo, Puerto Rico (posición geográfica de 18° 02' 45.3" N y 67° 12' 11.5" W). El área fue dividida en nueve cuadrantes de 10m² cada uno (Figura 2).



Figura 2. Área de muestreo, praderas de *T. testudinum* sumergidas, en Playa Buyé en Cabo Rojo, P.R.

En esta área se encontró una vasta pradera de *T. testudinum*, hábitat de peces, crustáceos, equinodermos y corales, entre otros. La pradera se ve afectada directamente por las marejadas y en ocasiones las hojas quedan totalmente expuesta a la radiación solar. El área también es frecuentada por botes que anclan directamente en ella. La temperatura del agua se mantuvo en 26°C durante ambos muestreos. La salinidad (3.2‰ para ambos muestreos) se determinó utilizando un refractómetro (modelo RHS-28).

3.2 Colección de muestras

Dos plantas de *T. testudinum* fueron recolectadas de forma aleatoria de cada uno de los 9 cuadrantes para un total de dieciocho plantas en cada muestreo. Las mismas fueron colectadas junto al sedimento y transportadas hasta el laboratorio en bolsas Ziploc® conteniendo agua salada para evitar la deshidratación y pérdida del contenido intercelular.

3.3 Procesamiento del tejido vegetal

En el laboratorio, las plantas se enjuagaron con agua potable para eliminar los sedimentos. Las hojas fueron desprendidas de los rizomas cuidadosamente sin romperlas ya que éstas representaban los órganos de interés para la investigación. Se escogieron treinta y seis hojas en total (dos hojas sanas de cada planta), sin ningún tipo de sintomatología (manchas foliares, lesiones, zonas cloróticas o necróticas). Las hojas fueron esterilizadas superficialmente utilizando una solución acuosa de hipoclorito de sodio al 0.5% (1 min) y dos enjuagues con agua destilada (1 min cada uno) con el propósito de eliminar todo tipo de organismos epífitos asociados al tejido superficial (Maldonado et al., 2003). Cada hoja se

secó con papel toalla estéril (Wilson, 1998) y se colocaron por separado en platos Petri estériles grandes (100 x 15mm) rotulados con la información de procedencia de cada hoja (cuadrante, número de la planta en el cuadrante y número de la hoja por planta).

Las hojas previamente esterilizadas se dividieron en tres secciones ápice (A), centro (C) y base (B) utilizando tijeras estériles (Figura 3). Cada una de estas porciones se dividió en 4 fragmentos de aproximadamente 2mm^2 , obteniendo un total de 12 fragmentos/hoja ya que en un estudio previo se determinó que aumentar el número de fragmentos por hoja aumenta la posibilidad de recuperar un mayor número de especies endofitas (Gamboa et al., 2002).

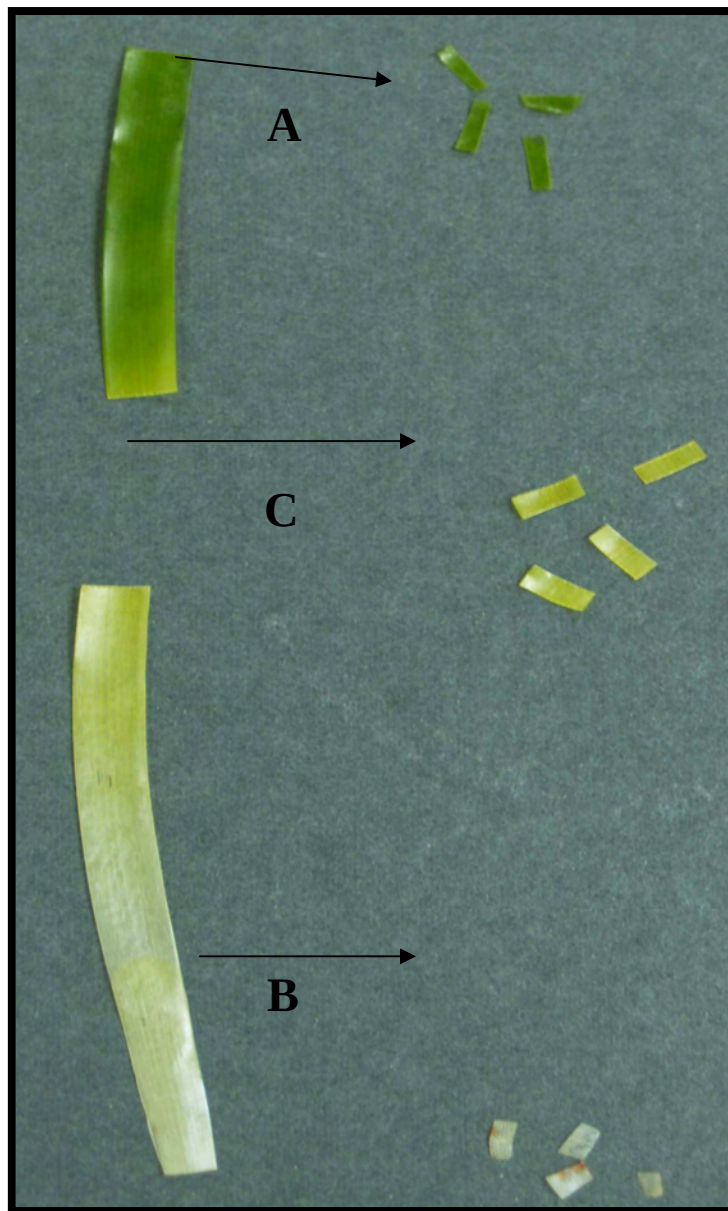


Figura 3. Secciones de hoja sana de *T. testudinum*: ápice (A), centro (C) y base (B).

3.4 Recuperación de hongos endofitos cultivables

Los cuatro fragmentos de cada sección se colocaron en un mismo plato Petri (100 x 15mm) con agar marino (MA, por sus siglas en inglés; 55.1g/1000mL agua destilada) y 2mL de cloramfenicol/500mL de medio para evitar el crecimiento de bacterias previo a que éste solidificara. Los platos se incubaron a 25°C por 7 días o hasta un máximo de un mes.

3.5 Identificación de hongos endofitos miceliales cultivables

Al observar crecimiento asociado al tejido procesado, se determinó si el crecimiento de los hongos era saprofítico (sobre las hojas) o endofítico (proviene del interior del tejido vegetal). Se descartaron los platos que no mostraron ningún crecimiento durante un mes y los platos que presentaron crecimiento saprofítico. Los hongos endofitos se sub-cultivaron en platos Petri pequeños (60 x 15mm) con MA y se incubaron a 25°C por 7 días o hasta un máximo de un mes. Luego, los cultivos puros se colocaron a temperatura ambiente expuestos a periodos naturales de luz y oscuridad.

Las colonias obtenidas en cultivo puro se caracterizaron macroscópicamente (color del anverso y reverso, textura, forma, elevación, exudados). Para determinar el color de las colonias se utilizó la guía *Munsell Soil Color Chart* (U.S. Soil Conservation Service, 2000). A partir de estos cultivos puros, se prepararon cámaras húmedas (Riddell, 1950), las cuales se incubaron a 25°C por 7 días. Si luego del período de incubación el crecimiento no resultó abundante, se incubaron por 7 días adicionales expuestas a periodos naturales de luz y oscuridad. Luego del periodo de incubación se removieron los cubreobjetos, se colocaron

sobre laminillas con una gota de lactofenol y fueron sellados con esmalte transparente para preservar las preparaciones (Kern y Blevins, 1997). Para la caracterización microscópica, se utilizaron laminillas de las cámaras húmedas y laminillas de preparaciones semipermanentes.

Para promover la esporulación de algunos de los endofitos, éstos se transfirieron a otros medios de cultivo: agar de papa y dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés; 39g/1,000mL agua destilada), agar de avena (OA, por sus siglas en inglés; 72.5g/1,000mL agua destilada), agar de esporulación (según Jong y Edwards, 1991), agar de extracto de malta (MEA, por sus siglas en inglés; 33.6g/1,000mL agua destilada), agar de papa y sacarosa (según Booth, 1971). Para la identificación de especies de *Penicillium* se utilizó agar de extracto de levadura Czapek (CYA por sus siglas en inglés), agar de extracto de malta y agar de nitrato de glicerol al 25% (G25N por sus siglas en inglés) según el protocolo descrito por Pitt (1985). La identificación de especies de *Aspergillus* se logró utilizando CYA, MEA y agar de extracto de levadura Czapek con 20% sacarosa (CY20S por sus siglas en inglés) según el protocolo descrito por Klich y Pitt (1988). En algunos casos fue necesario hacer nuevamente cámaras húmedas utilizando estos medios de cultivo. Las colonias en los diferentes medios de cultivo fueron fotografiadas utilizando una cámara digital Olympus C4040.

3.6 Microscopía

Para facilitar la identificación microscópica se utilizaron varios microscopios: disponibles en el Centro de Microscopía del Departamento de Biología, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez. Con la ayuda del microscopio compuesto de luz (Nikon Alphapot YS), microscopio compuesto equipado con óptica Nomarski (Olympus BH-2), microscopio de contraste de fase (Olympus CX41) se documentaron características morfológicas de los aislados. Para documentar detalles superficiales se utilizó un microscopio electrónico de rastreo (MER), JEOL JSM 5410 LV.

3.7 Claves taxonómicas

Se utilizaron diversas claves taxonómicas para la identificación de los hongos endofitos miceliales cultivables recuperados. La identificación de los organismos a género se hizo de acuerdo a la clave de Barnett y Hunter (1987). Se utilizaron claves taxonómicas específicas para llevar la identificación de especies de *Aspergillus* (Klich y Pitt, 1988), *Penicillium* (Pitt, 1985), *Curvularia* (Sivanesan, 1987), *Cladosporium* (Ellis, 1971; Boyd, 1993), *Fusarium* (Booth, 1971) y *Botrytis* (Ellis, 1971).

3.8 Análisis estadístico de los datos

Con los datos recopilados en esta investigación se calcularon las tasas de infección total, por época (por muestreo) y por sección de hoja. La tasa de infección (%) se obtuvo

dividiendo el número de fragmentos de hojas con crecimiento endofítico entre la cantidad total de fragmentos utilizados (Espola, 2005; Wilson, 1998). Se calculó la tasa de infección total (fragmentos infectados/864), por cada muestreo (fragmentos infectados/432), y por sección de la hoja (fragmentos infectados/288). Los resultados fueron evaluados a su vez con la prueba de Chi² (χ^2) con un nivel de confianza 95% para demostrar si las tasas de infección fueron independientes del muestreo o de la sección de la hoja (Espola, 2005). Se calculó, además, la frecuencia relativa de los hongos endofitos miceliales cultivables recuperados (número de veces que se aisló la especie/total de hongos aislados cultivables), por muestreo y por sección de tejido muestreado. Se utilizaron los programas InfoStat ® versión estudiantil 2006 y Microsoft Excel ® 2003 para realizar el análisis.

4. RESULTADOS

4.1 Tasas de infección total y por muestreo

Durante los dos muestreos se procesaron un total de 864 pedazos de las hojas de *T. testudinum* resultando infectados con hongos endofitos sólo 66 de ellos. Esto representó una tasa de infección total de 7.64% (Tabla 1). Las tasas de infección por muestreo fueron de 6.48% para muestreo 1 (época de verano) y de 8.80% para muestreo 2 (época de invierno) (Tabla 1). Los resultados para la tasa de infección indicaron que hubo una mayor frecuencia de pedazos infectados para el muestreo 2 y la prueba de χ^2 mostró que los valores son independientes de la época del año estudiada ($\chi^2 = 1.52$, $p = 0.2184$, $gl = 1$).

4.2 Tasa de infección por sección del tejido muestreado

De cada sección de la hoja (ápice, centro y base) se obtuvieron 288 pedazos (muestreo 1 y 2). Para la sección del ápice, 25 pedazos mostraron infección con hongos endofitos obteniendo una tasa de infección total de 8.68%. En la sección del centro, 19 de los pedazos contenían hongos endofitos, para un 6.60% de tasa de infección total. Por último, en la sección de la base, 22 de los pedazos fueron infectados para una tasa de infección de 7.64% (Tabla 1; Figura 4). Estadísticamente, la tasa de infección no depende de la sección de la hoja estudiada ($\chi^2 = 3.20$, $p = 0.2023$, $gl = 2$).

Tabla 1. Hongos endofitos aislados y tasa de infección por sección de la hoja y por muestreo.

Muestreo	Sección de hoja	Número de aislados*	Pedazos de hoja procesados	TI** (%)
M1	Base	6	144	4.17
	Centro	10	144	6.94
	Ápice	12	144	8.33
	Total M1	28	432	6.48
M2	Base	16	144	11.11
	Centro	9	144	6.25
	Ápice	13	144	9.03
	Total M2	38	432	8.80
M1 + M2	Base	22	288	7.64
	Centro	19	288	6.60
	Ápice	25	288	8.68
	Total M1 + M2	66	864	7.64

* Incluye hongos endofitos miceliales cultivables y no cultivables.

**TI = tasa de infección

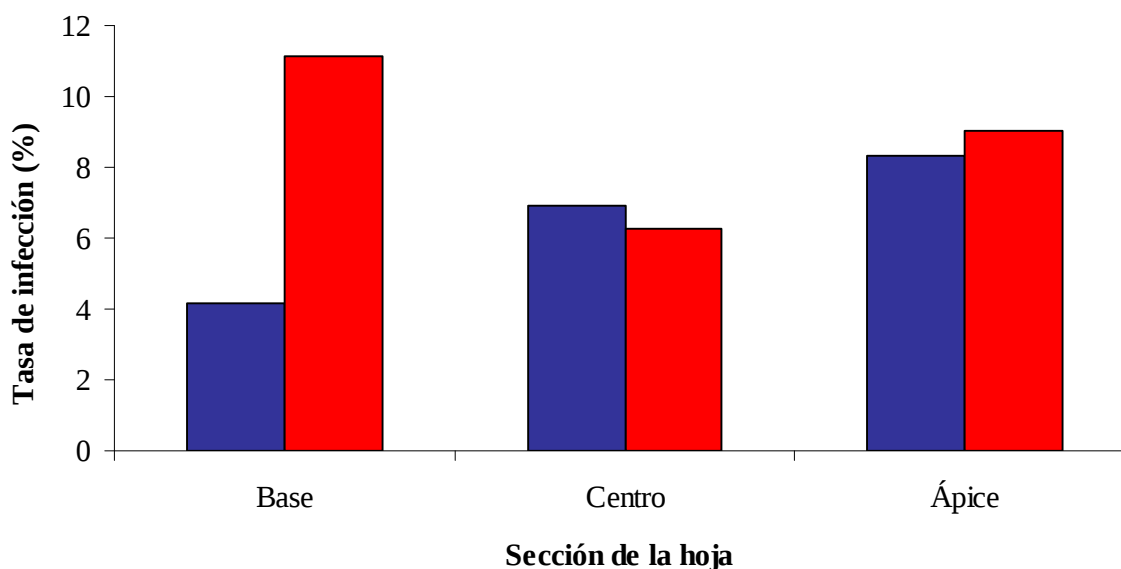


Figura 4. Tasa de infección por sección de tejido incubado en cada muestreo (barra azul M1 y barra roja M2).

4.3 Hongos endofitos miceliales cultivables recuperados

Sesenta y seis hongos endofitos fueron recuperados a partir de los 864 pedazos procesados (Tabla 1). De éstos, cuarenta y siete (71.2%) fueron identificados de acuerdo a sus características microscópicas y estructuras de reproducción (denominados como cultivables) y los diecinueve restantes (28.8%) no fueron cultivables en los medios de cultivo utilizados, por lo tanto no se consideraron para efectos de descripción morfológica. Se identificaron 7 géneros y 1 morfotipo. La frecuencia relativa de los hongos endofitos miceliales cultivables por género se resume en la Tabla 2. Para ambos muestreos el género dominante fue *Aspergillus*. En menor frecuencia se aisló *Cladosporium* sp., *Botrytis* sp., *Curvularia* sp., *Acremonium* sp. y *Penicillium*

sp. en el primer muestreo y *Curvularia* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Acremonium* sp. y el morfotipo 1 en el segundo muestreo. Dentro del género *Aspergillus* se identificaron 3 especies diferentes *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. ustus*. En el muestreo 1, las frecuencias relativas de estas especies fueron 0.14, 0.36 y 0.07, respectivamente. *A. fumigatus* fue la única especie de *Aspergillus* aislada en el segundo muestreo (0.48). *Cladosporium cladosporioides* (0.07), *Curvularia brachyspora* (0.07) y *Penicillium janthinellum* (0.07) fueron especies aisladas del primer muestreo y *Cladosporium oxysporum* (0.15), *Curvularia brachyspora* (0.15), *Curvularia pallescens* (0.15) fueron aisladas del segundo muestreo (Figura 5).

Tabla 2. Frecuencia relativa de géneros y morfotipo aislados durante los muestreos.

Géneros	Frecuencia relativa	
	M1	M2
<i>Botrytis</i> sp.	0.07	0.00
<i>Cladosporium</i> sp.	0.14	0.15
<i>Acremonium</i> sp.	0.07	0.03
<i>Fusarium</i> sp.	0.00	0.12
<i>Penicillium</i> sp.	0.07	0.00
<i>Curvularia</i> sp.	0.07	0.18
<i>Aspergillus</i> sp.	0.57	0.48
Morfotipo 1	0.00	0.03

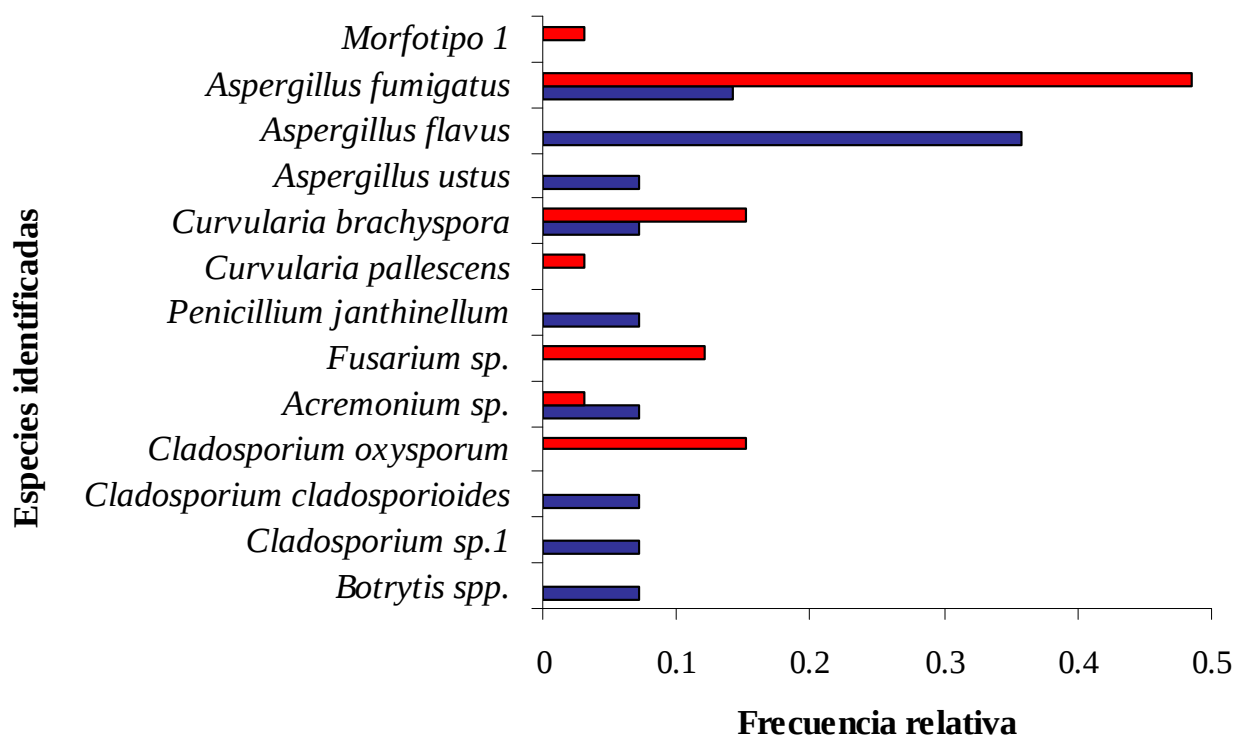


Figura 5. Frecuencia relativa de las especies identificadas en ambos muestreos (barra azul M1 y barra roja M2).

4.4 Caracterización de los hongos endofitos miceliales cultivables aislados

La identificación de las especies de los hongos endofitos aislados se llevó a cabo utilizando las claves taxonómicas previamente mencionadas. Aquellos hongos endofitos que no coincidieron con las características descritas en las claves para su identificación hasta especie fueron nombrados solamente por el género.

***Botrytis* sp. Micheli ex Fries**

En MA se observó una colonia de textura polvorosa, blanca en el anverso y amarillo pálido al reverso. En agar de esporulación, se observó una colonia amarillo pálido en el anverso y el reverso de color amarillo al centro con un borde amarillo rojizo y con textura granulosa. De micelio hialino septado se diferencian conidióforos hialinos, delgados, lisos y ramificados irregularmente en la parte superior. Se observaron conidias hialinas, unicelulares, lisas, de formas ovoides, subesféricas a esféricas (Figura 6). Este género incluye muchas especies patógenas de plantas (Ellis, 1971). Sería conveniente la aplicación de técnicas moleculares para facilitar la identificación a nivel de especie.

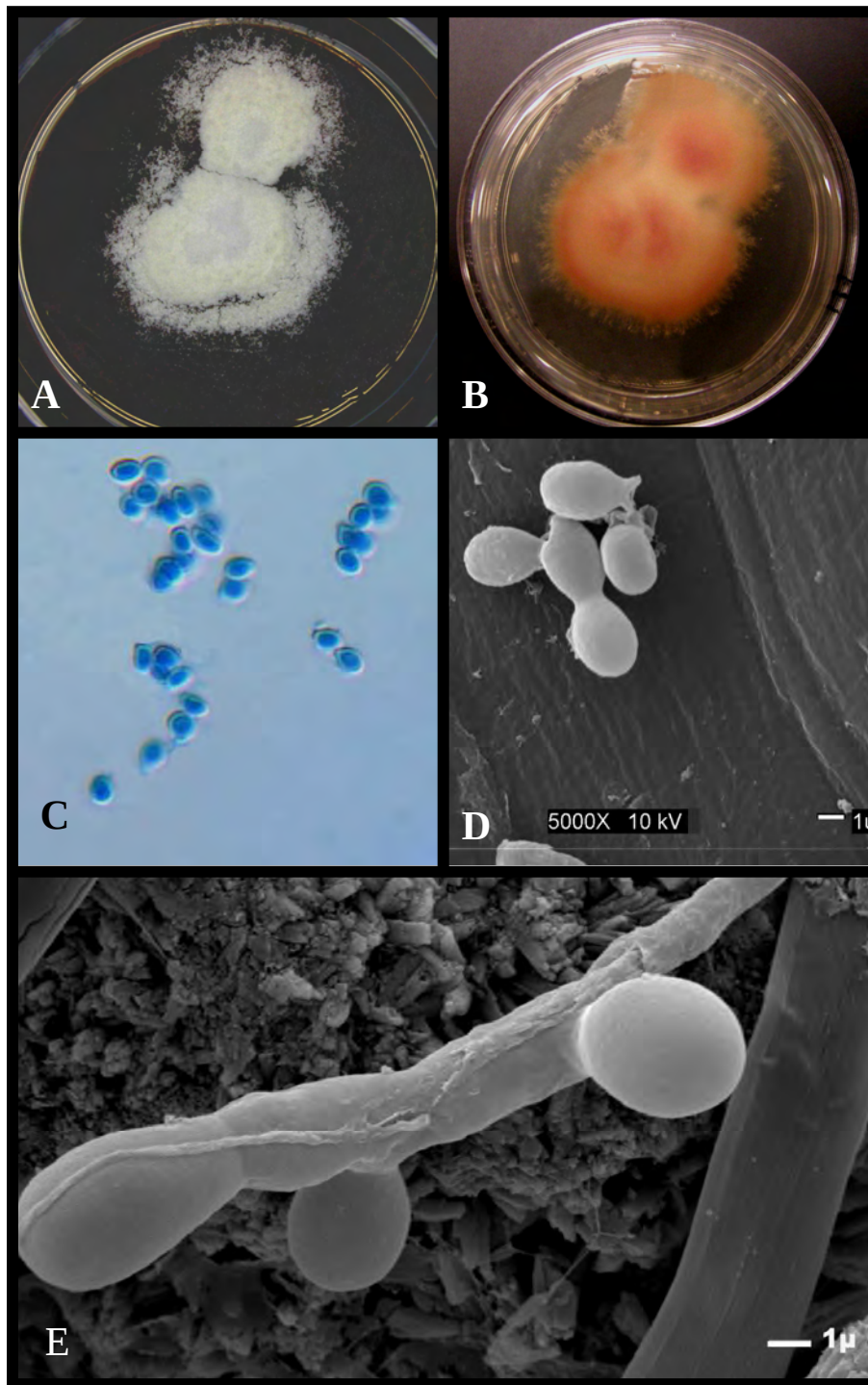


Figura 6. Características morfológicas de *Botrytis* sp. (A-B) anverso y reverso de la colonia en agar de esporulación; (C-D) conidias (en Nomarski y MER, respectivamente); (E) conidióforo y conidias (MER).

***Cladosporium* sp. Link ex Gray de Hoog**

En MA se observó una colonia gris-marrón oscuro al anverso y gris-marrón bien oscuro al reverso, de textura lanosa. El micelio es dematiaceo septado y se diferencia para producir conidióforos marrón, lisos, no ramificados o ramificados en la región apical. Se observaron ramoconidias y conidias en cadenas o solitarias, de color marrón, ovoides, esféricas a subesféricas, con cicatrices basales en los extremos, lisas o equinuladas, unicelulares a multicelulares, 2-7 x 2-4 μm (Figura 7).

***Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries**

En MA, la colonia presentó un color gris oscuro al centro con bordes blancos en el anverso y al reverso con un centro gris-marrón oscuro con bordes blancos, de textura lanosa. En agar de esporulación, la colonia se tornó gris oscuro con borde blanco al anverso y negro con borde blanco al reverso. En medios de cultivo sólido el crecimiento de la colonia fue lento, pobre y difícil de subcultivar. Sin embargo, en caldo de extracto de malta el crecimiento fue rápido y abundante. Se observaron conidióforos lisos, color marrón a verde oliva, de 28-350 μm de largo x 2-6 μm de ancho. Las ramoconidias aseptadas de color marrón (de hasta 30 μm de largo x 2-5 μm de ancho) presentaron una superficie lisa. El tamaño de las conidias color marrón aseptadas, ramificadas en cadenas, en forma de limón, de textura lisa, fue mayormente entre 3-7 x 2-4 μm (Figura 8).

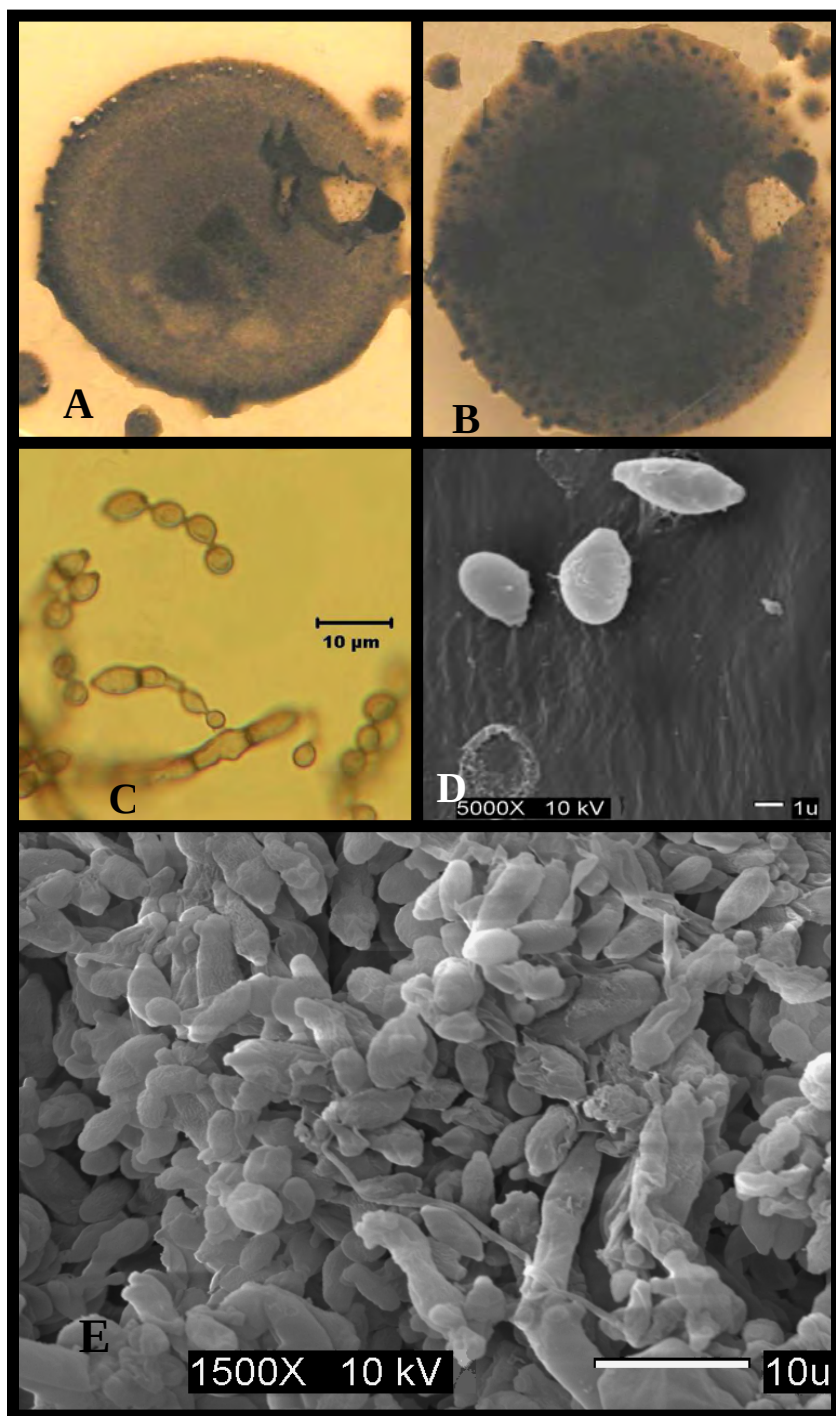


Figura 7. Características morfológicas de *Cladosporium* sp. (A-B) anverso y reverso de la colonia creciendo a partir de un pedazo de *T. testudinum* en MA; (C) conidias en cadenas (Nomarski); (D) conidias con cicatrices basales en los extremos (MER); (E) conglomerado de conidias (MER).

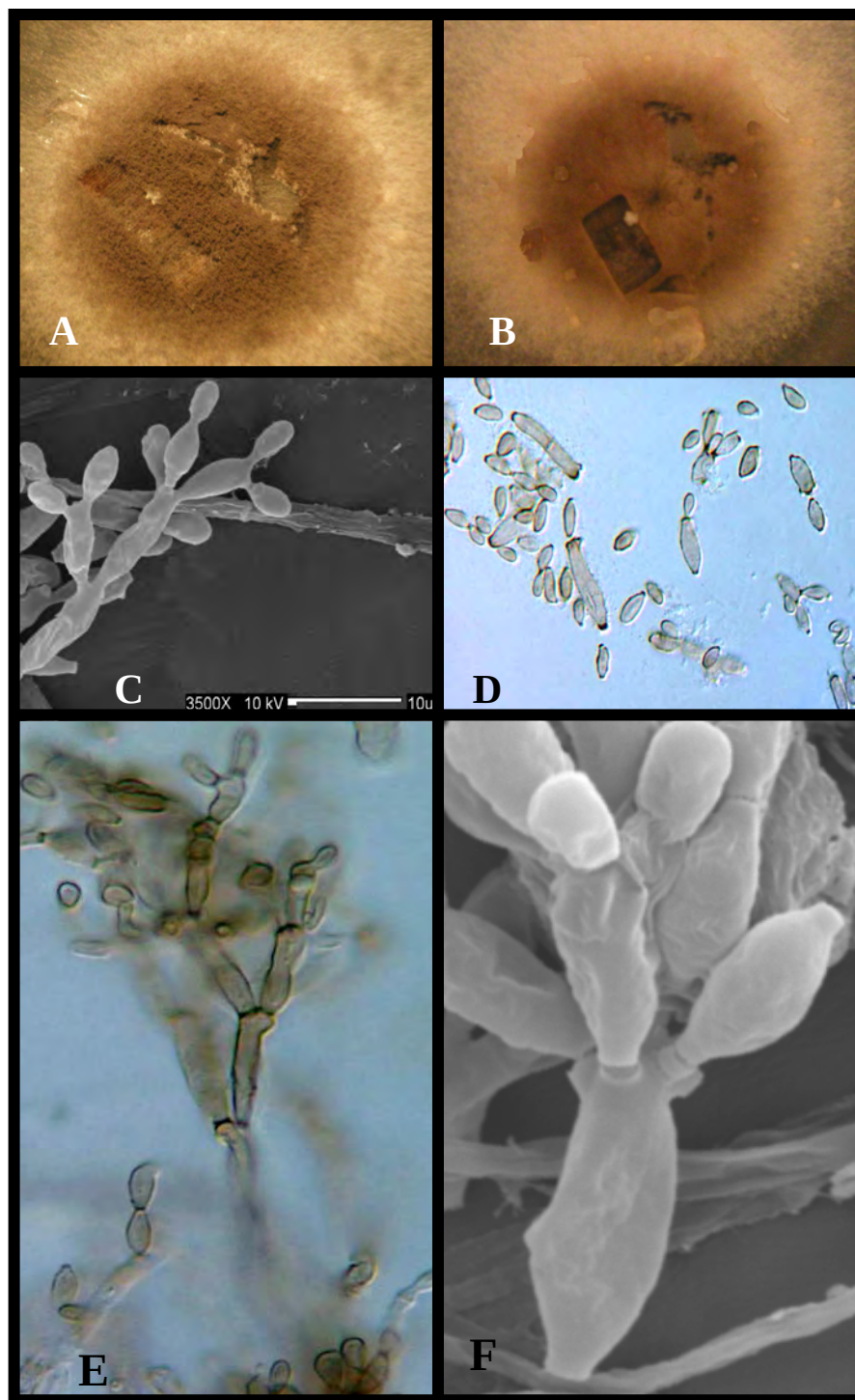


Figura 8. Características morfológicas de *Cladosporium cladosporioides*. (A-B) anverso y reverso de la colonia creciendo a partir de un pedazo de *T. testudinum* en MA; (C) conidióforo con ramoconidias y conidias (MER); (D) conidias y ramoconidias (Nomarski); (E) conidióforo con ramoconidias y conidias (Nomarski); (F) ramoconidia sujetando las conidias (MER).

***Cladosporium oxysporum* Berk & M.A. Curtis.**

En MA, la colonia de textura lanosa presentó un color gris oscuro al anverso y negro al reverso. Se observaron conidióforos lisos, nodosos, color marrón, de hasta 500 μm de largo x 3-5 μm de ancho. Las ramoconidias de superficie lisa aseptadas, de color marrón, alcanzaron un tamaño de hasta 30 μm de largo x 2-5 μm de ancho. Las conidias de color marrón aseptadas, ramificadas en cadenas, en forma de limón a subesféricas y textura lisa, midieron de 5-30 x 3-6 μm (Figura 9).

***Acremonium* sp. Corda**

En MA, la colonia se tornó blanca al anverso y amarillo pálido al reverso. En OA, la colonia creció en forma puntiforme, de color blanca al anverso con un reverso amarillo. Del micelio hialino septado surgen conidióforos y fiálidos delgados, hialinos, mayormente simples. Las conidias conocidas como fialosporas son hialinas, ovaladas, unicelulares, regularmente se encuentran agregadas en una gota pegajosa, de 2-5 μm de largo x 1-3 μm de ancho (Figura 10). Sería conveniente la aplicación de técnicas moleculares para facilitar su identificación a especie ya que muchas de las características morfológicas presentadas por este género son similares a otros géneros (Bacon y Hill, 1985).

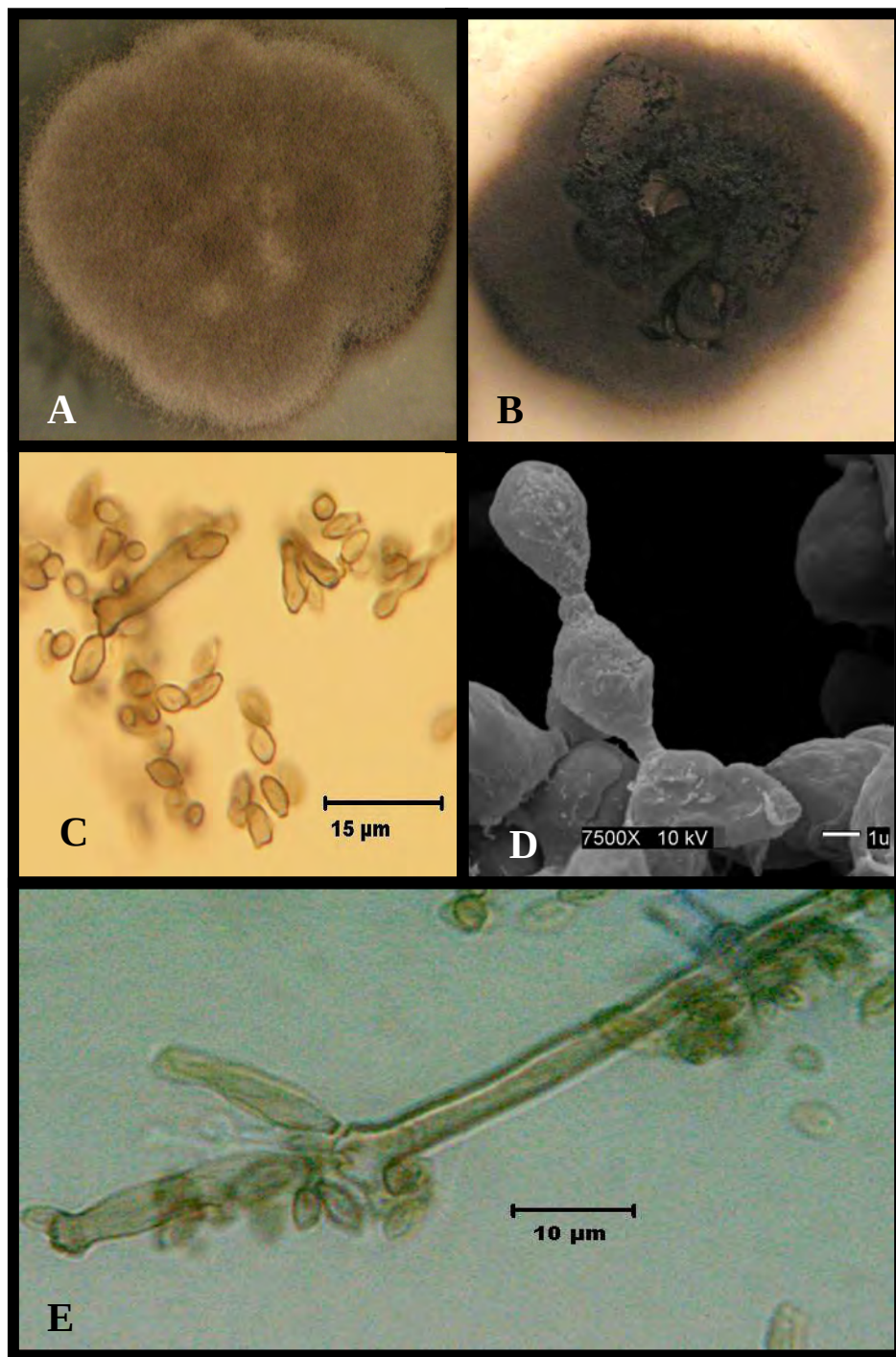


Figura 9. Características morfológicas de *Cladosporium oxysporum*. (A-B) anverso y reverso de la colonia en MA; (C) conidias y ramoconidia (Nomarski); (D) conidias en cadenas (MER); (E) conidióforo, ramoconidias y conidias (Nomarski).

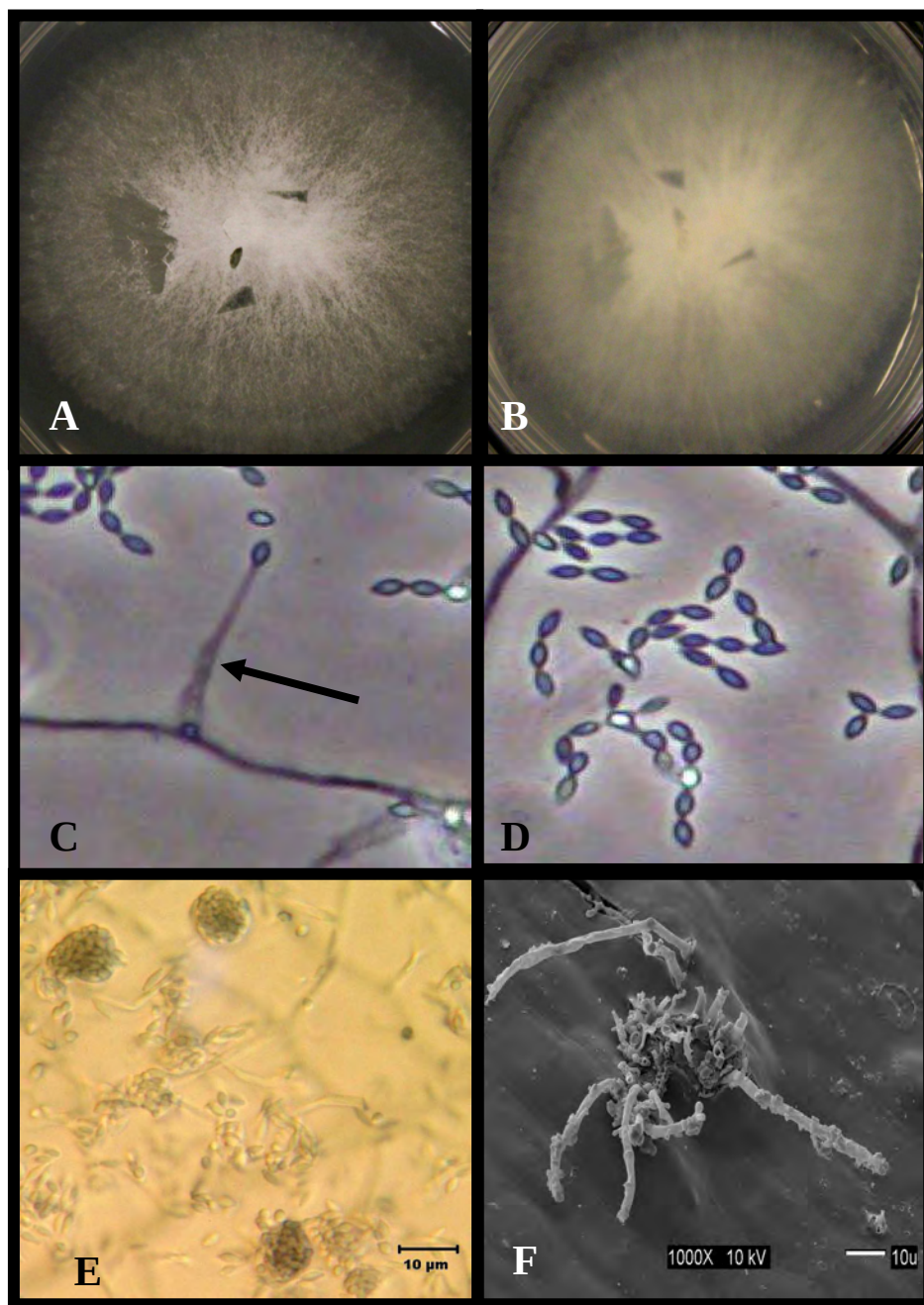


Figura 10. Características morfológicas de *Acremonium* sp. (A-B) anverso y reverso de la colonia en PDA; (C) conidióforo (contraste de fase); (D) conidias en cadenas (contraste de fase); (E) agregados de conidias (Nomarski); (F) micelio emergiendo del tejido vegetal (MER).

***Fusarium* sp. Link**

En OA, la colonia se tornó color blanco al anverso y rojizo al reverso con textura algodonosa y abundante, en algunas ocasiones produjo exudados amarillo pálido. En PSA, la colonia se tornó blanca al anverso y amarillo pálido al reverso, de crecimiento abundante, con un diámetro de 50-60 mm a los 4 días de incubación. Según Booth (1971), este aislado podría asociarse a la especie *F. oxysporum* a excepción de la característica del reverso de la colonia la cual no produjo pigmentos violeta. Del micelio hialino septado surgen conidióforos delgados, simples, hialinos, cortos, finalizando en fiálidos. Presenta conidias hialinas de dos tipos: macroconidias y microconidias. Las macroconidias fueron poco abundantes, levemente curvas (en forma de canoas), de paredes finas, mayormente de 2-5 células, con ambos extremos puntiagudos uno más fino que el otro, de 15-30 x 3-5 μm . Las microconidias fueron abundantes, ovoides, unicelulares, de 5-15 x 2-3 μm (Figura 11).

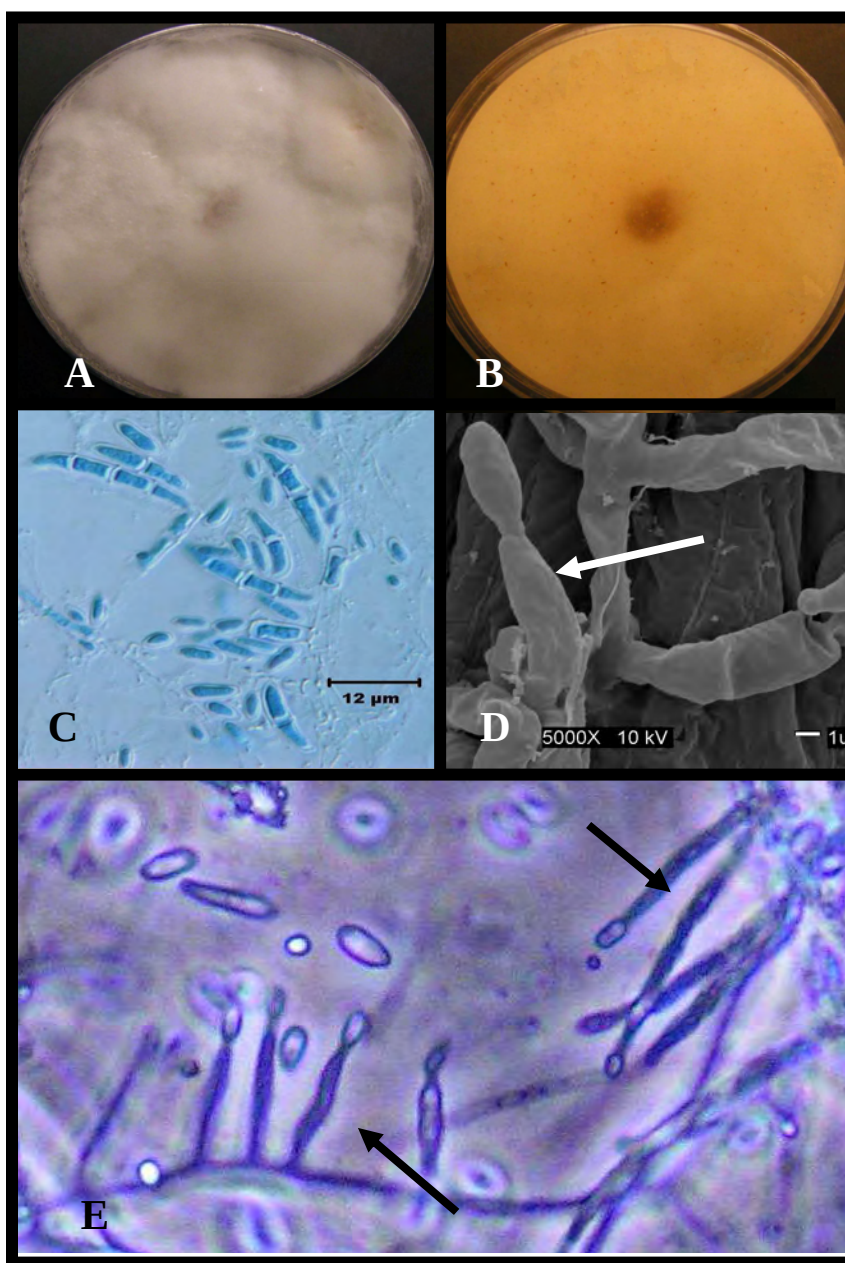


Figura 11. Características morfológicas de *Fusarium* sp. (A-B) anverso y reverso de la colonia en OA; (C) macroconidias y microconidias (Nomarski); (D) conidióforo (MER); (E) conidióforos y microconidias (contraste de fase).

***Penicillium janthinellum* Biourge**

En agar de esporulación, la colonia se tornó de un color gris verdoso oscuro al anverso y amarillo marrón al reverso. En CYA, la colonia se tornó blanca al anverso con exudados color rosa, su reverso amarillo, de forma arrugada y con crecimiento denso, el diámetro promedio fue de 36 mm. En G25N, la colonia presentó en el anverso un color blanco en el centro con bordes gris y al reverso un color amarillo, crecimiento poco abundante, con un diámetro promedio de 15 mm. Presentó crecimiento a 37°C, de colonias blancas al anverso y amarillas al reverso, con diámetro 20-25 mm y producción de exudados amarillos en CYA. No presentó crecimiento a 5°C. Del micelio septado hialino surgen conidióforos biverticilados, de textura lisos, delgados, de pared fina y delicada, de 30-70 μm de largo. Los fiálidos (7-11 μm de largo) surgen a partir de métulas. Se observaron conidias esféricas, unicelulares, con paredes rugosas, formando cadenas, con diámetro de 2.2-3.0 μm (Figura 12) (Pitt, 1985).

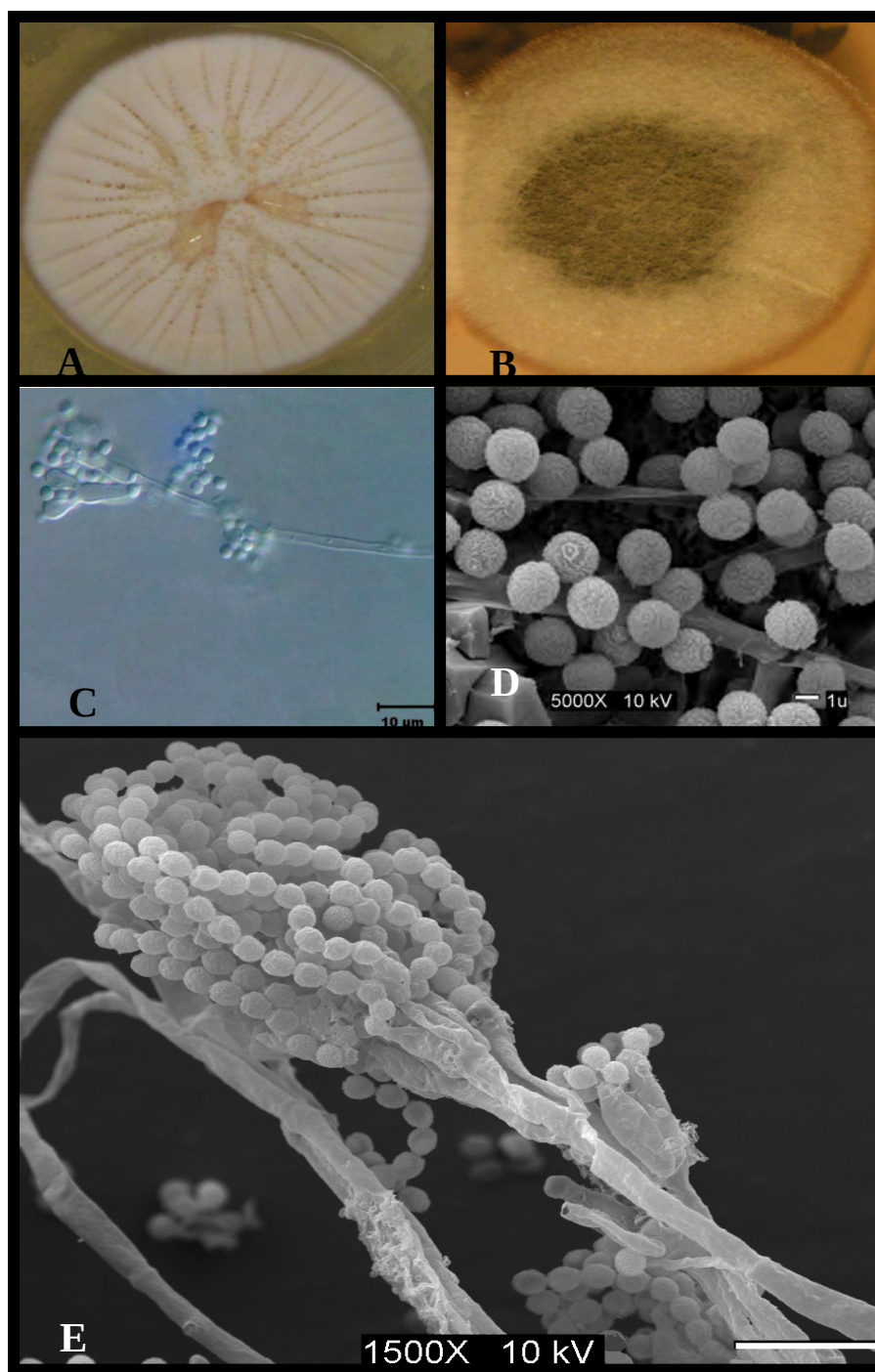


Figura 12. Características morfológicas de *Penicillium janthinellum*. (A) anverso de la colonia en CYA con exudado; (B) anverso de la colonia en agar de esporulación; (C) conidióforo, métulas, fiálidos y conidias (Nomarski); (D) detalle de las conidias (MER); (E) conidióforo con conidias en cadenas (MER).

***Curvularia pallescens* (Tsuda & Ueyama) Sivanesan**

En MA, la colonia se tornó en el anverso gris pálido con bordes blancos y al reverso gris oscuro con bordes gris, de crecimiento lento y poco abundante. En PDA, la colonia se tornó gris oscuro al anverso con un reverso negro. El crecimiento fue abundante, rápido y de textura algodonosa sin formación de estroma. El micelio septado marrón que se diferenció en conidióforos marrón, de textura lisa. Se observaron poroconidias con 3 septas transversales (4 células) marrón pálido, lisas, con un hilo no protuberante, de rectas a levemente curvas, 17-32 x 7-12 μm (Figura 13) (Sivanesan, 1987).

***Curvularia brachyspora* Boedijn**

En MA, la colonia se tornó en el anverso gris con bordes blancos y al reverso gris oscuro con bordes gris, de crecimiento lento y poco abundante. En PDA, la colonia se tornó gris oscuro al anverso con un reverso negro. El crecimiento fue abundante y de textura algodonosa. En OA, la colonia se tornó gris oscuro con micelio aéreo al anverso y al reverso color negro. Se observó formación de estroma cilíndrico y color negro. Del micelio septado marrón surgen conidióforos de color marrón y textura lisa. Se observaron poroconidias formando ramilletes en el ápice de los conidióforos, con textura lisa, con un hilo no protuberante, levemente curvas, de 20-26 x 10-14 μm . Las poroconidias poseen 3 septas transversales (4 células), con el septo central ubicado en la región más ancha de la conidia y mayormente más grueso y oscuro que los demás septos. Cada célula ubicada en los extremos de la conidia posee un color marrón pálido y las células intermedias poseen un color marrón (Figura 14) (Sivanesan, 1987).

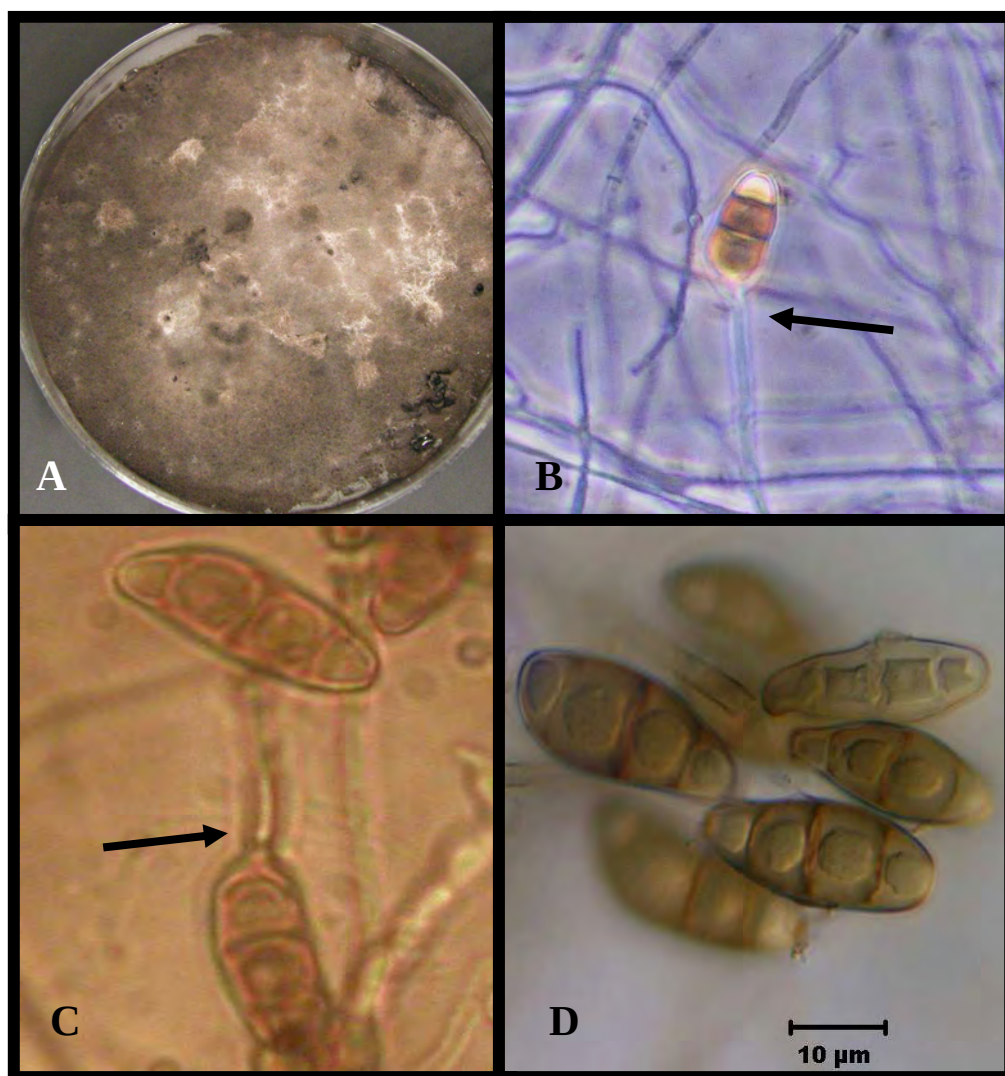


Figura 13. Características morfológicas de *Curvularia pallescens*. (A) anverso de la colonia en OA; (B-C) conidia con tubo germinativo (contraste de fase y de luz, respectivamente); (D) detalle de las conidias (Nomarski).

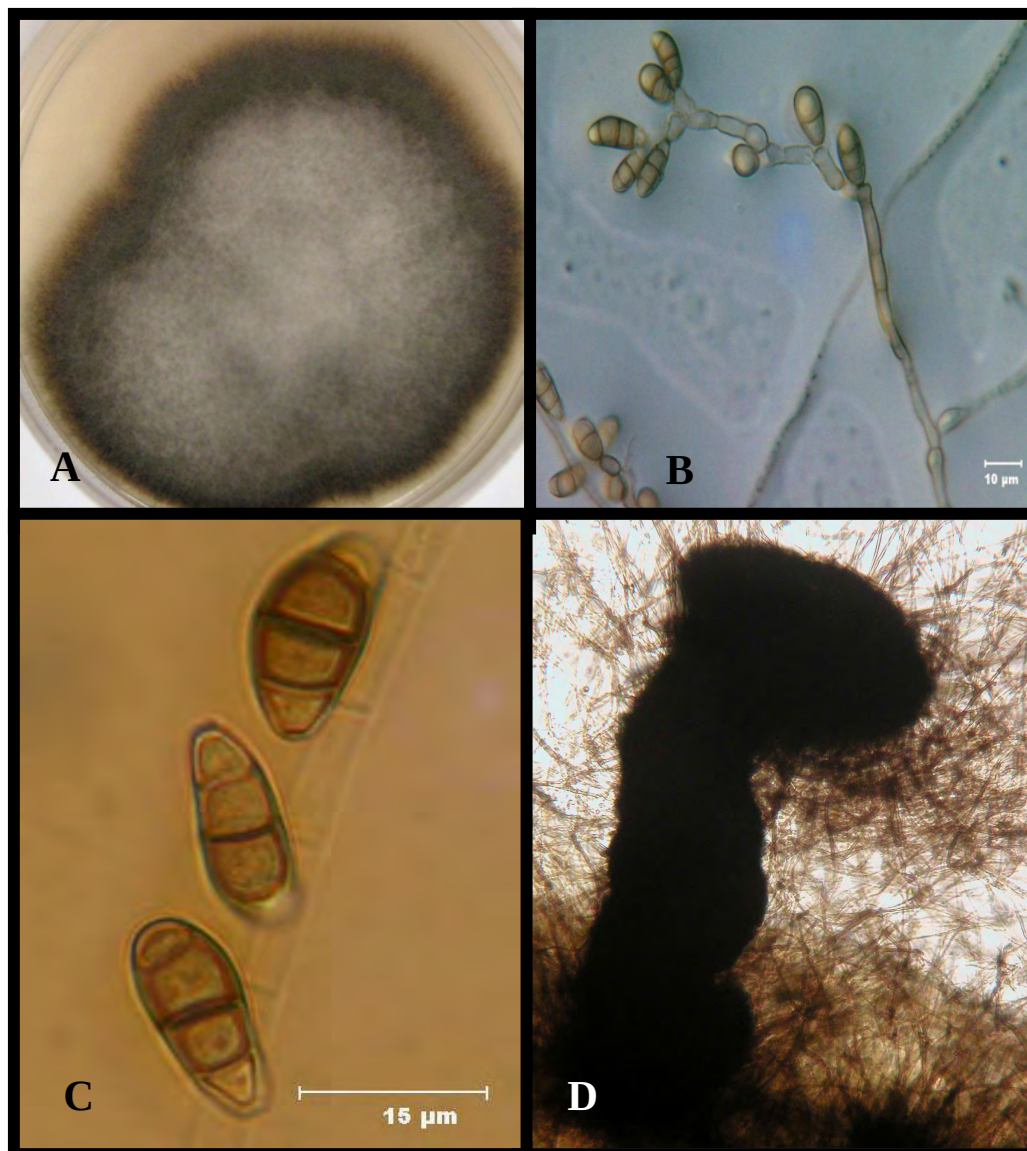


Figura 14. Características morfológicas de *Curvularia brachyspora*. (A) anverso de la colonia en PDA; (B) conidióforo y conidias (Nomarski); (C) detalles de las conidias (Nomarski); (D) estroma marrón bajo microscopía de luz.

***Aspergillus ustus* (Bain.) Thom & Church**

En MA, la colonia de crecimiento puntiforme se tornó marrón al anverso y en el reverso marrón oscuro. En CYA, la colonia se tornó gris con bordes blancos al anverso y amarillo al reverso, con un diámetro promedio de 38 mm. Se observó la producción de exudado incoloro y de pigmento soluble amarillo. En MEA, la colonia se tornó blanca al anverso y amarillo al reverso, con un diámetro de 36 mm. Presentó crecimiento a 37°C con diámetro de aproximadamente 25 mm. Se observaron conidióforos (75-200 x 4-7 μm) con paredes lisas y color marrón y vesículas organizadas en forma columnar y biseriadas con métulas (4-6 x 3-4 μm) y fiálidos (5-8 x 2.5-4 μm). Las conidias son esféricas, marrón pálido, con diámetros entre 3-4.5 μm y paredes rugosas. Se detectó la presencia de células Hülle con forma irregular (Figura 15) (Klich y Pitt, 1988).

***Aspergillus fumigatus* Fres.**

En MA, la colonia de crecimiento puntiforme se tornó gris marrón oscuro al anverso-reverso. En CYA y MEA, la colonia se tornó gris al anverso-reverso, con un diámetro promedio de 49 mm en CYA y de 64 mm en MEA. Presentó crecimiento abundante a 37°C y a 45°C con diámetros entre 60-70 mm. De los conidióforos (100-500 x 5-11 μm) con paredes lisas y color marrón pálido se diferencian las vesículas organizadas en forma columnar y uniseriadas. Los fiálidos de 5-9 x 2-3 μm , ubicados en forma paralela, se observaron desde la mitad o hasta dos terceras partes de la vesícula. Conidias globosas, con color verde pálido, con diámetros entre 2-3.5 μm y paredes lisas a levemente rugosas surgen de los fiálidos (Figura 16) (Klich y Pitt, 1988).

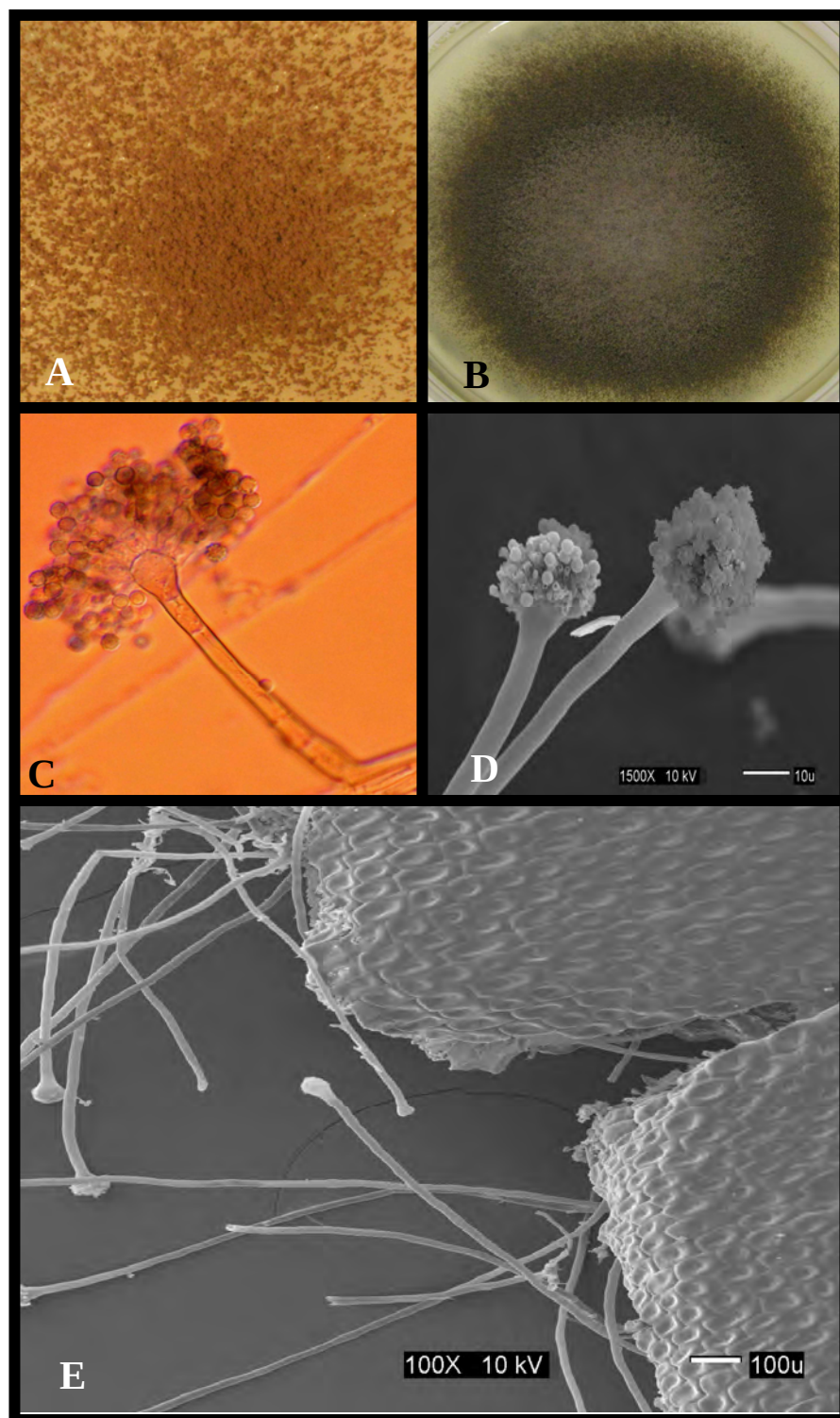


Figura 15. Características morfológicas de *Aspergillus ustus*. (A) anverso de la colonia en MA; (B) anverso de la colonia en PDA; (C-D) conidióforos y conidias (Nomarski y MER, respectivamente); (E) conidióforos emergiendo del tejido vegetal (MER).

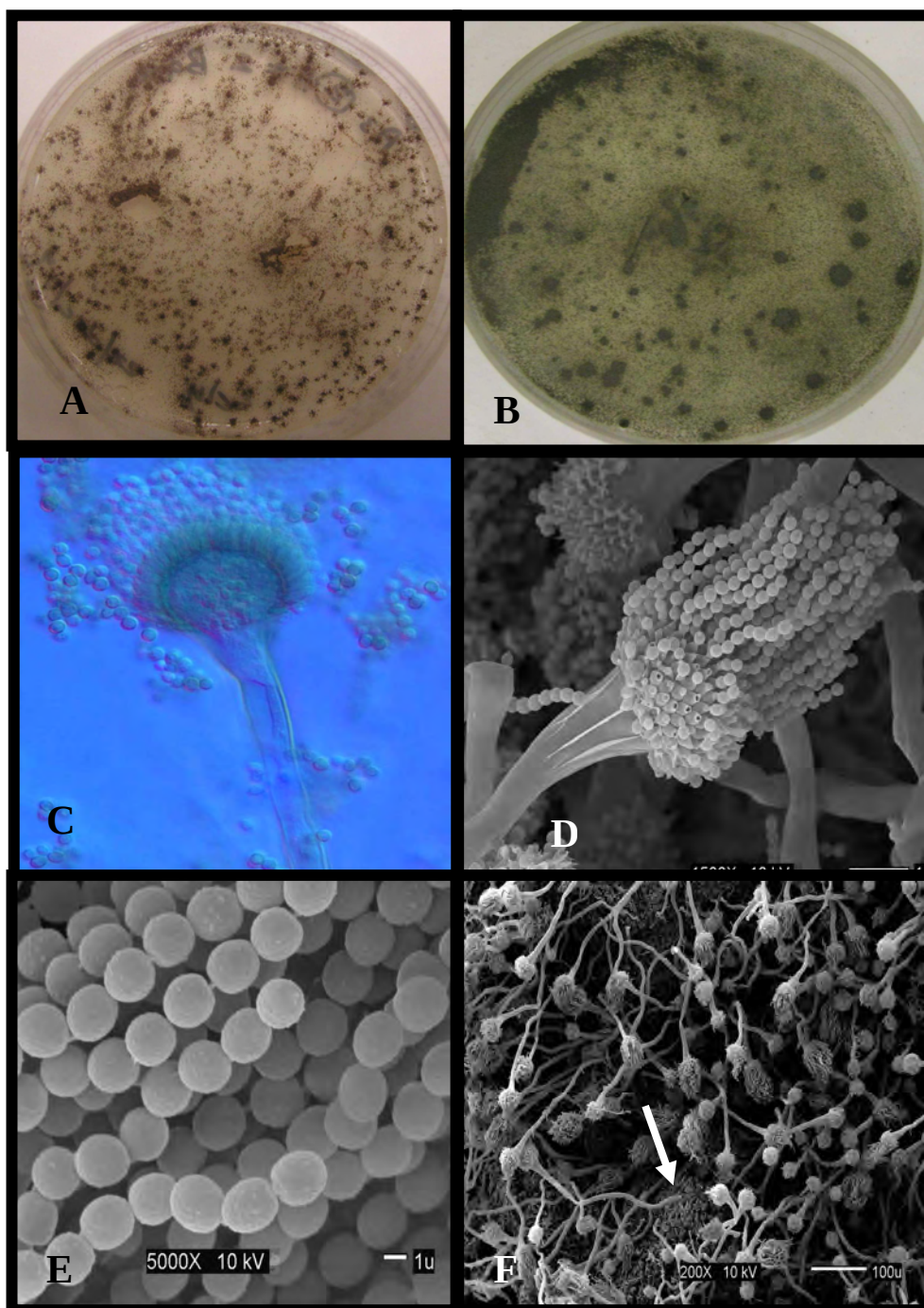


Figura 16. Características morfológicas de *Aspergillus fumigatus*. (A) anverso de la colonia en MA; (B) anverso de la colonia en PDA; (C-D) conidióforo, fiálidos y conidias (Nomarski y MER, respectivamente); (E) detalle de las conidias (MER); (F) conidióforos emergiendo del tejido vegetal (MER).

***Aspergillus flavus* Link**

En MA, la colonia puntiforme se tornó marrón-verde olivo oscuro al anverso-reverso. En CYA, la colonia se tornó blanca al anverso y amarillo pálido al reverso, con un diámetro promedio de 51 mm, de textura lanosa y crecimiento abundante. En CY20S, la colonia creció de color blanco con tonos gris verdosos al anverso y amarillo al reverso, con diámetro promedio de 64 mm. En MEA, la colonia se tornó blanca con amarillo al anverso y amarillo al reverso, con un diámetro de 55 mm. Presentó crecimiento a 37°C con diámetro de aproximadamente 55 mm. No produjo esclerocios. De los conidióforos (400-800 μm de largo) hialinos con paredes rugosas se diferencian las vesículas esféricas organizadas en forma radiada, en ciertas ocasiones uniseriadas y en otras biseriadas. De las métulas de 6-16 x 4-9 μm y fiálidos de 7-12 x 3-5 μm surgen conidias globosas, de color verde pálido, con paredes rugosas y diámetros entre 3-6 μm (Figura 17) (Klich y Pitt, 1988).

Morfotipo 1

En MA, la colonia se tornó negra con bordes gris oscuro en el anverso y reverso, de textura algodonosa. En OA, se observó una colonia algodonosa de color gris oscuro. Del micelio tabicado, de color marrón pálido surgen conidias redondas, de color marrón pálido, de 2-4 μm (Figura 18).

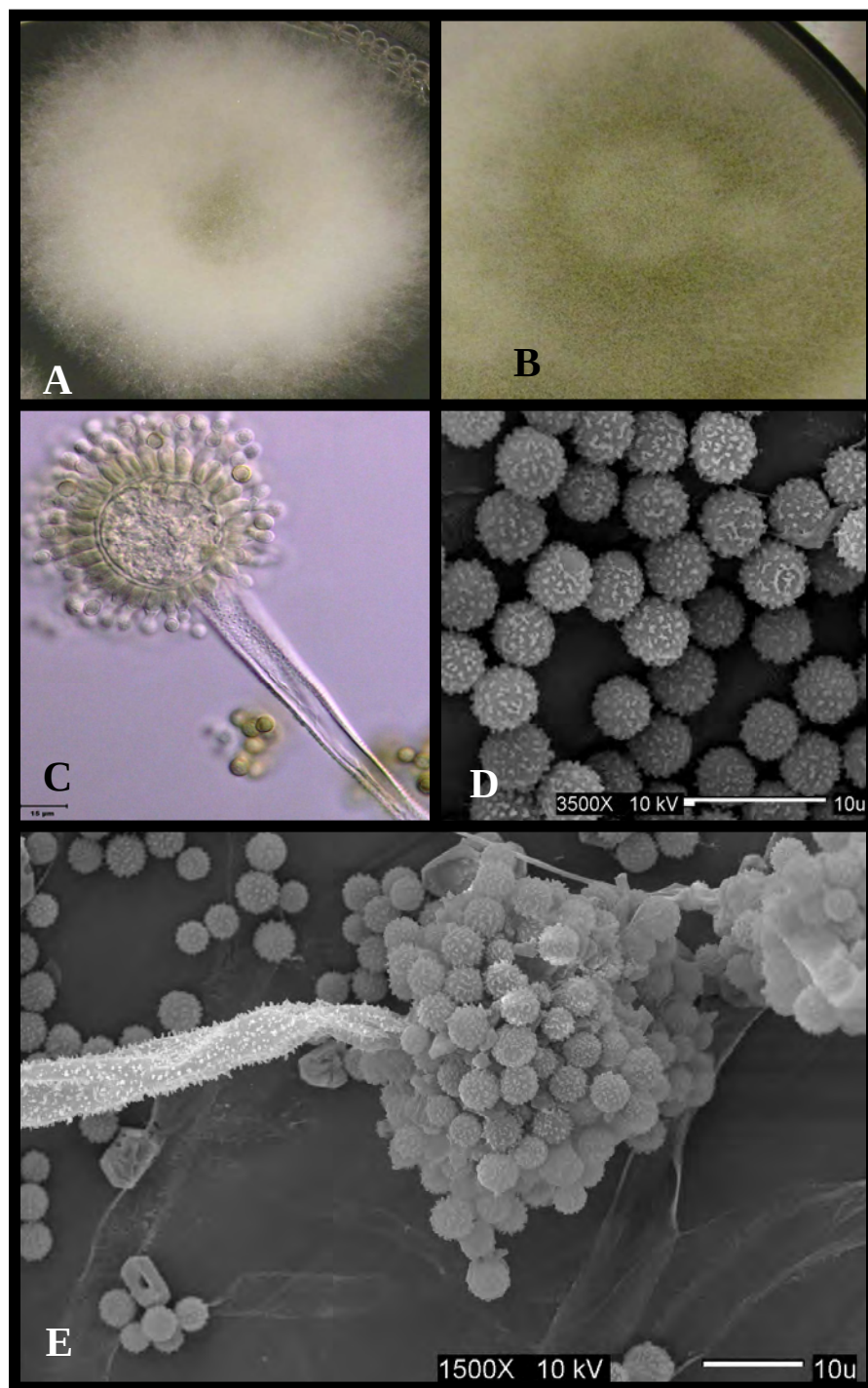


Figura 17. Características morfológicas de *Aspergillus flavus*. (A) anverso de la colonia en CYA; (B) anverso de la colonia en CY20S; (C) conidióforo y conidias (Nomarski); (D) detalle de las conidias (MER); (E) conidióforo y conidias (MER).

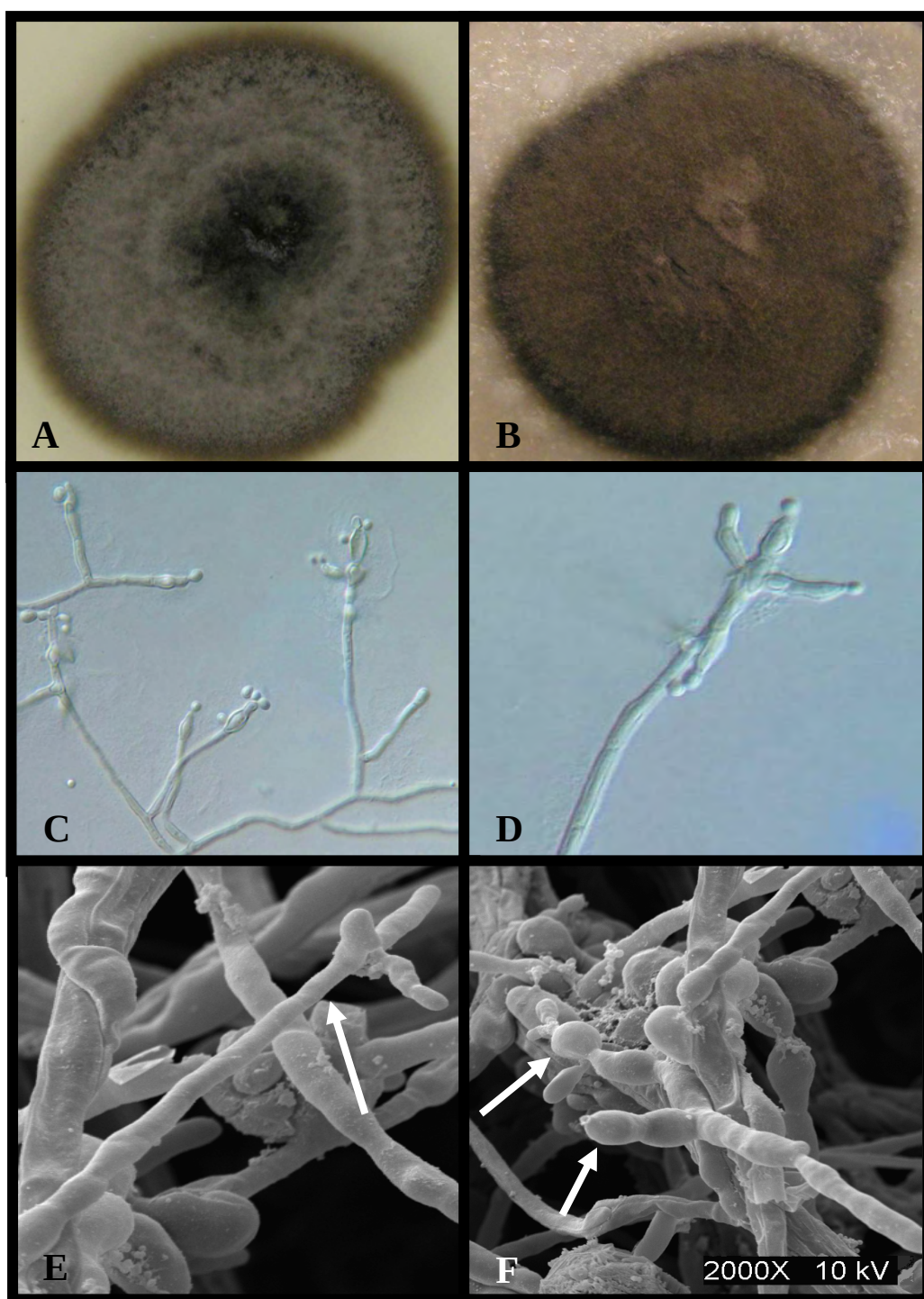


Figura 20. Características morfológicas del morfotipo 1. (A) anverso de la colonia en MA; (B) anverso de la colonia en OA; (C-D) conidióforos y conidias (Nomarski); (E) conidióforo (MER); (F) conidias (MER).

5. DISCUSIÓN

5.1 Tasas de infección total y por muestreo

En este estudio se confirmó la presencia de hongos endofitos miceliales en *T. testudinum* con una tasa de infección total de 7.64%. La tasa de infección fue de 6.48% para el primer muestreo (época de verano) y 8.80% para el segundo muestreo (época de invierno). Esto implica que para la época de invierno hubo mayor incidencia de hongos endofitos miceliales que para la época de verano a pesar que no se registró una diferencia en temperatura al comparar ambos muestreos. En contraste, en el estudio de Wilson (1998) se aisló mayor número de endofitos en el muestreo de verano asociándose a las altas temperaturas del agua en Bermuda durante esa época. Según Wilson (1998) la temperatura le proveía al endofito un ambiente propicio para su desarrollo y crecimiento. En un estudio realizado con la planta medicinal *Azadirachta indica* se demostró que la presencia de endofitos puede variar dependiendo las estaciones del año y que es afectada por las condiciones ambientales y tipo de hospedero donde se encuentran (Johnson et al., 2005). La prueba de χ^2 demostró que la tasa de infección para nuestros aislados no está influenciada por la época del año.

5.2 Tasas de infección por sección del tejido muestreado

El propósito de seccionar las hojas sanas fue para poder comparar los endofitos aislados a través de toda la hoja. Las tasas de infección total por sección de hoja fueron 8.68% para el ápice, 7.64% para base y 6.60% para el centro, mostrando que los hongos endofitos no tienen preferencia por una sección de la hoja en específico. Petrini et al. (1982) seccionaron las hojas

en discos encontrando que no siempre los endofitos estaban distribuidos en toda la hoja. De igual manera, se han examinado diferentes secciones de la hoja determinando la presencia de una flora endofítica diversa a través de toda la hoja (Bayman et al., 1997; Gamboa y Bayman, 2001). Según Bayman et al. (1997) y Gamboa y Bayman (2001), una especie endofita no presenta especificidad por una sección de la hoja en particular. Sin embargo, Ragazzi et al. (2001) encontraron una variación en la frecuencia de hongos aislados para las diferentes secciones (hojas, capullos y ramas) de la planta *Quercus cerris*, siendo las ramas la sección con el mayor número de endofitos. Por otro lado, Cannon y Simmons (2002) calcularon una tasa de infección mayor en la sección del ápice en especies de plantas como *Carapa guianensis*, *Jacaranda* sp., *Manilkara bidentata*, *Mora excelsa*, entre otras. Estadísticamente, el número de hongos endofitos aislados de *T. testudinum* fue independiente de la sección de la hoja.

5.3 Hongos endofitos miceliales cultivables recuperados

Siete géneros y un morfotipo de hongos endofitos fueron aislados de hojas sanas de *T. testudinum*. Las especies identificadas fueron *Aspergillus fumigatus* (38.3%), *Curvularia brachyspora* (12.8%), *Aspergillus flavus* (10.6%), *Cladosporium oxysporum* (10.6%), *Fusarium* sp. (8.5%), *Acremonium* sp. (4.3%), *Cladosporium* sp. (2.1%), *Cladosporium cladosporioides* (2.1%), *Curvularia pallescens* (2.1%), *Penicillium janthinellum* (2.1%), *Aspergillus ustus* (2.1%), *Botrytis* sp. (2.1%) y el morfotipo no identificado (2.1%). Estos endofitos son especies de hongos terrestres que fueron capaces de desarrollarse en ambientes marinos. Wilson (1998) y Höller et al. (2000) denominaron a estos hongos terrestres capaces de desarrollarse en ambientes marinos como hongos marinos facultativos. Sin embargo, en este estudio no se logró aislar ninguna especie endofita exclusiva de ambientes marinos, similar a los aislados del mangle negro,

Avicennia marina, en la región de Pakistan (Mehdi y Saifullah, 1992). En hierbas marinas (*Halodule bermudensis*, *Syringodium filiforme* y *T. testudinum*) de Bermuda se aislaron un total de once especies de hongos endofitos (nueve especies terrestres y dos especies marinas). Las especies terrestres *Penicillium sclerotiorum*, *Penicillium chermesinum*, *Aspergillus granulatus*, *Aspergillus niger* y las especies marinas *Sporobolomyces holsaticus* y *Tridentaria carvora* fueron recuperadas de *T. testudinum* en mayor incidencia, predominando las especies terrestres (Wilson, 1998). En praderas de *T. testudinum* en Cabo Rojo se aislaron a su vez especies diversas de hongos endofitos, todas de carácter terrestres, tales como *Aspergillus* sp., *Aspergillus carneus*, *Aspergillus flaviceps*, *Aspergillus niveus*, *Penicillium* sp., *Acremonium* sp. y *Nigrospora* sp. (Maldonado et al., 2003). Sin embargo, en nuestro estudio se aislaron otras especies de *Aspergillus* y *Penicillium* del mismo hospedero. La diferencia entre especies recuperadas podría estar asociada a la localización específica del área de muestreo y a los factores asociados a la pradera como cantidad de luz, profundidad, edad de las plantas, entre otros.

Inicialmente muchos de estos hongos terrestres (por ejemplo *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp.) se consideraban contaminantes o epífitos (Petrini, 1986) aunque en muchos de los estudios realizados se han aislado como endofitos de diversas plantas. Muchas de las especies endofíticas del presente estudio (*Aspergillus flavus*, *Botrytis* sp., *Curvularia* sp., *Cladosporium* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Acremonium* sp., *Penicillium janthinellum*, *Fusarium* sp.) han sido recuperadas a su vez de otras plantas como la rosa, el cactus, *Eucalyptus globulus*, *Rubus parviflorus* y *Quercus cerris* (Ragazzi et al., 2001; Salgado y Cerero, 2005; Suryanarayasna et al., 2005;). *Penicillium janthinellum* fue aislado de frutos de *Melia azedarach*, donde se descubrió que éste

tiene la habilidad de producir compuestos bioactivos con propiedades antimicrobiales e insecticidas (Do Rosario et al., 2005). Esto podría sugerir uno de los roles de *Penicillium janthinellum* en la protección de *T. testudinum* su hospedero contra la invasión de patógenos. La diversidad de metabolitos secundarios está comenzando a ser investigada para determinar su rol profiláctico en la planta y en un futuro su beneficio a nivel farmacéutico.

Curvularia sp. ha sido un género aislado del tejido interno de hojas de árboles tropicales en P.R. (Gamboa y Bayman, 2001). *Curvularia lunata* y *C. eragrostidis* en ocasiones actúan como fitopatógenos de cultivo agrícolas como guineo, plátano, arroz y maíz (Urdaneta et al., 2002). Sin embargo, las especies *Curvularia pallescens* y *C. brachyspora* fueron aisladas de *T. testudinum* como endofitos. Se ha determinado que *Curvularia pallescens* produce metabolitos con actividad antiviral contra el herpes (Lemos et al., 1999). Debido a la diversidad de plantas a las cuales *Curvularia* sp. se asocia endofíticamente podríamos especular que no hay especificidad por un hospedero en particular.

Aspergillus fumigatus, *Aspergillus ustus* y *Cladosporium oxysporum* fueron específicamente aisladas de *T. testudinum*. *Aspergillus fumigatus* fue aislado en ambos muestreos con mayor frecuencia en el muestreo 2 aunque no había sido reportado como endofito anteriormente. Esta especie se desarrolla a diferentes temperaturas (12-57°C), ha sido reportado como patógeno de humanos y animales, es responsable de micosis sistémicas, daños del pulmón y tracto respiratorio y es productor de metabolitos secundarios con efectos antibióticos y tóxicos (Klich y Pitt, 1988; Pontón et al., 2002). *Aspergillus ustus* está presente en áreas tropicales y subtropicales y se ha reportado como un patógeno oportunista en pacientes inmunocomprometidos (Verweij et al., 1999). Ésta es la primera ocasión que se reporta esta

especie endofita. *Cladosporium oxysporum* es una especie encontrada en tejidos vegetales en descomposición en la región de los trópicos y en ocasiones ha sido reportado como patógeno oportunista causando micosis subcutáneas (Ellis, 1971). En este estudio fue aislada de tejido interno sano de *T. testudinum* por primera ocasión.

La pradera de *T. testudinum* presentó características similares como el tipo de suelo, diversidad de vegetación circundante y el estar sumergidas constantemente. Ésta fue dividida en cuadrantes para observar la distribución de endofitos a lo largo de ella desde la orilla hasta 30m de distancia. Los primeros cuadrantes estaban más expuestos a la radiación solar y a poca profundidad en comparación con los demás cuadrantes. A pesar de esto, no se obtuvieron especies endofíticas específicas a un cuadrante en particular. Las especies aisladas estuvieron distribuidas entre los nueve cuadrantes, o sea, se recuperaron endofitos de todos los cuadrantes en ambos muestreos. *Aspergillus fumigatus* fue la especie predominante en este estudio y se recuperó en cada uno de los 9 cuadrantes. Según Petrini (1991), las comunidades endofíticas de una misma especie creciendo en la misma región por lo general son similares aunque si existe diferencia de la distribución de las especies dependiendo la edad del tejido muestreado. Sin embargo, en este estudio no se puede comparar la distribución de endofitos de acuerdo a la edad de las hojas de *T. testudinum* ya que este factor no fue evaluado.

Muchas especies endofíticas son capaces de producir compuestos antibióticos y metabolitos secundarios contra bacteria y plagas (Petrini, 1991). Estos metabolitos secundarios tienen un rol en el fortalecimiento y evolución de las hierbas donde se encuentran. Según Faeth (2002), los hongos endofitos son simbioses que crean una barrera de defensa en su hospedero contra los enemigos naturales de éste (Faeth, 2002). Se ha postulado que el efecto terapéutico de

Azadirachta indica, planta medicinal en la India conocida como *neem*, puede estar asociado a la secreción de metabolitos secundarios por sus especies endofitas *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum*, *Curvularia* sp. y *Penicillium* sp. (Johnson et al., 2005). *Aspergillus fumigatus*, *A. ustus*, *A. flavus*, *Penicillium janthinellum*, *Acremonium* sp., entre otras podrían ser especies endofíticas que proveen un sistema de defensa a *T. testudinum*. Se sugiere estudiar en más detalle el efecto de estas especies endofíticas en *T. testudinum* para determinar su beneficio para la hierba marina.

6. CONCLUSIONES

- ❖ Se logró determinar por primera vez la distribución estacional de hongos endofitos cultivables asociado al tejido interno sano de hojas de *T. testudinum* en Puerto Rico.
- ❖ Las especies *Aspergillus flavus*, *Botrytis* sp., *Curvularia* sp., *Cladosporium* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Acremonium* sp., *Penicillium janthinellum* y *Fusarium* sp. habían sido reportadas como endofitos de otras plantas; pero por primera vez aisladas de *T. testudinum*.
- ❖ *Aspergillus fumigatus*, *A. ustus* y *Cladosporium oxysporum* se reportaron como especies endofitas por primera vez.
- ❖ La prueba de χ^2 demostró que la micoflora endofítica es independiente de la época del año y del área de tejido muestreado.

7. RECOMENDACIONES

- ❖ Comparar la presencia de hongos endofitos en hojas sanas de *T. testudinum* de diferentes praderas ubicadas en Puerto Rico.
- ❖ Aislar hongos endofitos de otras hierbas marinas para determinar si hay especificidad por alguna de ellas en particular.
- ❖ Realizar estudios sobre la interacción de los hongos endofitos en *T. testudinum*.
- ❖ Determinar el rol de los endofitos en *T. testudinum*.
- ❖ Aplicar técnicas moleculares junto con las técnicas tradicionales para la identificación de los hongos endofitos aislados de *T. testudinum* y de aquellos que no logren esporular en los medios de cultivo.
- ❖ Continuar los estudios sobre la producción de compuestos bioactivos a partir de los hongos endofitos aislados de *T. testudinum* y determinar si tienen algún efecto antimicrobial.
- ❖ Incorporar estudios sobre la microflora existente en *T. testudinum* capaz de interaccionar con los hongos endofitos en el tejido.

LITERATURA CITADA

- Alexopoulos, C. J., C. W. Mims y M. Blackwell. 1996. Introductory Mycology. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1-25 pp.
- Arnold, A. E. y E. A. Herre. 2003. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia*. 95(3):388-398.
- Arnold, A. E., L.C. Mejía, D. Kyllö, E. I. Rojas, Z. Maynard, N. Robbins y E. A. Herre. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS*. 100(26):15649-15654.
- Arnold, A. E., M. M. Lee, M. Shimabukuro, M. Hoffman y F. Lutzoni. 2006. High diversity of endophytic fungi associated with *Pinus* species: evidence from three forests. Mycological Society of America, Quebec City, <http://piast.cbio.psu.edu/cgi-bin/mycological/search.cgi>.
- Bacon, C. W. y N. S. Hill. 1985. Symptomless grass endophytes: products of coevolutionary symbioses and their role in the ecological adaptations of grasses. En: Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants, pp. 155-178. The American Phytopathological Society, Minnesota.
- Barnett, H. L. y B. B. Hunter. 1987. Illustrated genera of imperfect fungi, fourth edition. Macmillan Publishing Company, New York, 218 pp.
- Bayman, P., L. L. Lebrón, R. L. Tremblay y D. J. Lodge. 1997. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). *New Phytologist*. 135:143-149.
- Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, England, 32-35 pp.
- Boyd, M. L. 1993. Estudio poblacional del género *Cladosporium* Link ex. Fries en la atmósfera del oeste de Puerto Rico. Tesis M.S. University of Puerto Rico-Mayagüez, 70 pp.
- Brem, D. y A. Leuchtman. 2001. *Epichloë* grass endophytes increase herbivore resistance in the woodland grass *Brachypodium sylvaticum*. *Oecologia*. 126:522-530.
- Calzada, C. M. 1988. El hongo *Lingra thalassiae* Orpurt et al. asociado a *Thalassia testudinum* Banks ex König en la Parguera, Puerto Rico. Tesis M. S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, P.R., 64 pp.
- Canon, P. F. y C. M. Simmons. 2002. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycologia*. 94(2):210-220.

- Carlile, M. J., S. C. Watkinson y G. W. Gooday. 2001. The Fungi. Academic Press, San Diego: 405-408 pp.
- Caruso, M., A. L. Colombo, L. Fedeli, A. Pavesi, S. Quaroni, M. Saracchi y G. Ventrella. 2000. Isolation of endophytic fungi and actinomycetes taxane producers. *Annals of Microbiology*. 50:3-13.
- Clay, K. y C. Schardl. 2002. Evolutionary Origins and Ecological Consequences of Endophyte Symbiosis with Grasses. *The American Naturalist*. 160:99-127.
- Devlin, M. 1999. Seagrasses and nutrients: What are the potencial effects of increasing nutrient levels?. *Reef Research*. 9(1):1-9.
- Do Rosário, A. M., E. Rodrigues, M. R. Moitinho y L. S. Santos. 2005. Biological Active Polyketides Produced by *Penicillium janthinellum* Isolated as an Endophytic Fungus from Fruits of *Melia azedarach*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16(2):280-283.
- Durako, M. J. 1988. Turtle Grass (*Thalassia testudinum* Banks ex König) – A Seagrass. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. 6:504-519.
- Durako, M. J y K. M. Kuss. 1994. Effects of *Labyrinthula* Infection on the Photosynthetic Capacity of *Thalassia testudinum*. *Bulletin of Marine Science*. 54(3):727-732.
- Ellis, M. B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, England, 178-319 pp.
- Espola, M. 2005. Catastro de hongos endófitos miceliales en *Thrinax morrisii* en el Bosque Estatal de Susúa, Sabana Grande, Puerto Rico. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, P.R., 80 pp.
- Faeth, S. H. 2002. Are endophytic fungi defensive plant mutualist? *Oikos*. 98:25-36.
- Fonseca, M. S. 1992. Restoring Seagrass Systems in the United States. En: G. W. Thayer (ed.). *Restoring the Nation's Marine Environment*, pp 79-110. Sea Grant College, College Park, Maryland.
- Fröhlich, J., K. D. Hyde y O. Petrini. 2000. Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research* 104(10):1202-1212.
- Gamboa, M. A. y P. Bayman. 2001. Communities of Endophytic Fungi Leaves of a Tropical Timber Tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). *Biotropica*. 33(2):352-360.
- Gamboa, M. A., S. Laureano y P. Bayman. 2002. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? *Mycopathologia*, 156:41-45.

- García, C. I. 1990. Guía de ecosistemas marinos de Puerto Rico – Las praderas de *Thalassia* de Puerto Rico. Programa de Colegio Sea Grant de la Universidad de Puerto Rico, 53 pp.
- Gold, S. E., M. D. García y A. D. Martínez. 2001. New (and Used) Approaches to the Study of Fungal Pathogenicity. *Annual Review of Phytopathology*. 39(1):337-365.
- Höller, U., A. D. Wright, G. F. Matthee, G. M. König, S. Draeger, H. J. Aust y B. Schulz. 2000. Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycological Research* 104(11):1354-1365.
- Horn, W. S., M. S. J. Simmonds, R. E. Schwartz y W. M. Blaney. 1995. Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp. *Tetrahedron*. 14:3969-3978.
- Jensen, P. R., K. M. Jenkins, D. Porter y W. Fenical. 1998. Evidence that a New Antibiotic Flavone Glycoside Chemically Defends the Sea Grass *Thalassia testudinum* against Zoosporic Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(4):1490-1496.
- Johnson, G., G. Ganga, R. Sandeep, B. Sasikumar y K.V. Saji. 2005. Endophytic mycoflora of inner bark of *Azadirachta indica* A. Juss. *Current Science*. 88(2):218-219.
- Jong, S. C. y M. J. Edwards. 1991. Media Formulation, Catalogue of Filamentous Fungi. ATCC. 440 pp.
- Kern, M. E. y K.S. Blevins. 1997. Medical Mycology-A Self Instructional Text. F. A. Davis Company, Philadelphia, 231 pp.
- Klich, M. A. y J. I. Pitt. 1988. A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* Species and their Teleomorphs. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, North Ryde, Australia, 114 pp.
- Lemos, C., A. S. Couto, M. D. Bertoni y C. E. Coto. 1999. Antiviral activity metabolites isolated from *Curvularia pallescens*. *Revista Argentina de Microbiología*. 31(4):193-200.
- Lodge, D. J., P. J. Fisher y B. C. Sutton. 1996. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. *Mycologia*. 88(5):733-738.
- Lodge, D. J. y S. Cantrell. 1995. Fungal communities in wet tropical forests: variation in time and space. *Canadian Journal of Botany* 3:1391-1398.
- Lupo, S., S. Tiscornia L. Bettucci. 2001. Endophytic Fungi from capsules and seeds of *Eucalyptus globules*. *Revista Iberoamericana de Micología* 18:38-41.
- Macarthur D. J. y P. A. McGee. 2000. A Comparison of the Endophytic Fungi from Leaves of *Banksia integrifolia* at Three Sites on the East Coast of Australia. *Australasian Mycologist*. 19(3):78-109.

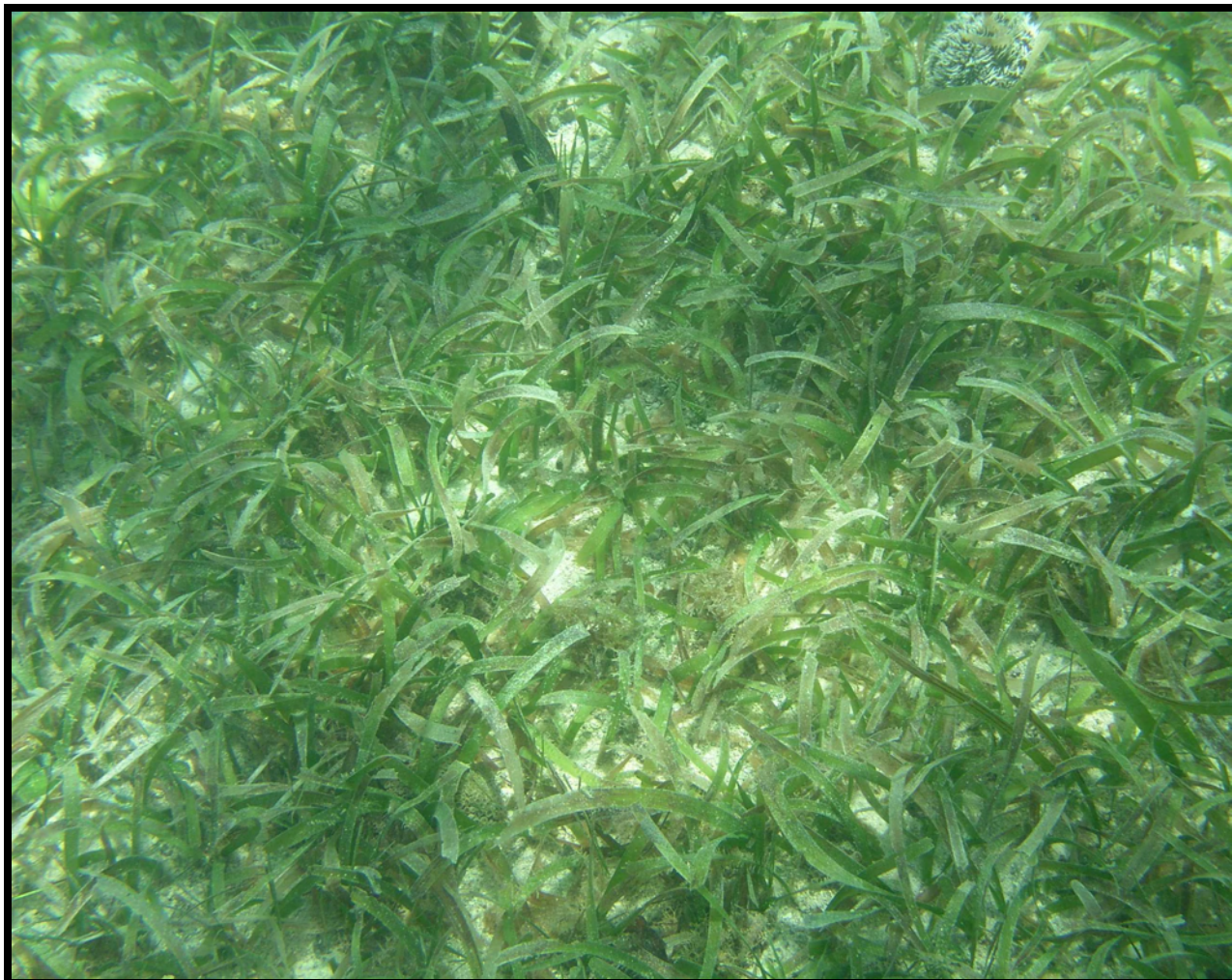
- Maldonado, S. L., J. Leiva y B. Quiñones. 2003. Preliminary studies of fungal endophytes in *Thalassia testudinum*. Puerto Rico Louise Strokes Alliance for Minority Participation organization. http://www.prlsamp.org/what_is_prlsamp/Major_Events/PRISM/2003/Abstract/biology.htm
- Marshall, D., B. Tunali y L. R. Nelson. 1999. Ocurrance of Fungal Endophytes in Species of Wild *Triticum*. Crop Science. 39:1507-1512.
- Mehdi, F. S. y S. M. Saifullah. 1992. Mangrove Fungi of Karachi, Pakistan. Journal of Islamic Academy of Sciences. 5(1):24-27.
- Menéndez, A., M. D. Bertoni y D. Cabral. 1997. Endofitos fúngicos en *Juncos imbricatus* var *chamissonis*: identificación de los patrones de colonización. Revista Iberoamericana de Micología 14:125-128.
- Petrini, O. 1986. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. En: N. J. Fonema and J. Van den Heuvel (eds.), Microbiology of the phyllosphere, pp. 175-187. Cambridge University Press, Cambridge.
- Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. En: J. H. Andrews and S. S. Hirano. (eds.) Microbial Ecology, pp. 179-197. Springer-Verlag, New York.
- Petrini, O., J. Stone y F. E. Carroll. 1982. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: A preliminary study. Canadian Journal of Botany. 60: 789-796.
- Phillips, R. C. 1982. Seagrass meadows. In Creation and restoration of coastal plant communities. R.R. Lewis, CRC Press, Boca Raton, pp. 173-201.
- Pitt, J. I. 1985. A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, North Ryde, Australia, 184 pp.
- Pontón, J., M. D. Moragues, J. Gené, J. Guarno y G. Quindos. 2002. Hongos y Actinomicetos Alergénicos. Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao, 22-23 pp. <http://hongos-alergenicos.reviberoammicol.com/>
- Ragazzi, A., S. Moricca, P. Capretti, I. Dellavalle, F. Mancini y E. Turco. 2001. Endophytic fungi in *Quercus cerris*: isolation frequency in relation to phenological phase, tree health and the organ affected. Phytopathology Mediterranean 40:165-171.
- Reyes, M. V. 1998. Restauración de habitat en hierbas marinas de la costa suroeste de Puerto Rico. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, P.R., 63 pp.
- Riddell, R. W. 1950. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. Mycologia. 42:265-270.

- Salgado, C. y M. C. Cepero. 2005. Aislamiento de hongos endofitos en rosa (*Rosa hybrida*) en Bogotá, Colombia. *Revista Iberoamericana de Micología* 22:99-101.
- Schulthess, F. M. y S. H. Faeth. 1998. Distribution, abundances and associations of the endophytic fungal community of Arizona fescue (*Festuca arizonica*). *Mycologia*. 90(4):569-578.
- Shamoun, S. F. y T. N. Sieber. 2000. Colonisation of leaves and twigs of *Rubus parviflorus* and *R. spectabilis* by endophytic fungi in a reforestation site in British Columbia. *Mycological Research* 104(7):841-845.
- Sivanesan, A. 1987. Graminicolous Species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. 1987. CAB International Mycological Institute, U.S., 261 pp.
- Stinson, M., D. Ezra, W. M. Hess, J. Sears y G. Strobel. 2003. An endophytic *Gliocladium sp.* of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. *Plant Science*. 165(1):913-922.
- Strobel, G. y B. Daisy. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67(4):491-502.
- Suryanarayanan, T. S., G. Venkatesan y T. S. Murali. 2003. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest tree: Diversity and distribution patterns. *Current Science*. 85(4):489-493.
- Suryanarayanan, T. S., S. K. Wittlinger y S. H. Faeth. 2005. Endophytic fungi associated with cacti in Arizona. *Mycol. Res.* 109(5):635-639.
- Tan, R. X. y W. X. Zou. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Products Reports* 18:448-459.
- Ulloa, M. y R. T. Hanlin. 2000. *Illustrated Dictionary of Mycology*. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 448 pp.
- Urdaneta, L. M., A. E. Delgado, L. Sosa y A. Piñeiro. 2002. Microbiota del fitoplano en plátano Harton, en el municipio Francisco Javier Pulgar del estado Zulia, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía* 19:95-108.
- U.S. Soil Conservation Service. 2000. *Munsell Soil Color Charts*. Munsell Color Corporation; Washable Edition, New York.
- Vega, F. E., F. Posada, M. C. Aime, S. W. Peterson y S. A. Rehner. 2006. Coffee endophytes. *Mycological Society of America*, Quebec City, <http://piast.cbio.psu.edu/cgi-bin/mycological/search.cgi>.

- Vergeer, L. H. y C. den Hartog. 1994. Omnipresence of Labyrinthulaceae in seagrass. *Aquatic Botany*. 48:1-20.
- Verweij, P. E., Bergh, M. F., P. M. Rath, B. E. Pauw, A. Voss y J. F. Meis. 1999. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(5):1606-1609.
- Vicente, V. P., J. A. Arroyo-Aguilú, y J. A. Rivera. 1978. *Thalassia* as a Food Source: Importance and Potencial in the Marine and Terrestrial Environments. *Journal of Agriculture of University of Puerto Rico*. 107-120 pp.
- Wilson, D. 1995. Endophytes-the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*. 73(2):535-536.
- Wilson, W. L. 1998. Isolation of Endophytes from Seagrasses from Bermuda. Tesis M.S. University of New Brunswick, 72 pp.

APÉNDICE A

Pradera de *Thalassia testudinum*



APÉNDICE B

Hongos endofitos aislados

I. Número de hongos endofitos aislados (cultivables y no cultivables) por muestreo.

Muestreo	Pedazos de hojas Procesados	Número de hongos aislados	Cultivables	No cultivables
M1	432	28	14	14
M2	432	38	33	5
M1 + M2	864	66	47	19

II. Especies de hongos endofitos miceliales cultivables aislados por muestreo.

Especies / morfotipo aislados	Número de aislados		% especies recuperadas
	M1	M2	
<i>Botrytis</i> sp.	1	0	2.1
<i>Cladosporium</i> sp.	1	0	2.1
<i>Cladosporium oxysporum</i>	0	5	10.6
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	0	2.1
<i>Acremonium</i> sp.	1	1	4.3
<i>Fusarium</i> sp.	0	4	8.5
<i>Penicillium janthinellum</i>	1	0	2.1
<i>Curvularia pallescens</i>	0	1	2.1
<i>Curvularia brachyspora</i>	1	5	12.8
<i>Aspergillus ustus</i>	1	0	2.1
<i>Aspergillus flavus</i>	5	0	10.6
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	16	38.3
Morfotipo 1	0	1	2.1
Total de hongos clasificados	14	33	100.0

APÉNDICE C

Análisis estadístico de los datos

Resultados de las prueba de χ^2 para las frecuencias de infección por época del año y por sección de la hoja.

I. Prueba de χ^2 para la infección por época de año (verano M1 e invierno M2)

Tablas de contingencia

Frecuencias: infección por muestreo/época total (verano + invierno)

Frecuencias absolutas

Muestreo 1		Total
1	28	42.42
2	38	57.58
Total	66	100.00

Frecuencias relativas al total

Muestreo 1		Total
1	0.42	0.42
2	0.58	0.58
Total	1.00	1.00

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	1.52	1	0.2184
Chi Cuadrado MV-G2	1.52	1	0.2175
Coef.Conting.Cramer	0.15		
Coef.Conting.Pearson	0.15		

II. Prueba de χ^2 para la infección por sección de la hoja de forma total (M1 + M2)

Tablas de contingencia

Frecuencias: pedazos infectados

Frecuencias absolutas

En columnas:Fracción

Muestreo	ápice	base	centro	Total
1	12	6	10	28
2	13	16	9	38
Total	25	22	19	66

*Frecuencias relativas al total**En columnas:Fracción*

Muestreo	ápice	base	centro	Total
1	0.18	0.09	0.15	0.42
2	0.20	0.24	0.14	0.58
Total	0.38	0.33	0.29	1.00

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	3.20	2	0.2023
Chi Cuadrado MV-G2	3.29	2	0.1932
Coef.Conting.Cramer	0.16		
Coef.Conting.Pearson	0.21		

APÉNDICE D

Definiciones de términos (adaptado de Ulloa y Hanlin 2000)

1. biseriado- arreglado en dos series o filas. En algunas especies de *Aspergillus*; la vesícula es biseriada cuando contiene una fila de métulas seguido de una fila de fiálidos sujetando las conidias.
2. biverticilado- ramificado en dos niveles; por ejemplo con métulas y fiálidos como en los conidióforos de *Penicillium*.
3. catenulado- formando cadenas.
4. conidióforo- hifa simple o ramificada, la cual es morfológica o fisiológicamente diferenciada de las hifas somáticas para producir y sujetar las conidias.
5. endofito- hongo o bacteria que vive en el interior de tejidos vegetales sin demostrar signos internos.
6. estroma- masa compacta de hifa somáticas.
7. exudado- cualquier líquido o fluído que sale de hifas de algunos hongos y se acumula en gotas de diferentes formas de acuerdo a las especies y condiciones del medio donde se desarrollan.
8. fitopatógeno- organismo capaz de causar una enfermedad (lesions, síntomas y signos) en tejidos vegetales.
9. hilo- cicatriz o marca en las esporas, indica un punto de union con el conidióforo.
10. *hülle cells*- células de pared gruesa con hueco angosto de forma intercalado o terminal.
11. patógeno- organismo capaz de causar una enfermedad.
12. poroconidia- espora de reproducción asexual que se origina de un poro en la pared de una célula conidiógena o de otra poroespora.
13. ramoconidias- ramificación apical o intercalada del conidióforo del cual se pegan las conidias.
14. simbiosis- dos o más organismos viviendo en común, los cuales se benefician el uno del otro.
15. tubo germinativo- hifa corta que surge de una espora durante la germinación, la cual en condiciones favorables puede desarrollarse como una hifa extensa.