CATASTRO DE HONGOS ENDÓFITOS MICELIALES EN *Thrinax morrisii* H. WENDL. EN EL BOSQUE ESTATAL DE SUSÚA, SABANA GRANDE, PUERTO RICO

Por

Marian Espola Sepúlveda

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
2005

Aprobado por:

_____	_____
Carlos A. Muñoz, Ph.D. Miembro, Comité Graduado	Fecha
_____	_____
Carlos Santos, Ph.D. Miembro, Comité Graduado	Fecha
_____	_____
Sandra L. Maldonado, Ph.D. Presidenta, Comité Graduado	Fecha
_____	_____
Mildred Zapata, Ph.D. Representante de Estudios Graduados	Fecha
_____	_____
Lucy B. Williams, Ph.D. Directora, Departamento de Biología	Fecha

ABSTRACT

Endophytic fungi are organisms that, during all or part of their life cycle, invade the internal tissues of plants without causing symptoms of disease. A survey of endophytic micelial fungi in leaves of *Thrinax morrisii* H. Wendl. in Susúa Forest, Sabana Grande, Puerto Rico, during the wet and dry seasons was performed. Two areas within the forest, with differences in elevation were identified and healthy leaves from palms were collected. Leaves fragments were surface sterilized with ethanol and sodium hipochlorite solutions and incubated in Malt Extract Agar (MEA) with chloramphenicol. Endophytic fungi were recovered with an infection rate between 48.5 – 76.5 %. The highest infection rate was observed during the wet season; there were also differences between infection rates among different study areas. No differences in endophytic colonization were observed when different regions of the leaves were examined. A total of six genera and six morphotypes were identified with the highest frequencies for two of these morphotypes and *Annellolacinia* sp. Also, *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp. and *Phomopsis* sp. were isolated in low frequencies, these fungi have been identified as pathogens in other plant species. This study represents the first reported evidence of the presence of endophytic fungi in *T. morrisii* leaves and it suggests a relationship between fungal colonization, season and localization of the palm populations within the forest.

RESUMEN

Los hongos endófitos son organismos que durante todo o parte de su ciclo de vida invaden los tejidos internos de las plantas sin causar síntomas de enfermedad. Se realizó un catastro de hongos endófitos miceliales en hojas de la palma tropical *Thrinax morrisii* H. Wendl. en el Bosque Estatal de Susúa en Sabana Grande, Puerto Rico en temporada seca y temporada de lluvia. Se seleccionaron dos áreas del bosque con diferencias en elevación y se colectaron hojas sanas de varias palmas. Secciones de hojas sanas se limpiaron superficialmente con soluciones de alcohol e hipoclorito de sodio y se incubaron en agar de extracto de malta (MEA) con cloramfenicol. Se recuperaron hongos endófitos con una tasa de infección entre 48.5 – 76.5 %. La tasa de infección mayor se observó durante el periodo lluvioso y también se observaron diferencias entre las tasas de infección de las dos áreas de estudio. No se encontraron diferencias en la colonización de hongos endófitos relacionadas a las diferentes regiones de la hoja. Se identificaron seis géneros y seis morfotipos diferentes, siendo dos de estos morfotipos los de mayor frecuencia junto a cf. *Annellolacinia* sp. Además, se aislaron en baja frecuencia *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp. y *Phomopsis* sp., hongos que han sido identificados como patógenos en otras especies de plantas. Este representa el primer informe escrito sobre la presencia de hongos endófitos en hojas de *T. morrisii* y se sugiere una relación entre la colonización, la temporada del año y la localización de las poblaciones de palmas dentro del bosque.

® MARIAN ESPOLA SEPÚLVEDA 2005

DEDICATORIA

A mi esposo John Guzmán Pérez porque siempre ha estado conmigo, en cada logro y en cada momento difícil. Sin ti no hubiera podido continuar.

A mi madre Esther Sepúlveda porque siempre me apoyó y envió sus oraciones que me llenaron de fuerza.

Al Dr. Carlos Betancourt por ser la inspiración y el ejemplo de muchos. Siempre será un buen micólogo, un excelente profesor y un gran amigo. Gracias por creer en mí.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que de alguna forma contribuyeron a que se llevara a cabo esta investigación. Primero que nada, a Dios por darme las fuerzas y el entendimiento para seguir adelante cada día y a mi familia por apoyarme y ayudarme a realizar todas mis metas.

Un agradecimiento especial a los miembros del mi comité graduado. A la Dra. Sandra Lee Maldonado, mi consejera de tesis, por darme la oportunidad de trabajar con ella y con un grupo de hongos que no conocía. Gracias por su ayuda durante todo este tiempo. Al Dr. Carlos Betancourt por ayudarme con el diseño y las primeras etapas de la investigación. Al Dr. Carlos Muñoz por su ayuda, sugerencias y buenos consejos. Finalmente, al Dr. Carlos Santos por sus sugerencias y porque amablemente se ofreció a ser miembro de mi comité.

Agradezco, además, a Wetsy Cordero, Oficial de Manejo del Bosque Estatal de Susúa, y al personal que trabaja en el bosque, por mostrar interés en mi investigación y ayudarme cuando lo necesité. Se trabajó en el bosque con el permiso del Departamento de Recursos Naturales y Ambientales (DRNA 02-IC-023). Gracias al Dr. Ernesto Riquelme por su ayuda en el análisis estadístico. Agradezco grandemente a las estudiantes subgraduadas Anmelys Rivera Valentín y Gloriner Morell Rodríguez por su excelente trabajo en el laboratorio y su ayuda al transferir los interminables cultivos. Gracias a Omar Monsegur y a Bárbara Sánchez por acompañarme durante los viajes de campo, ayudarme a colectar las muestras y realizar la descripción de las plantas en las áreas de estudio. Saben que además de ser unos excelentes compañeros de clase ya son

parte de mi familia. Agradezco al Dr. Rafael Montalvo por permitirme utilizar las facilidades de su laboratorio de investigación. A Greetchen Díaz Muñoz y Giovanni López Ferrer les agradezco su amistad y toda su ayuda; porque sin tener que hacerlo, invirtieron de su tiempo para ayudarme en el laboratorio.

Gracias a Carolyn Rivera y Magaly Zapata, por ser excelentes técnicos de laboratorio, por permitirme utilizar las facilidades y materiales. Carol, gracias por tus valiosas sugerencias y ayuda durante la investigación. Gracias al Dr. Carlos Ríos Velázquez por el préstamo de materiales y facilidades de su laboratorio de investigación. Así también, al Dr. Duane Kolterman y Dr. Gary Breckon por permitir el uso de las facilidades del Herbario de Biología (MAPR) y biblioteca de botánica. Al Dr. Paul Bayman que gentilmente me facilitó literatura relacionada con el tema y a los doctores Gary Samuels y Jack Rogers por sus sugerencias.

Finalmente, agradezco al Sr. José Almodóvar, técnico del Centro de Microscopía del Departamento de Biología, Recinto Universitario de Mayagüez por su asistencia y ayuda. Al Sr. Luis J. Olivieri director del programa Partnership for Spatial and Computational Research (PaSCoR), por permitirme utilizar las facilidades y al Sr. Roy Ruiz, asistente de investigación, por crear los mapas del bosque y áreas de estudio. Muchas gracias a Luis Soto por ayudarme con la edición de algunas fotos y a mis compañeros de laboratorio: Marylee, Yanitza, William, Idarnis, Selimar y Carlos, por su apoyo. Así también agradezco las sugerencias de mis compañeros Gualberto, Jessie, Barbie y la Dra. Dimaris Acosta y a los miembros de la Asociación de Estudiantes de Biología (AEB).

TABLA DE CONTENIDO

Lista de Figuras ix

Lista de Tablas xi

Lista de Apéndices xii

Introducción 1

Revisión de Literatura 4

Materiales y Métodos 18

Resultados 29

Descripción de los Hongos Endófitos Miceliales Recuperados 36

Discusión 52

Conclusiones 62

Recomendaciones 63

Literatura Citada 64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localización de las zonas donde se han realizado estudios de hongos endófitos en Puerto Rico. 11

Figura 2. Localización del Bosque Estatal de Susúa. 14

Figura 3. *Thrinax morrisii* H. Wendl. ……..... 17

Figura 4. Localización de las poblaciones de *T. morrisii* utilizadas en el estudio. 18

Figura 5. Áreas de estudio seleccionadas en el Bosque Estatal de Susúa. 19

Figura 6. Diagrama de la hoja de *T. morrisii* utilizado para procesar las muestras. 25

Figura 7. Tasa de infección de discos por muestreo. 29

Figura 8. Tasa de infección de discos por área en cada muestreo. 30

Figura 9. Proporción de las tasas de infección por región de la hoja 32

Figura 10. Morfología de cf. *Annellolacinia* sp. 37

Figura 11. Morfología de *Colletotrichum* sp. 38

Figura 12. Morfología de cf. *Fusarium* sp. 40

Figura 13. Morfología de *Pestalotiopsis* sp. 41

Figura 14. Morfología de *Phomopsis* sp. 43

Figura 15. Morfología de *Pithomyces maydicus.* 44

Figura 16. Mofotipo 1. 46

Figura 17. Morfotipo 2. 47

LISTA DE FIGURAS (CONT.)

Figura 18. Morfotipo 3. 48

Figura 19. Morfotipo 4. 50

Figura 20. Morfotipo 5. 50

Fugura 21. Morfotipo 6 (Orden Xylariales). 51

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Identificación y descripción de las áreas de estudio. 20

Tabla 2. Precipitación mensual promedio en el Bosque Estatal de Susúa para los años 2003 – 2004. 21

Tabla 3. Palmas seleccionadas por área para realizar los muestreos. 22

Tabla 4. Parámetros físico-químicos medidos durante el primer y segundo muestreo..... 23

Tabla 5. Código de identificación para las palmas seleccionadas en los muestreos y las muestras rotuladas en el laboratorio. 26

Tabla 6. Número de hongos endófitos miceliales aislados y su frecuencia de infección por área y por muestreo. 31

Tabla 7. Tasa de infección de hongos endófitos miceliales por región de la hoja durante cada uno de los muestreos. 33

Tabla 8. Frecuencias relativas de los géneros y morfotipos aislados durante el estudio. 35

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice 1. Lista de las especies de plantas encontradas en las áreas de estudio y algunas de sus características. 69

Apéndice 2. Número total de hongos endófitos miceliales aislados por área de estudio en cada muestreo. 71

Apéndice 3. Resultados de las pruebas de independencia Chi ^{2} para las frecuencias de infección de discos por temporada, por área de estudio en cada muestreo y por región de la hoja. 72

Apéndice 4. Resultados de las pruebas de hipótesis de muestras independientes (prueba *t*) y muestras pareadas (prueba *t* pareada) para los parámetros físico-químicos. 78

INTRODUCCIÓN

Los endófitos son organismos que durante todo o parte de su ciclo de vida invaden los tejidos internos de las plantas sin causar síntomas de enfermedad (Wilson, 1995). Este grupo incluye bacterias (Chanway, 1996) y hongos, y probablemente existan protozoarios y nematodos capaces de vivir endofíticamente (Gamboa y Bayman, 2001). En este caso, se le prestará atención a los hongos endófitos, grupo en el que se incluyen además, hongos patógenos que no provocan síntomas en el tejido o que se encuentran en fases previas al periodo de infección (Wilson, 1995).

Los científicos no han llegado a una conclusión definitiva sobre qué realmente es un endófito ni sobre el tipo de asociación que presentan con su hospedero. Carroll (1986; 1988) describió esta asociación como una simbiosis mutualista de dos posibles formas: constitutiva o inducida. El mutualismo constitutivo predomina en las infecciones de gramíneas, transmitidas a través de semillas, donde la producción de toxinas por el hongo resulta en protección, pero a la vez en un alto costo metabólico para la planta. El mutualismo inducido predomina en plantas donde los endófitos se diseminan por esporas y provee protección a poblaciones enteras y no a plantas específicas. Por otro lado, Faeth y Fagan (2002) no apoyan el concepto de mutualismo en los endófitos porque existe la probabilidad de que se conviertan en patógenos si la fisiología de la planta o las condiciones ambientales lo propician.

Así también, se desconoce el mecanismo evolutivo por el cual un hongo se convierte en endófito y cómo será su comportamiento eventualmente. Sridhar y Raviraja (1995) indican que el endofitismo podría ser una adaptación en respuesta a la competencia por sustrato. Por otro lado, se sugiere que los hongos, luego de vivir como endófitos, pueden actuar como saprófitos al iniciar los procesos de senescencia en una planta (Petrini, 1991). Estudios como el de Rodrigues (1996) confirman esta hipótesis debido a que la mayoría de los hongos aislados como endófitos ya han sido reportados como saprófitos o patógenos de otras especies de plantas. De igual manera, Schulz *et al*. (1998) corroboraron la capacidad patogénica de hongos aislados inicialmente como endófitos.

Según las investigaciones, todas las plantas de la tierra pueden ser hospederos de al menos un hongo endófito (Petrini, 1986; Rodrigues, 1996) e inclusive los endófitos han sido aislados de plantas acuáticas (Stone *et al*., 2000). El mayor énfasis se le ha dado a plantas de las familias Coniferaceae, Ericaceae y Gramineae en zonas templadas; pero también se han aislado endófitos de plantas no vasculares y helechos (Dreyfuss y Petrini, 1984; Petrini, 1986). En los últimos años se ha comenzado a estudiar la diversidad de hongos endófitos en un amplio grupo de plantas en zonas tropicales.

En la mayoría de las plantas la presencia de hongos endófitos es beneficiosa y de algunas de estas especies de hongos tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios; actividad que promete adelantos en el área biotecnológica y en sistemas agrícolas. Algunas gramíneas estériles a causa de infecciones endófitas adquieren la habilidad de competir, crecer vigorosamente o tolerar sequías (Clay 1986; 1989; Siegel y

Schardl, 1991). Algunos de estos hongos también producen sustancias con propiedades insecticidas, antibacteriales, antifúngicas y tóxicas a mamíferos (Siegel y Schardl, 1991). Estos compuestos se pueden desarrollar como modelos investigativos, fuentes de nuevos metabolitos para medicamentos y usos industriales, agentes de control biológico y manipulación genética con fines biotecnológicos (Clay, 1989; Siegel y Schardl, 1991; Stone *et al*., 2000).

Debido al interés que ha surgido en estudiar nuevas comunidades endófitas en diferentes hospederos y regiones geográficas, se escogió el Bosque Estatal de Susúa, Sabana Grande, Puerto Rico, para realizar esta investigación. El propósito principal de este trabajo es realizar un catastro cuantitativo y cualitativo de hongos endófitos miceliales en la palma *Thrinax morrisii* H. Wendl. (Arecaceae). Actualmente no se han realizado estudios de hongos endófitos en esta planta ni el área suroeste de la Isla, por lo que se propusieron los siguientes objetivos:

- Identificar los géneros de hongos endófitos miceliales en las hojas de *T. morrisii* y determinar su frecuencia relativa en cada muestreo.
- Determinar la tasa de infección de hongos endófitos miceliales.
- Comparar las tasas de infección de hongos endófitos entre periodos de lluvia y sequía y entre dos zonas del bosque a diferentes alturas.

REVISIÓN DE LITERATURA

Definición de hongos endófitos

La palabra endófito se deriva del griego *endon*, que significa dentro y *phyte* que significa planta (Chanway, 1996). De Barry fue el primero en utilizar este término, en el año 1866, al referirse a hongos viviendo dentro de los tejidos de una planta (Petrini, 1986). Através de los años, diferentes autores han propuesto definiciones más complejas, coincidiendo en que la naturaleza endofítica permite colonizar tejidos internos de plantas sin producir signos visibles de enfermedad. Sin embargo, la polémica reside en determinar qué grupo de organismos se incluyen en la definición. En 1986, Carroll describió los hongos endófitos como endosimbiontes y excluyó los hongos patógenos y asociaciones micorrizas. Petrini (1991) expandió esta definición e incluyó a los organismos con fases epifitas y patógenos latentes que viven asintomáticamente, por algún tiempo, dentro de los tejidos internos de la planta. Wennström (1994) abogó para que se redefiniera el término o que se continuara utilizando en su contexto original ya que no estuvo de acuerdo con las nuevas definiciones. Específicamente, argumentó a favor de mantener la definición original, un organismo que vive en otro organismo, y prestar mayor atención a los ciclos de vida y características de los hongos. Finalmente, Wilson (1995) presentó una extensa revisión sobre los diferentes significados del término y definió a los endófitos como hongos o bacterias que, durante todo o parte de su ciclo de vida, invaden los tejidos de plantas vivas y causan infecciones asintomáticas en todos los tejidos sin producir síntomas de infección. Esto excluye las asociaciones micorrizas e

incluye hongos con fases latentes antes del periodo de infección y hongos que son patógenos conocidos pero que no expresan síntomas en el tejido.

Taxonomía

Los hongos endófitos que afectan generalmente a las gramíneas pertenecen a la Familia Clavicipitaceae, tribu Balansieae, y son biotrofos obligados. Este grupo incluye los géneros *Balansia* y *Myriogenospora*, que afectan gramíneas C4 o de temporada cálida, y *Atkinsonella* y *Epichlöe* que afectan gramíneas C3 o de temporada fría (Siegel y Schardl, 1991). A pesar de clasificarse como endófitos, porque se mantienen en los tejidos por meses o años sin causar enfermedad, *Balansia Atkinsonella* y *Epichlöe* producen una fase patogénica. La producción de estromas y esporas en las inflorescencias del huésped causan la esterilización parcial o completa (Stone *et al*., 2000) e infecciones sistémicas trasmitidas entre generaciones a través de las semillas (Carroll, 1986). Las otras plantas también se infectan por las conidias aerotransportadas.

Estados anamorfos de la tribu Balansieae se clasifican dentro del género *Acremonium*, sección *Albo-lanosa* Morgan-Jones & Gams, donde se conocen dos especies principales: *A. coenophialum* y *A. lolii* (Siegel y Schardl, 1991). Estos hongos no esporulan en los tejidos y nunca producen signos externos de enfermedad, considerándose endófitos verdaderos. Al igual que *Epichlöe*, están restringidos al grupo de gramíneas de temporada fría (Clay, 1989).

Los endófitos no clavicipitáceos causan infecciones asintomáticas en los tejidos de sus huéspedes. Aunque un pequeño número se ha reportado en gramíneas,

generalmente se consideran colonizadores de otras plantas. Este grupo de hongos incluye un gran número de géneros y especies de diferentes familias (Petrini, 1986). Stone *et al*. (2000) presentan una amplia revisión de las plantas estudiadas hasta el momento y las especies de hongos endófitos encontradas en los diferentes tejidos.

Mecanismos de infección

Petrini (1991) propuso tres mecanismos que explican la llegada de hongos endófitos al tejido vegetal: 1) llegada e incorporación de esporas aerotransportadas; 2) transmisión por semillas, y 3) esporas inoculadas por insectos directamente en las plantas. El primer mecanismo, también conocido como transmisión horizontal, ocurre en la mayoría de los casos, predominando en plantas leñosas donde el hongo usualmente se dispersa mediante esporas (Carroll, 1990). La transmisión por semillas ha sido ampliamente estudiada en gramíneas, donde los hongos se transmiten entre generaciones a través de las semillas de la planta hospedera (Carroll, 1986).

Estudios en zonas tropicales

A pesar que los hongos endófitos en gramíneas han sido los más estudiados, se han realizado muchas investigaciones en otras familias de plantas en zonas templadas y tropicales. Los reportes incluyen coníferas, monocotiledóneas, dicotiledóneas y plantas no vasculares (Petrini, 1986). En esta revisión, se prestará mayor atención a los estudios realizados en zonas tropicales.

En 1984, Petrini y Dreyfuss publicaron uno de los primeros estudios donde se demostró la presencia de hongos endófitos en treintiséis plantas tropicales dentro de diferentes familias. Al analizar tejidos de raíces, hojas y tallos se encontraron hongos exclusivos de algunos tejidos y hongos identificados como patógenos de plantas tropicales. Estudios más recientes han intentado demostrado la ocurrencia de hongos endófitos (Suryanarayanan *et al*., 2002), su especificidad en tejidos (Cannon y Simmons, 2002), han correlación las fuentes externas de inóculo con los hongos asociados a las plantas y se han manipulado las condiciones ambientales para evidenciar la transmisión de hongos endófitos (Arnold y Herre, 2003; Evans *et al*., 2003).

Suryanarayanan *et al*. (2002) estudiaron las comunidades endófitas de los árboles en cuatro tipos de bosques tropicales. Estos bosques, dentro de una reserva forestal de la India, se diferenciaron por el gradiente de precipitación. Esta característica influyó en los resultados ya que, la mayor diversidad y riqueza de especies endófitas se encontró en el bosque con mayor precipitación y se reportó un aumento en el número de aislados durante la temporada lluviosa.

Cannon y Simmons (2002) analizaron doce especies de árboles en una reserva forestal de Guyana. Aunque no se pudo demostrar que los hongos endófitos fueran específicos a un hospedero, se encontraron altas tasas de colonización y de infecciones múltiples, comparables con otros estudios en zonas tropicales. Además, se encontraron diferencias en el patrón de colonización entre tejidos y la preferencia por las zonas específicas de la hoja.

Arnold y Herre (2003) realizaron un importante estudio donde identificaron factores asociados a los patrones de colonización endofítica en *Theobroma cacao* (Malvaceae), un cultivo de importancia en Panamá. Estos factores incluyeron la cobertura del dosel del bosque, la cantidad y disponibilidad de propágulos epifitos en el aire y la transmisión horizontal de éstos hongos. Como evidencia, se produjeron plantas libres de endófitos a partir de semillas no infectadas y se observó la eventual colonización de las hojas expuestas. Así también, Evans *et al*. (2003) aislaron hongos de plántulas de *T. gileri* previamente inoculadas, corroborando así su capacidad endofítica.

Hongos endófitos en palmas

Los estudios de hongos endófitos en palmas han sido pocos y en su mayoría solo se han cuantificado e identificado los hongos aislados. En 1990 Rodrigues y Samuels publicaron sus hallazgos en *Licuala ramsayi*, la palma de abanico australiana. Aislaron once hongos diferentes pertenecientes a ocho géneros, siendo la familia Xylariaceae la más común, seguido por el género *Idriella*, en el cual se describió una nueva especie, *I. licualae*. En el estudio se encontró que la mayoría de estos hongos se concentraron en el área de las venas.

Rodrigues (1992; 1994), además, analizó las comunidades endófitas de *Euterpe oleracea*, una palma que se encuentra en los llanos inundables del Amazonas. El potencial para la descripción de nuevas especies en diferentes huéspedes de zonas tropicales se comprobó con esta investigación. De cincuentisiete especies de hongos endófitos aislados, *Xylaria cubensis* y *Letendraea* sp. fueron los más frecuentes. Se

describió una nueva especie, *Letendraeopsis palmarum* (Rodrigues y Samuels, 1994), así como tres nuevas especies de *Idriella*: *I. euterpes*, *I. asaicola* e *I. amazonica* (Rodrigues y Samuels, 1992). En el análisis de diferentes aislados de *Xylaria* se encontró una alta diversidad genética entre especies (Rodrigues, 1992; Rodrigues *et al*., 1995) y Las frecuencias de colonización mostraron una variación significativa entre estaciones del año, mientras que la temperatura, lugar y estado de crecimiento de las plantas afectaron las frecuencias de las especies encontradas. Estos resultados además, apoyaron la hipótesis de especificidad entre especies de hongos y tejidos vegetales.

Southcott y Johnson (1997) aislaron hongos endófitos de las palmas *Sabal bermudana* y *Livistona chinensis* en Bermuda. Los géneros *Idriella* y *Aspergillus* fueron los más comunes. En este estudio no se encontró diferencia significativa entre las especies de endófitos aisladas de ambas palmas, pero al observar secciones de tejido bajo microscopía de luz, se determinó una diferencia en el patrón de crecimiento de los hongos.

Taylor *et al*. (1999) compararon la colonización de hongos endófitos de *Trachycarpus fortunei* entre China, su ambiente natural, y Australia y Suiza. Los porcientos de colonización fueron bajos pero estuvieron dentro del rango reportado por Rodrigues (1994). Sin embargo, los resultados mostraron más afinidad con investigaciones de otras plantas en zonas templadas que en zonas tropicales. *Glomerella cingulata* y especies de *Phomopsis* fueron los hongos dominantes y se encontró también un gran número de especies raras.

El estudio más reciente de hongos endófitos en palmas se realizó simultáneamente en Australia y Brunei con una especie no identificada de *Licuala sp*. y *Licuala ramsayi* (Fröhlich *et al*., 2000). El propósito de la investigación fue examinar cualitativa y cuantitativamente los hongos endófitos presentes en ambas especies y se encontró que *Xylaria* fue el género más común. Además, se determinó una posible transmisión vertical de endófitos en estas palmas y una mayor tasa de aislamiento de las venas de las hojas.

Hongos endófitos en Puerto Rico

En Puerto Rico, se han investigado hongos endófitos en árboles de diferentes familias y en orquídeas. Sin embargo, los estudio se han limitado al área noreste de la Isla (Figura 1), especialmente en la Estación Experimental El Verde (EEEV) en el pueblo de Luquillo (Bayman *et al*., 1997; Bayman *et al*., 1998; Gamboa y Bayman, 2001; Gamboa *et al*., 2002; Lodge *et al*., 1996). Estos terrenos son parte del Bosque Nacional del Caribe, en la zona de vida de bosque lluvioso subtropical (Ewel y Whitmore, 1973). Estas investigaciones han comparado las comunidades endófitas de plantas del Jardín Botánico de la Universidad de Puerto Rico en Río Piedras (Gamboa *et al*., 2002), el Bosque Estatal de Carite (Bayman *et al*., 1997) o zonas del área norte (Bayman *et al*., 1998) con las de EEEV y el Bosque Nacional del Caribe.

Lodge *et al*. (1996) realizaron el primer estudio de hongos endófitos en *Manilkara bidentata* (Sapotaceae), un árbol que crece en Puerto Rico. Al comparar los resultados con estudios previos en palmas y coníferas, se encontró que la frecuencia de

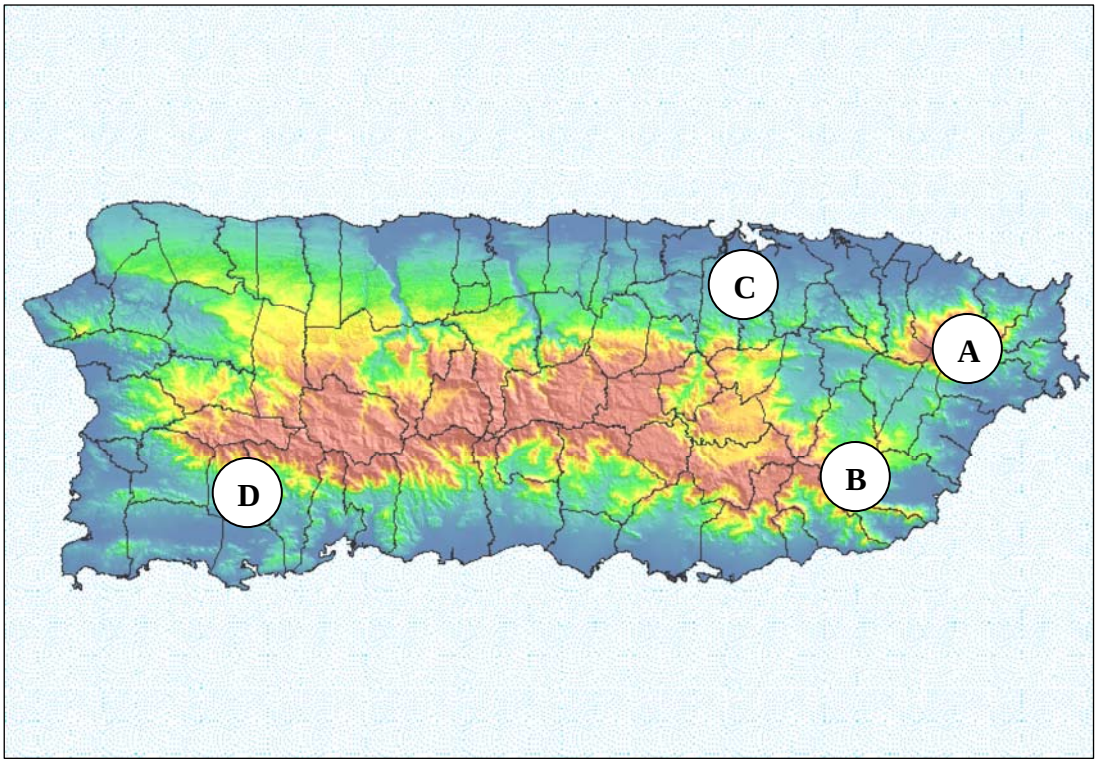

Figura 1. Localización de las zonas donde se han realizado estudios de hongos endófitos en Puerto Rico. (A) Estación Experimental El Verde y Bosque Nacional del Caribe, (B) Bosque Estatal de Carite, (C) Jardín Botánico de Río Piedras, (D) Bosque Estatal de Susúa donde se desarrolló el presente estudio. Mapa creado en el Laboratorio PaSCoR por Roy Ruiz.

infección fue alta. En el 90-95 % de las secciones de hoja procesadas se aisló al menos un hongo endófito así como en el 100% de los pedazos de peciolo. Además, la alta frecuencia de especies de *Xylaria* en las hojas y su ausencia en los peciolos y renuevos sugirió la transmisión horizontal de los propágulos. Otras veinte especies de hongos endófitos se encontraron en bajas frecuencias, incluyendo los géneros *Colletotrichum* sp. y *Pestalotiopsis* sp.

Un estudio de las asociaciones no micorrizas en siete especies de *Lepanthes* (Orchidaceae) de dos bosques lluviosos de Puerto Rico reflejó una flora endófita similar

en las raíces y hojas de las plantas (Bayman *et al*., 1997). En seis de las especies de orquídeas se aisló *Xylaria* como género dominante así como hongos parecidos al género *Rhizoctonia*. También se aislaron en ambos tejidos, pero en menor frecuencia, géneros como *Colletotrichum*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Pestalotia*. Estos hallazgos, así como el estudio de ciclos de vida de *Lepanthes,* podrían contribuir a mejorar los programas de manejo y conservación de plantas amenazadas o en peligro de extinción.

Bayman *et al*. (1998) buscaron especies endofíticas de *Xylaria* en hojas y semillas de *Casuarina equisetifolia* (Casuarinaceae), en parques y zonas costeras, y de *Manilkara bidentata* en la zona de EEEV. Luego del estudio se determinó un posible patrón de dispersión y transmisión del hongo y una comparación entre áreas secas y húmedas. Las especies de *Xylaria* fueron los aislados más comunes en ambos árboles excepto en las semillas de *M. bidentata*, donde se confirmó el tipo de transmisión horizontal según sugerido por Lodge *et al*. (1996). Para *C. equisetifolia* se sugirió la transmisión vertical y en zonas costeras la transmisión horizontal debido a la ausencia del hongo en semillas de árboles playeros.

Gamboa y Bayman (2001) compararon comunidades endófitas de poblaciones *Guarea guidonia* (Meliaceae) en EEEV y en un área perturbada. El 95 % de las muestras presentaron al menos un endófito incluyendo treintiocho morfoespecies identificadas y donde los géneros más abundantes fueron *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Xylaria* y géneros parecidos a *Rhizoctonia*. A pesar de que los géneros de hongos dominantes fueron similares en ambas áreas, se observó una diversidad mayor en el área de EEEV donde la composición de otras especies arbóreas fue mayor que en el área perturbada.

El último estudio publicado sobre hongos endófitos en Puerto Rico lo realizaron Gamboa *et al*. en 2002. En su estudio propusieron estrategias de muestreo para hongos endófitos y estimados de biodiversidad. Se utilizaron especies de plantas como *Coffea arabica* (Rubeaceae), *G. guidonia*, *M. bidentata*, *Renealmia jamaicences* var. *puberula* (Zingiberaceae) y *Tabebuia rosea* (Bignoniaceae) del Jardín Botánico de Río Piedras y EEEV. Se concluyó que con el uso de fragmentos de tejidos más pequeños los valores de diversidad de hongos endófitos serán más aproximados. Aunque no se determinó la frecuencia de colonización de hongos en las diferentes plantas, los géneros dominantes fueron *Xylaria, Colletotrichum* y *Phomopsis*.

Lugar de estudio

El Bosque Estatal de Susúa ocupa unas 3,341 cuerdas de terreno entre los municipios de Sabana Grande y Yauco en el suroeste de Puerto Rico (Figura 2) en la posición 18° 05’ N y 66° 55’ O (García, 1991). En 1935, la Administración de Reconstrucción de Puerto Rico compró los terrenos (Departamento de Recursos Naturales, 1976) para declararlo bosque público y actualmente se encuentra bajo la administración del Departamento de Recursos Naturales y Ambientales de Puerto Rico.

Este bosque tiene elevaciones entre 80 a 473 m de altura sobre el nivel del mar con una temperatura promedio de 23.9 °C y precipitación anual promedio de 1,413 mm (Álvarez, 1983). Los índices de precipitación reportados para el bosque colocan los periodos de enero a marzo dentro de la temporada baja y de julio a noviembre en la temporada alta de lluvia (García, 1991). Según el sistema de clasificación de Holdridge,

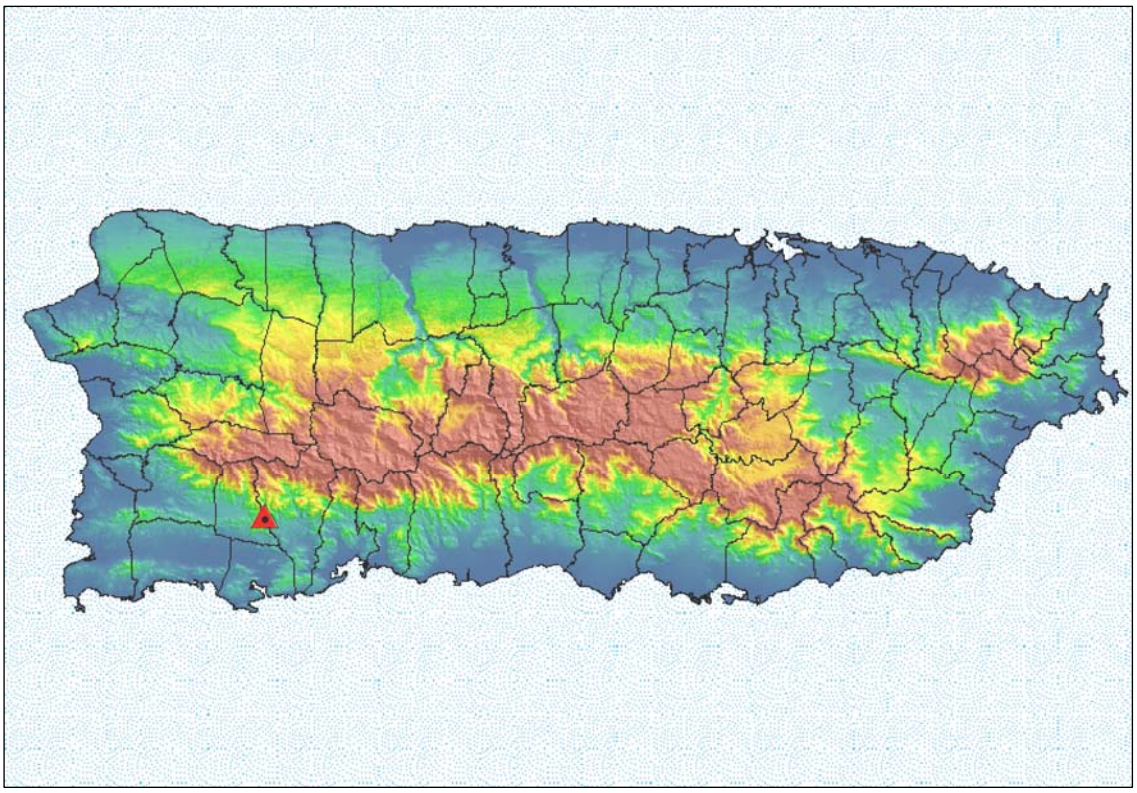

Figura 2. Localización del Bosque Estatal de Susúa. El triángulo indica la localización del bosque entre los municipios de Sabana Grande y Yauco. Mapa creado en el Laboratorio PaSCoR por Roy Ruiz.

que utiliza estos valores de temperatura y precipitación, Susúa pertenece a la zona de vida de bosque húmedo subtropical (Ewel y Whitmore, 1973). Ésta clasificación puede traer confusiones ya que el bosque se encuentra en el área de transición entre la zona húmeda y la zona seca de la isla donde las clasificaciones de zona de vida son diferentes.

Existen dos tipos de vegetación importantes en este bosque; 1) la arbustiva con alturas entre 1-6 m, predominantemente en cimas y laderas y 2) la vegetación arborescente, en ocasiones con árboles de 15 m de altura, que se encuentra en quebradas y márgenes de ríos (García, 1991). El dosel abierto y la alta evaporación de agua también permiten el crecimiento de plantas espinosas y cactáceas. Según Álvarez (1983), la

vegetación que predomina en las laderas del bosque es más parecida a la zona de vida de bosque seco subtropical que se encuentra en el bosque seco de Guánica.

La composición de los suelos determina esta vegetación única y el 12.8 % de endemismo (García, 1991) que caracteriza el bosque. La roca serpentina predomina en el noventa porciento del suelo y en otras áreas se encuentra suelo derivado de serpentina o material de origen volcánico (Departamento de Recursos Naturales, 1976; Ewel y Whitmore, 1973). En general, el pH es aproximadamente neutro y los suelos son permeables (Musa, 1981). Sin embargo, la productividad y fertilidad de este tipo de suelo se encuentra entre los más bajos de Puerto Rico.

***Thrinax morrisii* H. Wendl.**

Thrinax morrisii H. Wendl. (Arecaceae) es una especie nativa pero no endémica (García, 1991) de Puerto Rico. Según Read (1975), Morris la colectó por primera vez en diciembre de 1890 en la isla de Anguila. Actualmente, mantiene sinónimos como *T. microcarpa* Sarg. y *T. ponceana* O. F. Cook (Little *et al*., 1988).

Esta palma (Figura 3) tolera diversas condiciones climáticas extremas y su morfología es muy variable (Read, 1975). De acuerdo a Little *et al*. (1988), la palma es pequeña, en forma de arbusto de menos de 4.6 m de altura con hojas alternas extendidas y el tronco cubierto de hojas muertas. Las hojas son en forma de abanico, abiertas en la base, con una lámina de 0.6 m de largo y 1.2 m de ancho, sin vena principal. El color es verde lustroso en el haz y blanco plateado en el envés. Los peciolos son de 0.6-0.9 m de largo. Cuando florece, los racimos son ramificados, de 0.9-1.8 m de largo con flores

blancas de 3mm de largo. Sus frutos son redondos y blancuzcos, de 5mm de diámetro con una semilla redonda y lisa.

T. morrisii se encuentra distribuida en el sur del estado de Florida, Bahamas, Cuba, Puerto Rico, Anguila y Barbuda (Little *et al*., 1988). En Puerto Rico, es común en colinas y acantilados de piedra caliza así como en las áreas secas del suroeste donde crece en suelos de serpentina o derivados de serpentina. Actualmente es una especie protegida, con una de las poblaciones más grandes en el Bosque Estatal de Susúa. Musa (1981), reportó la palma como una especie de poca dominancia en el área sur del bosque donde encontró 175 individuos, pero García (1991) la colocó dentro de las especies más abundantes en las cimas y laderas.

En Puerto Rico, esta palma es de valor artesanal entre los residentes de la región de Sabana Grande. La confección de artesanías, conocidas como petate, representan una tradición y fuente de ingresos para algunas familias. Así también, en 1891 Morris destacó que los nativos de Anguila utilizaban las hojas de la palma para techar sus cabañas (Read, 1975). De esta forma surgieron los nombres comunes que actualmente tiene *T. morrisii* como: *brittle-thatch palm*, *buffalo-thatch*, palmita, palma de escoba y palma de petate, entre otros.

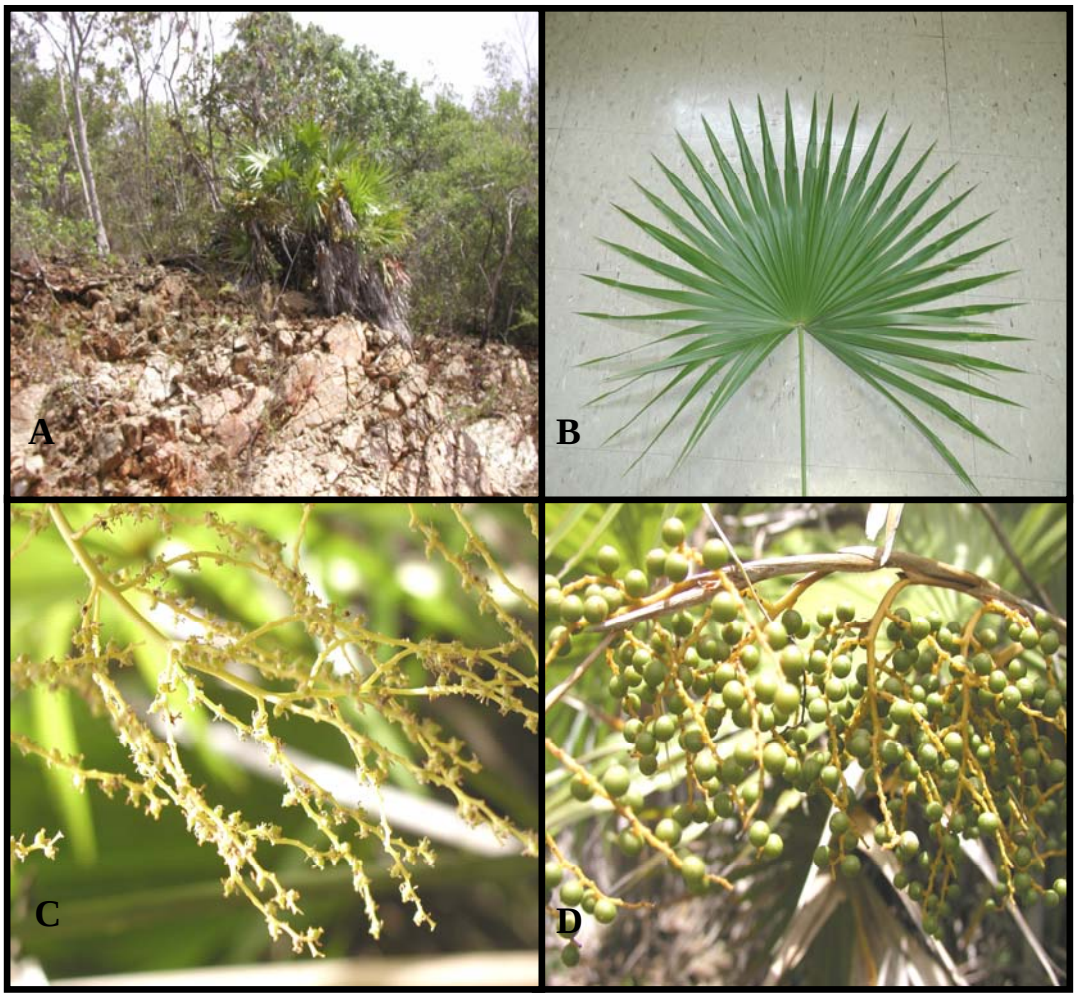

Figura 3. ***Thrinax morrisii* H. Wendl.** (A) palma creciendo en laderas del bosque, (B) hoja en forma de abanico, (C) flores y frutos en desarrollo, (D) fruto maduro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Durante los meses de mayo y septiembre de 2003 se localizaron dos poblaciones de la palma *Thrinax morrisii* en el Bosque Estatal de Susúa, Sabana Grande, P.R. (Figura 4).

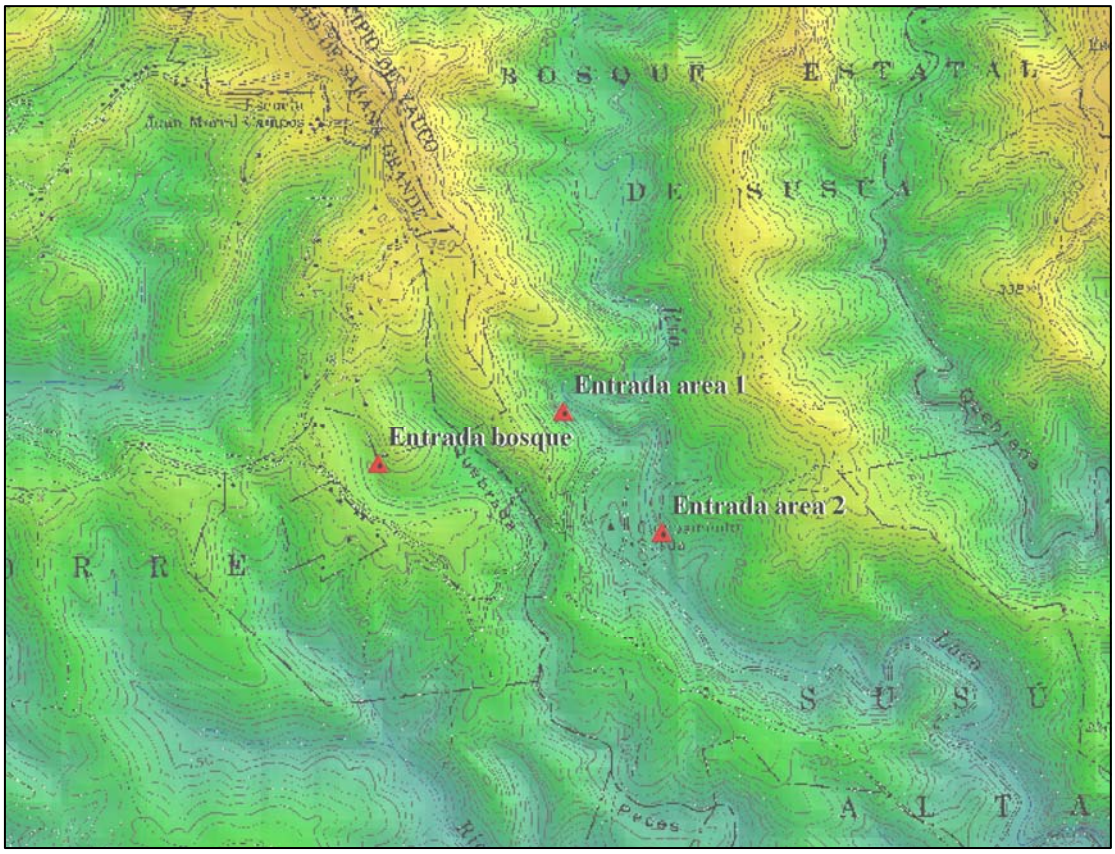

Figura 4. Localización de las poblaciones de *T. morrisii* utilizadas en el estudio. Mapa creado por Roy Ruiz, en el laboratorio PaSCoR, utilizando el programador ArcMap, versión 9.

Cada población representó un área de estudio. El Área I (A I) se encuentra bordeando la carretera principal, en una ladera a media montaña. La zona es de bosque abierto donde la vegetación posee una altura promedio de 2.5 m de alto con árboles emergentes de 3.5 m de altura, no está protegida por montañas y se encuentra lejos de los cuerpos de agua (Figura 5 A). El Área II (A II) se encuentra en el camino hacia el

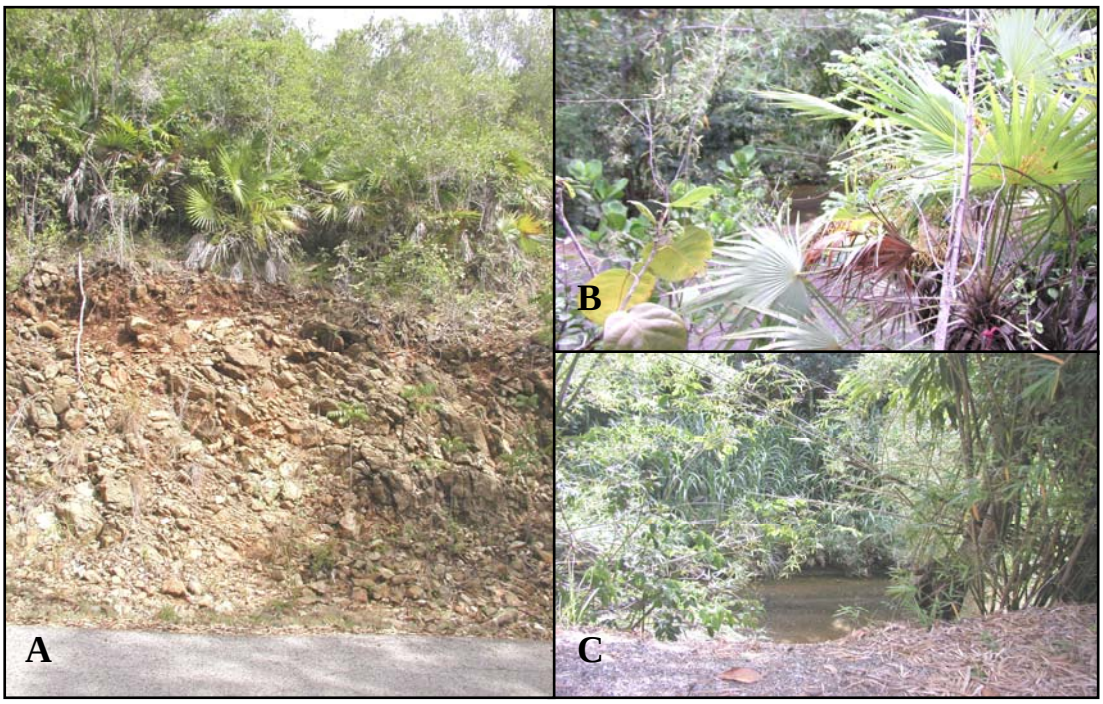

Figura 5. Áreas de estudio seleccionadas en el Bosque Estatal de Susúa. (A) Área I, (B) Área II, (C) cauce del Río Loco, cerca del Área II.

área de acampar, en una ladera en la base de la montaña, a unos 30-50 m del Río Loco (Figura 5 B-C) y está protegida por otra montaña al noreste. La vegetación posee una altura promedio de 3 m de alto con árboles emergentes de 4-5 m de altura.

En cada área de estudio se determinó la posición geográfica (latitud y longitud) y elevación sobre el nivel del mar con un sistema de posición geográfica (Suunto ®). Se determinó la dirección de la pendiente y la dirección del viento utilizando una brújula marca Suunto ® (modelo KB-14/360 R/D). La pendiente del terreno se midió con un inclinómetro Suunto ®, (modelo PM 5/360PC). Los datos se resumen en la Tabla 1. Además, se hizo un listado de las especies de plantas dominantes en cada área (Apéndice 1).

Tabla 1. Identificación y descripción de las áreas de estudio.

Área	Posición geográfica	Elevación (m)	Pendiente (%)	Dirección de la pendiente	Palmas marcadas
I	18º 04’ 28.5” N 66º 54’ 31.2” W	178-193	40	140° (sureste)	15
II	18º 04’ 14.7” N 66º 54’ 19.8” W	127-140	40	65° (noreste)	30

Trabajo de campo

En cada área se marcaron inicialmente palmas que tuvieran más de 10 hojas, incluyendo hojas sanas (jóvenes y adultas) y al menos una hoja sin abrir para garantizar la disponibilidad de hojas nuevas durante los muestreos. Las palmas se marcaron con cinta de colores y etiquetas de metal previamente numeradas.

Se obtuvieron los índices de precipitación mensual promedio en el bosque durante los años 2003 y 2004 (Tabla 2) y se identificaron los periodos con mayor y

menor precipitación. Una semana antes del primer muestreo se escogieron en cada área cinco palmas de las previamente marcadas (Tabla 3). Se verificó nuevamente que tuvieran hojas recientemente abiertas y sin signos de enfermedad. Para el segundo muestreo se utilizaron las mismas palmas en cada área, corroborando antes que tuvieran hojas sanas disponibles.

Tabla 2. Precipitación mensual promedio en el Bosque Estatal de Susúa para los años 2003 – 2004.

	Precipitación mensual promedio (mm)	
	Año	
Mes	**2003**	**2004**
Enero	57.15	127.00
Febrero	12.70	57.15
Marzo	133.35	101.60
Abril	196.85	127.00
Mayo	63.50	285.75
Junio	0.00	38.10 [b]
Julio	95.25	165.10
Agosto	114.30	158.75
Septiembre	279.40	228.60
Octubre	---	177.80
Noviembre	603.25 [a]	---
Diciembre	158.75	---

[a] periodo de mayor precipitación, [b] periodo de menor precipitación, -- dato no disponible.

Tabla 3. Palmas seleccionadas por área para realizar los muestreos.

Área	Número de palma	Diámetro tronco (cm)
I	32	9.4
	34	8.4
	35	6.6
	36	9.3
	41	6.4
II	4	11.4
	16	---
	25	---
	27	---
	28	---

-- tronco no visible.

Se realizaron dos muestreos, el primero (M1), luego de un periodo lluvioso, se realizó el 18 de diciembre de 2003. El segundo muestreo (M2) correspondiente a un periodo de baja precipitación, se realizó durante los días 28 de junio y 1 de julio de 2004. Todas las muestras se colectaron entre 8:00 – 11:00 AM. Se midieron parámetros físico-químicos del suelo como temperatura, pH y grado de humedad (Tabla 4) con un termómetro de suelo y el muestreador de suelo Kelway ® (HB-2).

En cada palma se seleccionó una hoja completamente abierta, que no mostrara síntomas de enfermedad (manchas foliares, clorosis, zonas necróticas, marchitez o heridas). Cada hoja se cortó por el pecíolo donde se pegó un pedazo de cinta adhesiva identificado con el área de muestreo y número de palma. Se colectaron 10 hojas por muestreo (5 en cada área), se transportaron al laboratorio en un período no mayor de tres horas y se procesaron entre 1-3 días (Taylor *et al*., 1999).

Tabla 4. Parámetros físico-químicos medidos durante el primer y segundo muestreo.

Área	Número de palma	Temperatura suelo (ºC)		pH suelo		Humedad suelo (%)	
		M1	M2	M1	M2	M1	M2
I	32	22	25	6.5	6.8	55.0	35.0
	34	22	27	5.5	6.6	10.0	25.0
	35	24	26	6.6	7.2	52.5	50.0
	36	23	26	6.2	6.6	60.0	26.0
	41	24	27	6.4	6.6	73.0	62.5
II	4	23	25	6.0	5.6	90.0	92.5
	16	22	25	6.5	6.0	62.5	35.0
	25	23	25	5.8	5.6	87.5	95.0
	27	24	26	6.0	6.8	72.5	57.5
	28	23	26	6.4	6.4	57.5	52.5

M 1 = primer muestreo, M 2 = segundo muestreo.

Procesamiento de muestras

Las hojas se lavaron con agua potable y se mantuvieron en un salón con aire acondicionado, en bandejas con papel toalla húmedo hasta ser procesadas. De cada hoja se obtuvieron 10 lóbulos uniformemente distribuidos. Para seleccionarlos, se contó el número de lóbulos en cada lámina y ese número se dividió entre diez. Se colocó un pedazo de cinta adhesiva en el ápice de cada lóbulo, con los números del 1-10 (Figura 6 A). Éstos lóbulos se cortaron con un escalpelo para separar las partes no lobuladas del resto de la lámina y del pecíolo. Luego, cada lóbulo se cortó en cuatro secciones de igual longitud que se rotularon por su posición: (a) cerca de la base, (b-c) centro de la lámina y (d) cerca del ápice (Figura 6 B).

Las secciones se desinfectaron superficialmente, para eliminar organismos epífitos, esporas o fragmentos de micelio (Petrini, 1986), siguiendo el método establecido por Rodrigues (1992; 1994). Se realizaron inmersiones consecutivas de 1 minuto en etanol al 75 %, 10 minutos en Clorox® al 65% (concentración final hipoclorito de sodio 3.41%) y 30 segundos en etanol al 75%. Para el secado, las secciones se cubrieron con papel toalla esterilizado y se dejaron en el gabinete microbiológico por aproximadamente una hora.

Utilizando técnicas asépticas, se cortaron discos de 6.25 mm de diámetro con una perforadora (Fröhlich *et al*., 2000) esterilizada con alcohol y calentada en el mechero. De esta forma se obtuvo un disco por sección (a-d), para un total de 40 discos por hoja. Se procesaron un total de 800 discos en el estudio (400 discos por muestreo).

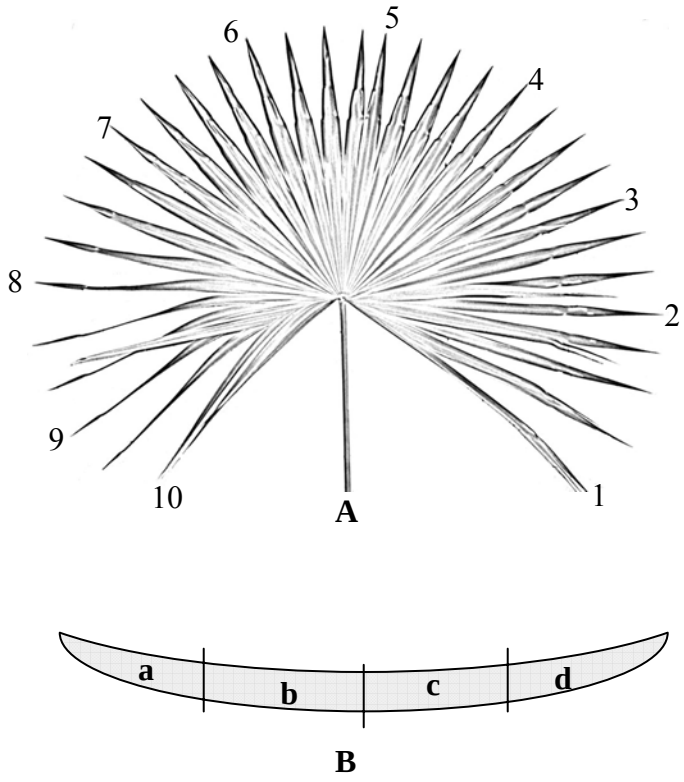

Figura 6. **Diagrama de la hoja de *T. morrisii* utilizado para procesar las muestras.** (A) selección de los lóbulos de la hoja, (B) identificación de secciones las cuatro secciones en que se cortó cada lóbulo, (a) cerca de la base, (b-c) centro de la lámina y (d) cerca del ápice.

Recuperación de hongos endófitos miceliales

Los cuatro discos correspondientes a cada hojuela, se colocaron en platos Petri (100 x 15 mm) con agar de extracto de malta (MEA, 33.6 g l^{-1}, Difco) suplementado con cloramfenicol (4 ml/l^{-1}) para evitar el crecimiento de bacterias. Los platos se rotularon de acuerdo al código establecido (Tabla 5) y incubaron en el laboratorio a temperatura de salón (25 ± 2º C) expuestos a períodos naturales de luz y oscuridad. El crecimiento de colonias se observó durante cuatro a cinco semanas y se verificó que las colonias

crecieran a partir del borde de los discos y no sobre la superficie. Las nuevas colonias se transfirieron a platos Petri de plástico (60 x 15 mm), de cristal y tubos de ensayo con MEA, agar de papa y dextrosa (PDA, 39 g l^{-1}, Difco) o agar de avena (OA, 72.5 g l^{-1}, Difco). Los cultivos puros se rotularon y mantuvieron a temperatura de salón expuestos a periodos naturales de luz y oscuridad, luego se colocaron en la incubadora de 25 ± 2ºC. Algunos de los aislados se inocularon medios de cultivo con hojas de clavel para inducir la producción de estructuras reproductivas.

Tabla 5. Código de identificación para las palmas seleccionadas en los muestreos y las muestras rotuladas en el laboratorio.

Área	Número de palma	Codificación	
		M 1	M 2
I	32	I A	I AA
	34	I B	I BB
	35	I C	I CC
	36	I D	I DD
	41	I E	I EE
II	4	II A	II AA
	16	II B	II BB
	25	II C	II CC
	27	II D	II DD
	28	II E	II EE

Se documentó la presencia de hongos endófitos miceliales mediante fotografía digital y se anotaron características macroscópicas de los cultivos puros, incluyendo forma, color y textura. Para los cultivos que produjeron estructuras reproductivas se prepararon cámaras húmedas y laminillas semipermanentes con lactofenol. Durante el segundo muestreo se hicieron cortes de los discos infectados y se montaron en laminillas. Las características microscópicas se observaron con microscopía de luz y microscopía de contraste interdiferencial (Nomarsky) utilizando un microscopio Olympus BH2. Las fotos y medidas de los conidios se obtuvieron utilizando el sistema de cámara digital y programa de computadora SPOT Insight®.

Mediante el uso de claves taxonómicas se identificaron y compararon las estructuras de los hongos recuperados en cultivo puro. Para las descripciones de los géneros se siguió la terminología de Barnett y Hunter (1986), Ellis (1971), Guba (1961), Nag Raj (1993) y Sutton (1980). Los aislados que presentaron crecimiento pero que no se pudieron identificar o no produjeron estructuras para su correcta identificación se clasificaron en morfotipos, diferenciados por las características del cultivo (Taylor, *et al.*, 1999).

Análisis de resultados

Se definió la tasa de infección, expresada en porciento, como el número de discos colonizados dividido entre el número de discos procesados. En el estudio se calculó la tasa de infección total (discos infectados / 800), por muestreo (discos infectados / 400) y por área de estudio en cada muestreo (discos infectados / 200). Además, se calculó la

tasa de infección por región de la hoja (discos infectados de cada región / número de discos inoculados por cada región de la hoja). Los resultados se compararon con una prueba de independencia Chi ² (χ^2) con un nivel de confianza de 95 % para demostrar si las tasas de colonización fueron independientes del muestreo o del área de estudio.

También se calculó la frecuencia relativa de los hongos más comunes en cada muestreo (número de veces que se aisló el hongo / total de hongos aislados inicialmente en el muestreo). Los resultados de los parámetros físico-químicos entre las áreas de estudio y los muestreos se analizaron con la prueba *t* para datos independientes y prueba *t* para muestras pareadas. Se utilizó el programa estadístico Infostat ® versión estudiantil 2004 y la presentación gráfica se realizó con el programa Microsoft Excel ® versión 9.0.

RESULTADOS

Tasas de infección total

Se procesaron un total de 800 discos de las hojas de *T. morrisii* durante los dos muestreos. De éstos, 501 discos resultaron infectados con hongos endófitos (Tabla 6). Esto representó una tasa de infección total de 62.6 %.

La tasa de infección por muestreo fue de 76.5 %, luego de un periodo lluvioso (M1) y de 48.5 % luego de un periodo de sequía (M2) (Figura 7). Los resultados indicaron que durante M1 la frecuencia de infección fue mayor y la prueba de independencia de χ^2 mostró que los valores son dependientes de la temporada (χ^2 = 69.73, P < 0.0001, gl = 9).

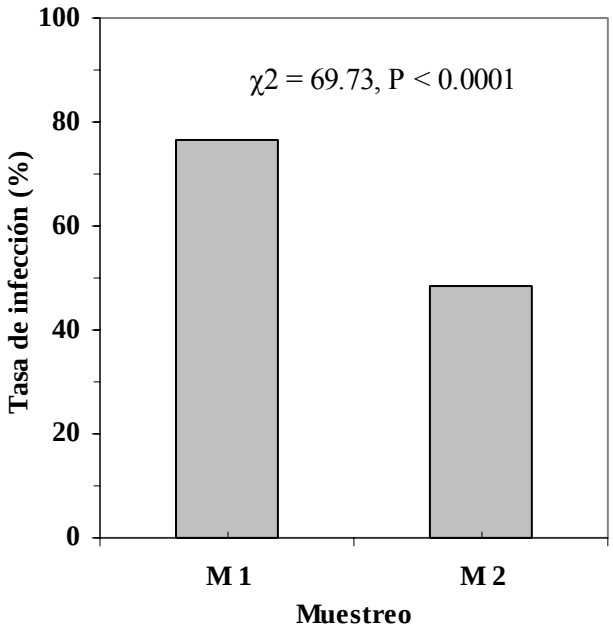

Figura 7. Tasa de infección de discos por muestreo.

Tasas de infección múltiple

La tasa de infección múltiple (discos infectados con dos hongos) para M1 fue 2.8%, equivalente a once discos. En M2 solo un disco (0.5%) presentó una infección múltiple. No se realizó un análisis estadístico para determinar la independencia de estos valores.

Tasas de infección por área de estudio

Al comparar las tasas de infección por área de estudio (Tabla 6) durante el primer muestreo, se encontró un 72.5 % para el Área I y 80.5 % el Área II. En el segundo muestreo la tasa de infección de discos resultó en 55.0 % para el Área I y 42.5 % en el Área II (Figura 8). Se determinó, además, que las frecuencias de infección por área en cada muestreo estuvieron influenciadas por el área de estudio (M1: $\chi^2 = 38.09$, $P < 0.0001$, gl = 4; M2: $\chi^2 = 26.49$, $P < 0.0001$, gl = 4).

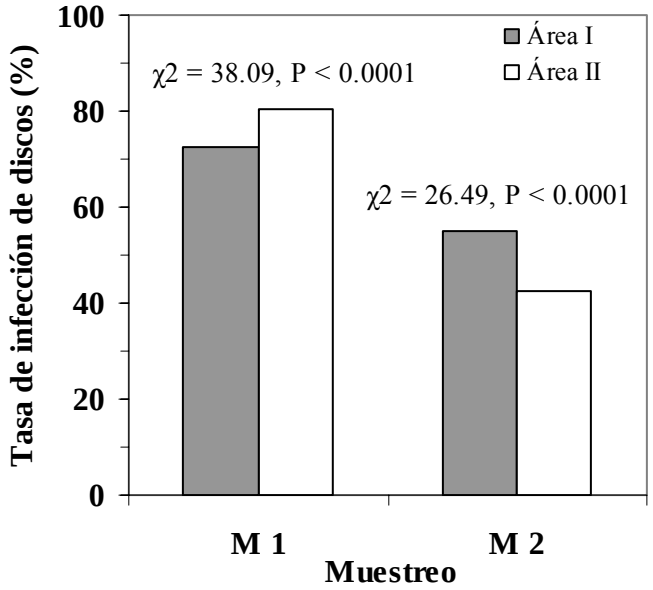

Figura 8. Tasa de infección de discos por área en cada muestreo.

Tabla 6. Número de hongos endófitos miceliales aislados y su frecuencia de infección por área y por muestreo.

Muestreo	Área	Individuo	Hongos aislados	Discos infectados	F I* por área (%)	F I* por muestreo (%)
		A	3	3		
		B	32	32		
	I	C	40	38	72.5	
		D	37	34		
M 1		E	40	38		
						76.5
		A	40	38		
		B	39	39		
	II	C	35	34	80.5	
		D	34	33		
		E	17	17		
Total en M 1			**317**	**306**		
		AA	32	31		
		BB	4	4		
	I	CC	36	36	55.0	
		DD	13	13		
M 2		EE	27	27		
						48.5
		AA	11	11		
		BB	24	24		
	II	CC	22	22	42.5	
		DD	9	9		
		EE	18	18		
Total en M 2			**196**	**195**		

* F I = frecuencia de infección

Tasas de infección por región de la hoja

Los lóbulos seleccionados en cada hoja procesada se dividieron en cuatro regiones, desde la base hasta el ápice, y se pudo calcular la tasa de infección por región (Tabla 7). Al comparar los resultados de cada muestreo (Figura 9), no se encontró una diferencia en la tasa de colonización de discos relacionada a la región de la hoja (χ^2 = 0.87, P = 0.83, gl = 3). Tampoco se encontró esta diferencia entre palmas o entre las áreas de estudio en cada muestreo (Pruebas χ^2: P > 0.05).

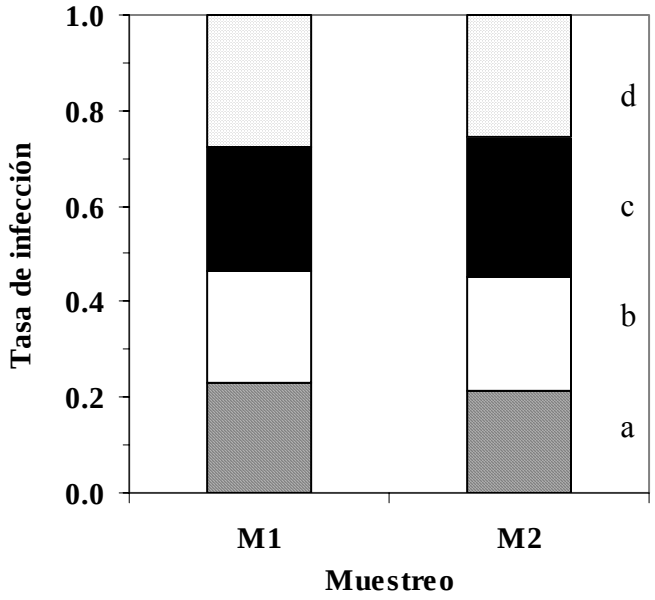

Figura 9. **Proporción de las tasas de infección por región de la hoja.**

Tabla 7. Tasa de infección de hongos endófitos miceliales por región de la hoja durante cada uno de los muestreos.

Muestreo	Área	Individuo	Discos colonizados por región			
			a	**b**	**c**	**d**
M 1	I	A	1	0	1	1
		B	6	8	8	10
		C	8	10	10	10
		D	9	8	7	10
		E	9	9	10	10
	II	A	9	9	10	10
		B	10	10	10	9
		C	7	9	8	10
		D	10	7	8	8
		E	2	1	7	7
	Frecuencia relativa en M1 (%)		**23.2**	**23.2**	**25.8**	**27.8**
M 2	I	AA	8	8	8	7
		BB	1	1	1	1
		CC	9	10	10	7
		DD	3	2	6	2
		EE	5	7	7	8
	II	AA	1	2	4	4
		BB	3	8	6	7
		CC	8	4	4	6
		DD	0	2	4	3
		EE	4	2	7	5
	Frecuencia relativa en M2 (%)		**21.5**	**23.6**	**29.2**	**25.6**

Hongos endófitos miceliales recuperados

Un total de quinientos trece hongos infectaron los discos en ambos muestreos (Tabla 6). De éstos, el 49.1 % se pudo asociar a algún género o morfotipo, de acuerdo a sus características microscópicas o estructuras de reproducción. Un 9.9% resultó en micelios estériles no clasificados y el restante 41 % no creció luego de transferirlos o no se desarrolló adecuadamente en los medios de cultivo utilizados.

Se identificaron 6 géneros y 6 morfotipos diferentes. Los hongos clasificados pertenecen a las clases Hyphomycetes y Coelomycetes, del grupo de hongos mitospóricos, y el morfotipo 6 se incluyó preliminarmente en el Orden Xylariales o sus anamorfos.

La frecuencia relativa de los hongos endófitos aislados se documentó para cada muestreo (Tabla 8). Los hongos que dominaron en el M1 fueron los morfotipos 6, 5, cf. *Annellolacinia* sp. y *Phomopsis* sp. con frecuencias relativas de 28.7 %, 9.8 %, 3.2 % y 2.5 %, respectivamente. Otros hongos que se aislaron en frecuencias menores fueron cf. *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp. y el morfotipo 2. cf. *Annellolacinia* sp. solo se encontró colonizando las palmas del Área 1 mientras que, cf. *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp. solamente se aislaron del Área 2 (Apéndice 2).

En el segundo muestreo los hongos más frecuentes fueron los morfotipos 5 y 6 (33.7% y 4.6% respectivamente) y cf. *Annellolacinia* sp. (3.6%). Se encontraron además en bajas frecuencias, *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp., *Pithomyces maydicus* y cuatro morfotipos diferentes. *Colletotrichum* sp. y los morfotipos 1, 3 y 4 sólo se recuperaron durante la época de sequía.

Tabla 8. Frecuencias relativas de los géneros y morfotipos aislados durante el estudio.

Género / Morfotipo	Frecuencia relativa (%)	
	M 1	**M 2**
cf. *Annellolacinia* sp.	3.15	3.57
Colletotrichum sp.	0	0.51
cf. *Fusarium* sp.	0.32	0
Pestalotiopsis sp.	0.63	1.53
Phomopsis sp.	2.52	0.51
Pithomyces maydicus	0	1.53
Morfotipo 1	0	1.53
Morfotipo 2	1.26	2.55
Morfotipo 3	0	0.51
Morfotipo 4	0	3.06
Morfotipo 5	9.78	33.67
Morfotipo 6	28.71	4.59
Otros hongos no clasificados	9.46	10.71

DESCRIPCIÓN DE LOS HONGOS ENDÓFITOS MICELIALES RECUPERADOS

cf. *Annellolacinia* sp. Sutton

En MEA se observó la colonia rugosa color marrón claro, bordes crema y sedosos. En PDA, colonia semi-algodonosa color blanco-rosado claro con bordes crema y sedosos. Reverso con varios tonos marrón y bordes crema. En ocasiones, torna el PDA amarillo. Micelio marrón claro a hialino, septado y ramificado. Conidioma acervular y en medio de cultivo formación de estromas con presencia de setas marrón. Conidios fusiformes, unicelulares, subhialinos, gutulares, 16-27 x 3-5 µm (n=50) con presencia de apéndices tubulares no ramificados, 11-22 µm de largo. El ápice se estrecha hasta formar un apéndice simple y la base contiene un apéndice lateral (Sutton, 1980) (Figura 10).

***Colletotrichum* sp. Corda**

En PDA se observaron colonias rosado salmón con parches aislados de micelio blanco grisáceo y reverso rosado salmón. Micelio ramificado, hialino a marrón con formación de apresorios marrón claro y borde ligeramente irregular. Conidioma acervular, marrón oscuro con presencia de setas color marrón (Sutton, 1980). Conidios subhialinos, aseptados, derechos, cilíndricos en ocasiones con el ápice prolongado, de 13-20 x 5-6 µm (n=50) (Figura 11).

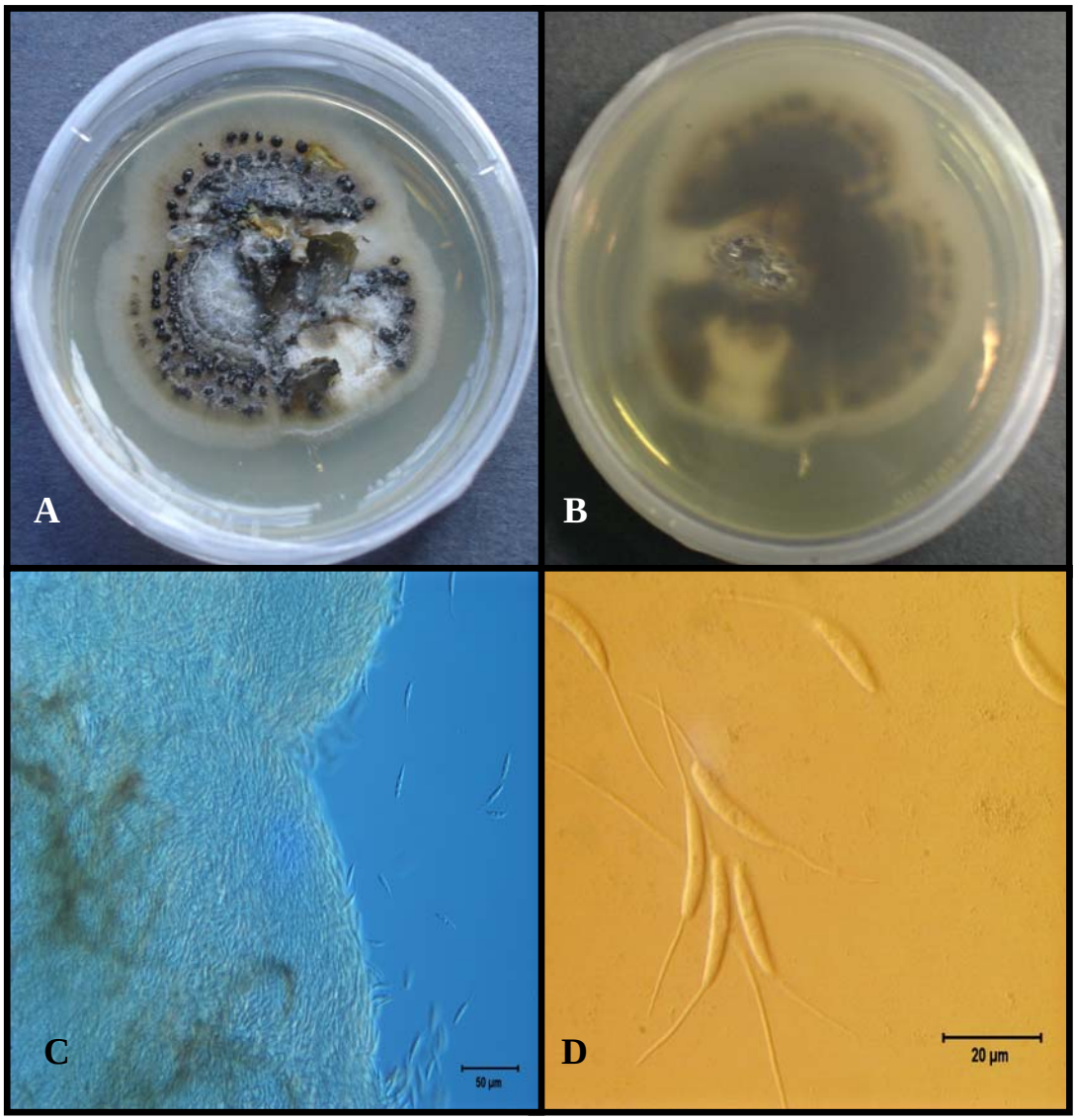

Figura 10. **Morfología de cf. *Annellolacinia* sp.** (A-B) anverso y reverso de la colonia en PDA, (C) conglomerado de conidios (Nomarski, 200 X), (D) conidios con apéndices (Nomarski, 600 X).

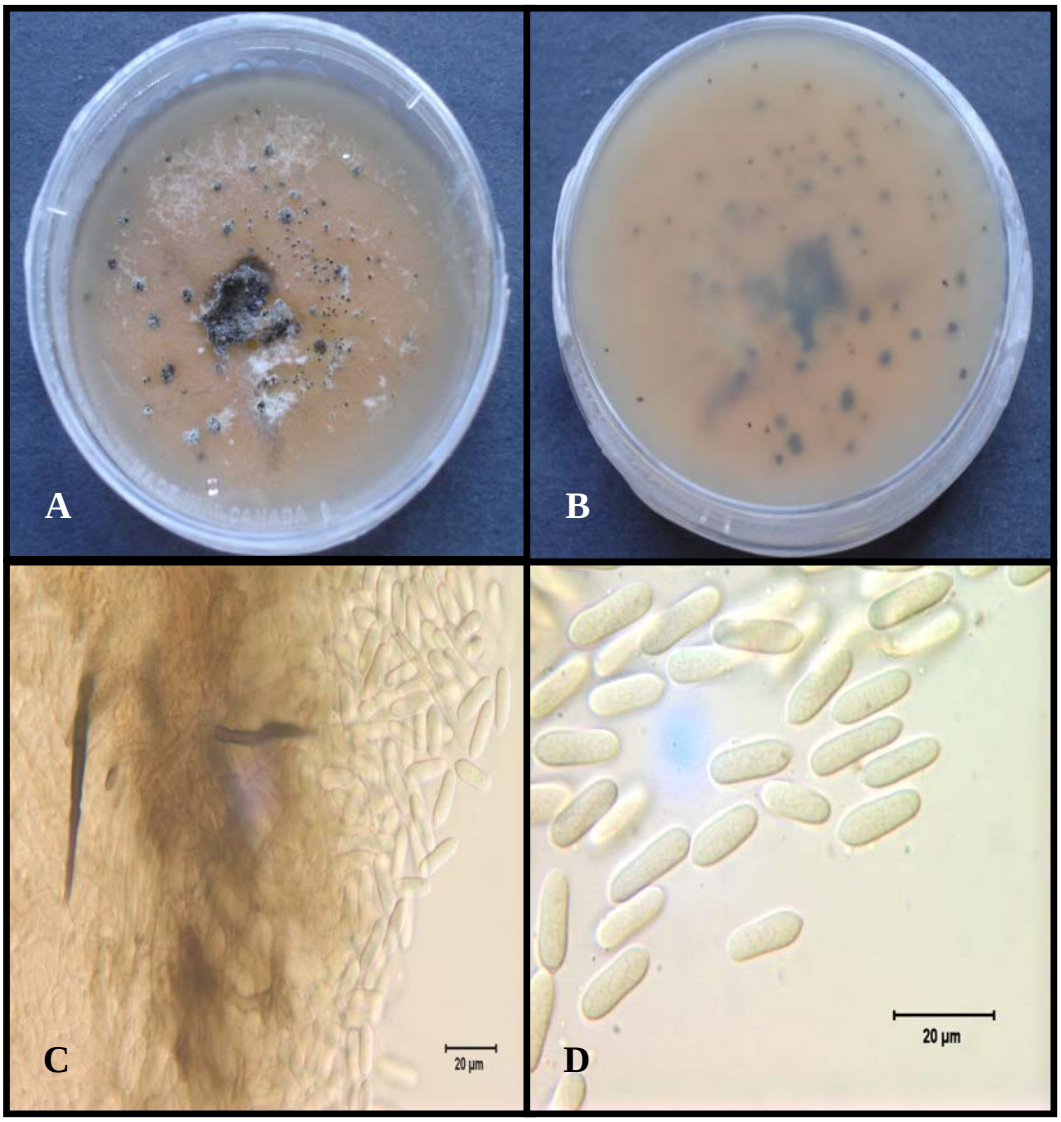

Figura 11. **Morfología de *Colletotrichum* sp.** (A) anverso de la colonia en PDA, (B) reverso de la colonia en PDA, (C) setas (Nomarski, 400 x), (D) conidios (Nomarski, 600 x).

cf. *Fusarium* sp. Link

En OA colonia rugosa, marrón con parches blancos, aterciopelados. Cambia la tonalidad del medio a marrón claro. Micelio marrón claro, septado con presencia de clamidosporas y formación de esporodoquios. Conidios hialinos, levemente curvos con extremos puntiagudos (Barnett y Hunter, 1987), 13.9-18.8 x 1.1.7 µm (n=25). No se pudo determinar la presencia de septas (Figura 12).

***Pestalotiopsis* sp. Steyaert**

En MEA se observa la colonia formando anillos concéntricos de colores, rosado, verde, blanco y bordes marrón. En PDA el micelio es blanco algodonoso, en ocasiones con tonalidades rosado claro, reverso con diferentes tonalidades de marrón en anillos. Formación de agregados negros, gelatinosos y brillantes donde hay alta concentración de conidios. Conidioma acervular en tejido vegetal. Conidios fusiformes de 4 septas con leve constricción, versicolor, 20-27 x 6-9 µm (n=25), que contienen apéndices. Célula basal obcónica, incolora, de pared fina, con un apéndice simple y corto, 3 células medias de pared gruesa, la segunda célula (desde la base) marrón claro y la tercera y cuarta célula marrón oscuro. Célula apical cónica, incolora, con 3 apéndices no ramificados (Nag Rag, 1993) (Figura 13).

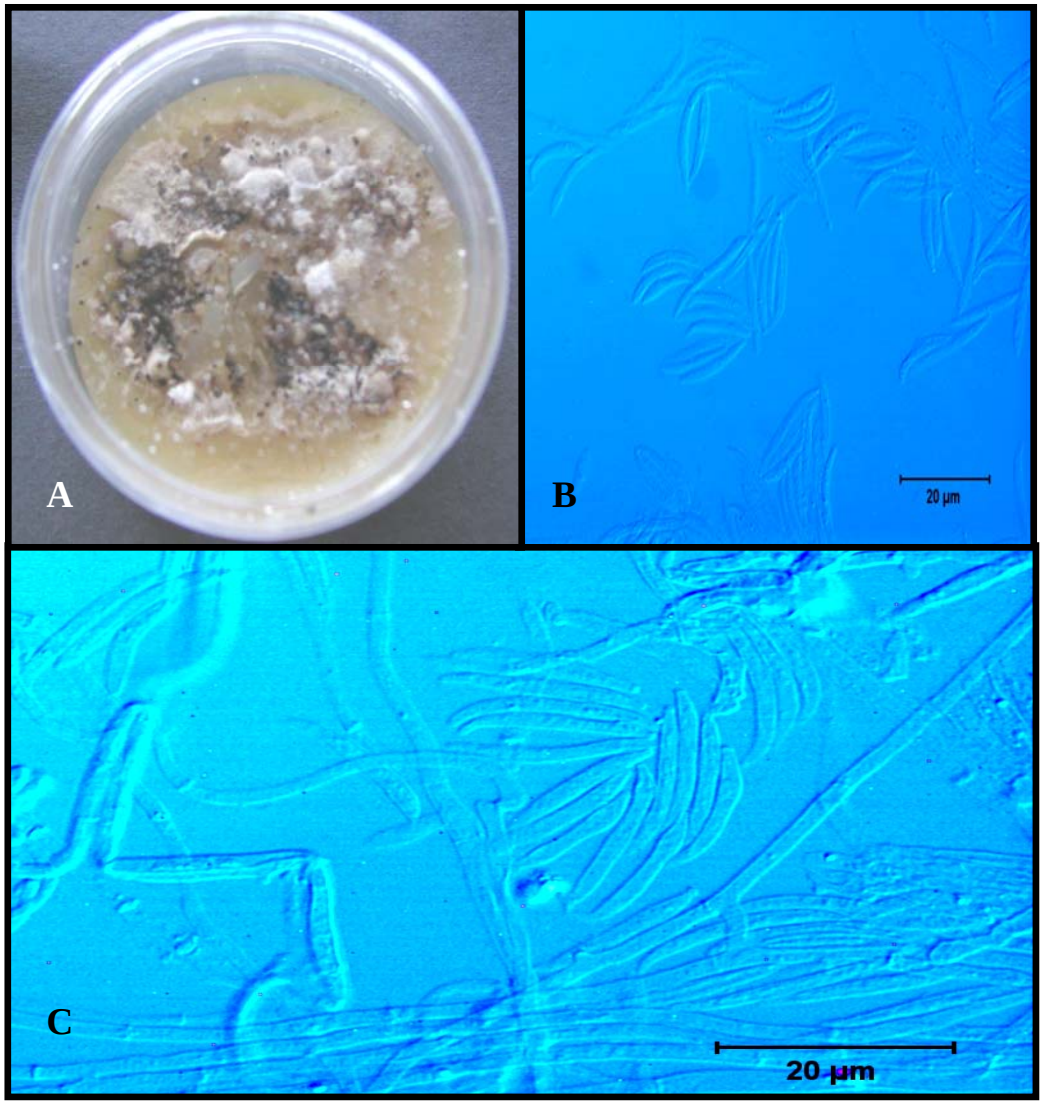

Figura 12. Morfología de cf. *Fusarium* sp. (A) anverso de colonia en OA, (B- C) conidios (Nomarski, 600 X).

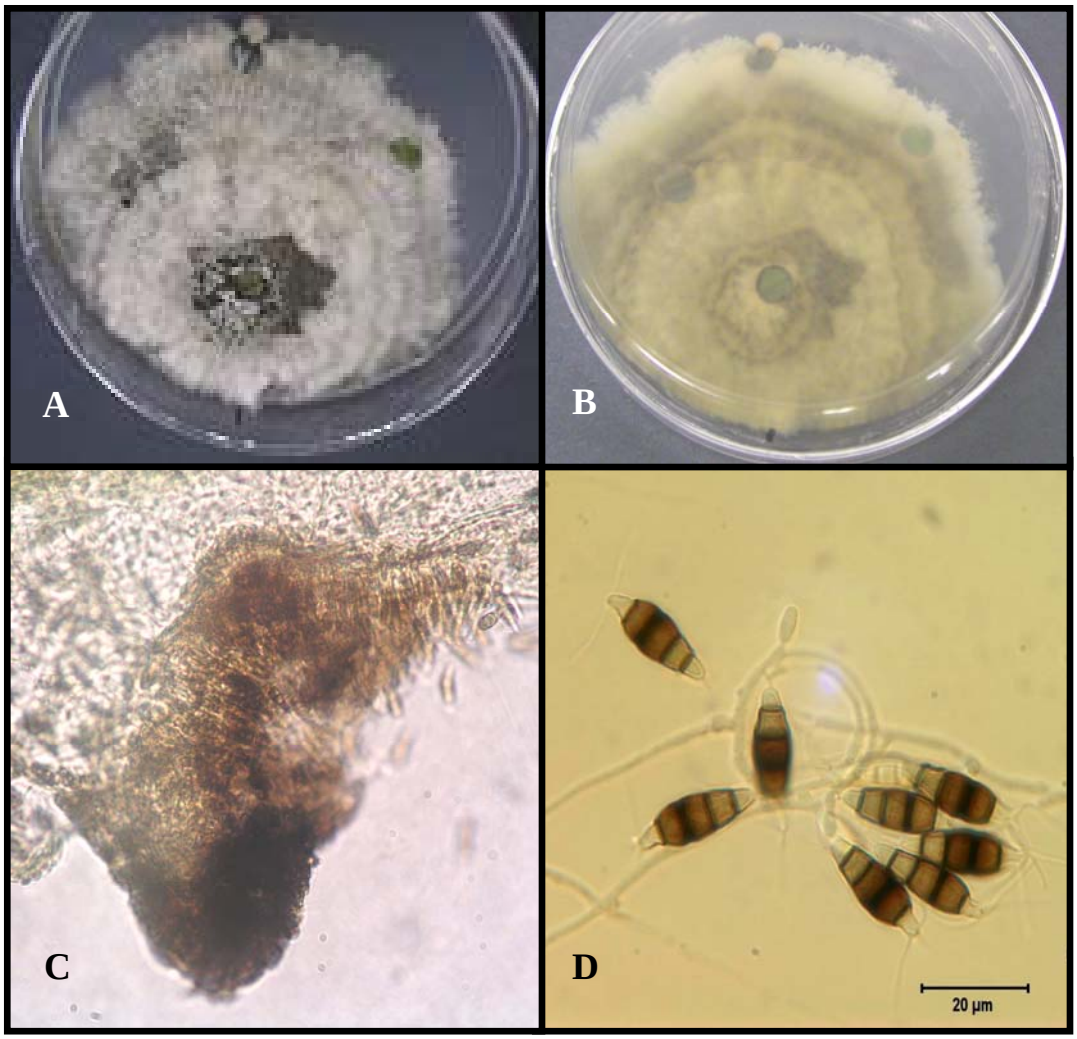

Figura 13. Morfología de *Pestalotiopsis* sp. (A-B) anverso y reverso de la colonia creciendo a partir de los fragmentos de *T. morrisii* en MEA, (C) formación de acérvulo en hoja de clavel, (D) conidios y conidióforos (Nomarski, 600 X) .

***Phomopsis* sp. Sacc.**

En PDA produce colonia blanca algodonosa con zonas marrón, reverso con anillos desde marrón en el centro hasta crema en los bordes. Micelio hialino a marrón claro. Picnidios globosos, marrón oscuro, separados o agregados, inmersos o superficiales. Presenta conidios de dos tipos, alfa (α) conidios subhialinos de una célula, fusiforme, usualmente bigutular y de 6-9 x 2 µm (n=25). Beta (β) conidios hialinos, filiformes, curvos y aseptados de 20-30 µm de largo (n=50) (Figura 14).

Esta especie es muy parecida a *P. archeri* (Sacc.) en el tamaño y forma de los conidios. Sutton (1980) presentó unas dimensiones de α y β-conidios menores, sin embargo, indicó que en el conteo original las medidas de los α –conidios fueron 7-10 x 2.5 µm y β-conidios de 20-30 µm.

***Pithomyces maydicus* (Sacc.) M. B. Ellis**

Colonia granular, negro-marrón, con reverso marrón oscuro, torna OA negro. Conidióforos cortos, subhialinos, arreglados lateralmente en el micelio. Conidios (aleuriosporas), simples, elipsoidales, con cicatriz basal o remanente del dentículo, equinulados de color marrón (Barnett y Hunter, 1987; Ellis, 1971). Conidios con dos septas, 11-17 x 5-8 µm (n=25) y conidios con dos septas, célula central hinchada y dividida por una septa longitudinal, 12-21 x 7-13 µm (n=25). Ocasionalmente presenta conidios con tres septas donde la segunda célula está hinchada y dividida por una septa longitudinal (Figura 15).

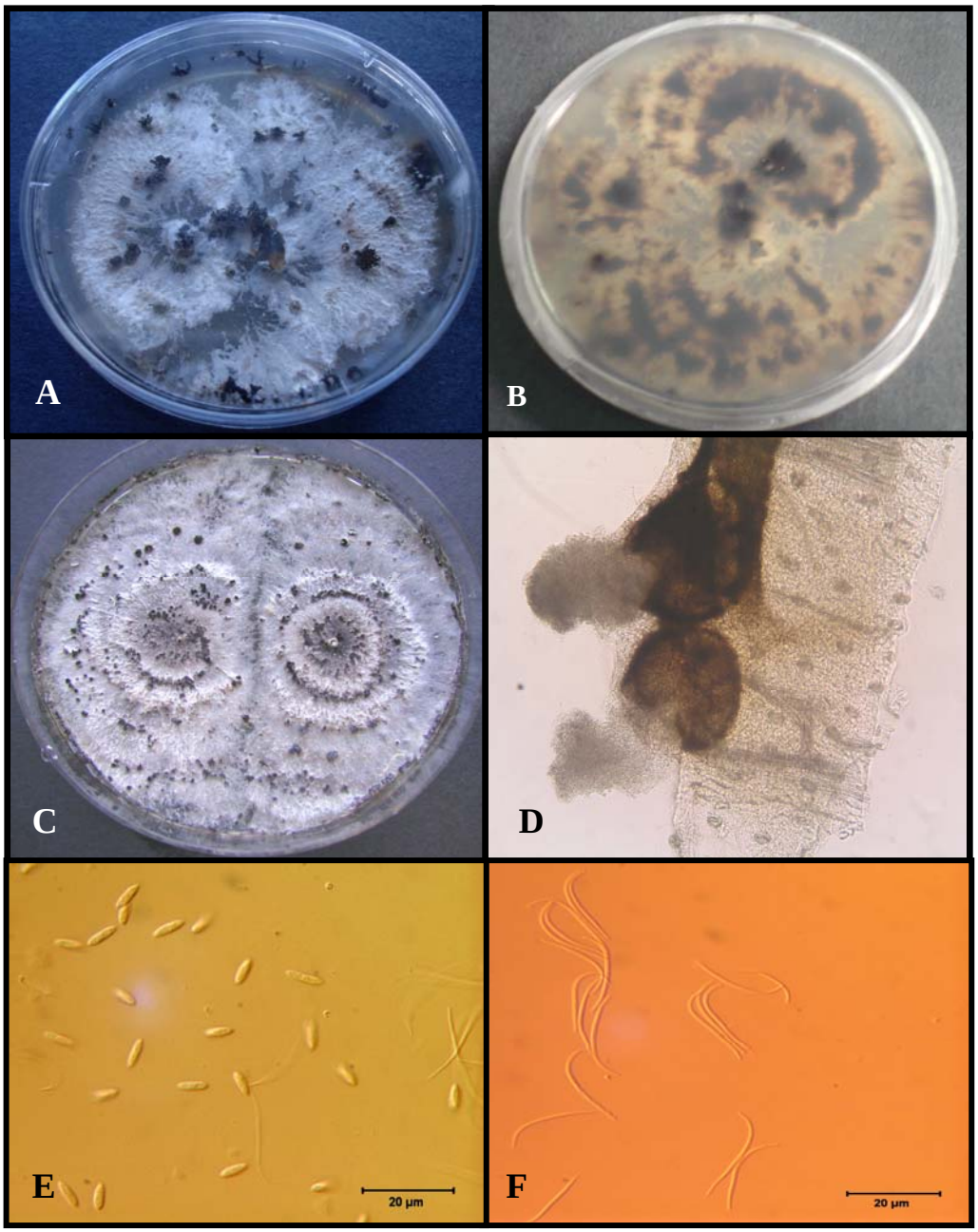

Figura 14. Morfología de *Phomopsis* sp. (A-B) anverso y reverso de la colonia en PDA, (C) formación de picnidios en PDA, (D) picnidios en hoja de clavel, (E) α-conidios (Nomarski, 600 X), (F) β-conidios (Nomarski, 600 X).

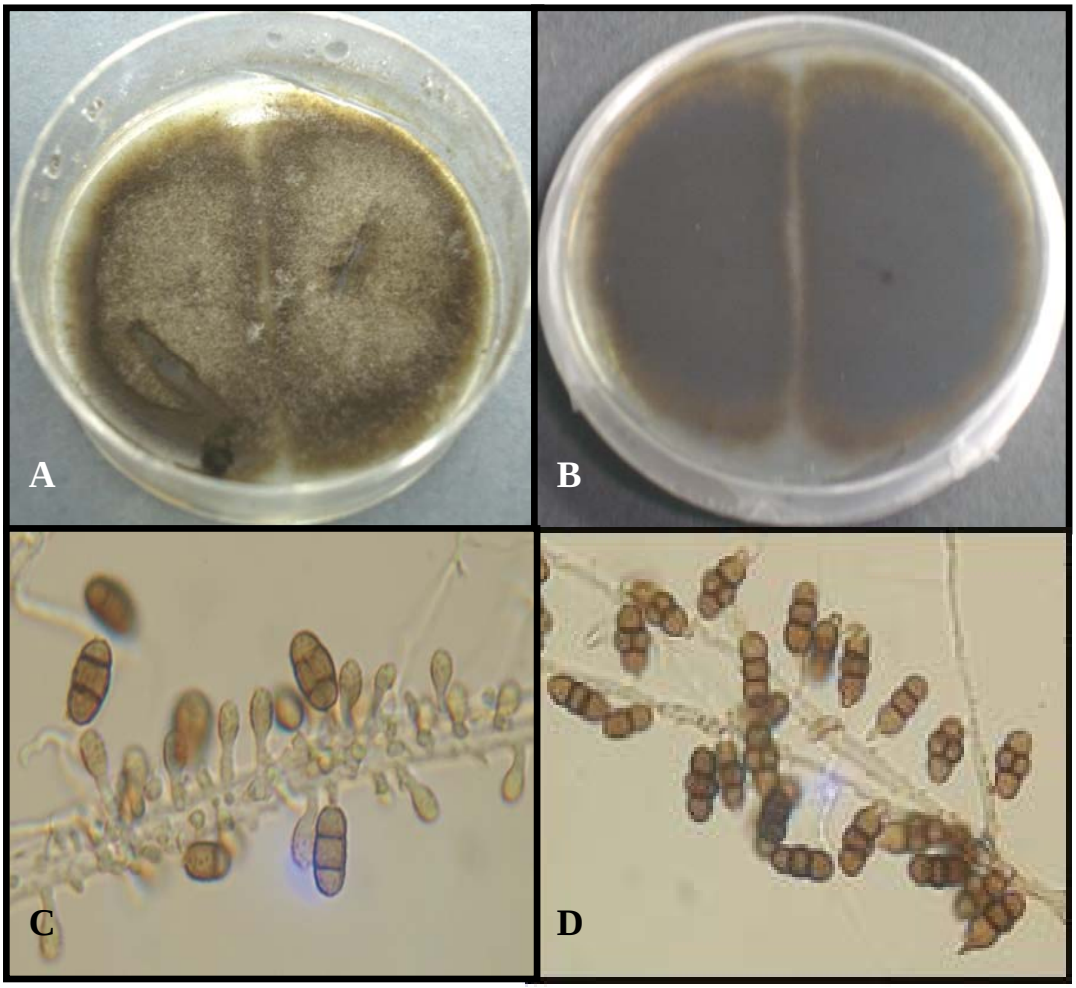

Figura 15. **Morfología de *Pithomyces maydicus*.** (A-B) anverso y reverso de colonia en PDA, (C) conidióforos con formación de conidios, (D) conidios maduros de tres y cuatro células.

Morfotipo 1

En OA, colonia aterciopelada marrón claro en el centro, crema hacia el borde, con borde irregular y filamentoso. Reverso con formación de anillos concéntricos marrón oscuro, marrón claro y crema con borde irregular. Micelio hialino con formación de picnidios marrón en tejido vegetal y en medio de cultivo. Conidios subhialinos, uniseptados, gutulares, 5.4-8.3 x 1.7-2.4 µm (n=50) (Figura 16).

Morfotipo 2

En MEA se observa colonia verrucosa, umbonada, negra-gris con bordes blancos satinados. Reverso marrón con bordes crema. En OA, colonia glabra con zonas oscuras. Conidios hialinos, cilíndricos, en ocasiones curvos, con extremos redondos, 5.8-10.1 x 1.1-1.6 µm (n=25) (Figura 17).

Morfotipo 3

En MEA la colonia es granular, verde oscuro con borde crema, sedoso e irregular. En PDA, colonia granular, negra con borde irregular, reverso marrón oscuro con borde filamentoso. Micelio marrón, septado. Picnidios negros y superficiales en medio de cultivo y tejido vegetal. Conidios subhialinos, unicelulares, de dos tipos: (1) ovoides de 1-2 células, 8.6-11.1 x 5.2-6.4 µm (n=25) y (2) conidios de una célula, hinchada en el centro, 10.9-13.4 x 5.1-6.3 (n=25) (Figura 18).

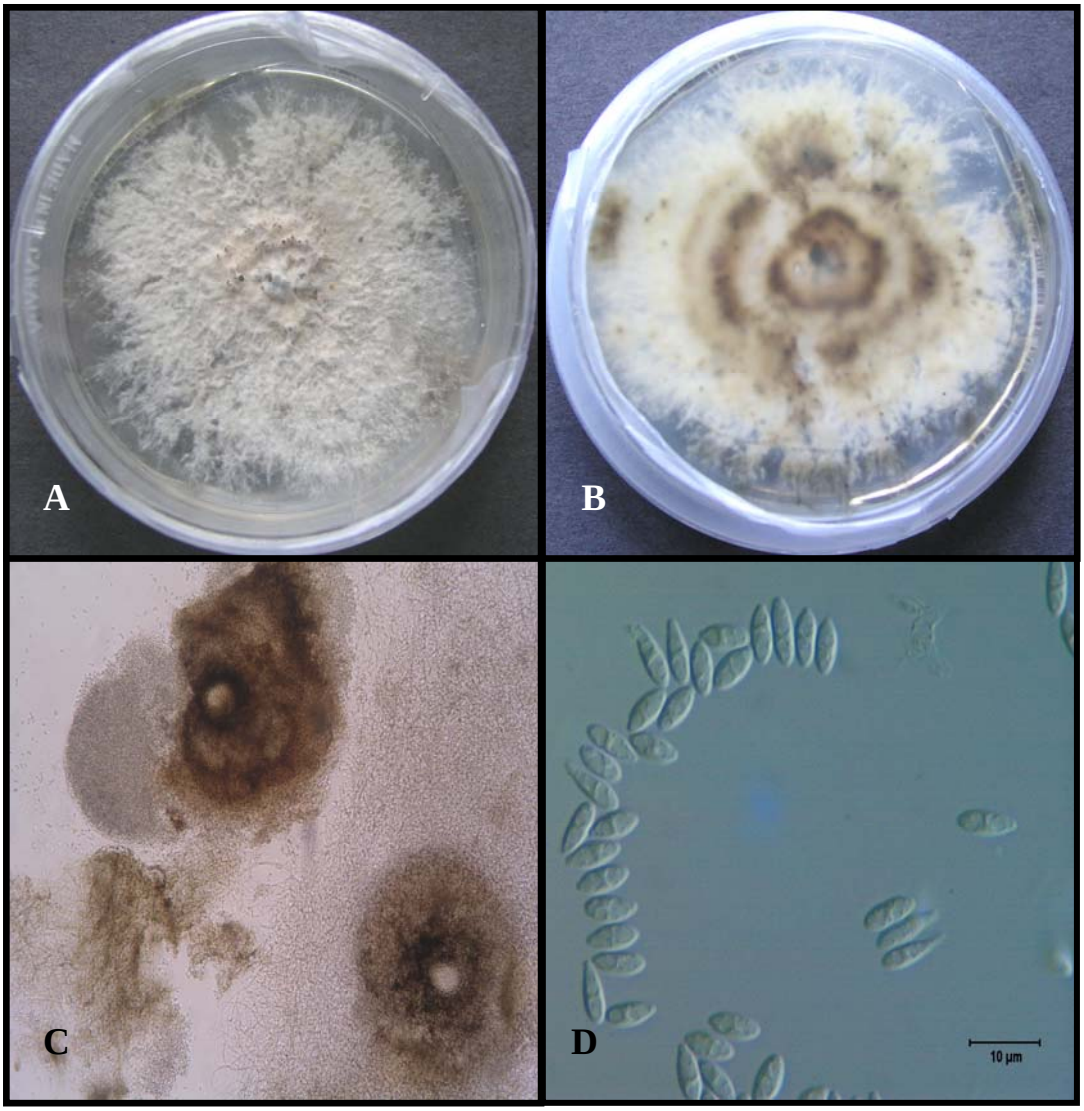

Figura 16. **Mofotipo 1.** (A-B) anverso y reverso de la colonia en PDA, (C) estructuras parecidas a picnidios, (D) conidios (Nomarski, 1,000 X).

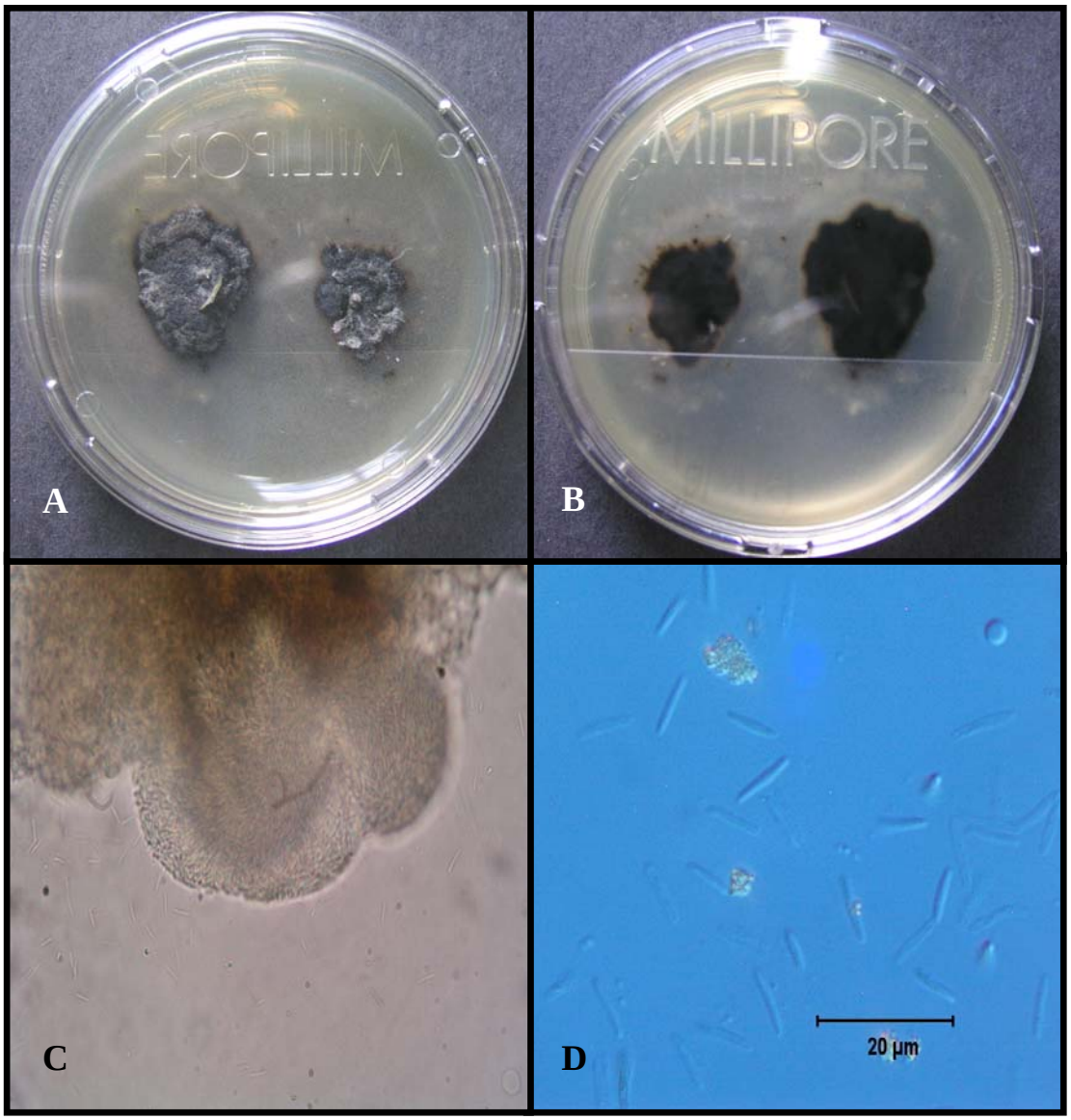

Figura 17. **Morfotipo 2.** (A-B) anverso y reverso de la colonia en PDA, (C), posible estructura donde se encuentran los conidios, (D) conidios (Nomarski, 600 X).

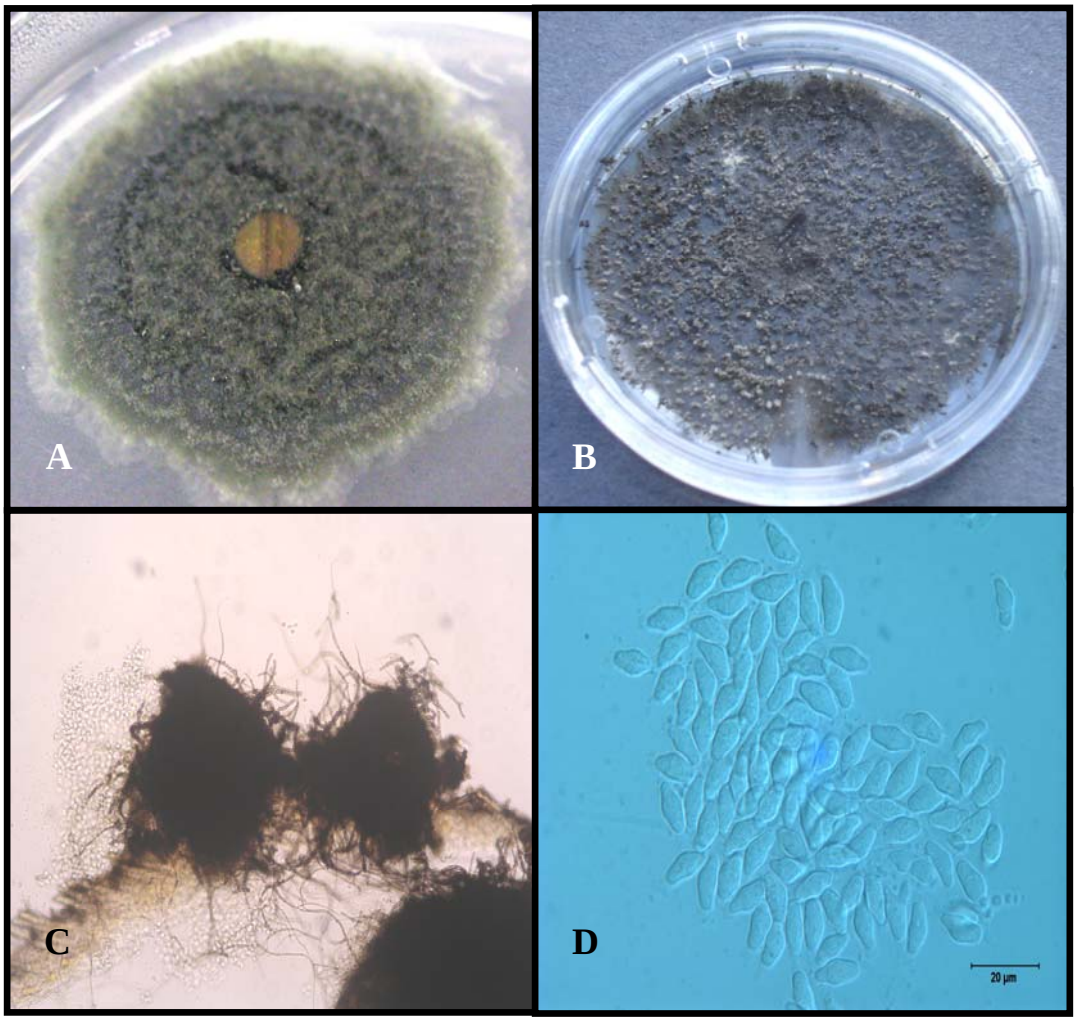

Figura 18. **Morfotipo 3.** (A) colonia en MEA creciendo a partir del fragmento de hoja de *T. morrisii*, (B) colonia creciendo en PDA, (C) formación de picnidios en hoja de la palma, (D) conidios con parte central hinchada (Nomarsky, 600 X).

Morfotipo 4

En PDA produjo colonias rugosas con anverso y reverso color melocotón, de crecimiento muy lento. Micelio hialino que no presenta producción de conidios (Figura 19).

Morfotipo 5

En MEA, colonia inicial sedosa y verde con borde crema. En OA, colonias desde marrón claro hasta oscuro de textura grumosa por la formación de cuerpos redondos o globosos. En PDA, colonia sedosa y lisa, marrón en el centro, verdoso hacia los bordes, donde no se distingue el micelio. Presenta escasas hifas septadas, marrón y estructuras globosas marrón a marrón oscuro, que son agregados de células pequeñas y globosas (Figura 20).

Morfotipo 6 (Orden Xylariales)

En MEA, la colonia es algodonosa, blanca rosada, borde plumoso e irregular, reverso crema. En OA, colonia blanca algodonosa durante las primeras semanas, luego comienza la formación de cuerpos fructíferos que van desde color rosado hasta marrón o verde oscuro, con interior relleno y negro. En ocasiones presenta conidios color salmón sobre los cuerpos fructíferos, que al desprenderse, son de apariencia polvorienta sobre el micelio. Conidios subhialinos de 4.2-5.4 x 1.3-1.9 µm (n=25). También se observaron colonias algodonosas blancas de bordes negros con poca o ninguna producción de cuerpos fructíferos y una colonia con cuerpos frutíferos negros de ramificación dicotómica (Figura 21).

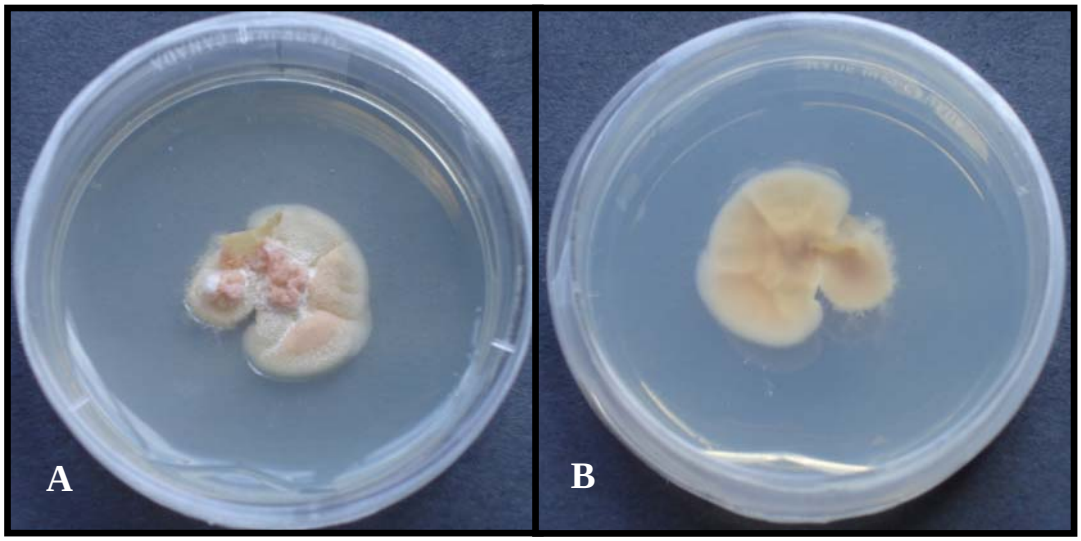

Figura 19. Morfotipo 4. (A) anverso de la colonia en PDA, (B) reverso de la colonia en PDA.

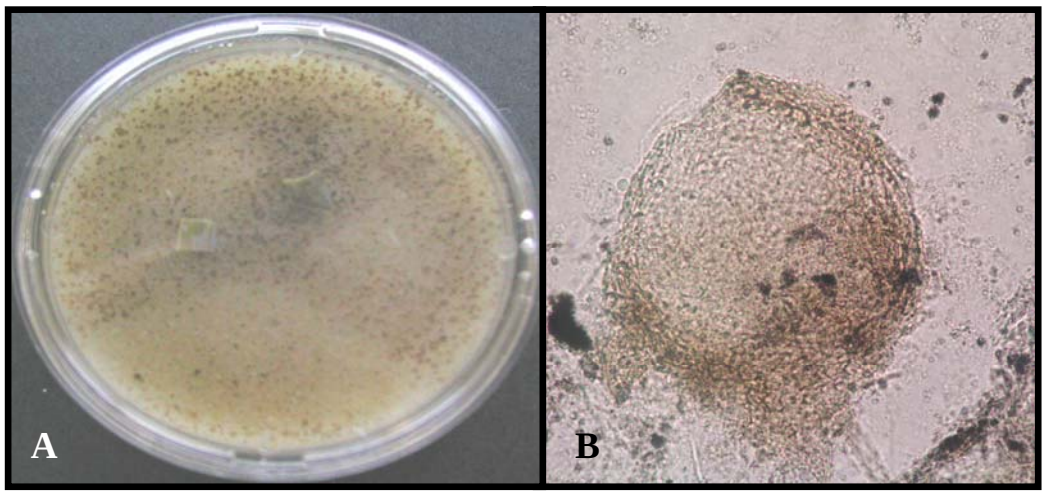

Figura 20. Morfotipo 5. (A) colonia en OA, (B) estructuras globosas formadas en el medio de cultivo.

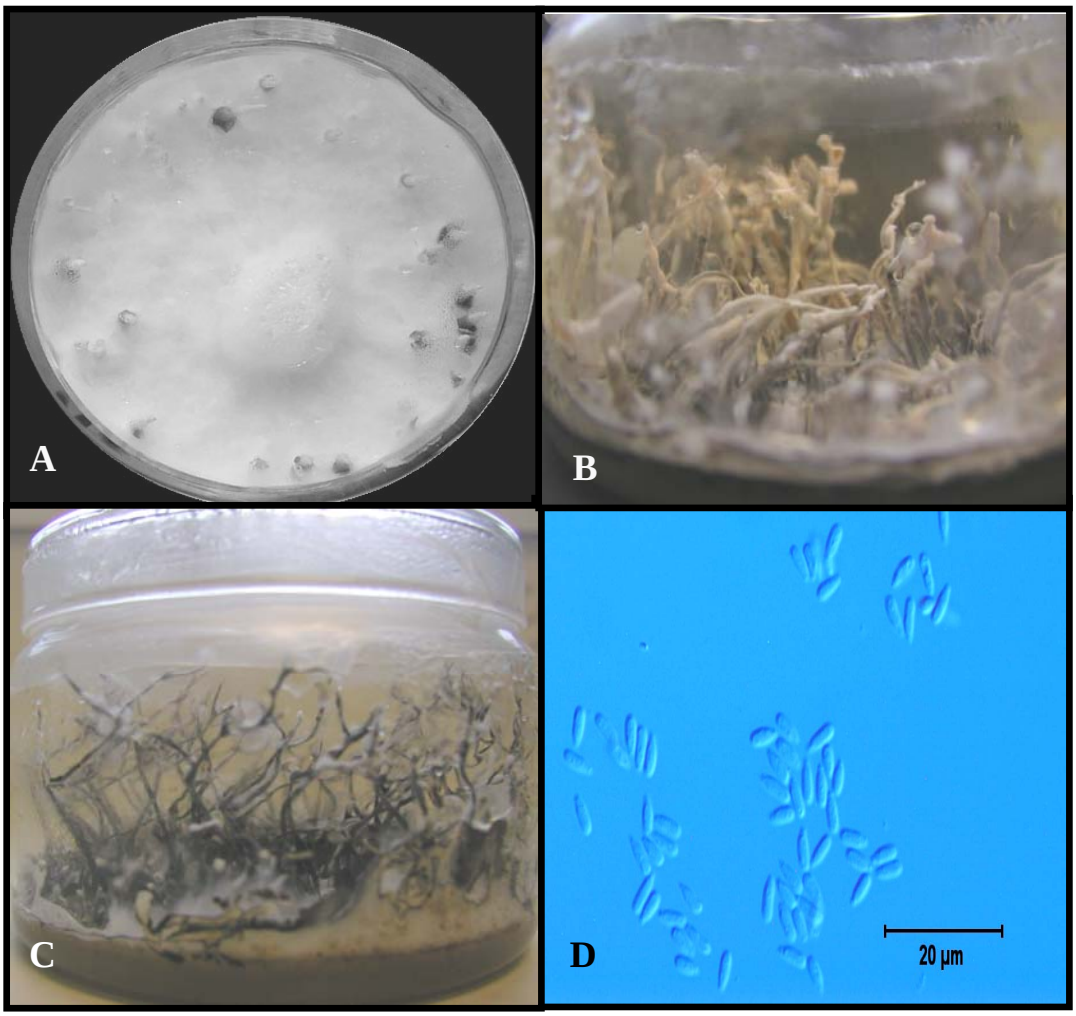

Figura 21. **Morfotipo 6 (Orden Xylariales).** (A) colonia en OA donde comienzan a aparecer los cuerpos fructiferos, (B) formación de cuerpos fructíferos cubiertos de conidios en OA, (C) cuerpos fructiferos negros con ramificación dicotómica, (D) conidios asexuales (Nomarsky, 600 X).

DISCUSIÓN

Tasas de infección total

La tasa de infección total para el estudio de hongos endófitos miceliales en *T. morrisii* fue 62.6 %, con lo cual se corroboró la presencia de estos hongos en el tejido sano. Este valor, dividido entre el primer (76.5%) y segundo muestreo (48.5%), se encuentra dentro de los valores previamente reportados para palmas tropicales. Se han reportado tasas de colonización de 12.6% en *L. ramsayi* (Rodrigues y Samuels, 1990), 21-30% en *E. oleracea* (Rodrigues, 1994) y 20.3 % en *Sabal bermudana* y *Livistona chinensis* (Southcott y Jonson, 1997). Hasta el momento las tasas de infección de *Licuala* sp. y *Licuala ramsayi* (81-89 %) en Brunei y Australia son las más altas que se han reportado en palmas de una zona tropical (Fröhlich *et al*., 2000). Para *T. fortunei*, Taylor *et al*. (1999) obtuvieron tasas de colonización entre 46-56 % en China, 42 % en Australia y 17 % en Suiza. Sin embargo, esta palma es natural de zonas templadas cálidas en China. Los valores obtenidos para los individuos de Australia y Suiza fueron menores (Taylor *et al*., 1999) posiblemente porque las palmas se encontraban creciendo fuera de su marco geográfico natural.

En palmas, las tasas de infección de hongos endófitos han mostrado una gran variación (Taylor *et al*., 1999). Fröhlich *et al*. (2000) argumentaron que las bajas tasas de infección estaban asociadas al tamaño de los fragmentos o discos utilizados en las investigaciones. Por ejemplo, los valores presentados por Rodrigues (1994) pudieron estar relacionados con el tamaño de 3 mm de los discos de utilizados. Sin embargo, esta hipótesis no explica los resultados obtenidos por Lodge *et al*. (1996) en *M. bidentata*

donde el 90-95 % de los fragmentos resultaron infectados cuando su tamaño fue de solo 1 x 2 mm. En contraste, Southcott y Jonson (1997) encontraron una baja tasa de infección al utilizar discos de 8 mm de diámetro. En nuestro estudio se utilizaron fragmentos de 6.25 mm de diámetro. Fröhlich *et al*. (2000) sugirieron entonces que, los valores podrían ser variables dependiendo de la planta hospedera.

Otros factores que pueden estar directamente relacionados con las tasas de infección de hongos endófitos son la temporada en la cual se realizan los muestreos, discutida más adelante, y variables en la metodología tales como los protocolos de limpieza superficial, medio de cultivo y condiciones de crecimiento. Bills (1996) presenta ejemplos de protocolos que se han utilizado para aislar hongos endófitos de diferentes familias de plantas leñosas. Se sugiere realizar estudios preliminares para ajustar estas variables de acuerdo al tipo de muestra para maximizar la obtención de hongos endófitos colonizando los tejidos en el laboratorio.

Tasas de infección múltiple

La tasa de infecciones múltiples, en este caso, la incidencia de dos hongos en el mismo fragmento, fue 0.5 – 2.8 %. Los valores para *T. morrisii* fueron bajos al compararlos con las tasas de infecciones múltiples reportadas en palmas tropicales (Taylor *et al*., 1999; 14 - 54 %; Fröhlich *et al*., 2000; 43.2 – 50.7%). En Puerto Rico se reportaron valores entre 1 – 10 % para las hojas de la especie arbórea *M. bidentata* (Lodge *et al*., 1996).

La baja tasa de infecciones múltiples puede estar relacionada con la presencia de hongos de rápido crecimiento que limitan el desarrollo de otras especies (Lodge *et al*., 1996). Sin embargo, las infecciones múltiples también pueden aparecer por la competencia entre hongos creciendo en un solo fragmento de tejido vegetal. Esta probabilidad debe minimizarse, particularmente cuando se realizan estudios de diversidad y distribución de especies. Una reducción en el tamaño de la unidad de muestreo puede disminuir la competencia entre hongos (Gamboa *et al*., 2002) evitando así las infecciones múltiples, tal como lo sugirió Carroll (1995). A pesar de esto, no se ha establecido un tamaño estándar a utilizarse en los diferentes estudios para obtener datos y cifras comparables.

Tasas de infección relacionadas a la temporada

La tasa de infección de hongos endófitos miceliales durante un periodo de lluvia fue mayor que durante el periodo de sequía (26% de diferencia). Estadísticamente se encontró que esta diferencia es significativa. Otras investigaciones también han mostrado que la precipitación es un factor determinante en las frecuencias de infección de hongos endófitos (Carroll, 1995). Rodrigues (1994) encontró que el número de aislados en palmas adultas varió significativamente de acuerdo a la temporada del año y que la tendencia fue una mayor recuperación durante la temporada lluviosa. De igual forma, Suryanarayanan *et al*. (2002) encontraron un aumento en el número de aislados durante la temporada lluviosa en un bosque seco espinoso. Estas tendencias probablemente explican que la lluvia puede favorecer la dispersión y germinación de los propágulos de

hongos causantes de infecciones endofíticas (Carroll, 1994). Según Rodrigues (1994) las bajas tasas de infección durante temporadas secas sugieren que las palmas se encuentran en deficiencia de agua, haciendo menos propicia la colonización por endófitos.

Tasa de infección por área de estudio

El Área I resultó ser la zona más expuesta donde la dirección de la pendiente y la altura hacen más propicio el impacto del viento así como periodo de irradiación solar más largo. Bajo estas condiciones, la pérdida de agua puede ser mayor disminuyendo las condiciones de humedad, sobre todo cuando en el área no hay otras especies vegetales de gran altura que le provean protección. Estos factores pueden estar directamente asociados a los resultados obtenidos donde la tasa de infección de discos fue menor en el Área 1 durante la temporada lluviosa. Petrini *et al*. (1980) encontraron una razón de infección de hongos endófitos menor en áreas perturbadas y abiertas y atribuyeron las diferencias a factores como elevación, humedad, densidad, y cobertura de dosel.

Durante la temporada seca la tasa de infección de discos fue mayor en el Área I, en contraste con la observación de Petrini *et al*. (1980). Aunque las condiciones de humedad deben ser mucho más bajas durante este periodo, se sugieren dos factores que pueden estar relacionados a la alta tasa de infección. En el Área I, la comunidad de palmas es más densa y el impacto del viento es directo, factores que podrían mantener constante la disponibilidad de inóculo durante periodos climáticos extremos. Sin embargo, no se puede establecer que la transmisión de hongos endófitos en *T. morrisii* es

de tipo vertical ya que no estudió la presencia o ausencia de estos hongos en las semillas de la palma.

Durante el segundo muestreo también se observaron en el Área I variaciones en los parámetros físico-químicos medidos. Los valores promedio de pH y temperatura del suelo fueron significativamente mayores durante M2 (prueba *t* pareada: $P < 0.05$). Así también el valor promedio del pH resultó significativamente mayor que en el Área II (prueba *t*: $P < 0.05$). La temperatura del suelo en el bosque fue mayor durante el periodo de sequía ya que este muestreo se realizó durante un mes de verano donde la temperatura ambiental es mayor. No se reportaron otras diferencias significativas entre los parámetros físico-químicos medidos por área de estudio y por muestreos. El análisis estadístico se encuentra en el Apéndice 3. Aunque se conoce que los parámetros ambientales pueden afectar la condición fisiológica y el ambiente interno de las plantas no existe evidencia para correlacionar estos factores con la tasa de infección de hongos endófitos en los tejidos foliares de *T. morrisii*.

En la temporada lluviosa la tasa de infección de discos fue mayor en el Area II. En este lugar, la dirección de la pendiente y baja altura limitan el impacto del viento y el periodo de irradiación solar. La zona además, se encuentra cerca del cauce del río. Estos factores pueden contribuir a que la pérdida de agua en la zona sea menor. La mayoría de las plantas que crecen en el Área II también son características de zonas húmedas (Apéndice 1). Sin embargo, no se pudo establecer que el porciento de humedad del suelo es mayor que en el Área I ya que no se encontró una diferencia significativa entre los valores promedio en ninguno de los muestreos (prueba *t*: $P > 0.05$). La altura promedio

de las especies vegetales en el área provee protección a las palmas, puede prolongar el periodo de humedad en la superficie de las hojas (Arnold y Herre, 2003) y posiblemente evita que las fuentes de inóculo de hongos endófitos sean arrastradas con las lluvias.

Durante la temporada seca la tasa de infección en el Área II fue menor que en el Área I. Estos resultados no coinciden con los resultados de otras investigaciones donde la mayor colonización y diversidad de hongos endófitos se encuentra en zonas húmedas. Tampoco están acorde con la correlación entre la diversidad de plantas en un área y la diversidad de endófitos (Gamboa y Bayman, 2001; Rodrigues, 1994) ya que durante este muestreo la mayor diversidad de hongos se encontró también en el Área I.

El Bosque Estatal de Susúa posee unas características singulares como el tipo de suelo, diversidad de especies vegetales y condiciones ambientales que pueden haber influenciado los resultados de este estudio. Se sugiere estudiar en más detalle las comunidades endofíticas en diferentes temporadas del año y contemplar la posibilidad de que existan especies de hongos endófitos tolerantes o específicos a las diversas condiciones climatológicas.

Tasas de infección por región de la hoja

Las tasas de infección en las diferentes regiones de la hoja no mostraron diferencias significativas entre muestreos, áreas de estudio o individuos. Fröhlich *et al*. (2000) tampoco reportó variaciones significativas entre la posición de los discos en la hoja, lugar o muestreo. En las investigaciones de Rodrigues y Samuels (1990) y Southcott y Jonson (1997) también dividieron las hojas en diferentes secciones; sin

embargo, no analizaron este factor. Cannon y Simmons (2002) encontraron la mayor tasa de infección en las zonas del ápice de las hojas. En su estudio sugirieron que el drenaje del agua de lluvia podía lavar la superficie de las hojas arrastrando propágulos de hongos hacia la zona apical, haciendo el área más propensa a infecciones. Sin embargo, esta explicación no se puede aplicar a las hojas de *T. morrisii* ya que las hojas utilizadas se encontraban orientadas hacia arriba y solamente las hojas enfermas o senescentes comienzan a orientarse hacia el suelo. Los resultados de nuestro estudio sugieren que los hongos endófitos están distribuidos por toda la hoja y no tienen preferencia por un área específica. Además, el tamaño de la unidad de muestreo (discos de 6 mm de diámetro) pudo haber sido suficiente como para mostrar la composición y localización de hongos endófitos en la hoja (Fröhlich *et al*., 2000).

Hongos endófitos miceliales recuperados

Entre los hongos endófitos identificados, la diversidad de géneros no fue tan alta. Sin embargo, Rodrigues y Samuels (1990) y Southcott y Jonson (1997) también reportaron pocos taxones en sus estudios. Se encontraron hongos en bajas frecuencias al igual que en *Licula* sp y *Licuala ramsayi* (Fröhlich *et al*., 2000), donde la mayoría de las especies ocurrieron en baja frecuencia y con razones de infección menor de 1%. Según Fröhlich *et al*. (2000), este patrón es común en investigaciones de plantas, animales y diversidad y riqueza de especies de hongos.

Los hongos dominantes fueron los mismos para ambas temporadas aunque hubo cambios en sus frecuencias al igual que en el estudio de Suryanarayanan *et al*. (2002). El

morfotipo 6, preliminarmente clasificado en el Orden Xylariales se aisló en altas frecuencias. Los hongos que pertenecen al Orden Xylariales han sido ampliamente recuperados en estudios sobre hongos endófitos en plantas de zonas tropicales (Dreyfuss y Petrini, 1984). Rodrigues y Samuels (1990), Rodrigues (1994) y Fröhlich *el al.* (2000) reportaron una alta frecuencia de Xylariales o sus anamorfos creciendo endofíticamente en los tejidos de palmas. En Puerto Rico, todas las plantas estudiadas hasta el momento han mostrado la presencia de especies de *Xylaria* como grupo dominante (Bayman *et al*. 1997; Bayman *et al*., 1998; Gamboa, 2002; Gamboa y Bayman, 2001; Lodge *et al*.,1996). No obstante, la identificación de especies de Xylariales utilizando solamente características morfológicas muchas veces resulta difícil. Es necesaria la utilización de un medio de cultivo que propicie la formación de estromas, en este estudio el uso de OA resultó efectivo. Además, se deben combinar análisis bioquímicos (Rodrigues *et al*., 1995) y moleculares para poder realizar una identificación adecuada. En el presente estudio, todos los Xylariales encontrados se colocaron dentro del mismo morfotipo y aún no se han realizado pruebas para determinar posibles diferencias entre especies.

El tercer hongo de mayor frecuencia en ambos muestreos fue cf. *Annellolacinia* sp. un hongo que solamente ha sido reportado causando lesiones en hojas de *Ananas comosus* (Bromeliaceae) y *A. sativus* en Ghana, Trinidad e India (Sutton, 1980). La presencia de géneros como *Colletotrichum*, *Phomopsis* y *Pestalotiopsis*, aunque en bajas frecuencias relativas, coincide con reportes en palmas tropicales (Fröhlich *et al*., 2000; Rodrigues, 1992; 1994; Southcott y Johnson, 1997) y de zonas templadas cálidas (Taylor *et al*., 1999). Así también existe similaridad con los géneros reportados en plantas de

Puerto Rico (Bayman *et al*. 1997; Gamboa, 2002; Gamboa y Bayman, 2001; Lodge *et al*.,1996).

Según Rodrigues (1994) y Taylor *et al*. (1999), estos hongos ya han sido reportados como patógenos conocidos de palmas y otras plantas. En palmas ornamentales se ha encontrado que *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Pestalotiopsis palmarum* son causantes de enfermedades (Chase y Broschat, 1991). De esta forma, las teorías aplicadas a hongos endófitos como estados de latencia de patógenos conocidos (Wilson, 1995) pueden ser también aplicables a las especies encontradas en *T. morrisii*. Aunque no se determinó el rol de estos hongos en nuestro estudio, es posible que sean parte de la flora endófita residente y que, dependiendo del estado fisiológico de la planta puedan eventualmente convertirse en patógenos.

Otra teoría propuesta es la adaptación al endofitismo como competencia por el sustrato (Sridhar y Raviraja, 1995) o la eventual conversión de éstos hongos en saprófitos (Petrini, 1991). *Pithomyces maydicus*, un hongo aislado durante el segundo muestreo, podría presentar éstas características. *Pithomyces* no es un género que haya sido reportado como endófito, sin embargo, Zhang y Zhang (2003) reportaron a *P. maydicus* como saprófito en hojas de la palma *Trachycarpus fortunei* en China. Fröhlich y Hyde (1999) también aislaron *Pestalotiopsis*, *Phomopsis* y hongos de la clase Coelomycetes como hongos endófitos y saprófitos.

La mayoría de los morfotipos aislados en este estudio presentaron características similares a hongos de la clase Coelomycetes al igual que en el estudio de

Suryanarayanan *et al*. (2002), donde fue el grupo que más prevaleció. Sin embargo, su identificación ha resultó difícil, ya sea por la falta de estructuras reproductivas o por la similaridad de éstos con varios géneros dentro del mismo grupo. Se sabe que las características que presentan los Coelomycetes en medios de cultivo presentan diferencias morfológicas (Petrini, 1986) haciéndolos uno de los grupos más problemáticos para identificar (Bills, 1996). Gamboa y Bayman (2001), sugieren la combinación de técnicas tradicionales con los análisis moleculares para la adecuada identificación de hongos endófitos que no esporulan en cultivos.

CONCLUSIONES

Esta tesis representa el primer estudio de hongos endófitos miceliales en el tejido foliar de la palma tropical *Thrinax morrisii*. Los resultados obtenidos revelan lo siguiente:

- Existe una flora endófita en los tejidos foliares de la palma tropical *T. morrisii*.
- La tasa de infección de hongos endófitos miceliales se encontró dentro del rango reportado para otras palmas tropicales.
- La tasa de infección fue mayor durante la época lluviosa y se sugiere una correlación entre la colonización de hongos endófitos y la temporada del año, así como entre la localización de las plantas.
- Se recuperaron en mayor frecuencia y en ambos muestreos dos morfotipos, uno de ellos dentro del Orden Xylariales, y cf. *Annellolacinia* sp. Esto sugiere que son comunidades de hongos endófitos que se pueden encontrar en *T. morrisii* independientemente de la temporada.
- Se recuperaron hongos endófitos, como *Colletrotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp. y *Phomopsis* sp., que han sido reportados como patógenos de otras especies de plantas, lo que sugiere la capacidad de esta flora endofítica para convertirse en patógenos cuando las condiciones ambientales lo propicien.

RECOMENDACIONES

Luego de realizar este estudio y analizar los resultados se recomienda:

- Realizar un estudio similar aumentando el número de muestreos por año y las áreas del bosque para determinar si la tasa de colonización de hongos endófitos sigue un patrón más específico.
- Estudiar las comunidades endófitas en las semillas de *T. morrisii* y observar si la transmisión de estos hongos es horizontal o vertical.
- Realizar pruebas de especificidad de tejido para determinar las verdaderas diferencias entre la colonización de las hojas y las diferentes partes de la planta así como de tejido enfermo y en estado de descomposición.
- Adoptar el uso de técnicas moleculares en combinación con las técnicas tradicionales para identificar adecuadamente los hongos endófitos que presentan problemas.
- Estudiar el ciclo de vida de *T. morrisii* en el bosque y determinar si su fisiología influye en las tasas de colonización de hongos endófitos para crear mejores programas de manejo y conservación de esta planta.

LITERATURA CITADA

Álvarez, H. J. 1983. Estudio del bosque de Susúa. En: A. E. Lugo (ed.), Los bosques de Puerto Rico, pp. 152-156. Servicio Forestal de los Estados Unidos, Instituto de Dasonomía Tropical y Departamento de Recursos Naturales, Río Piedras, Puerto Rico.

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.

Barnett, H. L. y B. B. Hunter. 1987. Illustrated genera of imperfect fungi, fourth edition. Macmillan Publishing, New York, 218 pp.

Bayman, P., L. L. Lebrón, R. L. Tremblay y D. L. Lodge. 1997. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). New Phytologist. 135: 143-149.

Bayman, P., P. Angulo-Sandoval, L. L. Lebrón, R. L. Tremblay y D. J. Lodge. 1998. Distribution and dispersal of *Xylaria* endophytes in two tree species in Puerto Rico. Mycological Research. 102 (8): 944-948.

Bills, G. F. 1996. Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. En: S.C. Redlin y L.M. Carris (eds.), Endophytic fungi in grasses and woody plants, pp. 31-65. APS Press, Minnesota.

Cannon, 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.

Carroll, G. C. 1986. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. En: N. J. Fokema and J. Van den Heuvel (eds.), Microbiology of the phyllosphere, pp. 205-222. Cambridge University Press, Cambridge.

Carroll, G. C. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. Ecology. 69 (1): 2-9.

Carroll, G. C. 1990. Fungal endophytes in vascular plants: mycological research opportunities in Japan. Trans. Mycol. Soc. Japan. 31: 103-116.

Carroll, G. C. 1995. Forest endophytes: pattern and process. Canadian Journal of Botany. 73 (Suppl. 1): S1316-S1324.

Chanway, C. P. 1996. Endophytes: they're not just fungi! Canadian Journal of Botany. 74: 321-322.

Chase, A. R. y T. K. Boschat. 1991. Diseases and disorders of ornamental palms. APS Press, Minnesota, 56 pp.

Clay, K. 1986. Grass endophytes. En: N.J. Fokema y J. Van den Heuvel (eds.), Microbiology of the phyllosphere, pp. 188-204. Cambridge University Press, Cambridge.

Clay, K. 1989. Clavicipitaceous endophytes of grasses: their potential as biocontrol agents. Mycological Research. 92 (1): 1-12.

Departamento de Recursos Naturales. 1976. The Master Plan for the Commonwealth Forests of Puerto Rico. Departamento de Recursos Naturales, San Juan, Puerto Rico, 259 pp.

Dreyfuss, M. y O. Petrini. 1984. Further investigations on the occurrence and distribution of endophytic fungi in tropical plants. Botanica Helvetica. 94 (1): 33-40.

Ellis, M. B. 1971. Dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, 608 pp.

Evans, H. C., K. A. Holmes y S. E. Thomas. 2003. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. Mycological Progress. 2 (2): 149-160.

Ewel, J. J. y J. L. Whitmore.1973. The ecological life zones of Puerto Rico and the U. S. Virgin Islands. Forest Service Research Paper ITF-18. Institute of Tropical Forestry, Forest Service, U.S. Department of Agriculture, Río Piedras, Puerto Rico, 72 pp.

Faeth, S. H. y W. F. Fagan. 2002. Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. Integ. and Comp. Biol. 42: 360-368.

Fröhlich, J. y K. Hyde. 1999. Biodiversity of palm fungi in the tropics: are global fungal diversity estimates realistic? Biodiversity and Conservation. 8: 977-1004.

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 in 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, R. G. 1991. Relaciones Taxonómicas y Fitogeográficas entre la flora endémica de serpentina en Susúa, Puerto Rico y Río Piedras, Gaspar Hernández, República Dominicana. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, P.R., 137 pp.

Guba, E. F. 1961. Monograph of *Monochaetia* and *Pestalotia*. Harvard University Press, Massachusetts, 342 pp.

Little, E. L., R. O. Woodburry y F. H. Wadsworth. 1988. Árboles de Puerto Rico y las Islas Vírgenes, vol. 2. U. S. Department of Agriculture, Washington D. C., 1177 pp.

Lodge, D. G., P. J. Fisher and B. C. Sutton. 1996. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. Mycologia. 88 (5): 733-738.

Musa, J. C. 1981. Estudio de la vegetación y el suelo del Bosque de Susúa. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, P.R., 80 pp.

Nag Raj, T. R. 1993. Coelomycetous anamorphs with appendage-bearing conidia. Mycologue Publications, Waterloo, 1101 pp.

Petrini, O. 1986. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. En: N. J. Fokema 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 of leaves, pp. 179-197. Springer-Verlag, New York.

Petrini, O., J. Stone y F. E. Carroll. 1980. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. Can J Bot. 60: 789-796.

Read, R. W. 1975. The Genus *Thrinax* (Palmae: Coryphoideae). Smithsonian Contributions to Botany, number 19. Smithsonian Institution Press, Washington, 98 pp.

Rodrigues, K. F. 1992. Endophytic fungi in the tropical palm *Euterpe oleracea* Mart. Thesis. City University of New York, 258 pp.

Rodrigues, K. F. 1994. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. Mycologia. 86 (3): 376-385.

Rodrigues, K. F. 1996. Fungal endophytes of palms. En: S.C. Redlin y L.M. Carris (eds.), Endophytic fungi in grasses and woody plants, pp. 121-132. APS Press, Minnesota.

Rodrigues, K. F. y G. J. Samuels. 1990. Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. Mycological Research. 94 (6): 827-830.

Rodrigues, K. F. y G. J. Samuels. 1992. *Idriella* species endophytic in palms. Mycotaxon. XLIII: 271-276.

Rodrigues, K. F. y G. J. Samuels. 1994. *Letendraeopsis palmarum*, a new genus and species of loculoascomycetes. Mycologia. 86 (2): 254-258.

Rodrigues, K. F., O. Petrini y A. Leuchtmann. 1995. Variability among isolates of *Xylaria cubensis* as determined by isozyme analysis and somatic incompatibility tests. Mycologia. 87 (5): 592-596.

Schulz, B., S. Guske, U. Dammann y C. Boyle. 1998. Endophyte-host interactions. II. Defining symbiosis of the endophyte-host interaction. Symbiosis. 25: 213-227.

Siegel, M. L. y C. L. Schardl, 1991. Fungal endophytes of grasses: detrimental and beneficial associations. En: J. H. Andrews y S. S. Hirano (eds.) Microbial ecology of leaves, pp. 198-221. Springer-Verlag, New York.

Southcott, K.A. y J.A. Johnson. 1997. Isolation of endophytes from two species of palm from Bermuda. Canadian Journal of Microbiology. 43: 789-792.

Sridhar, K.R. y N. S. Raviraja. 1995. Endophytes- a crucial issue. Current Science. 69 (7): 570-571.

Stone, J. K., C. W. Bacon y J. F. White. 2000. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. En: C. W. Bacon y J. F. White (eds.) Microbial endophytes, pp. 3-29. Marcel Dekker, New York.

Suryanarayanan, T. S., T. S. Murali y G. Venkatesan. 2002. Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. Canadian Journal of Botany. 80: 818-826.

Sutton, B. C. 1980. The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew, 696 pp.

Taylor, J. E., K. D. Hyde y E. B. G. Jones. 1999. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. New Phytologist. 142: 335-346.

Wennström, A. 1994. Endophyte- the misuse of an old term. Oikos. 71 (3): 535-536.

Wilson, D. 1995. Endophytes- the evolution of a term, and clarification of its use and definition. Oikos. 73 (2): 274-276.

APÉNDICE 1

Lista de las especies de plantas en las áreas de estudio y algunas de sus características. A = árbol, C = común en el área de estudio, E = planta endémica, Ec = extremadamente común en el área de estudio, H = planta de áreas húmedas, Pc = poco común en el área de estudio, S = planta de áreas secas.

Familia y especie	Área I	Área II	Comentario
ANACARDIACEAE			
Comocladia dodonaea (L.) Urban	X	X	C
BIGNONIACEAE			
Tabebuia haemantha (Bert.) DC.	X	X	C, E
BROMELIACEAE			
Pitcairnia angustifolia Aiton		X	H, R
Tillandsia recurvata (L.) L.		X	Ec
Tillandsia sp.		X	C
BURSERACEAE			
Bursera simaruba (L.) Sarg.		X	C, A
CYCADACEAE			
Zamia portoricensis Urb.		X	C, E, H
ERYTHROXYLACEAE			
Erythroxylum urbanii O. E. Schulz	X		C, S
EUPHORBIACEAE			
Chamaesyce articulata (Aubl.) Britton	X		Pc, S
GESNERIACEAE			
Gesneria pedunculosa (DC.) Fritsch		X	H
LAURACEAE			
Licaria parvifolia (Lam.) Kosterm.		X	A, C, H

APÉNDICE 1 (CONT.)

Familia y especie	Área I	Área II	Comentario
MELIACEAE			
Swietenia mahogani (L.) Jacq	X	X	C, I
MYRTACEAE		X	C, H
Pimenta racemosa (Mill.) J.W. Moore	X		C
Siphoneugena densiflora Berg.			
ORQUIDACEAE			
Psychillis Kraenzlinii (Bello) Sauleda		X	E
Psychillis Krugii (Bello) Sauleda	X	X	E, Pc
Tetramicra canaliculata (Aubl.) Urb.		X	Ec
Vanilla barbellata Rchb. f.	X	X	C
POLYGONACEAE			
Coccoloba microstachya Willd.	X		Ec, S
Coccoloba sintenisii Urban		X	C, E, H
RUBIACEAE			
Antirhea acutata DC.) Urban	X		C, S
Guetarda pungens Urb.	X	X	C
Guettarda scabra (L.) Vent.	X	X	Ec, S
Neolaugeria resinosa (Vahl) Nichols.	X	X	C
Randia aculeata L.	X	X	C
RUTACEAE			
Amyris elemifera Britton	X		Pc
SMILACACEAE			
Smilax havanensis Jacq.	X	X	C
THEACEAE			
Ternstroemia stahlii Krug & Urb.		X	E

APÉNDICE 2

Número total de hongos endófitos miceliales aislados por área de estudio en cada muestreo.

Género / Morfotipo	M1			M2		
	A1	A2	Total M1	A1	A2	Total M2
Cf. *Annellolacinia* sp.	10	0	10	7	0	7
Colletotrichum sp.	0	0	0	1	0	1
Cf. *Fusarium* sp.	0	1	1	0	0	0
Pestalotiopsis sp.	0	2	2	1	2	3
Phomopsis sp.	2	6	8	1	0	1
Pithomyces maydicus	0	0	0	3	0	3
Morfotipo 1	0	0	0	2	1	3
Morfotipo 2	3	1	4	5	0	5
Morfotipo 3	0	0	0	0	1	1
Morfotipo 4	0	0	0	0	6	6
Morfotipo 5	23	8	31	49	17	66
Morfotipo 6	31	60	91	2	7	9
Otros hongos no clasificados	9	21	30	1	20	21
Total de hongos clasificados			**147**			**105**

APÉNDICE 3

Resultados de las pruebas de independencia Chi ^{2} para las frecuencias de infección de discos por temporada, por área de estudio en cada muestreo y por región de la hoja.

Prueba de independencia Chi² para la infección de discos por muestreo.

Tablas de contingencia
Frecuencias: discos colonizados
Frecuencias absolutas
En columnas:indiv

Muestreo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
M1	3	32	38	34	38	38	39	34	33	17	306
M2	31	4	36	13	27	11	24	22	9	18	195
Total	34	36	74	47	65	49	63	56	42	35	501

Frecuencias relativas por filas (expresadas en porcentajes)
En columnas:indiv

Muestreo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
M1	0.980	10.458	12.418	11.111	12.418	12.418	12.745	11.111	10.784	5.556	100.000
M2	15.897	2.051	18.462	6.667	13.846	5.641	12.308	11.282	4.615	9.231	100.000
Total	6.786	7.186	14.770	9.381	12.974	9.780	12.575	11.178	8.383	6.986	100.000

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	69.728	9	<0.0001
Chi Cuadrado MV-G2	75.027	9	<0.0001
Coef.Conting.Cramer	0.264		
Coef.Conting.Pearson	0.350		

Prueba de independencia Chi² para la infección de discos por área de estudio durante el primer muestreo.

Tablas de contingencia
Frecuencias: discos colonizados

Frecuencias absolutas
En columnas:Individuo

Área	1	2	3	4	5	Total
I	3	32	38	34	38	145
II	38	39	34	33	17	161
Total	41	71	72	67	55	306

Frecuencias relativas por filas (expresadas en porcentajes)
En columnas:Individuo

Área	1	2	3	4	5	Total
I	2.07	22.07	26.21	23.45	26.21	100.00
II	23.60	24.22	21.12	20.50	10.56	100.00
Total	13.40	23.20	23.53	21.90	17.97	100.00

Frecuencias relativas al total (expresadas en porcentajes)
En columnas:Individuo

Área	1	2	3	4	5	Total
I	0.98	10.46	12.42	11.11	12.42	47.39
II	12.42	12.75	11.11	10.78	5.56	52.61
Total	13.40	23.20	23.53	21.90	17.97	100.00

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	38.09	4	<0.0001
Chi Cuadrado MV-G2	43.69	4	<0.0001
Coef.Conting.Cramer	0.25		
Coef.Conting.Pearson	0.33		

Prueba de independencia Chi² para la infección de discos por área de estudio durante el segundo muestreo.

Tablas de contingencia
Frecuencias: discos colonizados

Frecuencias absolutas
En columnas:Individuo

Área	1	2	3	4	5	Total
I	31	4	36	13	27	111
II	11	24	22	9	18	84
Total	42	28	58	22	45	195

Frecuencias relativas por filas (expresadas en porcentajes)
En columnas:Individuo

Área	1	2	3	4	5	Total
I	27.93	3.60	32.43	11.71	24.32	100.00
II	13.10	28.57	26.19	10.71	21.43	100.00
Total	21.54	14.36	29.74	11.28	23.08	100.00

Frecuencias relativas al total (expresadas en porcentajes)
En columnas:Individuo

Área	1	2	3	4	5	Total
I	15.90	2.05	18.46	6.67	13.85	56.92
II	5.64	12.31	11.28	4.62	9.23	43.08
Total	21.54	14.36	29.74	11.28	23.08	100.00

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	26.49	4	<0.0001
Chi Cuadrado MV-G2	27.98	4	<0.0001
Coef.Conting.Cramer	0.26		
Coef.Conting.Pearson	0.35		

Prueba de independencia Chi² para la infección de discos por región de la hoja por muestreo.

Tablas de contingencia
Frecuencias: discos colonizados

Frecuencias absolutas
En columnas:región

muestreo	1	2	3	4	Total
M1	71	71	79	85	306
M2	42	46	57	50	195
Total	113	117	136	135	501

Frecuencias relativas por filas (expresadas en porcentajes)
En columnas:región

muestreo	1	2	3	4	Total
M1	23.20	23.20	25.82	27.78	100.00
M2	21.54	23.59	29.23	25.64	100.00
Total	22.55	23.35	27.15	26.95	100.00

Frecuencias relativas al total (expresadas en porcentajes)
En columnas:región

muestreo	1	2	3	4	Total
M1	14.17	14.17	15.77	16.97	61.08
M2	8.38	9.18	11.38	9.98	38.92
Total	22.55	23.35	27.15	26.95	100.00

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	0.87	3	0.8334
Chi Cuadrado MV-G2	0.86	3	0.8339
Coef.Conting.Cramer	0.03		
Coef.Conting.Pearson	0.04		

Prueba de independencia Chi² para la infección de discos por región de la hoja y por área de estudio, durante el primer muestreo.

Tablas de contingencia
Frecuencias: discos colonizados

Frecuencias absolutas
En columnas:región

Área	1	2	3	4	Total
I	33	35	36	41	145
II	38	36	43	44	161
Total	71	71	79	85	306

Frecuencias relativas por filas (expresadas en porcentajes)
En columnas:región

Área	1	2	3	4	Total
I	22.76	24.14	24.83	28.28	100.00
II		23.60	22.36	26.71	27.33 100.00
Total	23.20	23.20	25.82	27.78	100.00

Frecuencias relativas al total (expresadas en porcentajes)
En columnas:región

Área	1	2	3	4	Total
I	10.78	11.44	11.76	13.40	47.39
II	12.42	11.76	14.05	14.38	52.61
Total	23.20	23.20	25.82	27.78	100.00

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	0.26	3	0.9680
Chi Cuadrado MV-G2	0.26	3	0.9680
Coef.Conting.Cramer	0.02		
Coef.Conting.Pearson	0.03		

Prueba de independencia Chi² para la infección de discos por región de la hoja y por área de estudio, durante el segundo muestreo.

Tablas de contingencia
Frecuencias: discos colonizados

Frecuencias absolutas
En columnas:región

Área	1	2	3	4	Total
I	26	28	32	25	111
II	16	18	25	25	84
Total	42	46	57	50	195

Frecuencias relativas por filas (expresadas en porcentajes)
En columnas:región

Área	1	2	3	4	Total
I	23.42	25.23	28.83	22.52	100.00
II	19.05	21.43	29.76	29.76	100.00
Total	21.54	23.59	29.23	25.64	100.00

Frecuencias relativas al total (expresadas en porcentajes)
En columnas:región

Área	1	2	3	4	Total
I	13.33	14.36	16.41	12.82	56.92
II	8.21	9.23	12.82	12.82	43.08
Total	21.54	23.59	29.23	25.64	100.00

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	1.71	3	0.6350
Chi Cuadrado MV-G2	1.71	3	0.6355
Coef.Conting.Cramer	0.07		
Coef.Conting.Pearson	0.09		

APÉNDICE 4

Resultados de las pruebas de hipótesis de muestras independientes (prueba *t*) y muestras pareadas (prueba *t* pareada) para los parámetros físico-químicos.

4-A. Prueba de hipótesis para diferencia en las medias de los parámetros físico-químicos entre las áreas de estudio por muestreo (prueba *t* para muestras independientes).

TEMPERATURA DE SUELO

M1: **prueba *t* para muestras Independientes**

Clasific	Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	media(1)
area	temp	{1}	{2}	5	5	23.00

media(2)	p(Var.Hom.)	T	gl	p	prueba
23.00	0.5185	0.00	8	>0.9999	Bilateral

M2: **prueba *t* para muestras Independientes**

Clasific	Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	media(1)
area	temp	{1}	{2}	5	5	26.20

media(2)	p(Var.Hom.)	T	p	prueba
25.40	0.4320	1.79	0.1114	Bilateral

PH DEL SUELO

M1: **Prueba *t* para muestras Independientes**

Clasific	Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	media(1)
area	pH	{1}	{2}	5	5	6.24

media(2)	p(Var.Hom.)	T	p	prueba
6.14	0.4656	0.42	0.6843	Bilateral

M2: prueba *t* para muestras Independientes

Clasific	Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	media(1)
area	pH	{1}	{2}	5	5	6.76

media(2)	p(Var.Hom.)	T	p	prueba
6.08	0.2080	2.61	0.0312	Bilateral

GRADO DE HUMEDAD DEL SUELO

M1: prueba *t* para muestras Independientes

Clasific	Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	media(1)
area	hum suelo	{1}	{2}	5	5	49.90

media(2)	p(Var.Hom.)	T	gl	p	prueba
74.00	0.3656	-1.94	8	0.0888	Bilateral

M2: prueba *t* para muestras Independientes

Clasific	Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	media(1)
area	hum suelo	{1}	{2}	5	5	39.70

media(2)	p(Var.Hom.)	T	p	prueba
66.50	0.3732	-1.94	0.0881	Bilateral

4-B. Prueba de hipótesis para diferencia en las medias de los parámetros físico-químicos entre muestreos por área de estudio(prueba *t* para muestras pareadas).

TEMPERATURA SUELO

Área I: Prueba T (muestras apareadas)

Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	T	Bilateral
M1	M2	5	-3.20	1.10	-6.53	0.0028

Área II: Prueba T (muestras apareadas)

Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	T	Bilateral
M1	M2	5	-2.40	0.55	-9.80	0.0006

PH SUELO

Area 1: **Prueba T (muestras apareadas)**

Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	T	Bilateral
M1	M2	5	-0.52	0.36	-3.26	0.0310

Área 2: **Prueba T (muestras apareadas)**

Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	T	Bilateral
M1	M2	5	0.06	0.52	0.26	0.8083

GRADO DE HUMEDAD DEL SUELO

Area 1: **Prueba T (muestras apareadas)**

Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	T	Bilateral
M1	M2	5	10.20	18.29	1.25	0.2805

Área 2: **Prueba T (muestras apareadas)**

Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	T	Bilateral
M1	M2	5	7.50	14.03	1.20	0.2980