ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción

Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador

Programa de Maestría en Biotecnología Agrícola

"Aislamiento e identificación de hongos marinos del manglar de Palmar-Provincia de Santa Elena, y establecimiento del banco de cepas fúngicas"

TESIS DE GRADO

Previa la obtención del Título de:

MAGISTER EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA CON MENCIÓN EN AGRICULTURA ORGÁNICA

Presentada por:

Xavier Álvarez Montero

GUAYAQUIL – ECUADOR

2011

AGRADECIMIENTO:

Agradezco al Dr. Washington B. Cárdenas, tutor de esta tesis, apoyo y guía permanente en el correcto desarrollo de la investigación.

A la Dra. Siti A. Alias, por prestar sus valiosos conocimientos sobre el aislamiento e identificación de micromicetos marinos del manglar.

A la Dra. Jinx Campbell y su estudiante de posgrado Allison Walker por su ayuda en la confirmación del trabajo taxonómico.

Al Dr. Efrén Santos, amigo y maestro, por su apoyo incondicional.

A la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar – Laboratorio de Biomedicina por todo el aporte para la culminación exitosa de esta investigación.

A la Máster Diana Enríquez, quien desinteresadamente aportó con sus amplios conocimientos en micromicetos marinos.

A la Blga. Ruth Chóez de Quezada directora del Laboratorio de Biotecnología y Genética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil, por su apoyo al desarrollo de esta investigación.

Al Tcnlgo. Eduardo Panchana, por la dedicación brindada a este proyecto.

DEDICATORIA:

A Nancy, mujer especial, que con su esfuerzo, comprensión y dedicación ayudó a desarrollar está investigación.

A mi madre, mujer de excepcional carácter y honradez, formadora de mis primeros días.

A mis hijos, Desiree, Denise, Diana y Daniel, por su cariño.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Francisco Andrade, Msc
Decano FIMCP

Washington B. Cárdenas, PhD
DIRECTOR DE TESIS

Efrén Santos O, PhD
VOCAL PRINCIPAL

Alfredo Barriga, PhD
VOCAL PRINCIPAL

DECLARACIÓN EXPRESA:

"La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL"

…….....

Xavier Álvarez Montero

RESUMEN

El manglar es un ecosistema circunscrito a zonas tropicales y subtropicales. Está formado por fanerógamas que presentan adaptaciones para poder vivir en terrenos inundados altamente salinos, con baja concentración de oxígeno y que está sujeto a mareas de agua salobre y salada. Se estima que el área total de manglares a nivel mundial es de aproximadamente 16´530.000 hectáreas, de las cuales los manglares de América Latina y el Caribe constituyen el 35,27% del área total. Ecuador cuenta con aproximadamente 196.000 Ha de manglar.

Este ecosistema acuático es hábitat de numerosas especies de vertebrados e invertebrados, mantenida por una rica comunidad de bacterias y hongos encargada de fijar nitrógeno, solubilizar el fósforo y descomponer la materia orgánica. La acción de estos microorganismos permite que se mantengan los flujos de materia y energía de este ecosistema.

El estudio de los hongos del manglar ecuatoriano, no sólo sirve para entender mejor este ecosistema y su funcionamiento, sino también para investigaciones en el campo de la biotecnología, ya que este tipo de microorganismo producen enzimas que pueden utilizarse en la industria alimenticia (*e.g.,* pectinasas, proteasas y amilasas), producción de

detergentes (*e.g.,* amilasas) y la naciente industria de biocarburantes. Esta última a través de la degradación de celulosa y lignina en azucares simples fermentables para la producción de bioetanol. De igual manera las enzimas fúngicas son usadas en la industria del papel y de la biorremediación.

El presente estudio establece por primera vez la presencia y caracterización taxonómica de los hongos marinos lignícolas del manglar de Palmar, Provincia de Santa Elena. Se implementó un método de colección y procesamiento de muestras, que permitió el aislamiento de las estructuras reproductivas para la identificación taxonómica y el cultivo de los micromicetos. También se estableció un banco de cepas fúngicas para estudios posteriores.

ABSTRACT

The mangrove is an ecosystem limited to tropical and subtropical zones. It is formed by phanerogams that present adaptations to live in flooded areas, with low oxygen concentration, high salinity and influenced by brackish and salty water tides. It is estimated that the world mangrove area is approximately 16´530,000 hectares, from which 35.27% is located in Latin America and the Caribbean. Ecuador has approximately 196,000 ha of mangroves.

This aquatic ecosystem is inhabited by numerous vertebrate and invertebrate species, that are supported by a rich bacteria and fungi community in charged of fixing nitrogen, solubilizing phosphorus and decomposing organic matter. The action of these microorganisms allows the continuous flow of matter and energy in these ecosystems.

The study of the fungi community of the ecuadorian mangroves, is important to understand not only the ecosystem and its function, but also to develop further research initiatives in the biotechnology field. These microorganisms can produce enzymes that can be used in food industry (*e.g.,* pectinases, proteases and amylases), production of detergent (*e.g.,* amylases) and the biofuel industry. This last one to decompose cellulose and lignin into

fermentable simple sugars that can be used in bioethanol production. Further, fungal enzymes are also used in the paper and the bioremediation industries.

This study establishes for the first time the presence and taxonomic characterization of marine ligninolytic fungi in the mangrove ecosystem of Palmar, Santa Elena province. It was implemented a method for collection and processing of field samples that allowed the isolation of reproductive structures for identification and culture of the fungi. A strain collection was also established for future studies.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN……..…7

ABSTRACT……..……9

GLOSARIO……14

ÍNDICE DE TABLAS……19

ÍNDICE DE FIGURAS…….….20

CAPÍTULO 1…….24

GENERALIDADES…….….24

1.1 Características ecológicas del manglar y los micromicetos..……..24

1.2 Antecedentes…….26

1.3 Morfología de los micromicetos marinos……..34

1.4 Diversidad de micromicetos marinos……..…39

1.5 Evolución e importancia ecológica de los micromicetos marinos..…43

1.6 Degradación de la madera por micromicetos marinos……..……...47

1.7 Objetivos……48

1.7.1 General……..48

1.7.2 Específicos……48

CAPÍTULO 2…….....50

MATERIALES Y MÉTODOS……..50

2.1 Descripción del área de estudio…….…….50

2.2 Técnica de muestreo y procesamiento de las muestras……..52

2.3 Metodología de laboratorio……53

2.3.1 Incubación en cámara húmeda……..55

2.3.2 Aislamiento de estructuras de reproducción……56

2.3.3 Obtención de cultivos monospóricos……58

2.3.4 Conservación de cepas monospóricas……63

2.3.4.1 Procedimiento 1……63

2.3.4.2 Procedimiento 2……64

CAPÍTULO 3.....66

RESULTADOS……..66

3.1 Aislamiento e identificación de micromicetos marinos lignícolas…..…....66

3.1.1 Teleomorfos……66

3.1.2 Descripción de *Dactylospora haliotrepha*…..66

3.1.3 Descripción de *Corollospora maritima*……...67

3.1.4 Descripción de *Lulworthia grandispora*……..……...68

3.1.5 Descripción de *Saccardoella* sp……..69

3.1.6 Anamorfos u hongos mitospóricos..……71

3.1.7 Descripción de *Zalerion maritimun*……..…71

3.1.8 Descripción de *Trichocladium alopallonelum*……72

3.1.9 Descripción de *Trichocladium achrasporum*……..73

3.1.10 Descripción de *Periconia prolífica*……74

3.2 Obtención y conservación de cultivos monospóricos para el establecimiento de un banco de cepas fúngicas……75

CAPÍTULO 4……77

DISCUSIÓN……..…77

4.1 Discusión…….……..77

CAPÍTULO 5……83

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES……..……..83

5.1 Conclusiones……..83

5.2 Recomendaciones……..84

BIBLIOGRAFÍA……...……86

GLOSARIO

Anamorfo. Estadio reproductivo asexual de hongos ascomicetes y basidiomicetes.

Anóxico. Carente de oxígeno.

Asca. Estructura esporógena (reproductora) de los ascomicetes, dentro de la cual se organizan ocho endósporas.

Ascocarpo. Denominado también cuerpo fructífero, encierra las ascas.

Basipétalo. Crecimiento o transporte desde el ápice hacia la base.

Celulosa. Polímero lineal de la D-glucosa que posee enlaces β(1 → 4) glucosídicos.

CMA. Corn **M**eal **A**gar.

Cultivo monospórico. Cultivo fúngico proveniente de una sola ascospora.

Detrito. Materia orgánica muerta, como hojas y ramas secas y otros desechos vegetales y animales que se encuentran en cualquier ecosistema.

Detritívoro. Organismo que obtiene su energía y nutrientes a partir del detritos.

Eucaryota. Organismo que está formado por células eucariotas (con núcleo).

Exuvia. Cutícula usada (exoesqueleto), que es abandonada por los artrópodos (insectos, crustáceos o arácnidos) tras la ecdisis. La exuvia de un artrópodo puede ser de gran importancia para identificar la especie o incluso el sexo del animal.

Fase ameboidea. Las células ameboideas alteran su forma emitiendo o retrayendo pseudópodos a partir de cualquier punto de la superficie celular. Por debajo del plasmalema yace una capa no granular, el ectoplasma, de consistencia gelatinosa, que rodea al endoplasma, más fluido.

GPS. Sistema de Posicionamiento Global

Hifa. Es un filamento de pared rígida en el que fluye el protoplasma. Su longitud es variable, pero su diámetro es relativamente constante, variando

de 1 a 30 µm. El extremo terminal de la hifa se llama zona de extensión y corresponde a la región de crecimiento más activo de la pared. La hifa no siempre es un filamento continuo. En hongos superiores, ésta posee paredes transversales, espaciadas regularmente, denominadas septos.

Lignina. Polímero de alcoholes aromáticos.

Macrófitas. Las plantas acuáticas o macrófitas (también llamadas plantas hidrofíticas o hidrofitas o plantas hidrofilaceas o higrofitas) son plantas adaptadas a los medios muy húmedos o acuáticos.

Plastidios. Nombre general para el tipo de orgánulos de las células vegetales que están rodeados de una doble membrana y contienen plastoglóbulos y una red de membranas internas y vesículas.

Proporción C:N. Estas proporciones caracterizan a las distintas MO (materia orgánica) y nos permiten anticipar como combinarlas para que se descompongan adecuadamente. Mucho carbono (relaciones altas) hace muy lento al compostaje y mucho nitrógeno (relaciones bajas) puede generar problemas para las lombrices. Para optimizar el proceso se deben ajustar los materiales a compostar a relaciones entre 25/1 y 40/1.

Queratina. Son proteínas insolubles de los animales, derivadas de las células del ectodermo (piel). Están incluidas en ella elementos proteicos estructurales de la piel (el cuero es casi queratina pura), así como los derivados biológicos del ectodermo, tales como el pelo, la lana, las escamas, las plumas y sus cañones, las pezuñas, las uñas, los cuernos y la seda.

Quitina. Es un homopolímero de la N-acetil-D-glucosamina, con enlace β(1 → 4), es el elemento orgánico principal en el exoesqueleto de los insectos y de los crustáceos, y compone la pared celular (2 %) de muchos grupos de hongos.

Recalcitrante. Molécula o compuesto totalmente resistente al ataque microbiano.

Saprobio. Organismos como termitas, hongos y bacterias que obtienen su energía y nutrientes de la materia orgánica muerta.

Seudoparénquima. En micología y ficología, tipo de plecténquima en el que las hifas del hongo se disponen de forma compacta, no apareciendo individualizadas, y con morfología más redondeada, recordando al parénquima vegetal. Se forma por aproximación y soldadura de hifas separadas en hongos, y de la misma manera por células separadas en algas

Términos equivalentes: blastoparénquima, hifénquima, nematoparénquima, paraplecténquima.

Simbionte. Organismo asociado íntimamente con otro.

Teleomorfo. Estadio reproductivo sexual de hongos ascomicetes y basidiomicetes.

Zona nerítica. Zona marítima correspondiente a la plataforma continental.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1……41

Tabla 2……42

Tabla 3……52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ascocarpo o cuerpo fructífero de *Lulworthia grandispora* y un diagrama de su estructura. Magnificación 4X.……...34

Figura 2. Pared fina con células poligonales seudoparenquimatosas de un ascocarpo de *L. grandispora*. Magnificación 100X.……...……36

Figura 3. Ascas claviformes de un ascomicete marino no identificado. Magnificación 40X..……..……36

Figura 4 A) Ascosporas de *Dactylospora haliotrepha* con estrías longitudinales. Magnificación 40X. **B)** Ascospora de *Corollospora maritima* con doble flequillo de apéndices flexibles alrededor del septum y apéndices apicales. Magnificación 100X.……37

Figura 5. Ascospora filiforme de *L. grandispora* y parte del cuerpo fructífero. Magnificación 10X..……..……38

Figura 6. Vista aérea del manglar de Palmar-Provincia de Santa Elena…...51

Figura 7. Técnica de muestreo y procesamiento de muestras. **A)** Zona intermareal del manglar de Palmar. **B)** Muestras del manglar de Palmar colocadas en bolsas de polietileno herméticas. **C)** Muestras recolectadas en un recipiente térmico……..…….……53

Figura 8. Esquema de la metodología de laboratorio……54

Figura 9. Material lignificado colocado en la cámara húmeda de incubación…….55

Figura 10. Aislamiento de estructuras reproductivas. **A)** Microfotografía de cuerpos fructíferos de micromicetos marinos lignícolas. Flechas blancas: Cuerpos fructíferos de micromicetos marinos lignícolas. **B)** Aislamiento de cuerpos fructíferos de la muestra incubada. **C)** Placas semi-permanentes fijadas con azul de lactofenol (001 - 102) y glicerol (007).……..……57

Figura 11. Caja de Petri con el medio Agar agua mostrando la suspensión de esporas……..……..59

Figura 12. Cajas de Petri con el medio CMA con esporas germinadas señaladas con un círculo…….……59

Figura 13. Caja de Petri con el medio CMA mostrando la colonia de un cultivo monospórico……..……...60

Figura 14. Caja de Petri con 500 µL de suspensión de esporas antes de ser agregado el medio de cultivo.…….....61

Figura 15. Aislamiento de esporas germinadas en medio V8……..……61

Figura 16. Colonias monospóricas del micromiceto marino *C. maritima*……..……..…62

Figura 17. Aislamiento de colonias fúngicas en placas individuales. **A)** Colonia monospórica de *C*. *maritima* en medio V8. **B)** Colonia monospórica de *C*. *maritima* en medio CMA. **C)** Colonia monospórica de *D*. *haliotrepha* en medio V8……..……62

Figura 18. Conservación de cepas monospóricas por Procedimiento 1. **A)** Colonia monospórica de *C*. *maritima* lista para obtener un disco de ella y

proceder a su conservación. **B)** Discos de *C*. *maritima* en glicerol al 20 %.....64

Figura 19. Conservación de cepas monospóricas por Procedimiento 2. **A)** Discos de *C*. *maritima* en glicerol al 10 y 15 % con agua de mar (35 ‰) o glicerol al 10 y 15 % con agua destilada. **B)** Disco de *C*. *maritima* en glicerol para su conservación……..…….65

Figura 20. Ascosporas de la especie *D. haliotrepha*. **A)** Magnificación 40X. **B)** Magnificación 100X, mostrando mayor detalle de estructuras...…..……..67

Figura 21. Ascosporas del género *C*. *maritima* **A)** Ascospora mostrando el septo, cinturón de flequillos y apéndice polar. Magnificación 100X. **B)** Ascosporas y parte del cuerpo fructífero. Magnificación 40X..……68

Figura 22. Ascosporas de *L*. *grandispora*. **A)** Ascosporas filiformes. Magnificación 10X. **B)** Ascosporas filiformes mostrando la cámara cónica apical. Magnificación 100X..…….…....69

Figura 23. Ascosporas del género *Saccardoella* sp. **A)** Ascosporas con septos claros. Magnificación 100X. **B)** Ascosporas mostrando la “capa fina hialina”. Magnificación 100X…….……..70

Figura 24. Conidios de *Z. maritimun*. Magnificación 100X..……..…..….71

Figura 25. Conidios de la especie *T. alopallonelum*. **A)** Conidio mostrando el septo. Magnificación 100X. **B)** Tejido seudoparenquimatoso del cuerpo fructífero. Magnificación 10X……..……....72

Figura 26. Conidio de la especie *T. achrasporum*, mostrando los septos y células apical y basal. Magnificación 100X……..……73

Figura 27. Conidio de la especie *P. prolífica*. **A)** Conidio simple color café, unicelular. Magnificación 100X. **B)** Conidio germinando. Magnificación 40 X..…….……...74

Figura 28. Cultivos monospóricos. **A)** *C*. *maritima*. **B)** *D. haliotrepha*……75

Figura 29. Micelio con estructuras vegetativas del cultivo monospórico conservado en: **A)** Glicerol al 10% en agua de mar después de 4 meses. Magnificación 40X. **B)** Glicerol al 15% en agua de mar después de 4 meses. Magnificación 40X……76

CAPÍTULO 1

GENERALIDADES

1.1 Características ecológicas del manglar y los micromicetos.

Los manglares son árboles que habitan las zonas costeras, con adaptaciones fisiológicas, reproductivas y estructurales que les permiten colonizar sustratos inestables y áreas anegadas de las zonas intermareales de las costas tropicales y subtropicales (Feller & Sitnik, 1996).

Los mangles sirven para "limpiar" las aguas que fluyen de los ríos antes de que éstas lleguen a otros ecosistemas marinos, tales como praderas de macrófitas y arrecifes de coral. Estos últimos serían cubiertos por sedimentos y detritos si los manglares, junto con su rica fauna de animales filtradores, no estuvieran presentes en las desembocaduras de los ríos (Lepcsick, 2002). Los manglares sirven de filtro biológico y retienen o procesan algunos contaminantes. Procesan nutrientes en exceso, degradan materia orgánica y almacenan algunos residuos utilizados en la agricultura (CONABIO, 2008). Muchos manglares se desarrollan alrededor de las lagunas costeras, esteros y desembocadura de ríos y arroyos. En estas áreas, a nivel mundial, se llevan a cabo importantes actividades pesqueras artesanales que aportan

alimento y desarrollo económico a comunidades en las zonas costeras (CONABIO, 2008).

Los ecosistemas de manglar son altamente productivos y generan una gran cantidad de nutrientes, los cuales son exportados a las aguas marinas de la franja litoral más cercana a la costa, donde son aprovechados por pastos marinos y una variedad de peces de importancia comercial (CONABIO, 2008). De acuerdo con la FAO, cerca del 80% de la captura mundial de peces marinos se realiza en la franja costera.

El ecosistema de manglar provee un ambiente ecológico único para las comunidades microbianas. Bacterias y hongos ocupan varios nichos y son fundamentales para el funcionamiento de estos hábitats. En el manglar se encuentra un grupo de hongos denominados “manglícolas”, los que son de vital importancia en el ciclo de los nutrientes de estos ecosistemas (Maria & Sridhar, 2003).

La descomposición de la materia orgánica por bacterias y hongos origina fragmentos de detritos ricos en proteínas (Sarma & Vittal, 2007). Los micromicetos son considerados como los principales responsables en este incremento en nitrógeno (Odum & Heald, 1972).

Los micromicetos marinos poseen una función ecológica fundamental, especialmente en las zonas costeras y en ecosistemas de manglar. Estos intervienen en la descomposición de todos los sustratos orgánicos, entre los que se encuentran los compuestos lignocelulósicos (Nambiar & Raveendran, 2009). Estos compuestos no pueden ser utilizados por otros organismos, y su acumulación puede causar un desequilibrio en diversos ecosistemas marinos (Gadd *et al.,* 2007). Por lo tanto, estos microorganismos contribuyen al reciclaje de los nutrientes, la mineralización de las fuentes de carbono y al movimiento de materia y energía en el ambiente marino (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979; Liberra & Lindeguist, 1995).

Las hojas caídas, flores, frutos, ramas pequeñas, corteza del tronco, todos proporcionan un sustrato idóneo para el crecimiento de los micromicetos. De hecho, los micromicetos son más efectivos como descomponedores que las bacterias, ya que tienen la capacidad penetrar los tejidos orgánicos (Mehdi & Saifullah, 2000).

1.2 Antecedentes.

En la última década, la diversidad fúngica ha recibido especial atención debido al elevado número de especies de hongos existentes en el planeta y a la pequeña proporción de especies descritas hasta el momento

(Groombridge, 1992). Además, el conocimiento de la diversidad fúngica es importante para entender el adecuado funcionamiento de los ecosistemas, así como potencial fuente de nuevos productos bioactivos (Hawksworth *et al*., 1995). El número de especies de hongos en el mundo se estima que supera los 1,5 millones, de los cuales, únicamente 80.060 (alrededor del 5%) se encuentran descritas (Hawksworth, 1991; Kirk *et al*., 2000).

Los métodos tradicionales para estimar la biodiversidad han presentado fuertes limitaciones cuando se trata de microorganismos hiperdiversos, como son los micromicetos (hongos microscópicos). Mientras que existe abundante información sobre la fisiología y taxonomía de macromicetos (hongos macroscópicos) terrestres, la información disponible para micromicetos marinos es escasa (Valderrama *et al*., 2006).

La microbiología marina es una ciencia nueva y dentro de ella, los hongos marinos constituyen uno de los grupos menos estudiados (Enríquez *et al*., 2004). La existencia de los hongos en los mares se conoce desde el siglo XIX, pero no es hasta 1944, con la publicación del libro "Hongos marinos, su taxonomía y biología " de Barghoorn y Linder (Barghoon & Linder, 1944), que resurge el interés en este campo. Desde entonces han sido descritas el 90% de las especies conocidas actualmente (Enríquez *et al*., 2004). La primera evidencia de la existencia de los hongos en ambientes marinos apareció en

1846, cuando Durieu de Monzonneuvo y Montagne describieron el ascomicete *Sphaeria posidoniae* sobre *Posidonia* (macrófito marino) (Montagne, 1856).

Durante los primeros cien años de desarrollo de esta ciencia se efectuaron algunas descripciones de hongos marinos, pero las mismas se limitaron a determinadas especies sin hacer referencia al hábitat marino. Excepciones fueron los trabajos publicados por los hermanos Crouan en 1867, quienes describieron 5 especies de hongos marinos asociados con algas (Kohlmeyer, 1974a; Sutherland, 1915a; 1916a).

Las contribuciones más relevantes en esta área han sido realizadas por:

- Wilson (Gran Bretaña) con “Some new marine Pyrenomycetes on wood and rope: *Halophiobolus* and *Lindra*” (Wilson, 1956),
- Höhnk (Alemania) con “Pilze aus marinen Schwaemmen” (Höhnk & Ulken, 1979),
- Meyers (USA) con “Taxonomy of marine Pyrenomycetes” (Meyers, 1957),
- Cribb y Herbert (Australia) con “Marine Fungi from Queensland” (Cribb & Herbert, 1955),

- Johnson (USA) con “Fungi in oceans and estuaries” (Borut & Johnson, 1962),
- Feldmann (Francia) con “Une ustilaginale, paraite du *Ruppia maritima* L (Feldmann, 1959)”,
- Kohlmeyer (USA) con “Illustrated key to the filamentous higher fungi” (Kohlmeyer & Volkmann-Kohlmeyer, 1991),
- Jones (Gran Bretaña) con “Marine fungi: some factor influencing biodiversity” (Jones, 2000) y
- Hyde y Pointing (Hong Kong) con “Marine Mycology, A practical Approach. Fungal Diversity” (Hyde & Pointing, 2000).

Si bien los manglares constituyen el segundo hábitat de importancia para los hongos marinos, después de la madera a la deriva, reporte de hongos marinos en estos ecosistemas no fueron publicados hasta que en 1955 Cribb y Cribb obtuvieron una colección de hongos de raíces de mangles de Australia (Sarma & Vittal, 2007).

En la micología marina las investigaciones se han enfocado en dos campos principales: el primero, en hongos que habitan en el mangle, madera de deriva y otros sustratos de la zona litoral, donde se efectúan observaciones directas de los cuerpos de fructificación, sin el empleo de medios de cultivo selectivos (Hyde & Pointing, 2000); el segundo, se desarrolla a partir de

aislamientos en sedimentos, arena y agua, mediante el empleo de técnicas de cultivo (Hyde & Pointing, 2000). El método de observación directa ha sido el más aceptado y empleado por un gran número de investigadores a nivel mundial (Hyde & Pointing, 2000). Sin embargo, la distribución de los hongos en el ambiente marino no ha sido completamente estudiada, cuando la comparamos con los estudios en hongos terrestres y de agua dulce. Los micromicetos marinos descritos representan solo el 5% del total de la micoflora (Hawksworth, 1991; Kirk, *et al*. 2000). A pesar de que se presentan comúnmente en la materia orgánica muerta y como parásitos de organismos vivos, todavía su distribución en ambientes marinos no ha sido convenientemente evaluada (Purushothaman & Jayalakshmi, 2008).

Los hongos marinos verdaderos se definen en base a su habilidad de crecer y esporular exclusivamente en agua de mar, así como sus esporas que son capaces de germinar en agua de mar (Raghukumar, 2008). Los hongos marinos facultativos son formas provenientes de tierra, capaces de crecer en agua de mar (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979).

No existe evidencia de la presencia de micelio fúngico creciendo plantónicamente en el mar; sin embargo, hongos unicelulares (levaduras) son comunes en la columna de agua, aunque en menor número que las bacterias (Molitoris, 1995; Raghukumar *et al.*, 1995). Los micromicetos pueden ser

encontrados adheridos a plantas y animales pelágicos. Tienen mejores índices de supervivencia a lo largo de la orilla costera, donde existen sustratos orgánicos como algas, plantas de marismas y restos de mangle en suficiente cantidades para sostener su crecimiento (Purushothaman & Jayalakshmi, 2008).

Los hongos marinos superiores se presentan como parásitos de plantas y animales y como simbiontes en líquenes marinos y algas (Gloer, 1993; Liberra & Lindequist, 1995; Konig & Wright, 1995). También viven como saprófitos en desechos orgánicos de origen animal y vegetal.

Los hongos marinos no constituyen un grupo filogenético, ya que en él se incluyen hongos de diferentes grupos, con una clara predominancia de ascomicetos y sus anamorfos (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979).

Está claramente demostrado que los micromicetos marinos en su taxonomía, morfología y adaptación al hábitat acuático, son distintos a su contraparte terrestre y de agua dulce (Barghoon & Linder, 1944; Johnston & Sparrow, 1961; Jones, 1976; Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979).

A pesar que el término “marino” es utilizado para incluir todos los hongos que habitan en el mar, en esta definición se agrupan a los hongos oceánicos, manglícolas, arenícolas y estuarinos (Rees & Jones, 1985).

Los micromicetos marinos son eucariotas heterotróficos que tienen un mayor rol en la descomposición de la celulosa y lignina del material vegetal, y en menor grado de la queratina y quitina de tejidos animales (González & Herrera, 1993). La descomposición libera nutrientes que regresan a los ecosistemas. Las diversas vías de evolución biológica y bioquímica de los hongos, les ha permitido utilizar diversos sustratos sólidos para su supervivencia (Bugni & Ireland, 2004).

El ciclo del detrito es crucial para el funcionamiento del ecosistema marino (Mann, 1988). La intervención de los hongos marinos en la descomposición de la materia orgánica, resultante de organismos muertos, que incluye exuvias y exudados, plumas, pelos, piel de animales y tejido muerto de plantas y animales, permite que ésta entre en la cadena alimenticia (Liberra & Lindequist, 1995). Esta intervención es vital para los procesos de remineralización, así como para la supervivencia de los animales detritívoros (González & Herrera, 1995).

Está establecida la importancia de los hongos como los mayores descomponedores de las macrófitas costeras, particularmente de los manglares. Los hongos forman un importante componente en los procesos del detrito en la zona nerítica, así como también en la oceánica (Raghukumar, 2005).

Es importante reconocer que bacterias y hongos ocupan diferentes nichos ecológicos en el detrito (Newell, 1984; Newell, 1994; Raghukumar, 1990). Las bacterias viven en la superficie del detrito particulado, donde son capaces de crecer y reproducirse rápidamente en condiciones de baja concentración de nutrientes (Raghukumar, 2005). Los hongos marinos filamentosos que pertenecen a los Eumicetes, crecen lentamente comparados a las bacterias, pero son capaces de penetrar las partículas del detrito persistente debido a sus filamentos (hifas) y al crecimiento apical (Raghukumar, 2005).

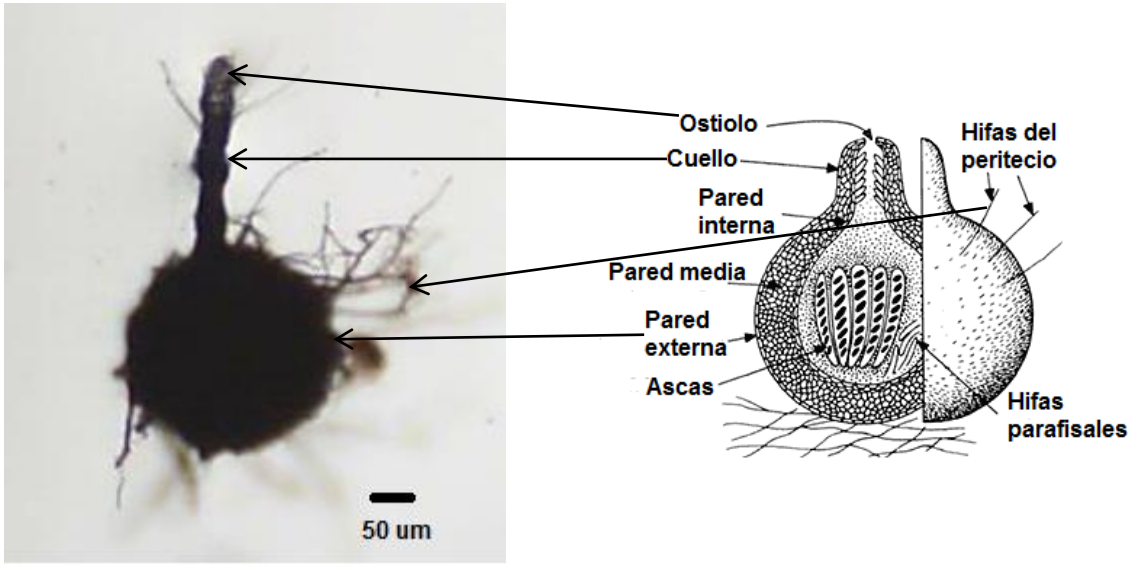
Los micromicetos marinos lignícolas están particularmente adaptados a utilizar grandes cantidades del sustrato lignocelulósico, que tiene un alto cociente C:N (Raghukumar, 2005).

1.3 Morfología de los micromicetos marinos.

Las cuatro características morfológicas relevantes para distinguir este grupo son: (1) la estructura de reproducción sexual (Ascocarpo), (2) la cavidad central (Centrum) del ascocarpo, (3) la estructura en forma de saco (Asca) que produce las ascosporas, y (4) la meioespora (Ascospora) (Spatafora *et al*., 1998).

La mayoría de las especies poseen ascocarpos con forma de frasco o peritecio (Fig. 1). Estos se caracterizan por tener un ostiolo, que es un canal con un poro terminal que puede estar ubicado en una papila o en el cuello del ostiolo. Únicamente después de atravesar el canal ostiolar, es que las ascosporas se liberan al ambiente (Spatafora *et al*., 1998).

Figura 1. Ascocarpo o cuerpo fructífero de *Lulworthia grandispora* y un diagrama de su estructura. Magnificación 4X.



La cavidad central o centrum del peritecio es el sitio de producción de las ascas y ascosporas, y está inicialmente compuesto por una pared fina de células poligonales seudoparenquimatosas (Fig. 2). Este seudoparénquima desarrolla cadenas de células estériles (catenophysas), las cuales se convierten en el asca o pueden desaparecer completamente en el peritecio maduro (Spatafora *et al*., 1998). El asca de la mayoría de los micromicetos marinos es claviforme y es típicamente producida en un fascículo (haz de hifas) localizado en la región basal de la cavidad central (Fig. 3) (Spatafora *et al*., 1998).

En la mayor parte de las especies la pared del asca se desintegra anteriormente o durante la maduración de las ascosporas. A este proceso se denomina ascas evanescentes. Esto permite que las ascosporas no sean forzadas a descargarse (Spatafora *et al*., 1998). Las ascosporas son empujadas dentro del canal ostiolar del peritecio por la producción adicional de ascas y ascosporas, y en las especies de micromicetos intermareales pueden ser exudadas en una gota en la punta del cuello, y así ser dispersadas por el agua (Jones, 1995).

A menudo las ascosporas con apéndices o cubiertas conspicuas son características de los micromicetos marinos (Fig. 4 A, B) (Jones, 1995).

Figura 2. Pared fina con células poligonales seudoparenquimatosas de un ascocarpo de *L. grandispora*. Magnificación 100X.

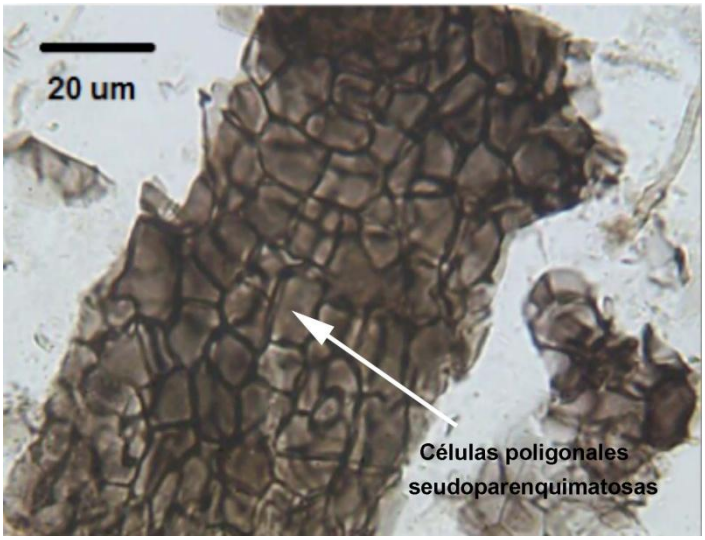
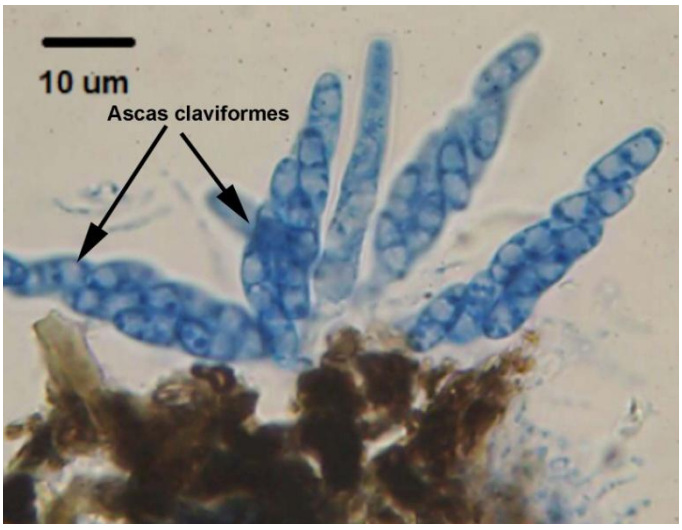
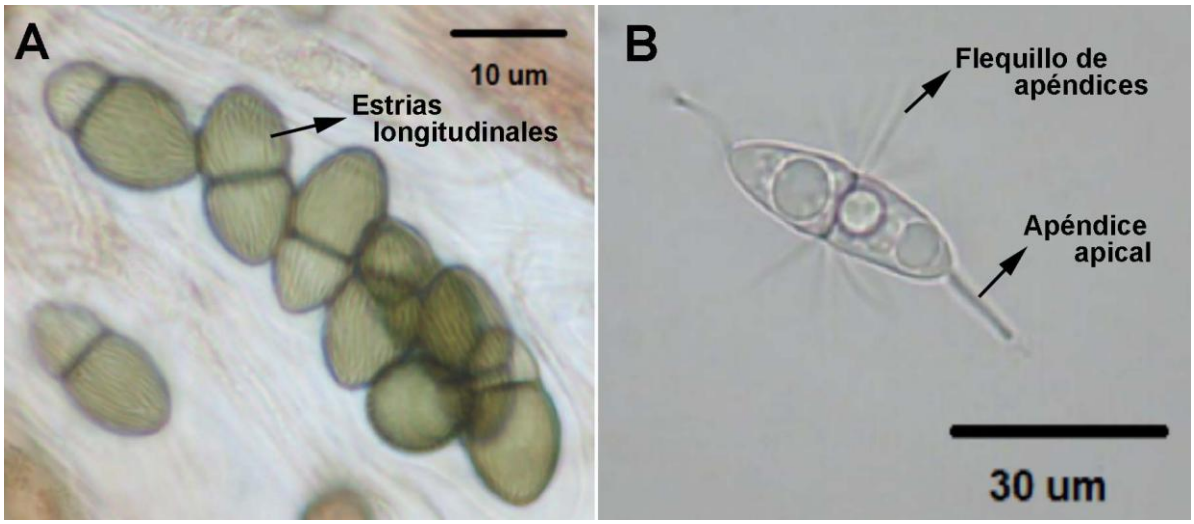


Figura 3. Ascas claviformes de un ascomicete marino no identificado. Magnificación 40X.



La pared de las ascosporas puede tener de dos a tres capas. La capa interna es denominada mesosporium, la capa media es el episporium, y la capa externa, ausente en algunos géneros, es el exosporium (Jones, 1995).

Figura 4 A) Ascosporas de *Dactylospora haliotrepha* con estrías longitudinales. Magnificación 40X. **B)** Ascosporas de *Corollospora maritima* con doble flequillo de apéndices flexibles alrededor del septum y apéndices apicales. Magnificación 100X.

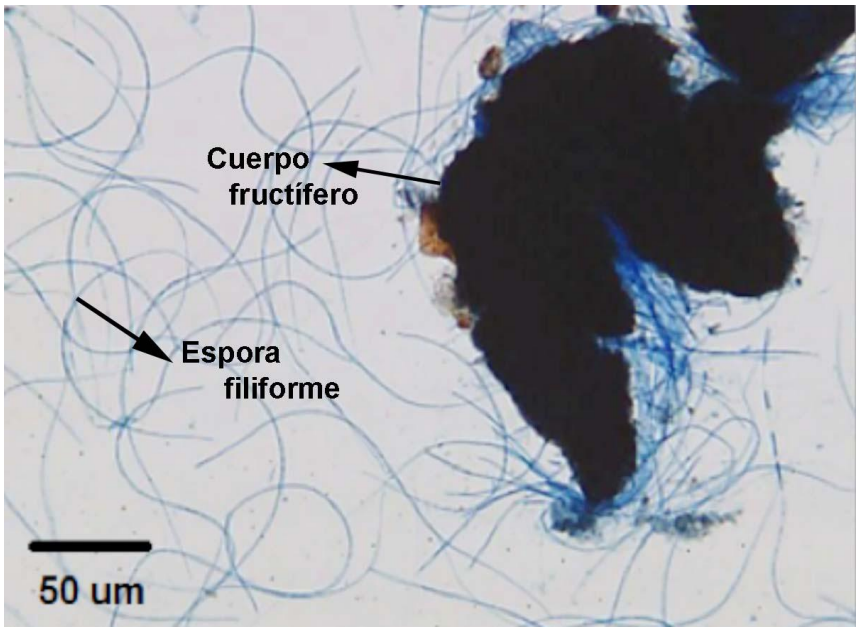


Los apéndices y cubiertas de las ascosporas derivan principalmente del episporium y/o del exosporium, y son específicos de cada género. Los apéndices de las ascosporas son adaptaciones al medio marino. Estos le permiten incrementar el área superficial para su dispersión en el agua

(apéndices y flequillos) y adherirse al sustrato apropiado (estrías y rugosidades) (Spatafora *et al*, 1998).

La mayoría de los géneros tienen ascosporas elipsoidales o fusiformes con uno o muchos septos. Sin embargo hay géneros (*e.g.*, *Lindra* y *Lulworthia*) que poseen ascosporas largas y filiformes (Fig. 5), con o sin septos dependiendo de la especie (Spatafora *et al*, 1998).

Figura 5. Ascospora filiforme de *L. grandispora* y parte del cuerpo fructífero. Magnificación 10X.



1.4 Diversidad de micromicetos marinos.

Entre los factores que influyen en la biodiversidad de los hongos marinos podemos destacar: disponibilidad de sustratos para la colonización, distribución geográfica, temperatura, salinidad, mecanismos de competencia e inhibición y microhábitat (Jones, 2000). Otros agentes incluyen: nutrientes orgánicos disueltos, concentración del ión hidrógeno, presión osmótica, disponibilidad de oxígeno, habilidad para adherirse a sustratos, presión hidrostática, tipo de sustrato, temperatura, amplitud de las mareas y posiblemente la luz (Booth & Kenkel, 1986). Por lo tanto la diversidad de hongos marinos es controlada por una combinación de factores fisicoquímicos interactivos.

Algunos micromicetos marinos pueden existir tanto en hábitats marinos como en hábitats terrestres y de agua dulce. Esto se ha observado en las especies *Savoryella lignícola* y *Lignincola laevis*, así como también en los géneros: *Leptosphaeria*, *Pleospora*, *Trematosphaeria* (Ascomicetes), *Calathella* (Basidiomicetes) y *Alternaria* (Mitospóricos) (Kohlmeyer & Volkmann-Kohlmeyer, 1991).

En los inicios de la década pasada Kohlmeyer & Volkmann-Kohlmeyer incluyeron 321 especies en su clave para hongos marinos superiores

(Enríquez *et al*., 2004). Desde entonces 74 nuevos géneros y 123 nuevas especies han sido descritos (Kohlmeyer & Volkmann-Kohlmeyer, 1995, 1996b, 1998; Kohlmeyer, *et al.* 1995a, b, 1996; 1997a, 1998; Hyde, 1994, 1996a; Hyde & Alias 1998; Hyde, *et al.,* 1998; 1999).

Hasta el año 2000 fueron aceptadas 444 especies catalogadas como hongos marinos superiores, de los cuales 360 especies en 177 géneros pertenecen a los ascomicetes (80%), 10 especies en 7 géneros a los basidiomicetes (1,6%), y 74 especies en 51 géneros a los hongos mitospóricos (17%) (Tabla 1). Estos últimos se denominan así ya que sus esporas son el resultado de la mitosis (Hawksworth *et al.*, 1995).

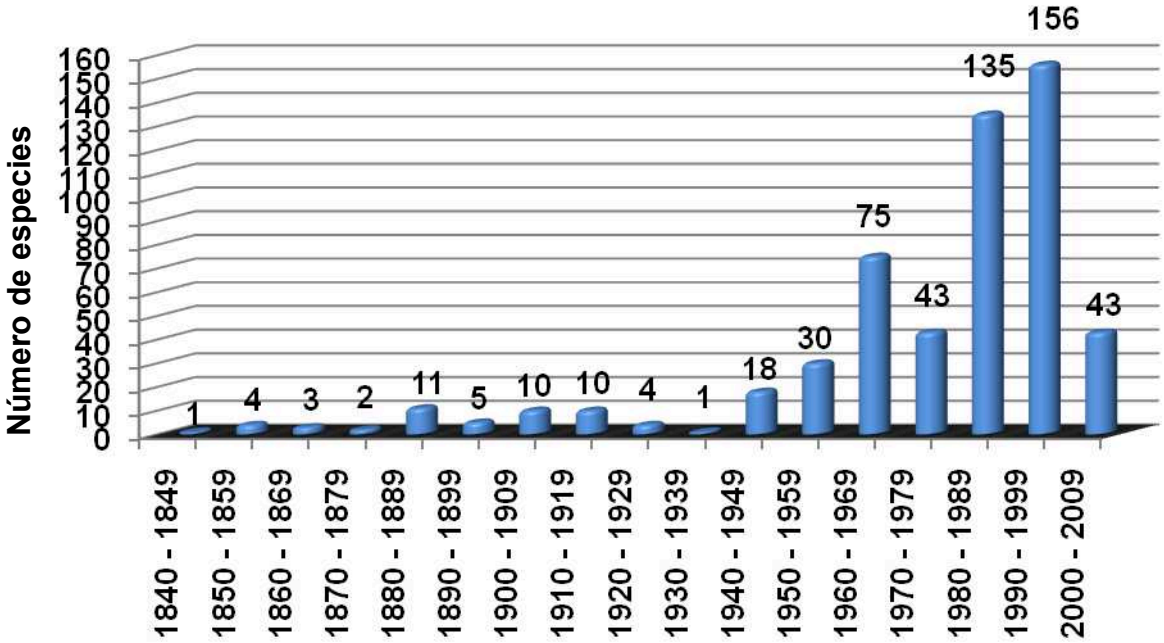
Recientes análisis filogenéticos de los micromicetos marinos, clasificó a un total de 530 especies (en 321 géneros), así los Ascomicetes presentan 424 especies (en 251 géneros), los hongos anamórficos 94 especies (en 61 géneros) y los Basidiomicetes 12 especies (en 9 géneros). El orden más numeroso de los hongos marinos es Halosphaeriales con 126 especies en 53 géneros, de los cuales 35 son monotípicos. Muchas taxa son de incierta posición y no han podido ser asignadas a ninguna clase taxonómica (Tabla 2) (Jones *et al.,* 2009).

Tabla 1. Hongos marinos superiores descritos en diferentes décadas (Enríquez *et al.*, 2008).

Grupo	(Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979)		(Kohlmeyer & Volkmann-Kohlmeyer ,1991)		(Hyde & Sarma, 2000)	
	Géneros	Especies	Géneros	Especies	Géneros	Especies
Ascomicetes	62	149	115	255	177	360
Basidiomicetes	4	4	5	6	7	10
Hongos mitospóricos	40	56	41	60	51	74
Total	106	209	161	321	235	444

La dominancia de los ascomicetes sobre los otros grupos de hongos marinos puede estar relacionada a sus adaptaciones morfológicas al hábitat marino. Por ejemplo, la presencia de cuerpos de fructificación microscópicos y de esporas ornamentadas con apéndices adhesivos que les permiten unirse fácilmente a los sustratos y dispersarse en forma efectiva (Jones & Alias, 1997). Dentro de los ascomicetes, el orden Halosphaeriales es el mayor grupo seguido por los Loculoascomycetes. Estos últimos están particularmente adaptados a las condiciones subacuáticas, mientras que los Halosphaeriales son más abundantes en la zona intermareal (Hyde, 1990).

Tabla 2. Especies de hongos marinos descritas por década desde 1840 (Jones *et al*., 2009).



En la última década, el uso de técnicas moleculares para examinar la filogenia de los micromicetos marinos ha avanzado considerablemente (Spatafora & Blackwell, 1994).

Con respecto a la diversidad fúngica marina, los manglares son el hábitat mejor estudiado. Los hongos que colonizan la madera (material lignificado) constituyen más del 50 % de las 450 especies de hongos marinos verdaderos descritas y son los más estudiados (Das *et al.*, 2006).

Estudios sobre la distribución geográfica de micromicetos marinos en las costas del continente suramericano son escasos. En Brasil se han reportado 5 hongos marinos (Ulken, 1970, 1972; Kohlmeyer, 1969; Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1971); en Chile se reportaron 15 especies marinas lignícolas (Hughes & Chamut, 1971); en Argentina 6 especies (Malacalza & Martínez, 1971), y en Venezuela 2 especies manglícolas (Kohlmeyer, 1968).

En otro estudio Erika Kohlmeyer reportó 13 hongos marinos verdaderos en Argentina, Brasil, Colombia y Perú (Kohlmeyer, 1976). Esta colección incluía especies alguícolas, arenícolas, lignícolas, manglícolas y hongos de plantas vasculares en estuarios.

1.5 Evolución e importancia ecológica de los micromicetos marinos.

Uno de los mayores temas en la evolución de los eucariotas es la repetida transición de hábitats acuáticos a terrestres que ha ocurrido en muchas taxa, incluyendo hongos, plantas y animales. En un artículo científico clásico, Pirozynski y Malloch (1975), sugieren que hongos y plantas fueron los primeros eucariotas en colonizar la tierra, y este cambio ecológico hizo posible el establecimiento de la simbiosis micorrizal (asociación que involucra hifas fúngicas y raíces de plantas). Esta hipótesis está fundamentada por el

reciente descubrimiento de esporas de un hongo micorrízico putativo del Ordoviciense (500 a 435 millones de años). En este periodo geológico aparecen las primeras plantas no vasculares similares a las Briofitas (Redecker, *et al*., 2000).

Los hongos marinos han jugado un rol central en la hipótesis filogenética relacionada con el origen y evolución del reino Fungi a lo largo de 100 años. Esta importancia se resalta en la hipótesis Florideana, la cual afirma que el Filo Ascomicete evolucionó de un alga roja parásita perteneciente a la familia Florideae (Filo Rodofita) (Sachs, 1874; de Bary, 1887). Recientemente, proponentes de la hipótesis Florideana relacionan similitudes en el ciclo vital, formas de nutrición y la morfología de las estructuras reproductivas, como evidencias de un ancestro común entre Ascomicetos y Rodofitas (Denison y Carrol, 1966; Kohlmeyer, 1975; Demoulin, 1985).

Opositores de la hipótesis Florideana, argumentan que estas similitudes son el resultado de evolución convergente o paralela (Barr, 1983; Blackwell, 1994). Ellos citan la disímil vía de biosíntesis del aminoácido lisina y la pared celular formada por carbohidratos en ambos grupos como argumentos que refutan la cercanía filogenética entre Ascomicetes y Rodofitas (Spatafora, *et al*., 1998).

Recientes análisis filogenéticos del gen que codifica para el ARN de la pequeña subunidad ribosomal nuclear (SSU ADNr ó ARNr) en eucariotas, no validan la hipótesis Florideana (Bhattyacharya *et al*., 1990; Cavalier – Smith *et al*., 1994).

Los Ascomicetos están ubicados dentro del Reino Fungi como clado monofilético, cercano a los basidiomicetes (Filo Basidiomicete) (Bruns *et al*., 1992; Berbee & Taylor, 1993). Las rodofitas están ubicadas en una región aparte del árbol eucariota y no están cercanas al Reino Fungi (Bhattyacharya *et al*., 1990; Cavalier-Smith *et al*., 1994).

Los hongos marinos superiores, se encuentran como parásitos de plantas y animales, como simbiontes en asociaciones liquenoides con algas y como saprobios de desechos orgánicos de plantas y animales (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979). Generalmente a los hongos de ecosistemas marinos y costeros se les resta importancia, aunque constituyen una parte significativa de la biodiversidad marina. Los hongos en general son capaces de degradar un amplio rango de moléculas biológicas recalcitrantes. En los ecosistemas costeros, la actividad fisiológica fúngica es crítica en los primeros estadios de la biodegradación (Damare, 2007).

Los hongos marinos filamentosos han sido reportados en una amplia variedad de detritos: madera y hojas en descomposición, algas, pasto marino, y sustratos calcáreos y quitinosos (González & Herrera, 1993).

Los hongos marinos comprenden formas saprófitas, presentes en aguas abiertas oceánicas (pelágicos) y en el fondo (bénticos) (Enríquez *et al*., 2004). Sin embargo la mayoría de los estudios en hongos marinos están relacionados a formas que ocurren en varios tipos de materiales sumergidos en el agua y sedimentos cercanos a la costa, las zonas nerítica y litoral (Hyde *et al.,* 1998). Son escasos los estudios de hongos presentes en aguas y sedimentos profundos oceánicos.

La mayoría de los hongos encontrados en hábitats marinos son microscópicos (micromicetos). El ascocarpo más grande reportado en *Amylocarpus encephaloides*, no excede de 3 mm. Los basidiomicetes *Digitatispora marina* y *Nia vibrissa* tienen cuerpos fructíferos de 4 mm de longitud y 3 mm de diámetro (Ruiz, 2004). Esto se debe a que el medio marino no permite el desarrollo de grandes y blandos cuerpos fructíferos, a causa de la abrasión causada por las olas y granos de arena (Johnson & Sparrow, 1961; Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979; Christophersen *et al*., 1999).

1.6 Degradación de la madera por micromicetos marinos.

La mayoría de los hongos marinos han sido identificados en sustratos que contienen lignocelulosa. Debido a esto, no es de sorprenderse que muchos géneros estén implicados en la descomposición de la madera dentro de ecosistemas marinos y estuarinos. A pesar de que los perforadores marinos son conocidos como degradadores de madera, estos son incapaces de tolerar las bajas concentraciones de oxígeno encontradas en los sedimentos (Blanchette *et al*., 1990). Muchos hongos marinos poseen la capacidad de tolerar bajas concentraciones de oxígeno y pueden ser los agentes dominantes del desdoblamiento de la lignocelulosa en sedimentos marinos. A pesar que existen bacterias lignocelulolíticas, estas no son degradadoras agresivas de este sustrato (Holt & Jones, 1983; Singh *et al*., 1990).

Esto es de particular importancia si consideramos la alta cantidad de biomasa lignocelulósica, representada en forma de manglares y otro material vegetal, en las áreas costeras con una alta descarga de sedimentos. Los micromicetos marinos son importantes descomponedores de madera en la zona intermareal superior, donde los perforadores marinos son incapaces de sobrevivir (Hyde *et al*., 1998).

1.7 Objetivos:

1.7.1 General:

Aislar e identificar micromicetos marinos lignícolas del manglar de Palmar-Provincia de Santa Elena, para establecer el primer banco de cepas fúngicas de manglar en el Ecuador, como base para aplicaciones biotecnológicas futuras; bioles, enzimas, antimicrobianos.

1.7.2 Específicos:

- Determinar las estaciones de muestreo en el manglar de Palmar así como su ubicación geográfica exacta.
- Colectar material lignificado en cada una de las estaciones de muestreo determinadas.
- Implementar el método de traslado de la muestra, aislamiento y cultivo de los micromicetos marinos lignícolas colectados del manglar de Palmar mediante la utilización de medios de enriquecimientos y medios selectivos.
- Evaluar taxonómicamente las cepas aisladas del manglar de Palmar mediante el análisis microscópico de estructuras reproductivas.

- Determinar las condiciones para el establecimiento de un banco de las cepas fúngicas aisladas del manglar de Palmar mediante el análisis de diversas técnicas de conservación.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Descripción del área de estudio.

La zona de estudio se encontró a un costado de la ruta de la costa ecuatoriana, en la comuna Palmar, del cantón Santa Elena, Provincia de Santa Elena, Ecuador.

Esta zona está limitada por los siguientes puntos: Al norte se encuentra el Cerro Angahuel y camaroneras (02° 00' 868´´ de latitud Sur y 80° 44' 240´´ de longitud Oeste); al sur, barrios, “Los Esteros” y “Las Conchas”, (02° 01' 232´´ de latitud Sur y 80° 44' 179´´ de longitud Oeste); al este la camaronera “Chila”, (02° 01' 22´´ de latitud Sur y 80° 44' 46´´ de longitud Oeste); al oeste se encuentra la desembocadura del río Grande (02° 00’ 989´´ de latitud Sur y 80° 44' 451´´ de longitud Oeste) (Fig. 6).

Los ocho puntos de muestreo en el manglar de Palmar se ubicaron con la ayuda de un GPS. Las localizaciones geográficas para cada una de las estaciones se indican en la Tabla 3.

Figura 6. Vista aérea del manglar de Palmar – Provincia de Santa Elena.

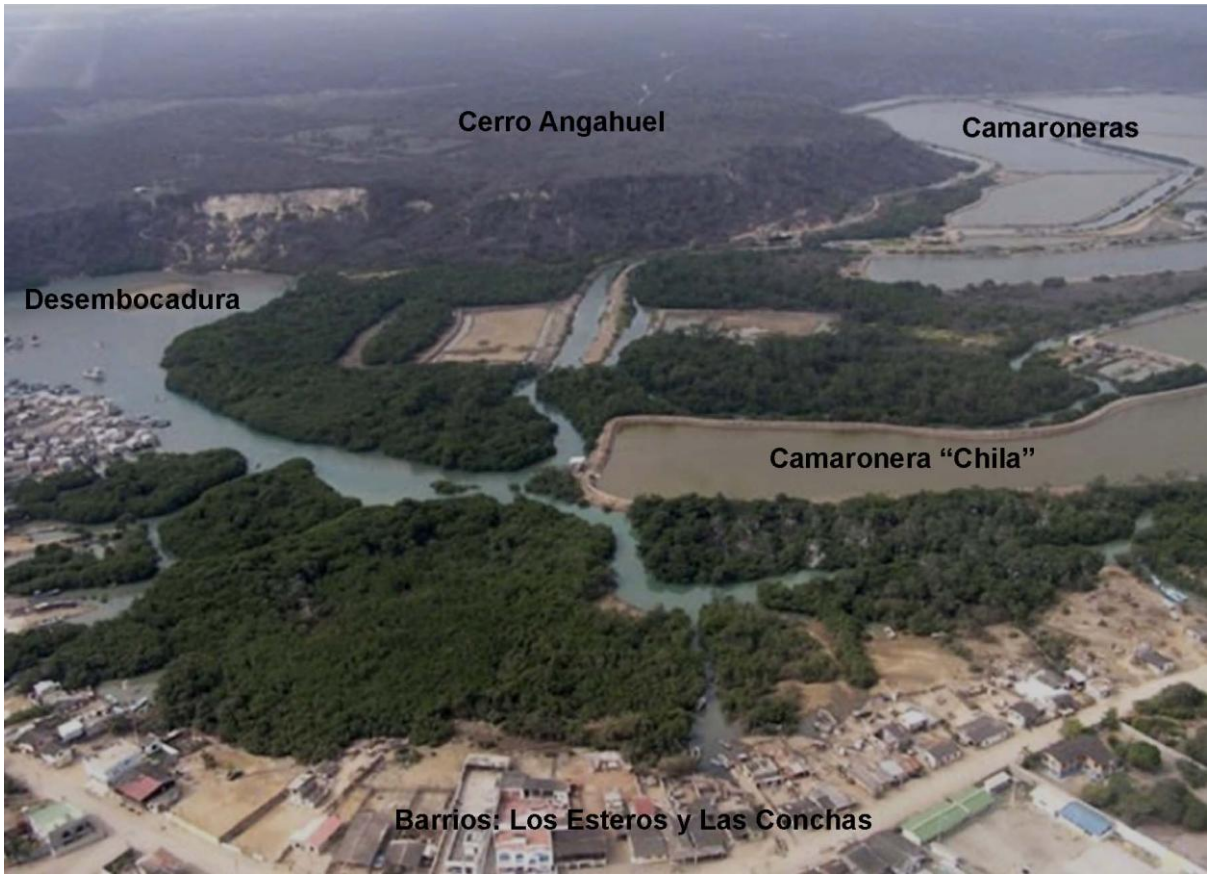


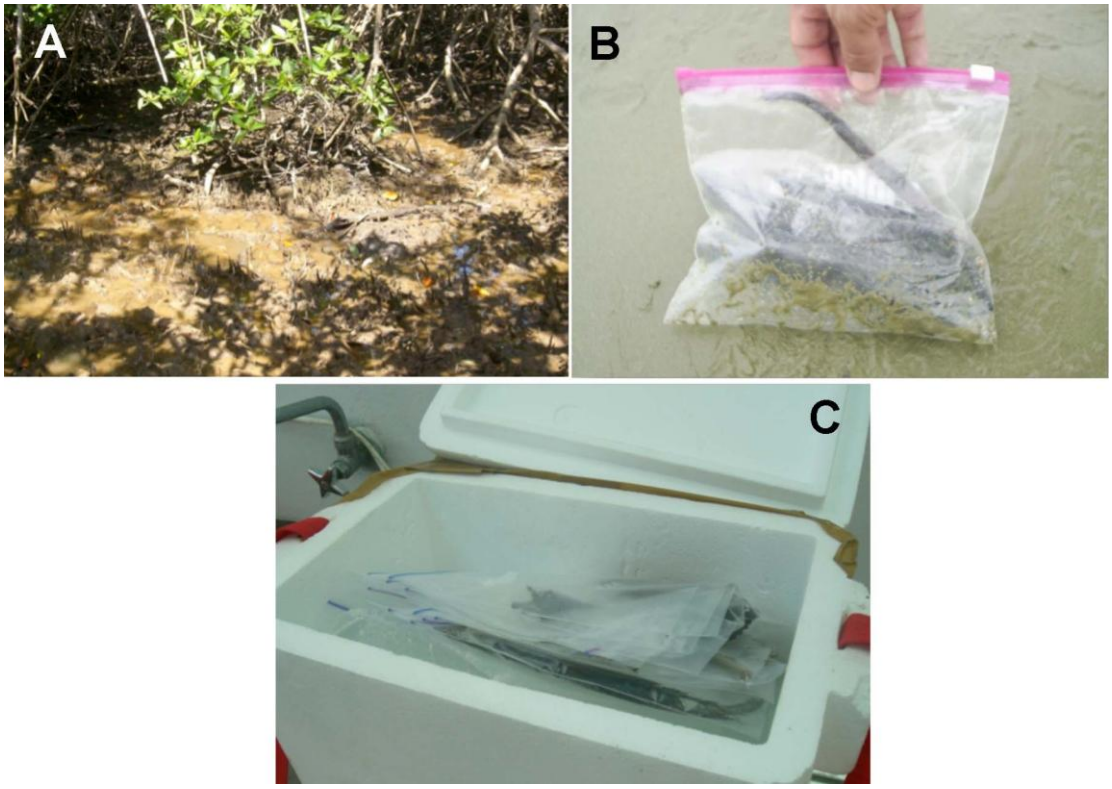
Tabla 3. Localización geográfica del área de investigación.

Estación	Localización geográfica
# 1	02°01´95´´S 80°44´175´´W
# 2	02°01´178´´S 80°44´184´´W
# 3	02°01´229´´S 80°44´144´´W
# 4	02°01´256´´S 80°44´106´´W
# 5	02°01´261´´S 80°44´057´´W
# 6	02°01´210´´S 80°44´058´´W
# 7	02°01´169´´S 80°44´041´´W
# 8	02°01´104´´S 80°44´031´´W

2.2 Técnica de muestreo y procesamiento de las muestras.

Los muestreos se realizaron a lo largo de la zona intermareal, durante la marea baja. En cada estación se tomaron 5 unidades de muestra que consistieron en restos vegetales como ramas, propágulos, y raíces de mangle, los cuales se colocaron en bolsas de polietileno cerradas herméticamente y ubicadas en un recipiente térmico (Fig. 7 A-C).

Figura 7. Técnica de muestreo y procesamiento de muestras. **A)** Zona intermareal del manglar de Palmar. **B)** Muestras del manglar de Palmar colocadas en bolsas de polietileno herméticas**. C)** Muestras recolectadas en un recipiente térmico.

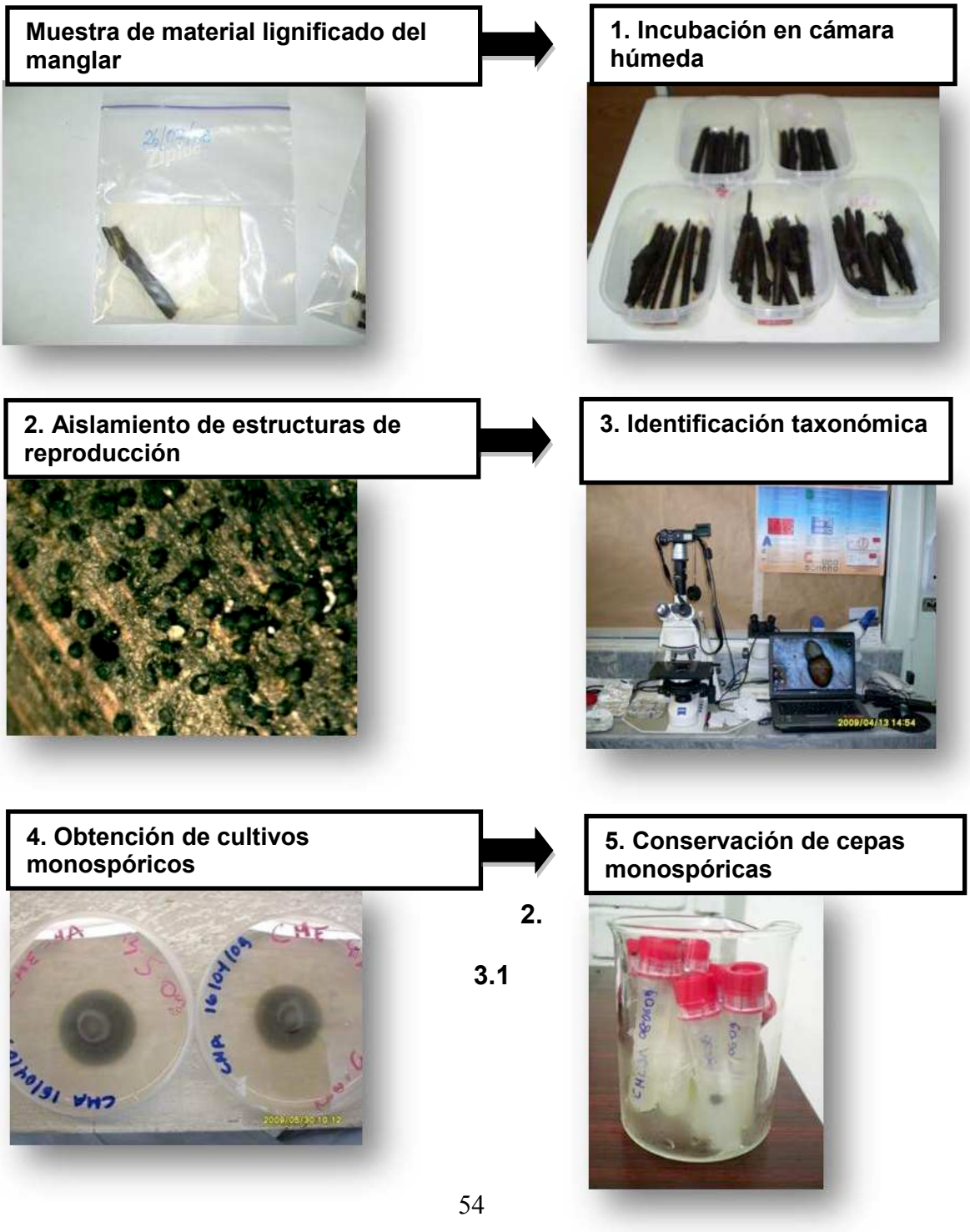


2.3 Metodología de laboratorio

Cinco etapas principales se implementaron durante el procesamiento de muestras en el laboratorio: (1) Incubación en cámara húmeda; (2) Aislamiento de estructuras de reproducción (cuerpos fructíferos); (3)

Identificación taxonómica; (4) Obtención de cultivos monospóricos; y (5) Conservación de cepas monospóricas (Fig. 8).

Figura 8. Esquema de la metodología de laboratorio.



Incubación en cámara húmeda.

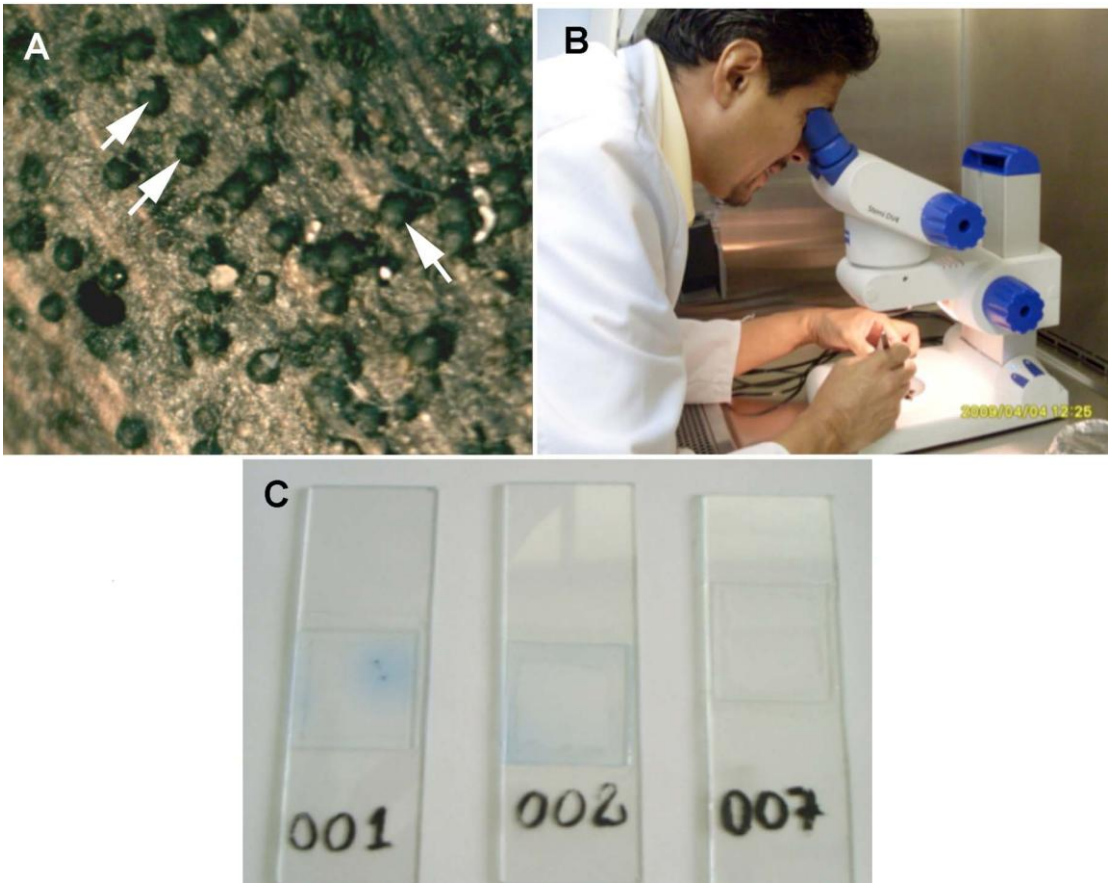
Las muestras colectadas se trasladaron al laboratorio de biomedicina de la Escuela Superior Politécnica del Litoral, donde se eliminó el exceso de sedimento mediante el enjuague con agua de mar filtrada y esterilizada. Una vez eliminado el exceso de sedimento se incubaron durante 10 meses a temperatura ambiente (revisando el material periódicamente), utilizando el método de incubación de material lignificado en cámara húmeda. Este consistió en colocar las muestras en un recipiente plástico con papel toalla estéril y humedecido con agua de mar filtrada y estéril. Dos veces por semana se asperjó agua de mar de las mismas características para mantener la cámara húmeda (Alias & Jones, 2000) (Fig. 9).

Figura 9. Material lignificado colocado en la cámara húmeda de incubación.

2.3.2 A

Periódicamente se revisó el material en incubación bajo un estereomicroscopio, en búsqueda de estructuras de reproducción (cuerpos fructíferos). Dichas estructuras fueron aisladas y transferidas a una gota de agua destilada sobre un portaobjeto. Luego se colocó un cubreobjetos y se presionó suavemente antes de su observación bajo el microscopio. Fue necesario presionar debidamente el cubreobjeto para provocar la liberación de las ascas y esporas. Para la observación de esporas con coloración marrón se añadió una gota de glicerol al borde del cubreobjetos para que ingrese por capilaridad. En caso de esporas hialinas, se agregó una gota de azul de lactofenol en lugar de la glicerina (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1972) (Fig. 10 A-C).

Figura 10. Aislamiento de estructuras reproductivas. **A)** Microfotografía de cuerpos fructíferos de micromicetos marinos lignícolas. Flechas blancas: Cuerpos fructíferos de micromicetos marinos lignícolas. **B)** Aislamiento de cuerpos fructíferos de la muestra incubada. **C)** Placas semi-permanentes fijadas con azul de lactofenol (001-002) y glicerol (007).



2.3.3 Obtención de cultivos monospóricos.

El proceso de identificación de hongos no se basa únicamente en características morfológicas. El uso de cultivos de hongos, obtenidos a partir de una espora es fundamental para la identificación de muchos hongos, así como para su posterior conservación y establecimiento de un banco de cepas. En términos del concepto morfológico de la especie, los cultivos monospóricos pueden proporcionar caracteres adicionales para la identificación, y establecer las conexiones entre el estado teleomorfo y el anamorfo.

El concepto de especie filogenética, incluye la comparación de ambos caracteres, los morfológicos y moleculares, y en la mayoría de los casos requieren cultivos monospóricos (Goh & Hanlin, 1997).

Para la obtención de cultivos monospóricos de micromicetos marinos lignícolas, se aislaron los cuerpos de fructificación en condiciones asépticas, colocándolos en una placa excavada con 100 µL de agua de mar estéril. Se aplastó el cuerpo fructífero hasta desalojar todas las esporas, luego se homogenizó y se agregó una gota en cada cuadrícula diagramadas en la base de placas de Petri con medio Agar-agua suplementadas, con cloranfenicol (40 µg/mL) (Mehdi & Saifullah, 1992) (Fig. 11). Después de 24

horas se observó bajo el estereomicroscopio las esporas germinadas. Posteriormente se transfirieron alrededor de 5 esporas germinadas, a nuevas placas de Petri con medio Corn Meal Agar (CMA), suplementadas con cloranfenicol (40 µg/mL) (Fig. 12). Se revisó periódicamente la formación de colonias, para transferirlas a placas de Petri individuales con medio CMA suplementado con cloranfenicol (Fig. 13).

Figura 11. Caja de Petri con el medio Agar agua mostrando la suspensión de esporas.

Figura 12. Cajas de Petri con el medio CMA con esporas germinadas señaladas con un círculo.

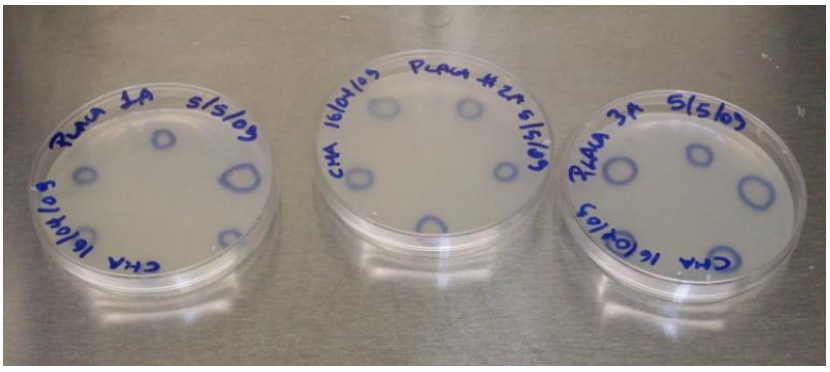


Figura 13. Caja de Petri con el medio CMA mostrando la colonia de un cultivo monospórico.

Con el método descrito se logró sólo el aislamiento monospórico de *C. maritima*. Debido a esto, se estableció otro protocolo para la obtención de cultivos monospóricos, utilizando un medio a base del jugo vegetal V8, suplementado con 250 mg de sulfato de estreptomicina. El proceso de obtención de esporas fue similar al descrito anteriormente, excepto que el homogenizado se colocó en la caja de Petri antes de agregar el medio a una temperatura de alrededor de 39ºC (Fig. 14). Esta técnica permitió que las esporas se integren al medio una vez solidificado. Las placas se incubaron a 35ºC. Las esporas germinadas (5 o 6) después de 24 h de incubación, fueron transferidas a nuevas placas con medio V8, con la ayuda de agujas entomológicas y bajo un estereomicroscopio (Fig. 15).

Figura 14. Caja de Petri con 500 µL de suspensión de esporas antes de ser agregado el medio de cultivo.

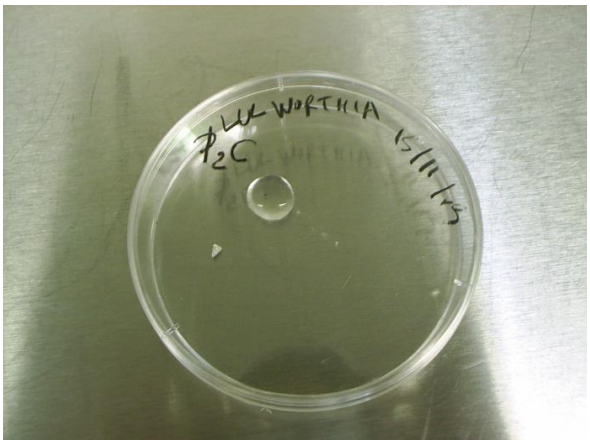
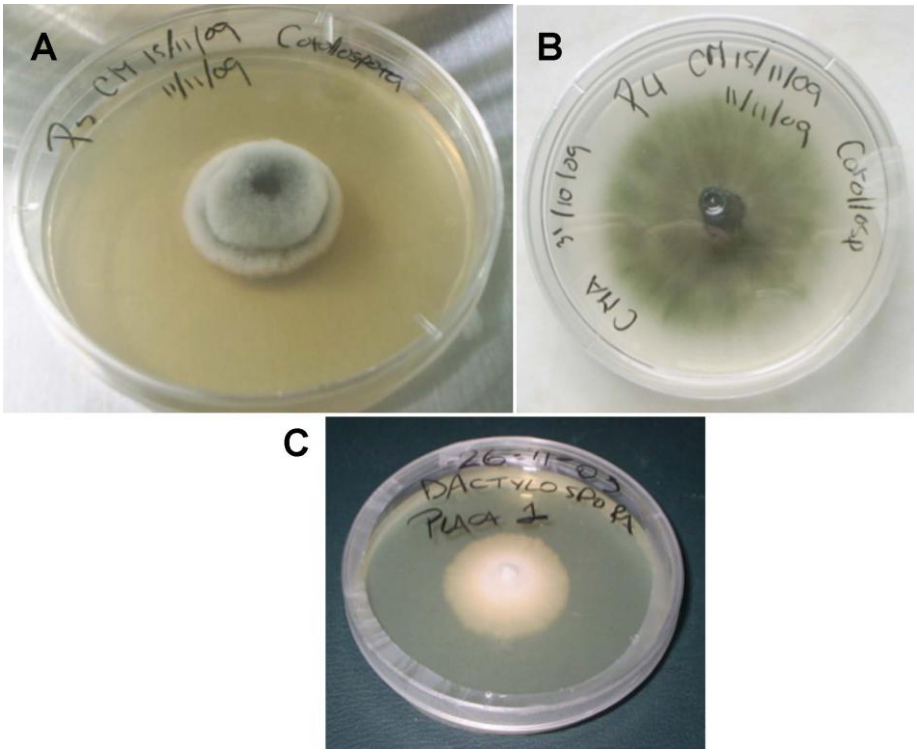


Figura 15. Aislamiento de esporas germinadas en medio V8.

Las cajas de Petri con las esporas germinadas fueron incubadas a 35 °C y se observaron cada 24 horas hasta que se detectó la formación de colonias (Figura 16). Posteriormente cada colonia fue transferida individualmente a nuevas cajas de Petri con medio V8 y medio CMA (Fig. 17 A-C).

Figura 16. Colonias monospóricas del micromiceto marino *C. maritima*.

Figura 17. Aislamiento de colonias fúngicas en placas individuales. **A)** Colonia monospórica de *C. maritima* en medio V8. **B)** Colonia monospórica de *C. maritima* en medio CMA. **C)** Colonia monospórica de *D. haliotrepha* en medio V8.



2.3.4 Conservación de cepas monospóricas.

Los dos objetivos que nos planteamos alcanzar para conservar correctamente las cepas monospóricas fúngicas en la presente investigación fueron: A) que el cultivo a conservar sea puro, evitando que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación; y B) que durante el tiempo de conservación sobrevivan al menos el 70-80% de las células (García & Uruburu, 2005).

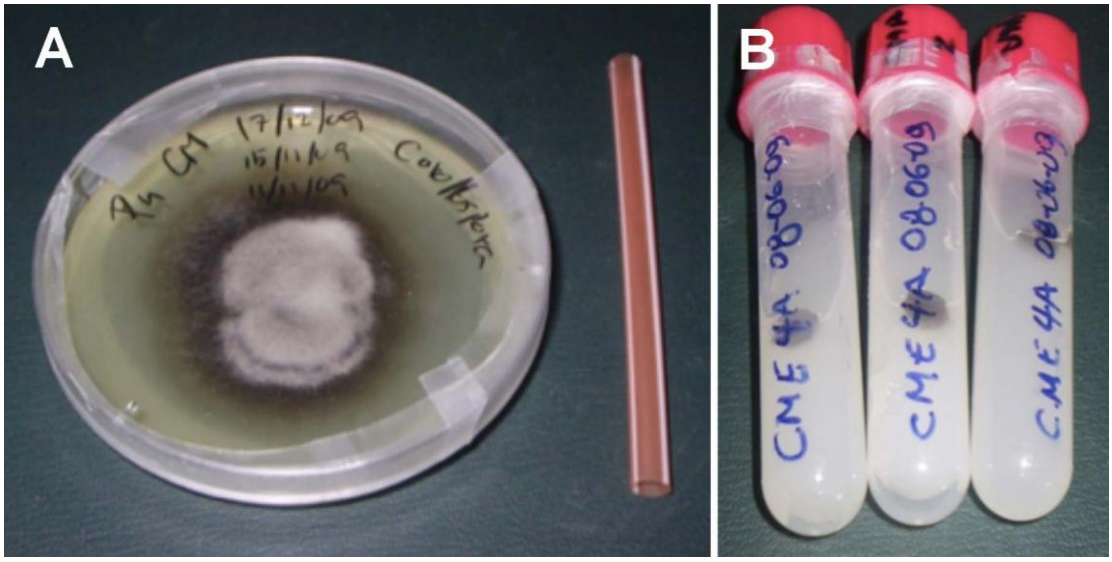
Una vez obtenidos los cultivos monospóricos se optimizó un método para su conservación, el mismo que debía mantener la viabilidad de los cultivos a través del tiempo.

2.3.4.1 Procedimiento 1.

Se dispensó medio CMA suplementado con cloranfenicol (40 µg/mL), en tubos de 17 x 100 mm y se dejó solidificar en ángulo para formar un “slant”. Posteriormente se agregó 3 mL de glicerol al 20% estéril sobre el slant.

Los tubos fueron inoculados con discos de colonias extraídas con sorbetes plásticos estériles, sellados con parafilm y conservados a -10 ºC (Fig. 18 A, B).

Figura 18. Conservación de cepas monospóricas por Procedimiento 1. **A)** Colonia monospórica de *C. maritima* lista para obtener un disco de ella y proceder a su conservación. **B)** Discos de *C. maritima* en glicerol al 20%.

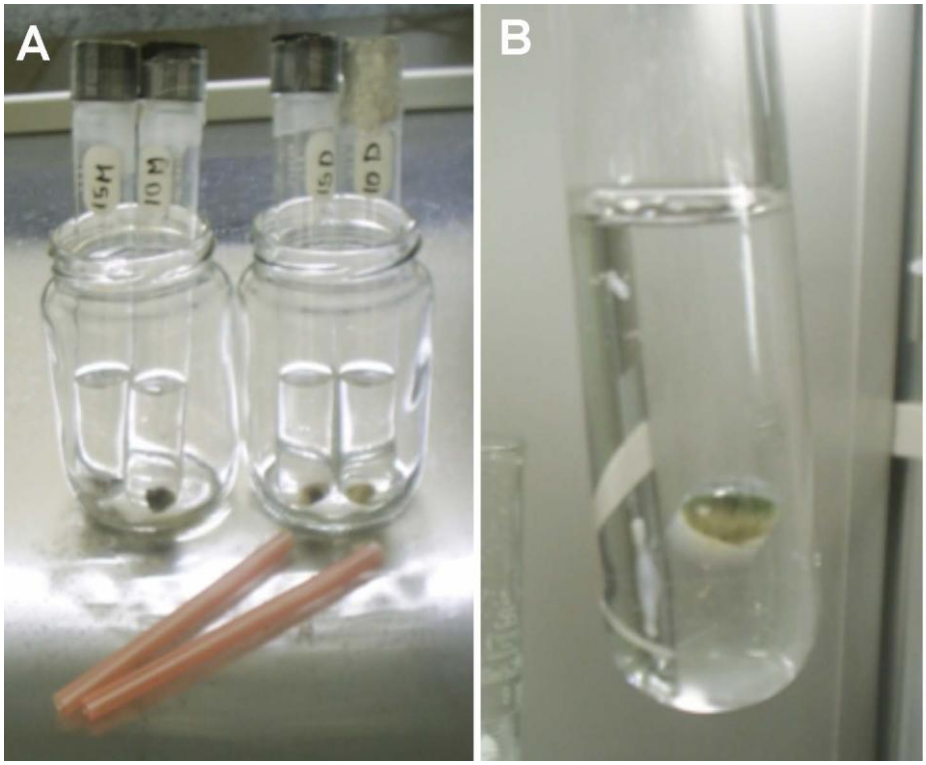


2.3.4.2 Procedimiento 2.

Se dispensó individualmente en tubos de vidrio con tapa 10 mL de glicerol al 10 y 15 % en agua de mar. Así mismo se colocaron 10 mL de glicerol al 10 y 15 % en agua destilada.

Los tubos fueron inoculados con discos de colonias de la misma manera que el procedimiento anterior. Se procedió a tapar cada tubo y sellar con parafilm, se rotularon y conservaron a -10 ºC (Fig.19. A, B).

Figura 19. Conservación de cepas monospóricas por Procedimiento 2. **A)** Discos de *C. maritima* en glicerol al 10 y 15 % en agua de mar (35 ‰) o en agua destilada. **B)** Discos de *C. maritima* en glicerol para su conservación.



CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Aislamiento e identificación de micromicetos marinos lignícolas.

En la presente investigación se identificaron siete especies y un género de micromicetos, cuya clasificación taxonómica y descripción se detalla a continuación:

3.1.1 TELEOMORFOS

3.1.2 Descripción de *Dactylospora haliotrepha*.

Phyllum: Ascomycota

Subphyllum: Pezizomycotina

Clase: Lecanoromycetes

Subclase: Lecanoromycetidae

Orden: Lecanorales

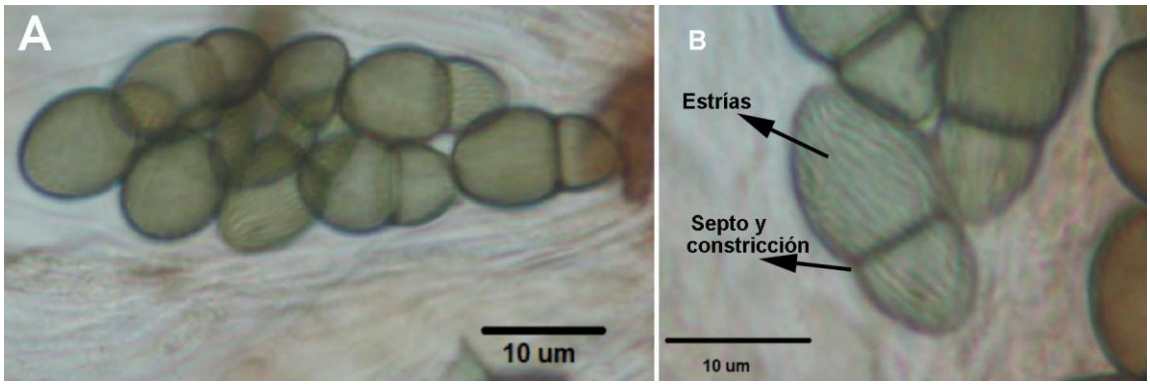
Familia: Dactylosporaceae

Género: *Dactylospora*

Especie: *haliotrepha*

D. haliotrepha presenta ascósporas elipsoidales u ovoides con medidas de 17 – 25 µm de longitud y de 8 – 11 µm de ancho, con un solo septo, con una constricción en el septo, de coloración verde grisáceo o café con estrías longitudinales delicadas (Fig. 20 A, B).

Figura 20. Ascosporas de la especie *D. haliotrepha*. **A)** Magnificación 40X. **B)** Magnificación 100X, mostrando mayor detalle de estructuras,



3.1.3 Descripción de *Corollospora maritima*.

Phyllum: Ascomycota

Subphyllum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Halosphaeriales

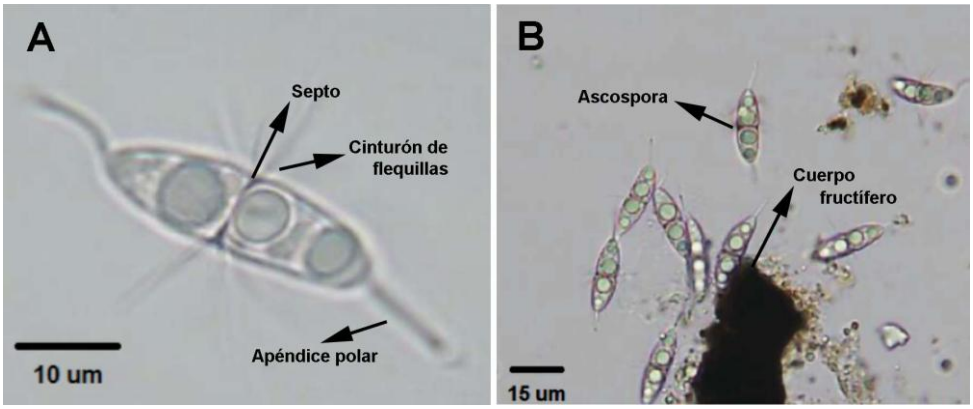
Familia: Halosphaeriaceae

Género: *Corollospora*

Especie: *maritima*

C. maritima presenta ascosporas de 20 – 40 µm de longitud y de 8 – 10 µm de ancho, hialinas, con un solo septo, apéndices polares de 4 – 7 µm de longitud y un cinturón de flequillos en la región ecuatorial (Fig. 21 A, B).

Figura 21. Ascosporas de la especie *C. maritima*. **A)** Ascospora mostrando el septo, cinturón de flequillos y apéndice polar. Magnificación 100X. **B)** Ascosporas y parte del cuerpo fructífero. Magnificación 40X.



3.1.4 Descripción de *Lulworthia grandispora*.

Phyllum: Ascomycota

Subphyllum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Lulworthiales

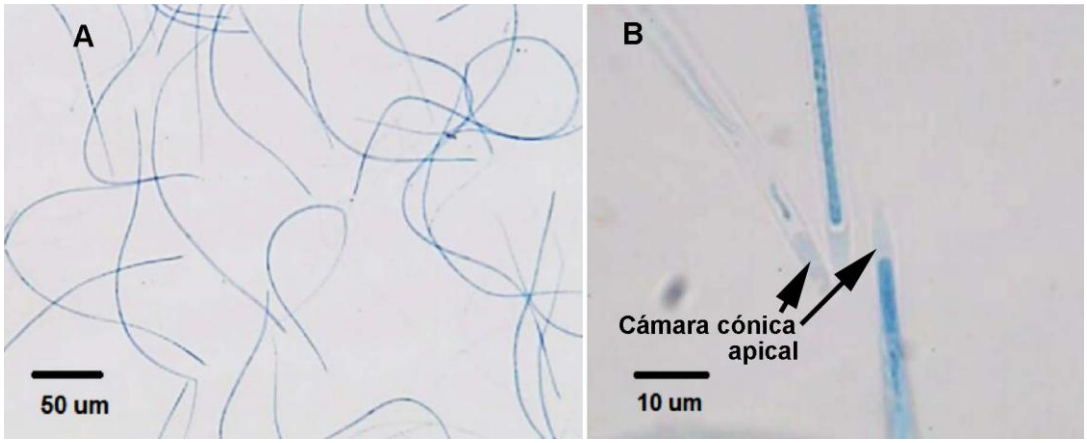
Familia: Lulworthiaceae

Género: *Lulworthia*

Especie: *grandispora*

L. grandispora presenta ascosporas filiformes curvas, hialinas, con extremos característicos, y una longitud de 200 – a 500 µm y un ancho de 3 – 5 µm. Las ascosporas filiformes de *L*. *grandispora*, pueden presentar una cámara cónica apical con una longitud de 5 a 10 µm (Fig. 22 A, B).

Figura 22. Ascosporas de *L*. *grandispora*. **A)** Ascosporas filiformes. Magnificación 10X. **B)** Ascosporas filiformes mostrando la cámara cónica apical. Magnificación 100X.



3.1.5 Descripción de *Saccardoella* sp.

Phyllum: Ascomycota

Subphyllum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Xylariomycetidae

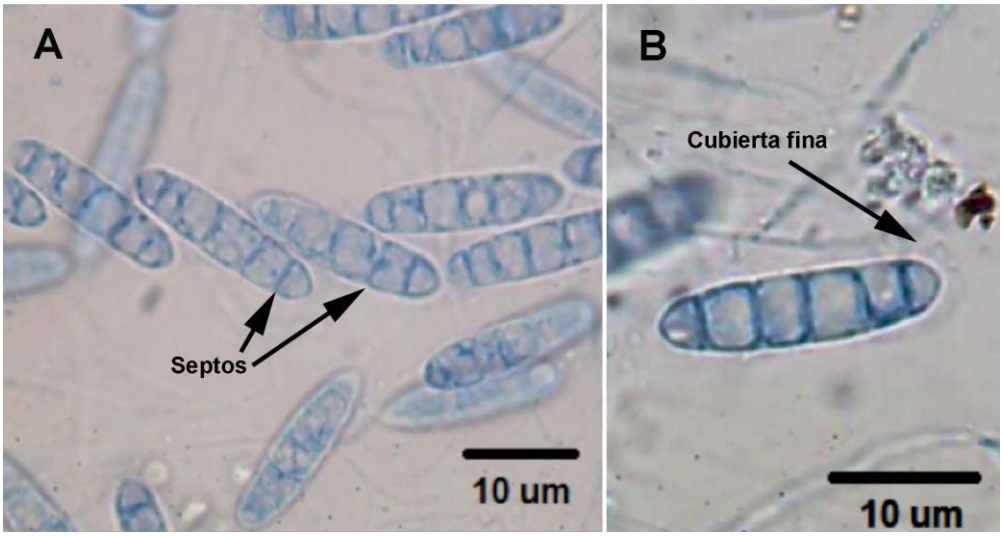
Orden: Xylariales

Familia: Clypeosphaeriaceae

Género: *Saccardoella*

Saccardoella sp., presenta ascósporas de 19 – 26 µm de longitud y de 5.5 – 7.5 µm de ancho, cuando las ascósporas son jóvenes se presentan como dos células, volviéndose 4, 5 o 6 septadas cuando maduran, son hialinas, elipsoidales, rodeadas por una fina cubierta cuando se encuentran en el agua (Fig. 23 A, B).

Figura 23. Ascosporas del género *Saccardoella* sp. **A)** Ascosporas con septos claros. Magnificación 100X. **B)** Ascosporas mostrando la "capa fina hialina". Magnificación 100X.



3.1.6 ANAMORFOS U HONGOS MITOSPÓRICOS

3.1.7 Descripción de *Zalerion maritimun*

Phyllum: Deuteromycota

Subphyllum: Deuteromycotina

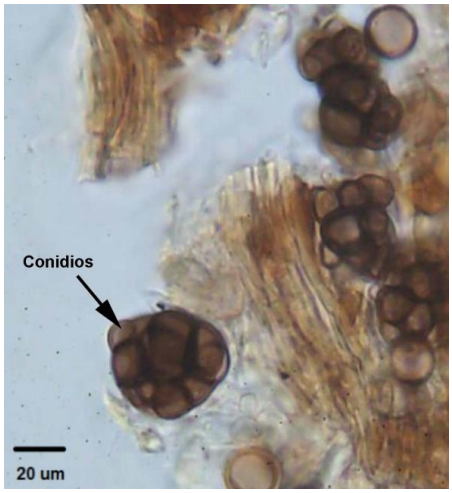
Clase: Hyphomycetes

Género: *Zalerion*

Especie: *maritimun*

Conidióforos cilíndricos, septados, simples, hialinos con tonalidad oliva a marrón. Los conidios tienen una longitud entre 30 – 42.5 x 26 – 50 µm de ancho, irregularmente helicoidales o enrollados en tres planos, formando una especie de nudo de aproximadamente 10 a 30 células. La pared es delgada y difusa, de coloración café a café oscura, puede aparecer en coloración negra cuando se presenta en grupos (Fig. 24).

Figura 24. Conidios de *Z. maritimun*. Magnificación100X.



3.1.8 Descripción de *Trichocladium alopallonelum*.

Phyllum: Deuteromycota

Subphyllum: Deuteromycotina

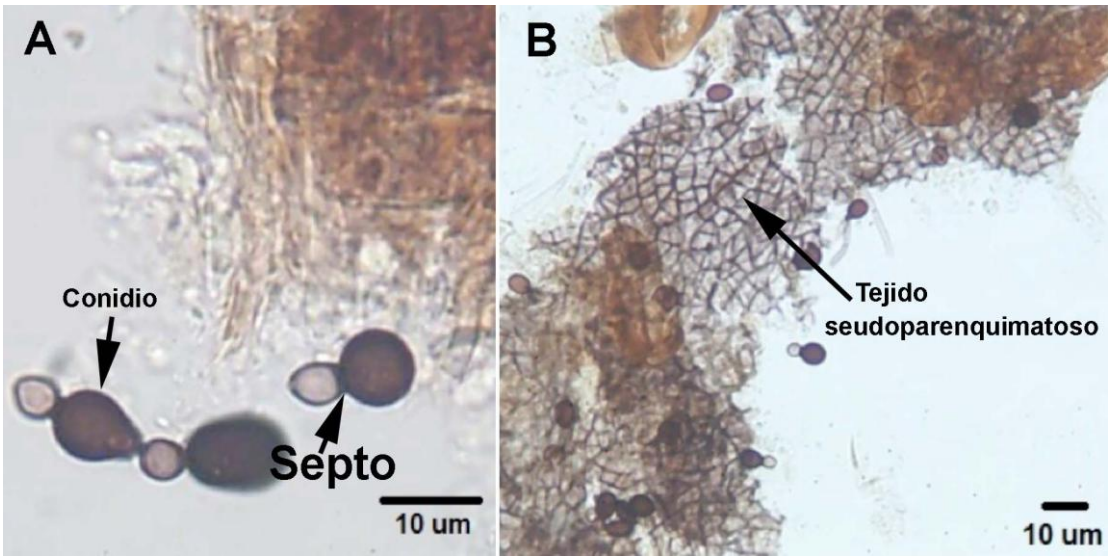
Clase: Hyphomycetes

Género: *Trichocladium*

Especie: *alopallonelum*

Los conidióforos presentan una longitud entre 3.5 – 6.8 x 3.5 – 6 µm de ancho, simples, 0 – 1 septos, difusos, sub-hialinos a café claro, cortos en ciertas ocasiones no se distinguen. Los conidios son células de 10 – 32 µm de longitud x 8 – 17 µm de ancho, ovopiriformes, ovoidales o subglobosos, 0 – 1 septo, célula apical grande, de 10 – 15.5 x 8 – 12 µm, ovoidales; célula basal pequeña, cónica o cilíndrica, de coloración café claro (Fig. 25 A, B).

Figura 25. Conidios de la especie *T. alopallonelum*. **A)** Conidio mostrando el septo. Magnificación 100X. **B)** Tejido seudoparenquimatoso del cuerpo fructífero. Magnificación 10X.



3.1.9 Descripción de *Trichocladium achrasporum*.

Phyllum: Deuteromycota

Subphyllum: Deuteromycotina

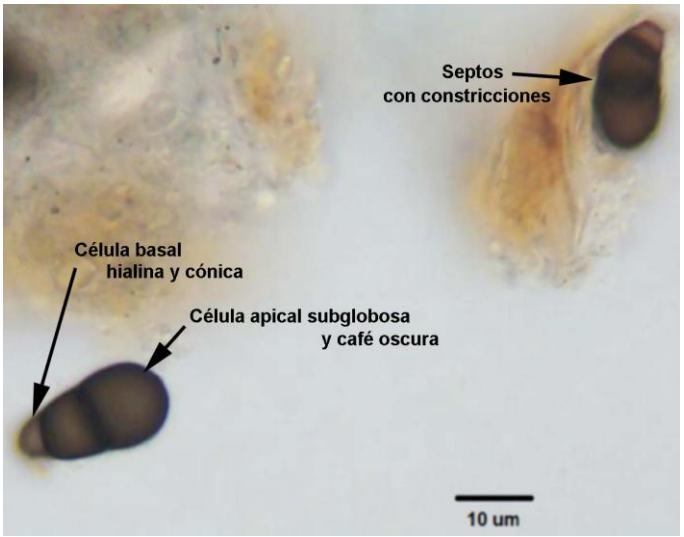
Clase: Hyphomycetes

Género: *Trichocladium*

Especie: *achrasporum*

Conidióforos algunas veces ausentes, si está presente es simple formado lateralmente en hifas, es hialino a café pálido. Conidios de 18– 25 x 10 – 16 µm, 2-3 septados, estrechos en el septo, clavados, obpiriformes, rectos o ligeramente curvos, el diámetro se incrementa de la base al ápice. Célula apical es subglobosa de coloración café oscura, la célula basal es cónica o subcilíndrica, subhialina a café claro (Fig. 26).

Figura 26. Conidio de la especie *T. achrasporum*, mostrando los septos y células apical y basal. Magnificación 100X.



3.1.10 Descripción de *Periconia prolifica*

Phyllum: Deuteromycota

Subphyllum: Deuteromycotina

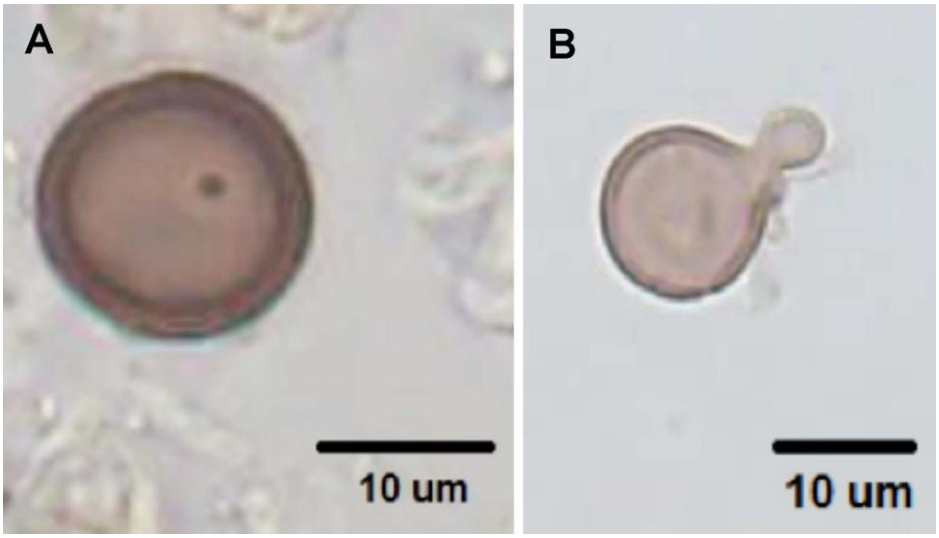
Clase: Hyphomycetes

Género: *Periconia prolifica*

Conidióforo septado, hialino, simple o ramificada, cilíndrica, usualmente formando pústulas en la superficie o en el sustrato.

Conidios de 7.5 – 12.5 µm de diámetro, unicelulares, subglobosas, desarrollo basipétalo, color café claro con tinte rojizo, células separadas (Fig. 27 A, B).

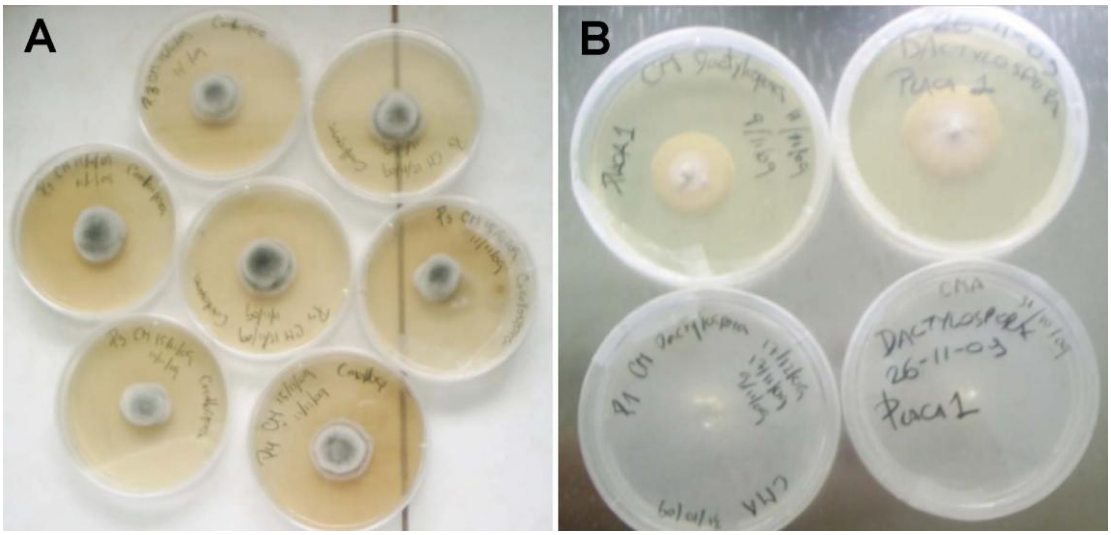
Figura 27. Conidio de la especie *P. prolifica*. **A)** Conidio simple color café, unicelular. Magnificación 100X. **B)** Conidio germinando. Magnificación 40X.



3.2 Obtención y conservación de cultivos monospóricos para el establecimiento de un banco de cepas fúngicas.

Se lograron obtener cultivos monospóricos de *D. haliotrepha* y *C*. *maritima*. Ambos cultivos fueron obtenidos con el método del vaciado del medio V8 sobre una caja de Petri con una suspensión de esporas y posteriormente el aislamiento de una sola célula y siembra en medio de cultivo apropiado (Fig. 28 A, B).

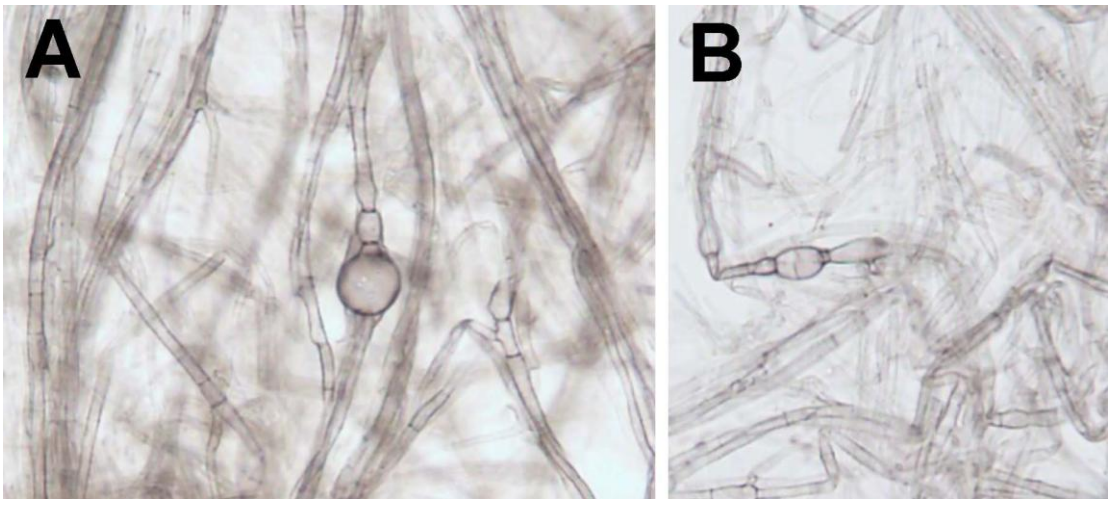
Figura 28. Cultivos monospóricos. **A)** *C*. *maritima*. **B)** *D. haliotrepha*.



La conservación de cultivos monospóricos de los micromicetos marinos lignícolas no fue la esperada. El procedimiento 1 (glicerol 20 % + - 10°C) después de 8 meses de conservación no produjo células viables. Se sembraron las muestras conservadas por este método en medio CMA y no

se observó crecimiento después de incubar por 72 horas a 35°C. Mientras que el procedimiento 2 (glicerol 10 y 15 % con agua de mar 35 ‰ y agua destilada) después de 4 meses sólo produjo células viables en los tratamientos con agua de mar 35 ‰. Se sembraron las muestras en medio PDA y se incubaron a 35°C durante 72 horas, observándose un crecimiento lento (Fig. 29 A, B).

Figura 29. Micelio con estructuras vegetativas del cultivo monospórico conservado en: **A)** Glicerol al 10 % en agua de mar después de 4 meses. Magnificación 40X. **B)** Glicerol al 15% en agua de mar después de 4 meses. Magnificación 40X.



CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1 Discusión.

En la actualidad se han descrito un total de 530 especies de hongos marinos filamentosos. De los cuales, 424 especies son ascomicetes, 94 especies son hongos mitospóricos y 12 especies son basidiomicetes (Jones *et al*., 2009). Según Kohlmeyer & Kohlmeyer (1979) y Hyde & Sarma (2000), los hongos marinos, a diferencia de los terrestres, en su mayoría son ascomicetes, debido al desarrollo de una serie de adaptaciones al medio marino (cuerpos fructíferos pequeños y esporas ornamentadas), lo que les da dominio en este hábitat.

En la presente investigación se identificaron 4 hongos ascomicetes y 4 hongos mitospóricos, lo que no refleja la dominancia reportada de los ascomicetes en este tipo de hábitat. Sin embargo otros autores en sus investigaciones han reportado una dominancia de los hongos mitospóricos frente a los ascomicetes; en India Sridhar obtuvo un 55,9% de mitospóricos y

un 36,3% de ascomicetes, (Sridhar, 2009), Fryar en Brunei, 54% de mitospóricos y 46% de ascomicetos (Fryar *et al*., 2004) y Sun 60% de mitospóricos y 40% de ascomicetos en China (Sun *et al.*, 2008).

Los micromicetos marinos descritos en la presente investigación, han sido descritos en otras locaciones geográficas del mundo.

Los ascomicetes *Dactylospora haliotrepha*, *Lulworthia grandispora* y los hongos mitospóricos *Periconia prolifica, Trichocladium alopallonelum* y *Zalerion maritimum* reportados aquí, fueron aislados e identificados, por el método de la cámara húmeda, de madera de *Avicennia* y *Rhizophora* en los manglares de Kerala - India (Nambiar & Raveendran, 2009a).

P. prolífica también ha sido reportada en los manglares de Phichavaram, costa sureste de la India, y se aisló mediante la incubación de madera, raíces y hojas de *Avicennia marina* y *Rhizophora mucronata* (Sridhar, 2009).

Mediante la incubación en cámara húmeda también se reportaron *Corollospora maritma*, *Trichocladium achrasporum* y *Z. maritimum* de muestras de madera enterradas en las playas de Kerala, Tamil Nadu y Pondicherry-India, (Nambiar & Raveendran, 2009b).

En la zona intermareal de la costa oeste de la India, también se aislaron e identificaron: *C. maritima*, *D. haliotrepha*, *P. prolifica*, *Z. maritimum*, *T. alopallonelum* y *T. achrasporum* (Prasannarai & Sridhar, 2003).

El método de la cámara húmeda también sirvió para la identificación de *D. haliotrepha*, *L. grandispora*, *Saccardoella rizophorae*, *P. prolifica*, *T. achrasporum*, *T. allopalonelum*, de restos vegetales de *Rizophora apiculata* y *Avicennia* sp. colectados en el delta de los ríos Godavari y Krishna de la costa oeste de la India (Sarma & Vittal, 2000).

En el pasado se han aislados e identificado hongos marinos en las costas de Sudamérica, en 1973 Erika Kohlmeyer colectó las siguientes especies: *Ceriosporopsis halima , Chadefaudia corallinarum, C. maritima, C. trifurcata, Didymosphaeria rhizophorae, Halosphaeria quadricornuta, H. salina, Keissleriella blepharospora, Leptosphaeria australiensis, Lulworthia sp., Mycosphaerella pneumatophorae, Phoma sp. y Rhabdospora avicenniae* (Kohlmeyer, 1976). Sin embargo, la mayor riqueza de especies es la encontrada en los manglares tropicales de Hong Kong, Borneo, India y Malasia (Sosa-Rodríguez *et al.,* 2009). Esto puede deberse a que los estudios son insuficientes para la región e inexistentes para nuestro país.

El género *Trichocladium* presentó dos especies *T. allopalonelum* y *T. achrasporum*. La especie *Corollospora maritima* es exclusivamente arenícola (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979. Sin embargo, en el presente trabajo se aisló de restos vegetales muy cercanos al área de playa, lo que explica su presencia.

Utilizando el método de incubación en cámara húmeda se aislaron e identificaron ocho hongos marinos después de diez meses de incubación. La incubación en cámara húmeda se efectuó hasta producir la disminución del número de estructuras de reproducción. Algunos investigadores incuban las muestras durante seis meses (Nambiar & Raveendran, 2009c) (Alias & Jones, 2000), otros por periodos de 0, 2, 6, 12 y 18 meses (Prasannarai & Sridhar, 2003), o de 0.5, 2, 4 y 8 meses (Ananda & Sridhar, 2004).

Desde el punto de vista biotecnológico, los hongos marinos constituyen una novedosa fuente de productos biológicamente activos, incluyendo compuestos de interés farmacológico (Mahdy, 2004). De algunos hongos marinos se han obtenido ácidos grasos como oleico, palmítico y linoleico, así como muchos aminoácidos (Damare, 2006). Se ha demostrado que los hongos marinos pueden degradar algunos compuestos del petróleo como el n-hexadecano, 1-hexadeceno, pristano y en menor grado n-tetradecano (Damare, 2006).

En un estudio realizado en Hong Kong el ascomicete *C. maritima*, presentó actividad celulolítica (celulasas) y xylanolítica (xylanasas) y *L. grandispora* presentó actividad celulolítica, xylanolítica y ligninolítica (lignasas), mientras que el hongo mitospórico *P. prolifica* presentó actividad celulolítica y ligninolítica (Bucher *et al*., 2004).

El metabolito secundario Corollosporina con actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y otros microorganismos, aislado del hongo marino *C. maritima,* es actualmente producido mediante la síntesis química (Liberra *et al.,* 1998).

Debido a estos antecedentes los hongos de hábitats marinos están recibiendo mucha atención en recientes años por la producción de metabolitos secundarios útiles (Punyasloke *et al.,*2006).

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la presencia de micromicetos es común en los manglares de Ecuador. No se conoce la distribución, diversidad ni el rol funcional de la micobiota marina de los manglares del Ecuador. Ninguna de las especies descritas en la presente investigación ha sido previamente reportada para nuestro país. Este primer estudio realizado en un punto del litoral ecuatoriano, evidencia la necesidad de ampliar las investigaciones de hongos marinos a todo el litoral, incluyendo

otros biotopos como son las playas, salinas y arrecifes, debido al total desconocimiento de este tipo de microorganismos en nuestro país.

La presente investigación sentará las bases para el conocimiento y potencial utilización de la biodiversidad microbiana de los ecosistemas de manglar. El establecimiento del banco de cepas puras de hongos marinos servirá para la posterior evaluación de metabolitos bioactivos producidos por ellos, los mismos que podrían ser utilizados o aplicados en el área farmacéutica, humana, animal y biorremediación.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones.

Se identificaron siete especies de micromicetos marinos, los teleomorfos: *C. maritima*, *L. grandispora* y *D. haliotrepha* y los anamorfos: *Z. maritimun*, *T. alopallonelum, T. achrasporum* y *P. prolifica*, y un género teleomorfo: *Sacardoella sp*.

Para la identificación taxonómica de hongos marinos se comprobó que el procedimiento de colecta y procesamiento del material lignificado en el laboratorio (cámara húmeda) es apropiado, habiéndose hallado desde el inicio estructuras de reproducción en todas las estaciones.

De los ocho microhongos identificados, sólo dos tipos de hongos marinos fueron aislados a partir de una sola espora (monospórico), *D. haliotrepha* y *C. maritima*; a pesar de que se obtuvo estructuras de reproducción (cuerpos fructíferos y ascosporas) de todas las especies identificadas, las restantes no germinaron.

De los dos métodos de conservación evaluados, sólo se pudo rescatar en PDA, el crecimiento en agua de mar con glicerol al 10 y 15%. Sin embargo el crecimiento observado de estos aislados después de la conservación a -30°C durante 4 meses, fue diferente morfológicamente al observado antes de la conservación.

5.2 Recomendaciones.

Es necesario implementar la caracterización molecular de este tipo de organismos en nuestro país, mediante la amplificación por PCR y posterior secuenciación de la región espaciadora interna del transcrito (ITS), para confirmar la identificación taxonómica realizada en este trabajo; está investigación se está desarrollando en colaboración con el laboratorio de biomedicina del FICMCM.

Para esto es necesaria la obtención de los cultivos monospóricos de todos los microhongos hallados, y debido a esto se deben formular medios de cultivo que permitan este propósito; en la actualidad se ha obtenido un tercer y cuarto cultivos monospóricos (*L. grandispora*; *T achrasporum*).

La conservación de estos microhongos debe ser re-evaluada, si bien el uso de glicerol al 10 y 15 % con agua de mar (35 ‰) produjo células viables,

estas tuvieron un crecimiento lento, por lo tanto es necesario evaluar otros métodos como la liofilización.

Se obtuvo un banco de cultivos monospóricos de dos especies, pero es indispensable incrementar este número para contar con una base más amplia para evaluar la producción de metabolitos de utilidad, actualmente se cuenta con un banco de cepas monospóricas de 4 especies.

Bibliografía

Alias, S. A., and Jones, E. B. G., Vertical distribution of marine fungi on *Rhizophora apiculata* at Morib mangrove, Selangor, Malaysia, Mycoscience, 2000; 41: 431-436.

Ananda, K., and Sridhar, K. R., Diversity of filamentous fungi on decomposing leaf and woody litter of mangrove forests in the southwest coast of India, Current Science, 2004; Vol. 87, NO. 10, 1431-1437.

Barghoon, E., and Linder, D. H., Marine fungi: their taxonomy and biology, Farlowia 1: 1944, pp. 395-467.

Barr, M. E., The ascomycete connection. *Mycologia,* 1983; 75**:** 1–13.

Bhattyacharya, D., Elwood, H. J., Goff, L. J., and Sogin, M. L., Phylogeny of *Gracilaria lamaneiformis* (Rhodophyta) based on sequence analysis of its small subunit ribosomal RNA coding region. *Journal of Phycology* 1990; 26**:** 181-186.

Blackwell, M., Minute mycological mysteries: the influence of arthropods on the lives of fungi. *Mycologia,* 1994; 86**:** 1–17.

Blanchette, R.A., Nilsson, T., Daniel, G., and Abad, A.. (1990) Biological degradation of wood. In Archaeological wood, properties, chemistry and conservation (R.M. Rowen and R.J. Barbour, eds). 1990; pp. 141-176 [Advances in Chemistry Series No. 125]. Washington: American Chemical Society.

Berbee, M. L., and Taylor, J. W., Dating the evolutionary radiation of the true fungi. Canadian Journal of Botany, 1993; 71: 1114-1127.

Booth, T. and Kenkel, N., Ecological studies of lignicolous marine fungi: a distribution model based on ordination and classification, In: The Biology of Marine Fungi (ed. S.T. Moss), Cambridge University Press, Cambridge, 1986; 297-310.

Borut, S., and Johnson, T., Some Biological Observations on Fungi in Estuarine Sediments, Mycological Society of America, 1962.

Bugni, T., and Ireland, C., Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms, Department of Medicinal Chemistry – University of Utah – Salt Lake City – USA, 2004.

Bruns, T. D., Vilgalys, R., Barns, S. M., Gonzalez, D., Hibbett, D. S., Lane, D. J., Simon, L., Stickel, S., Szaro, T. M., Weisburg, W.G., and Sogin, M. L.; Evolutionary relationships within the fungi: analyses of nuclear small subunit rRNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution,* 1992; 1**:** 231–241.

Bucher, V. V. C., Hyde, K. D., Pointing, S. B., and Reddy, C. A., Production of wood decay enzymes, mass loss and lignin solubilization in wood by marine ascomycetes and their anamorphs, Fungal Diversity, 2004; 15: 1-14.

Cavalier-Smith, T., Allsopp, M. T. E. P., and Chao, E. E., Chimeric conundra: are nucleomorphs and chromists monophyletic or polyphyletic. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 1994; *USA* 91**:** 11368-11372.

CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad), Manglares de México, 2008. Disponible en http://www.conabio.gob.mx.

Christophersen, C. O., Crescente, J. C., Frisvad, L., Gram, J., Nelsen, P. H., and Rahbaek, L., Antibacterial activity of marine derived fungi. Mycopathology 1999; 143: pp. 135-138.

Cribb, A.B., and Herbert, J.W., Marine fungi from Queensland I, University of Queensland Papers, Department of Botany, 1955; 3: pp. 77-81.

Damare, S., Deep-sea fungi as a source of alkaline and cold-tolerant proteases, National Institute of Oceanography-Dona Paula, Goa-India, 2006.

Damare, S., Fungi in Marine Environments, National Institute of Oceanography – Dona Paula, Goa – India, 2007.

Das, S., Lyla, P. S., and Ajmal Khan, S., Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives, Centre of Advanced Study in Marine Biology – Annamalai University – India, Current Science, Vol. 90, N° 10, 25 May 2006, pp. 1325-1335.

De Bary, A., Comparative morphology and biology of the fungi, Mycetozoa and bacteria (English translation). Clarendon Press, Oxford, 1887.

Demoulin, V., The red algal-higher fungi phylogenetic link: the last ten years. *BioSystems,* 1985; 18**:** 347–356.

Denison, W. C., and Carroll, G. C., The primitive Ascomycete: a new look at an old problem. *Mycologia, 1*966; 58: 249-269.

Enríquez, D., González, M. C., Ruíz, G., Núñez, R., and Delgado, Y., Marine Fungi Diversity in Beaches of Havana City, Instituto de Oceanología – Cuba, 2004.

Enríquez, D., González, M. C., and Delgado, Y., Distribution of marine microbiota in two beaches of Havana City, Instituto de Oceanología – Cuba, 2008.

Feldmann, G., Une ustilaginale marine, paraite du *Ruppia maritima* L, Revue general de botanique 1959; 66: pp. 35-39.

Feller, I. C. and Sitnik, M. Mangrove Ecology: A manual for a Field Course, Smithsonian Institution, 1996.

Fryar, S. C., Davies, J., Booth, W., Hodgkiss, I. J., and Hyde, K. D., Succession of fungi on dead and live wood in brackish in Brunei, Mycologia, 96 (2), 2004; pp. 219-225.

Gadd, G. M., Watkinson, S. C., and Dyer, P., Fungi in the Environment, Cambridge University Press – New York, ISBN-10 978-0-521-85029-2, 2007.

García, M. D., and Uruburu, F., La conservación de cepas microbianas, Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universitat de València, 2005.

Gloer, J. B., Marine and aquatic fungi as sources of new biologically active natural products, Mar. Biod. Conference, W. M. C. Brown, Dubuque 1993; Vol. 1.

Goh, T. K., and Hanlin, R. T., Nuclear divisions in the ascus and ascósporas of *Melanospora zamiae*, Mycological Research, 1997; 101: 1511-1514.

González, M. C., y Herrera, T., Micromicetes endopsamófilos de Barra Navidad, Jalisco, México, Rev. Mex. Micol. 1993, 9: pp. 19-33.

González, M. C., y Herrera, T., Micromicetos marinos lignícolas de la laguna costera de Barra Navidad, Estado de Jalisco, México. Rev. Mex. Micol. 1995; 11: pp. 145.

Groombridge, B., Global Biodiversity, status of the Earth´s living Resources, A report compiled by the world conservation monitoring Centre, Chapman and Hall, 1992.

Hawksworth, D. L., The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation, Mycol. Res. 1991; 95*:* pp. 641-655.

Hawksworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C. and Pegler, D. N., Ainsworth and Bisby´s Dictionary of Fungi. 8th Ed., Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1995.

Höhnk, W., and Ulken, A., Pize aus marinen Schwaemmen; Veroeff. Inst. Meeresforsch. Bremen 1979; 17: pp. 199-204.

Holt, D.M., and Jones, E.B.G., Bacterial degradation of lignified wood cell walls in anaerobic aquatic habitats. Appl. Environ. Microbiol. 1983; 46, 722-727.

Hughes, G. C., and Chamut, P. S., Lignicolous marine fungi from southern Chile, including a review of distributions in the southern hemisphere,-Cana. J. Bot. 1971; 49, 1-11, Vancouver.

Hyde, K. D., Intertidal fungi from warm temperate mangroves of Australia, including *Tunicatispora australiensis*, gen. et sp. nov. *Aust. Syst. Bot.* 1990; *3:* 711-718.

Hyde, K. D., Fungi from palms. XII. Three new intertidal ascomycetes from palms fronds. Sydowia 1994; 46: 257-264.

Hyde, K. D., Fungi from palms. XXIX. *Arecophila* gen. nov., with five new species and two new combinations. *Nov. Hed.* 1996a; 63*:* 81-100.

Hyde, K. D., and Alias, S. A., *Licocarpon angustatum* sp. nov., and *Neolinocarpon nypicola* sp. from petioles of *Nypa fructicans*, and a list of fungi from aerial parts of this host. *Mycoscience* 1998; *40:* 105-109.

Hyde, K.D., y Pointing, S.B., Marine Mycology, A practical Approach. Fungal Diversity Press, Hong Kong, 2000.

Hyde, K. D., and Sarma, V. V., A pictorial key to higher marine fungi In: Marine Mycology -A practical Approach (Eds. K. D. Hyde y S. B. Pointing), Fungal Diversity Press Series, 2000; Hong Kong, Vol.1, p. 205-270.

Hyde, K. D., Jones, E. B. G., Leaño, E., Pointing, S. B., Poonyth, A. D., and Vrijmoed, L. L. P., Role of fungi in marine ecosystems, Biodiversity and Conservation, 1998; 7, 1147-1161.

Hyde, K. D., Goh, T. K., Lu, B. S., and Alias, S. A., Eleven new intertidal fungi from *Nypa fruticans*. *Mycol. Res.* 1999; *103:* 1409-1422.

Johnson, T. W., and Sparrow, F. L., Fungi in oceans and estuaries, J. Cramer, New York, 1961.

Jones, E. B. G. Lignicolous and alguicolous fungi. In: Recent advances in aquatic mycology (ed. E.B.G. Jones), Paul Elek (Scientific Books) Ltd., London, UK, 1976; pp. 1-49.

Jones, E. B. G., Ultrastructure and taxonomy of the aquatic ascomycetous order Halosphaeriales. Canadian Journal of Botany 1995, 73 (suppl. 1): S790-S801.

Jones, E. B. G., Marine Fungi: some factors influencing biodiversity, Fungal Diversity 2000; 4: pp. 53-73.

Jones, E. B. G., and Alias S. A., Biodiversity of mangrove fungi, In: Biodiversity Tropical Microfungi 1997, Hong Kong University.

Jones, E. B. G., Sakayaroj, J., Suetrong, S., Somrithipol, S., and Pang, K. L., Classification of marine Ascomycota, anamorphic taxa and Basidiomycota.

Bioresources Technology Unit – Phylogenetics Laboratory – National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, 2009.

Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C., and Stalpers, J. A., Ainsworth & Bisby´s Dictionary of the fungi, 9ª. Ed., CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 2000.

Kohlmeyer, J., Marine Fungi from the Tropics, Mycological Society of America, 1968.

Kohlmeyer, J., Marine fungi of Hawaii including the new genus *Helicascus,* - Canad. J. Bot. 1969; 47. 1469-1487, Vancouver.

Kohlmeyer, J., On the definition and taxonomy of higher marine fungi, Veroeff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven Suppl. 1974a; 5: 263-286.

Kohlmeyer, J., New clues to the possible origin of ascomycetes. *BioScience* 1975; 25**:** 86–93.

Kohlmeyer, J. Marine Fungi from South America, Instituto Colombo-Alemán de Investigación Científica, Colombia, 1976.

Kohlmeyer, J., and Kohlmeyer, E., Marine fungi from tropical America and Africa-Mycologia, 1971; 63, 831-861, New York.

Kohlmeyer, J., and Kohlmeyer, E., Permanent Microscopic Mounts, Mycologia, 1972; Vol. 44, No. 3, pp. 666-669.

Kohlmeyer J., and Kohlmeyer, E., Marine mycology: the higher fungi, New York: Academic Press, 1979.

Kohlmeyer, J., and Volkmann-Kohlmeyer, B., Illustrated key to the filamentous higher fungi, Botanica Marina 1991; 34: pp. 1-61.

Kohlmeyer, J., and Volkmann-Kohlmeyer, B., Fungi on *Juncus roemerianus*. 1. *Trichocladium medullare* sp. nov. Mycotaxon, 1995; 53: 349-353.

Kohlmeyer, J., and Volkmann-Kohlmeyer, B., Fungi on *Juncus roemerianus*. 7. *Tiarosporella halmyra* sp. nov. Mycotaxon, 1996b; 56: 79-83.

Kohlmeyer, J., and Volkmann-Kohlmeyer, B., *Naufragela*, a new genus in the Halosphaeriaceae. Syst. Ascomycet., 1998; 67: 247-250.

Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., and Eriksson, O. E., Fungi on *Juncus roemerianus*. 2. New dictyosporous ascomycetes. Bot. Mar. 1995a; 38: 165-174.

Kholmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., and Eriksson, O. E., Fungi on *Juncus roemerianus*. 3. New ascomycetes. Bot. Mar. 1995b; 38: 175-186.

Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., and Eriksson, O. E., Fungi on *Juncus roemerianus*. 8. New bitunicate ascomycetes. Can. J. Bot. 1996; 74: 1830-1840.

Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., and Eriksson, O. E., Fungi on *Juncus roemerianus*. 9. New obligate and facultative marine ascomycotina. Bot. Mar. 1997a; 40: 291- 300.

Kohlmeyer, J., Baral, H. O., and Volkmann-Kohlmeyer, B., Fungi on *Juncus roemerianus*. 10. A new *Orbilia* with ingoldian anamorph. Mycologia 1998; 90: 303- 309.

Konig, G., and Wright, A., Marine natural products research: current directions and future potential, Plant. Med. 1995; 62: pp. 193-218.

Lepcsik, M., Manglares: Características anatómicas y adaptaciones morfológicas. Reproducción, ecología y distribución mundial, Botánica Marina-Facultad de Ciencias del Mar, 2002.

Liberra, K., and Lindequist, U., Marine fungi: a prolific resource of biologically active natural products? Pharmazie, 50, 1995; 553-555.

Liberra, K., Jansen, R., and Lindequist, U., Corollosporine, a new phthalide derivative from the marine fungus *Corollospora maritima*, Werderm 1069, Pharmazie, 53, 1998; 578-581.

Mahdy, A., Secondary metabolites of marine-derived fungi: Natural product Chemistry and Biological Activity. Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedich-Wihelms-Universität Bonn, 2004.

Malacalza, L., and Martinez, A., Ascomycetes marinos de Argentina,- Bol. Soc. Argentina Bot. 1971; 14, 57-72, Buenos Aires.

Mann, K.H., Production and use of detritus in various freshwater, estuarine, and coastal marine ecosystems, Limnology and Oceanography 1988; 33, pp. 910-930.

Maria, G. L., and Sridhar, K. R., Diversity of filamentous fungi on woody litter of five mangrove plants species from the southwest coast of India, Fungal Diversity 2003; 14: pp. 109-126.

Mehdi, F., and Saifullah, S., Mangrove Fungi of Karachi, Pakistan, Journal of Islamic Academy of Sciences 1992; 5:1, pp. 24-27.

Medhi, F., and Saifullah, S., Species Diversity and Seasonal Occurrence of Fungi on Seedlings of *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh, Journal of Biological Sciences 2000; 3 (2), pp. 265-268.

Meyer, S.P., Taxonomy of marine Pyrenomycetes, Mycological Society of America 1957; 49: pp. 475-528.

Molitoris, H. P., Are fungi adapted to the deep sea? Abstract, 6th International Marine Mycology Sym 1995; Portsmouth.

Montagne, J. F. C., Sylloge Generum Specierumque Cryptogamarum, Bailliere et. Fils, Paris, France, 1856.

Nambiar, R. G. and Raveendran, K., Manglicolous Marine Fungi of Kerala (South India). Botany Research International, 2009; 2 (3): 206-210.

Nambiar, R. G., and Raveendran, K., Manglicolous Marine Fungi on *Aviccenia* and *Rhizophora* along Kerala Coast (India), Middle-East Journal of Scientific Research, 2009a; 4 (1): 48-51.

Nambiar, R. G., and Raveendran, K., Frequency and Abundance of Arenicolous Marine Fungi along South Indian Beaches, Journal of Scientific Research, 2009b; 2 (1), 138-143.

Nambiar, R. G., and Raveendran, K., Marine Mycoflora on *Avicennia* and *Bruguiera* along Kerala Coast (India), Academic Journal of Plant Sciences; 2009c, 2 (2), 78-81.

Newell, S.Y., Bacterial and fungal productivity in the marine environment: a contrastive environment, Editions du CNRS Paris, In: Bacteriologie Marine. Marseille 177-18-19 Mai, 1984; pp. 133-139.

Newell, S.Y., Ecomethodology for organo-osmotrophs, prokaryotic unicellular versus eukaryotic mycelia, Microbial Ecology 1994; 28, pp. 151-157.

Odum, N. E., and Heald, E. J., Trophic analyses of an estuarine mangrove community, Bulletin of Marine Sciences 1972; 22: pp. 671-738.

Pirozynski, K. A., and Malloch, D. W., The origin of land plants: a matter of mycotrophism. *Biosystems,* 1975; 6: 153–164.

Prasannarai, K., and Sridhar, K. R., Abundance and diversity of marine fungi on intertidal woody litter of the West Coast of India on prolonged incubation, Fungal Diversity, 2003; 14: 127-141.

Punyasloke, B., Balsam, T. M., and Phillip, C. W., The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents, J Ind Microbiol Biotechnol, 2006; 33, 325-337.

Purushothaman, A., y Jayalakshmi, S., Biodiversity in Mangrove Ecosystems – Floral Diversity: Bacteria and Fungi, Centre of Advanced Study in Marine Biology, Annamalai University, 2008.

Raghukumar, C., Marine fungal biotechnology: an ecological perspective, National Institute of Oceanography – Dona Paula – Goa – India, 2008.

Raghukumar, C., Raghukumar, S., and Chandramohan, D., Spore germination in the deep sea, Abstract, 6th International Marine Mycology Sym 1995; Portsmouth.

Raghukumar, S., Speculations on niches occupied by fungi in the sea with relation to bacteria, Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Plant Sciences.) 1990; 100, pp. 129-138.

Raghukumar, S., The Role of Fungi in Marine Detrital Processes, Biological Oceanography Division – National Institute of Oceanography – Dona Paula, Goa – India, 2005.

Rees, G., and Jones, E. B. G., The fungi of the coastal sand dune system, Bot. Mar. 1985; 28*:* pp*.* 213-220.

Redecker, D., Kodner, R., and Graham, L., Glomalean fungi from the Ordovician. Science 2000; 289: pp. 1920–1921.

Ruiz, J., Arenicolous filamentous fungi in Mayagüez Bay Shoreline, Western Puerto Rico. University of Puerto Rico Mayagüez Campus, 2004.

Sachs, J., Lehrbuch der Botanik, 1874; ed. 4. Engelmann, Leipzig.

Sarma, V., and Vittal, B., Biodiversity of mangrove fungi on different substrata of *Rhizophora apiculata* and *Avicennia* spp. from Godavari and Krishna

deltas, east coast of India, Centre for Research in Fungal Diversity, The University of Hong Kong, 2007.

Singh, A.P., Nilsson, T., and Daniel, G., Bacterial attack of *Pinus sylvestris* wood under near anaerobic conditions. J. Inst. Wood Sci. 1990; 11, 237-249.

Sosa-Rodríguez, T., Sánchez-Nieves, J., y Melgarejo, L. M., Papel funcional de los hongos en ecosistemas de manglar, Bol. Invest. Mar. Cost. 38 (1), 2009; 39-57.

Spatafora, J. W., and Blackwell, M., Polyphyletic origins of ophiostomatoid fungi. Mycol Res, 1994; 98:1-9.

Spatafora, J. W., Kohlmeyer, B. V., and Kohlmeyer, J., Independent terrestrial origins of the Halosphaeriales (Marine Ascomycota), Department of Botany and Plant Pathology – Oregon State University – Institute of Marine Sciences – University of North Carolina, 1998.

Sridhar, K., Fungal Diversity of Pichavaram Mangroves, Southeast Coast of India, Nature and Science, 2009; 7(5).

Sun, S. L., Jin, J., Li, B. D., and Lu, B. S., Wood-inhabiting marine fungi from the coast of Shandong, China III, Mycosistema, 27 (1), 2008; 66-74.

Sutherland, G. K., New marine fungi on *Pelvetia*, New Phytol. 1915a; 14: 33-42.

Sutherland, G. K., Marine fungi imperfecti. New Phytol. 1916a; 15: 35-48.

Ulken, A., Phycomyceten aus der Mangrove bei Cananéia (Sâo Paulo, Brasilien)-Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven, 1970; 12, 313-319.

Ulken, A., Physiological studies on a Phycomycete from a mangrove swamp at Cananéia, Sâo Paulo, Brasil-Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven, 1972; 13, 217-230.

Valderrama, B., Loza, M. G., Martínez, F., Gasteazoro, F., Rodríguez, R., Dantan, E., Mendoza, A., y Folch, J. L., Biodiversidad de hongos acuáticos en México: Un enfoque metagenómico. Instituto de Biotecnología – UNAM – México, 2006.

Wilson, I.M., Some new marine Pyrenomycetes on wood and rope: *Halophiobolus* and *Lindra*, Transactions of the British Mycological Society 1956; 39: pp. 401-415.