



Universidad de Panamá
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología
Escuela de Biología
Sección de Microbiología



“Aislamiento de hongos endófitos foliares y fitopatógenos en cinco árboles de la Reserva Forestal Montuoso provincia de Herrera.”

Presentado por:

Jonathan Bratcher Lescure 8-834-1733



Trabajo de graduación presentado a la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología con orientación en Microbiología y Parasitología

Panamá, República de Panamá

2021



TRIBUNAL EXAMINADOR

Título:

“Aislamiento de hongos endófitos foliares y fitopatógenos en la Reserva Forestal
Montuoso provincia de Herrera.”

Por: **Jonathan Bratcher Lescure** _____

8-844-1733

Tesis presentada a consideración de la Escuela de Biología como requisito parcial para optar por el título de licenciatura en Biología con énfasis en Microbiología y Parasitología.

Asesor: **Dalila Montañez.** _____

Jurados:

Prof. **Magdilia Castillo.** _____

Prof. **José Iglesias.** _____



Profesora: Dalila Montañez.



- Facultad De Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología.
- Escuela De Biología.
- Departamento De Microbiología y Parasitología.

Profesor: José Iglesias.



- Facultad De Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología.
- Escuela De Biología.
- Departamento De Microbiología y Parasitología.

Profesora: Magdalia Castillo.



- Facultad De Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología.
- Escuela De Biología.
- Departamento De Biología Ambiental.



DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo de grado a mi madre Muguette Lescure, quien, con entrega amorosa, fundamento las bases de mi carácter basado en el trabajo honesto y perseverante, resaltando siempre la luz que el conocimiento arroja sobre la injusticia y las carencias humanas.

Su regalo más grande siempre ha sido el apoyo incondicional de mis sueños y recordarme que vale la pena luchar por ellos.



GRADECIMIENTO

Deseo agradecer profundamente a:

Betzaida Toribio, Gricel García, Isis González, Vladimir Guerra, Yillian Hernández. Quienes, como compañeros y hoy colegas, siempre brindaron su apoyo a lo largo de toda mi carrera, demostrando un espíritu ético y humano siempre dispuesto a compartir las pesadas cargas que presentaba cada reto.

Debo agradecer a Jason López por su indispensable asistencia de largas jornadas dentro y fuera del laboratorio de investigación en el desarrollo de este trabajo de grado demostrando la virtud del compromiso y el alto valor de la disciplina.

Agradezco de manera muy especial a la Dr. Dalila Montañez, tutora y guía en el desarrollo de este trabajo de grado quien, siempre se ha preocupado por despertar en sus estudiantes un espíritu de “investigador” y desarrollo de conocimiento científico.

NDICE GENERAL

| | | |
|-------------|---|----|
| I. | Introducción..... | 1 |
| 1. | Hongos:..... | 4 |
| 2. | Generalidades sobre los árboles muestreados:..... | 9 |
| | Justificación..... | 15 |
| | Objetivos..... | 16 |
| | Objetivo general:..... | 16 |
| | Objetivos específicos: | 16 |
| II. | Metodología..... | 17 |
| 1. | Materiales:..... | 18 |
| 2. | Área de estudio: | 20 |
| 3. | Sujetos de estudio: | 22 |
| 4. | Diseño de investigación: | 22 |
| 5. | Toma de muestras:..... | 23 |
| 6. | Procesamiento de muestras:..... | 24 |
| 7. | Siembra de muestras: | 25 |
| 8. | Microcultivo:..... | 26 |
| 9. | Caracterización por microscopía: | 27 |
| 10. | Obtención de imágenes: | 28 |
| 11. | Método de conservación: | 28 |
| 12. | Elaboración de guía ilustrada:..... | 28 |
| 13. | Análisis estadístico:..... | 28 |
| III. | Resultados | 31 |
| 1. | Aislamientos fúngicos. | 32 |
| 2. | Identificación de cepas: | 33 |
| 3. | Análisis estadístico:..... | 43 |
| IV. | Discusión..... | 48 |

| | | |
|------|--|----|
| V. | Conclusión..... | 61 |
| VI. | Bibliografía | 64 |
| VII. | Anexos | 74 |
| 1. | Descripción taxonómica:..... | 75 |
| 2. | Guía descriptiva (atlas) de los géneros fúngicos identificados:..... | 76 |



INDICE DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Materiales empleados..... | 19 |
| Tabla 2. Coordenadas en UTM de la RFM. | 20 |
| Tabla 3. Especies de árboles seleccionadas para la investigación..... | 22 |
| Tabla 4. Número de cepas aisladas y examinadas por cada árbol seleccionado. | 32 |
| Tabla 5. Cepas aisladas y examinadas de las muestras foliares de cacao..... | 34 |
| Tabla 6. Cepas aisladas y examinadas de café..... | 34 |
| Tabla 7. Cepas aisladas y examinadas en las muestras foliares de copé. | 35 |
| Tabla 8. Cepas aisladas y examinadas en las muestras foliares de guaba..... | 35 |
| Tabla 9. Cepas aisladas y examinadas en las muestras foliares de Pomarrosa..... | 36 |
| Tabla 10. Número de endófitos identificados por especie de árbol: | 38 |
| Tabla 11. Géneros de las cepas de hongos endófitos aislados por microcultivo. | 39 |
| Tabla 12. Géneros de las cepas de hongos endófitos aislados por microcultivo. | 42 |
| Tabla 13. Índice de Simpson (D), Índice de diversidad de Simpson (1-D)..... | 43 |
| Tabla 14. Frecuencia absoluta y relativa de los géneros de hongos identificados..... | 45 |

 **NDICE DE FIGURAS**



| | |
|--|----|
| Figura 1. Áreas protegidas y cobertura boscosa.. | 21 |
| Figura 2. Afecciones en partes foliares. | 23 |
| Figura 3. Cepas de hongos en tuvos inclinados con PDA. | 25 |
| Figura 4. Microfotografía: Técnica de cinta adhesiva.. | 26 |
| Figura 5. Cepas de Guaba incubadas en microcultivo, luego de 7 días. | 27 |
| Figura 6. Confección de sistema de microcultivo. | 27 |
| Figura 7. Microfotografías de las estructuras fúngicas. | 41 |
| Figura 8. Comparación de morfotipos en cultivos en plato de <i>Pestalotiopsis sp.</i> | 41 |
| Figura 9. Comparación de morfotipos en cultivos en plato de <i>Colletotrichum sp.</i> | 41 |
| Figura 10. Comparación de morfotipos en cultivos en plato de <i>Curvularia sp.</i> | 42 |
| Figura 11. <i>Colletotrichum sp.</i> | 76 |
| Figura 12. <i>Curvularia sp.</i> | 77 |
| Figura 13. <i>Drechslera sp.</i> | 78 |
| Figura 14. <i>Fusarium sp.</i> | 79 |
| Figura 15. <i>Gliocladium sp.</i> | 80 |
| Figura 16. <i>Humicola sp.</i> | 81 |
| Figura 17. <i>Nodulisporium sp.</i> | 82 |
| Figura 18. <i>Penicillium sp.</i> | 83 |

| | |
|---|----|
| Figura 19. <i>Pestalotiopsis sp.</i> | 84 |
| Figura 20. <i>Scedosporium sp.</i> | 85 |

 **NDICE DE GRAFICAS**



Gráfica 1. Distribución porcentual de cepas de hongos aislados.....33

Gráfica 2. Distribución porcentual de cepas con micelio estéril.37

Gráfica 3. Contraste de hongos endófitos aislados vs. endófitos identificados.....38

Gráfica 4. Distribución de la frecuencia relativa46

Gráfica 5. Coeficiente de Similitud de Jaccard.....47

RESUMEN



La posición geográfica única de Panamá, la convierte en un área esencial para la conservación global ya que sus bosques sirven como corredores migratorios entre América Central y América del Sur. El muestreo para el presente trabajo de grado se realizó en la Reserva Forestal El Montuoso (RFM) provincia de Herrera. Seleccionado para este trabajo de grado por ser un sitio de importancia ambiental. La RFM Fue creada con el objetivo de conservar la biodiversidad existente en el área, además del cuidado de fuentes de agua, y la protección de los bosques pluviales.

Ha sido ampliamente reportado alrededor del mundo que Todas las plantas son atacadas por algún tipo de hongo, y cada uno de los hongos parásitos ataca a uno o más tipos de plantas. Estos hongos fitopatógenos son organismos que desarrollan parte de su ciclo de vida en la planta que le sirve de huésped causando alteraciones en su fisiología normal y causando enfermedades.

Nuestra investigación realizó muestreo de 5 árboles presentes en la RFM: *Syzygium jambos* (pomarrosa), *Theobroma cacao* (cacao), *Clusia rosea* (copé), *Inga punctata* (guaba), *Coffea* sp. (café), por ser árboles de relevancia económica, en búsqueda de hongos endófitos foliares y detectar la presencia de hongos fitopatógenos.

Para este estudio se colectaron hojas con lesiones de los árboles de interés. Las muestras seccionadas, tanto de zonas lesionadas como de zonas sanas, se sometieron a una batería de desinfección y posterior sembrado en agar papa dextrosa, incubándose a temperatura ambiente durante 3 a 15 días. Observado crecimiento, se pasaron a tubos de PDA inclinados para caracterización por morfotipos mediante sus características macroscópicas y técnica de microcultivo para observar estructuras microscópicas.

El resultante fue el aislamiento de 72 cepas fúngicas entre las cuales se identificaron 10 géneros, que corresponden con reportes de otros autores.

Nuestros resultados reflejan la presencia de hongos fitopatógenos del género: *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Nodulisporium*, *Penicillium* y *Pestalotiopsis*. Adicional la presencia de endófitos como: *Gliocladium*, *Hemicola* y *Scedosporium*.

La biodiversidad de géneros fúngicos encontrados en la zona de colecta a través de las muestras calculado mediante el índice de biodiversidad de Margalef (I), es igual a 3.001, representativo de ecosistemas tropicales con actividad antropogénica y que se considera un valor medio de diversidad.

SUMMARY



Panama's unique geographic position makes it an essential area for global conservation as its forests serve as migratory corridors between Central and South America. The sampling for this degree work was carried out in the El Montuoso Forest Reserve (RFM) in the province of Herrera. It was selected for this study because it is a site of environmental importance. The RFM was created with the objective of conserving the existing biodiversity in the area, in addition to the care of water sources, and the protection of rainforests.

It has been widely reported around the world that all plants are attacked by some type of fungus, and each of the parasitic fungi attacks one or more types of plants. These phytopathogenic fungi are organisms that develop part of their life cycle in the host plant causing alterations in its normal physiology and causing diseases.

Our research conducted sampling of 5 trees present in the RFM: *Syzygium jambos* (pomarrosa), *Theobroma cacao* (cacao), *Clusia rosea* (copé), *Inga punctata* (guaba), *Coffea* sp. (coffee), because they are economically important trees, in search of foliar endophytic fungi and to detect the presence of phytopathogenic fungi.

For this study, leaves with lesions were collected from the trees of interest. The sectioned samples, from both injured and healthy areas, were subjected to a disinfection battery and then sown on potato dextrose agar, incubated at room temperature for 3 to 15 days. Once growth was observed, they were transferred to inclined PDA tubes for characterization by morphotypes through their macroscopic characteristics and microculture technique to observe microscopic structures.

The result was the isolation of 72 fungal strains among which 10 genera were identified, corresponding to reports by other authors.

Our results reflect the presence of phytopathogenic fungi of the genus: *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Nodulisporium*, *Penicillium* and *Pestalotiopsis*. In addition, the presence of endophytes such as: *Gliocladium*, *Humicola* and *Scedosporium*.

The biodiversity of fungal genera found in the collection area through the samples calculated using the Margalef biodiversity index (I) is equal to 3.001, which is representative of tropical ecosystems with anthropogenic activity and is considered a medium value of diversity.

I.

ntroducción

La República de Panamá está compuesta por 13 zonas de vida que albergan más de 9,520 especies de plantas con flores hasta últimos reportes. La posición geográfica única de Panamá la convierte en un área esencial para la conservación global ya que sus bosques sirven como corredores migratorios entre América Central y América del Sur (ANCON, 2017). Debido a que Panamá tiene solamente 100 km de ancho, el corredor es particularmente vulnerable; la destrucción de hábitat puede fácilmente interrumpir este importante vínculo de enlace entre los hemisferios. A medida que las fluctuaciones del clima se vuelven más severas, el papel de los corredores biológicos será cada vez más importante para las especies migratorias, en respuesta al cambio global (ANAM, 2014).

Panamá al igual que muchos países en vías de desarrollo, ha sufrido un fuerte proceso de deforestación, el cual se ha visto favorecido por el modelo económico y las políticas de titulación de tierras que han fomentado la transformación del bosque en cultivos agrícolas y pastizales ganaderos (Heckadon-Moreno, 2009). Asimismo, el interés de las compañías multinacionales por los recursos minerales, la construcción de presas que inundan amplias zonas selváticas o el crecimiento de las ciudades y las vías de comunicación son otros factores que también inciden en la pérdida de cobertura boscosa (Román, F. et al., 2012).

El siglo pasado, el país experimentó una “potrerización” de los territorios con vocación forestal, como resultado de las políticas crediticias públicas que favorecían la remoción de extensiones boscosas para transformarlas en tierras agropecuarias.

Hoy en día, la tendencia ha cambiado mundialmente y los sistemas agropecuarios están migrando rápidamente hacia sistemas donde la producción de carne no compite con el bosque, sino que se ordenan para generar más beneficios ecosistémicos y socioeconómicos. En Panamá las oportunidades de reforestación y restauración abarcan aproximadamente 2.5 millones de hectáreas (Ministerio De Ambiente, 2019).

El Fenómeno de la fragmentación de bosques y su conversión a suelos empobrecidos y sobre pastoreados, es crítico en la mayor parte de las tierras de la península de Azuero. Esta situación se comparte con el resto de las tierras rurales de Mesoamérica, donde aún se conserva una significativa parte de la diversidad biológica global; pero donde la pobreza de la gente constituye un problema central. La inseguridad alimentaria y la pobreza se encuentran a menudo concentradas en sitios con pronunciada degradación ambiental y pérdida de la biodiversidad (Cincotta et al., 2000). Según la información presentada en el informe sobre la cobertura y uso de la tierra para la provincia de Herrera: Para el primer nivel de agregación del sistema de clasificación, el uso agropecuario en la provincia es dominante, representando el 65.0% del territorio con 151,739 hectáreas (89% corresponde a pastos con 134,833 ha). En segundo lugar, se encuentra la cobertura boscosa, con 44,583 hectáreas y 19.1% de la superficie provincial, mientras el resto del territorio está dedicado en menor medida a áreas culturales con 8,313 hectáreas (3.6%), superficies de agua (0.5%) y áreas abiertas sin o con poca vegetación (0.3%) (Ministerio De Ambiente, 2017).

El sitio de muestreo para este trabajo de grado: La Reserva Forestal El Montuoso (RFM) fue creada mediante la Ley N° 12 del 15 de marzo de 1977, más del 80% de su superficie estaba cubierta por bosques, es considerada el último refugio de la biodiversidad en la provincia de Herrera y se creó con el objetivo de conservar la biodiversidad existente en el área protegida, además del cuidado de fuentes de agua, se pretende la protección de los bosques pluviales y el rescate de algunos humedales de la cuenca alta del río la Villa, cuenta con una extensión de 12,048 hectáreas, situada en el extremo Norte del macizo occidental de Azuero, compuesta principalmente por ecosistemas interconectados por diferentes sistemas de vegetación riverena o bien bosques de galería y se estima que la vegetación nativa cubre unas 400 ha. (ANAM, 2010).

1. Hongos:

Según Agrios (2005); Urbina (2011), los hongos son pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudo filamentosos que carecen de clorofila y que tienen paredes celulares que contienen quitina, celulosa, o ambos componentes. Con los vegetales comparten la presencia de paredes celulares definidas, en las fases vegetativas y reproductivas o solo en la fase de reproducción, la presencia de esporas y la forma de crecimiento pluricelular, filamentosos o alargados. Con los animales comparten la condición heterotrófica y el glucógeno como sustancia de reserva. Con las bacterias que también son heterótrofas, comparten la actividad de descomponedores del suelo y del

material orgánico en putrefacción, pero generalmente en medios ácidos, mientras que las bacterias lo hacen en medios alcalinos (Cabral et al., 2013).

La mayoría de las 100,000 especies de hongos conocidas son estrictamente saprófitas y viven sobre la materia orgánica muerta, a la que descomponen. Sin embargo, más de las 8,000 especies de hongos producen enfermedades en las plantas (Agrios, 2002).

1.1. Hongos Endófitos Y Fitopatógenos:

Se consideran endófitos los microorganismos que viven dentro de las plantas sin provocarles síntomas de alguna enfermedad aparente (Agrios, 2005). El endófito es una asociación costo-beneficio de una planta y un microorganismo definido por su localización y no por su función (Kusari et al., 2013). Sin embargo, algunos endófitos pueden comportarse parte de su ciclo de vida como saprófitos o patógenos (Petrini, 1991; Gamboa, 2006). Otros son simbioses que les proporcionan defensas químicas a sus hospederos (Carroll, 1988).

Todas las plantas son atacadas por algún tipo de hongo, y cada uno de los hongos parásitos ataca a uno o más tipos de plantas. Algunos hongos crecen y se reproducen sólo cuando establecen una cierta asociación con las plantas que les sirven de hospedante durante todo su ciclo de vida, estos hongos se conocen como parásitos obligados o biótrofos. Otros requieren de una planta hospedante durante una cierta etapa de su ciclo de vida, el cual lo pueden concluir desarrollándose en materia orgánica muerta o bien creciendo y reproduciéndose tanto en materia orgánica muerta como en plantas vivas (parásitos no obligados) (Agrios, 2005).

1.2.1 Relevancia Ambiental:

Hasta la fecha, se han encontrado hongos endofíticos en todas las especies de plantas que han sido analizadas con este fin, tanto en zonas tropicales y de clima templado, como desérticas o boreales (Fisher et al., 1995; Schulz y Boyle, 2005; Higgins et al., 2006; Stone, 2006; Arnold et al., 2007; Porras Alfaro et al., 2008). Es posible que los hongos patógenos con especificidad de hospedero o con marcadas preferencias al respecto, contribuyan a generar la enorme riqueza de especies arbóreas por hectárea y la poca predominancia de especies que caracterizan a muchos bosques tropicales. (Lodge, J., 2001).

Algunos géneros y especies presentan una gran capacidad de adaptación y se encuentran ampliamente distribuidos, mientras que otros presentan características de adaptación más limitadas o bien son sumamente especializados, lo cual restringe su distribución (Cook & Baker, 1983).

Muchos bosques tropicales presentan mayor diversidad arbórea, menor predominancia de especies individuales y densidades más bajas de cada especie de árbol por hectárea, que las que se observan típica mente en los bosques templados. La mayor dispersión de las plantas de algunos bosques tropicales puede ser un obstáculo para los insectos y otros organismos que dependen de una sola especie como hospedero, ya que las probabilidades de encontrar un hospedero adecuado disminuyen al aumentar la distancia entre los individuos (May., 1980, 1988).

Es esencial comprender la diversidad de endófitos existente en los ecosistemas, para establecer las implicaciones que éstos presentan (Moreno 2018). Por ejemplo, Gilbert et al., (1994) descubrieron, en el neotrópico, que una enfermedad ulcerante de origen micótico que afecta a *Ocotea whitei* en isla Barro Colorado, Panamá, depende de la densidad del hospedero, lo que dio por resultado un alejamiento espacial neto de las poblaciones de plántulas respecto a las plantas adultas de la misma especie. Algunos hongos tropicales patógenos no exhiben especificidad estricta en cuanto al hospedero, pero sí una marcada preferencia por ciertos hospederos, a veces emparentados, aunque no siempre. (Lodge, J., 2001).

El gen o los genes que determinan la virulencia en el patógeno generalmente son específicos para uno o varios tipos relacionados de plantas hospedantes. Asimismo, los genes que hacen que una planta hospedante sea susceptible a un determinado patógeno sólo existen en esa planta y quizá también en algunos tipos relacionados de plantas hospedantes. Algunas especies endofíticas se comportan como saprofitos latentes, es decir, hongos que infectan asintomáticamente a la planta y que cuando ésta senesce o muere colonizan sus tejidos, pudiendo llegar a formar estructuras reproductivas y completar su ciclo de vida (Promputtha et al., 2007). Por lo tanto, lo que determina el inicio y desarrollo de las enfermedades en las plantas es la presencia e interacción concurrentes de genes específicos que determinan la virulencia en el patógeno y la susceptibilidad en la planta hospedante (Agrios, 2005). Un ejemplo del último supuesto es un estudio en el que se demostró que la diferencia genotípica entre un hongo patógeno y un endófito puede ser mínima, identificándose un mutante en un

solo locus de un aislado patógeno de *Colletotrichum magna* que se comportaba como endófito (Freeman y Rodríguez, 1993). La especificidad de los genes que determinan las características de virulencia o susceptibilidad explica el por qué un patógeno que es virulento sobre un hospedante, no es virulento sobre los demás tipos de plantas hospedantes, y por qué una planta hospedante que es susceptible a un patógeno no es susceptible a todos los demás patógenos de otras plantas hospedantes (Agrios, 2005).

El ensamblaje de los endófitos difiere en localidades alejadas geográficamente, incluso para el mismo hospedante (Saikkonen, 2007). La germinación de las esporas de cierto patógeno se estimula por los exudados de las plantas susceptibles a ese patógeno particular. (Agrios, 2005)

1.2.2 Relevancia Económica:

La agricultura constituye uno de los pilares fundamentales en la economía mundial y el sustento principal para la vida humana. Por esta razón, la acción de ciertos organismos fitopatógenos sobre las cosechas puede provocar graves problemas, como la baja producción y desarrollo de cultivos o incluso la desaparición de los mismos, lo que supondría graves pérdidas económicas (Juárez-Becerra et al., 2010).

Las causas más comunes del crecimiento deficiente de las plantas y de la destrucción de cosechas son los fitopatógenos (Agrios, 2005). El bajo rendimiento que ocasionan en los cultivos representa pérdidas económicas significativas anualmente, que conducen a la aplicación de miles de toneladas de agroquímicos en todo el mundo, ante la necesidad de establecer un sistema de control (Regueira, 2017). Este método tan

generalizado, causa grandes daños a la salud humana y al ambiente, así como también propicia la aparición de hongos resistentes (Manzo et al., 2005).

2. Generalidades sobre los árboles muestreados:

2.1. *Theobroma cacao* (cacao):

Clasificación taxonómica:

Reino: *Plantae*.

Subreino: *Tracheobionta*.

División: *Magnoliophyta*.

Clase: *Magnoliopsida*.

Subclase: *Dilleniidae*.

Orden: *Malvales*.

Familia: *Malvaceae*.

Subfamilia: *Byttnerioideae*.

Tribu: *Theobromeae*.

Género: *Theobroma*.

Especie: *T. cacao*.

Descripción: Árbol de 3 a 10 m de alto. Tronco ramificado a baja altura. Corteza exterior negra o grisácea. Hojas simples y alternas, ovadas o lanceoladas, de 18 a 34 cm de largo y de 5 a 11 cm de ancho, con ápice acuminado, bordes enteros y base asimétrica. Las hojas presentan tres nervaduras principales saliendo desde la base. Estípulas lanceoladas y deciduas, pero persistentes en los ápices de las ramitas.

Pecíolos de 2 a 3 cm de largo y pulvinados en ambos extremos. Flores caulifloras, blancas o amarillas. Frutos en bayas oblongas o elipsoidales, acostillados y con la superficie exterior rugosa o lisa, muy variables en tamaño, pero generalmente alcanzan de 15 a 30 cm de largo, verdes o verde pálido, tornándose amarillos al madurar (Smithsonian Tropical Research Institute, 2020).

2.2. *Coffea arabica* (café):

Clasificación taxonómica:

Reino: *Plantae*.

Subreino: *Franqueahionta*.

División: *Espermatophyta*.

Subdivisión: *Magnoliophyta*.

Clase: *Magnoliatae*.

Orden: *Gentianales*.

Familia: *Rubiaceae*.

Género: *Coffea*.

Especie: *Coffea arabica*.

Descripción: La planta adulta es un arbusto que alcanza de tres a 4 metros de altura según la variedad. El eje principal es cilíndrico erecto, muy ramificado desde la base. Generalmente sus ramas son largas y flexibles su color es verde cuando joven y pardo oscuro después. Hojas Simples, opuestas, de pecíolo corto ovals o elípticas y de un color verde brillante. Flores hermafroditas y pentámeras. En las axilas de las hojas forman pequeños corimbos blancos y generalmente olorosos tienen corola gamopétala

y su cáliz es corto. 5 estambres y 1 pistilo con 2 estigmas, el ovario es ínfero, y el fruto es una baya. En su interior contiene 2 semilla plano convexas. Semillas a veces alada, o con cotiledones de base plana, endospermo a menudo abundante y carnosos, raramente cartilaginoso (Smithsonian Tropical Research Institute, 2020).

2.3. *Clusia divaricata* (copé):

Clasificación taxonómica:

Reino: *Plantae*.

División: *Magnoliophyta*.

Clase: *Magnoliopsida*.

Orden: *Theales*.

Familia: *Clusiaceae*.

Subfamilia: *Clusioideae*.

Tribu: *Clusieae*.

Género: *Clusia*.

Especie: *Clusia divaricata*.

Descripción: Árbol de 5 a 10 m de alto. Tronco irregular y ramificado a baja altura. El desprendimiento de cualquier parte de la planta produce el flujo de un exudado lechoso o cremoso. Hojas simples y opuestas, de 10 a 30 cm de largo y de 5 a 10 cm de ancho, elípticas, con ápice acuminado, bordes enteros y base obtusa. Las hojas son coriáceas y con nervaduras secundarias finas y paralelas. Pecíolos de 1 a 2 cm de largo. La especie es hermafrodita o dioica. Flores blancas. Frutos en cápsulas globosas, de 3 a

5 cm de diámetro, verdes y con restos de los estigmas de la flor en la punta, los cuales se observan como puntos negros y aplanados. Semillas cubiertas de un arilo anaranjado.

2.4. *Inga punctata* (guaba):

Clasificación taxonómica:

Reino: *Plantae*.

División: *Magnoliophyta*.

Clase: *Magnoliopsida*.

Orden: *Fabales*.

Familia: *Fabaceae*.

Subfamilia: *Mimosoideae*.

Tribu: *Ingeae*.

Género: *Inga*.

Especie: *Inga punctata*.

Descripción: Árbol de 5 a 15 m de altura y de 10 a 40 cm de diámetro. Copa umbelada o redondeada. Tronco ramificado a baja altura. Corteza exterior negra y lenticelada. Ramitas terminales cilíndricas y con lenticelas blancas, glabras o ligeramente pubescentes. Hojas paripinnadas y alternas, con 2 a 3 pares de folíolos, opuestos en el raquis, los basales reducidos en tamaño. Folíolos de 3 a 17 cm de largo y de 2 a 7 cm de ancho, elípticos o lanceolados, con ápice obtuso, agudo o acuminado, bordes enteros, base aguda y ligeramente desigual. Estípulas deciduas. Pecíolos de 1 a 3 cm de largo,

cilíndricos. Raquis cilíndrico. Flores blancas en pequeñas espigas axilares. Frutos en legumbres arqueadas y aplanadas, de 4 a 20 cm de largo, verdes, tornándose globosos y amarillos al madurar (Smithsonian Tropical Research Institute, 2020).

2.5. *Syzygium jambos* (Pomarrosa):

Clasificación taxonómica:

Reino: *Plantae*.

División: *Magnoliophyta*.

Clase: *Magnoliopsida*.

Subclase: *Rosidae*.

Orden: *Myrtales*.

Familia: *Myrtaceae*.

Subfamilia: *Myrtoideae*.

Tribu: *Syzygieae*.

Género: *Syzygium*.

Especie: *Syzygium jambos*.

Descripción: Árbol de 5 a 20 m de altura y de 20 a 40 cm de diámetro. Copa redondeada y con follaje lustroso. Tronco ramificado a baja altura. Ramitas terminales ligeramente aplanadas y de color marrón. Hojas simples y opuestas, de 10 a 22 cm de largo y de 3 a 6 cm de ancho, lanceoladas o elíptico-lanceoladas, con ápice largamente acuminado, bordes enteros y base cuneada o redondeada. Las hojas son coriáceas y glabras, con nervaduras secundarias finas y paralelas. Pecíolos de 0.5 a 1 cm de largo y acanalados

en la parte superior. Flores blancas y con numerosos estambres. Frutos globosos de 3 a 5 cm de largo y con una estructura en forma de corona en la punta, verdes, tornándose rosados o amarillos al madurar. (Smithsonian Tropical Research Institute, 2020).

Justificación



Aspectos muy importantes que impulsan el desarrollo de esta investigación de grado, han sido expresados por diversos autores, entre los cuales cito:

- Existe numerosa información sobre la biodiversidad de fauna y flora en general, sus tendencias y los principales desafíos, principalmente relacionada con las áreas protegidas, pero hay muy poca información de la biodiversidad asociada relacionada con los microorganismos, invertebrados y otros grupos como hongos y algas (Camargo et al., 2016).
- Existen diversos estudios relativos a hongos endófitos de las zonas templadas, no obstante, la información sobre los endófitos de las zonas tropicales aun representa un objeto potencial de estudio, ya que se tiene información muy limitada al respecto (Sánchez-Fernández et al., 2013).
- Los hongos son relativamente bien conocidos en la Zona del Canal de Panamá (en especial la Isla de Barro Colorado), la provincia de Chiriquí, y la isla de Coiba. De acuerdo con esta primera lista, aproximadamente 1,800 especies de hongos son conocidos para Panamá, que posiblemente representa sólo el 3% de la diversidad existente. (Piepenbring, 2006).
- Panamá, el Darién, la mayor parte de la Península de Azuero, y grandes áreas en el Caribe nunca o rara vez han sido visitados por los micólogos. (Piepenbring, 2006).

Objetivos



Objetivo general:

- Realizar un muestreo que sirva de base para futuras investigaciones sobre la presencia de hongos endófitos y fitopatógenos en la Reserva Forestal El Montuoso provincia de Herrera, Panamá.

Objetivos específicos:

- Llevar a cabo un muestreo en las partes foliares lesionadas de cinco (5) árboles de interés en la RFM, en busca de hongos fitopatógenos.
- Aislar e identificar los hongos endófitos y fitopatógenos encontrados en las muestras foliares de los cinco (5) árboles de interés.
- Comparar la diversidad de hongos identificados, entre cada especie de árbol sujeto a muestreo.
- Elaborar una guía ilustrada en formato tabla comparativa respecto a sus morfologías (macroscópica en cultivo en platos / microscopías) y esquemas morfológicos que ofrecen las literaturas sobre los hongos identificados.
- Conservar las cepas de los hongos resultantes de la investigación, con disposición para la comunidad científica, con la finalidad de ampliar y contrastar la información en futuros estudios.

II.

 etodología

1. *Materiales:*



Medios de cultivo utilizados:

➤ **Agar papa dextrosa:**

(APD Scharlau Microbiology) + Ácido tartárico 1.4%.

➤ **Agar (AV8):**

Jugo vegetal V8 150 ml

**Agua de levadura 850 ml

Agar 20g

Ajustar a pH: 7.0

**Agua de levadura: disolver 40 g de levadura prensada en 1 litro de agua, preservar a 4°C por 48 horas y utilizar el sobrenadante.

➤ **Agar agua (AA):**

Agar Agar 20,0 g

Agua destilada 1000 ml

Disolver el Agar Agar en agua destilada.

Tabla 1. Materiales empleados.

| <i>Equipo de laboratorio</i> | <i>Cristalería</i> | <i>Reactivos</i> | <i>Medios de cultivo</i> | <i>Otros</i> |
|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|------------------|
| Refrigeradora | Frascos de vidrios (500 ml) | Acido Tartárico 10% | Agar papa Dextrosa (PDA) | Asa micológica |
| Incubadora | Probetas (100 ml) | Alcohol al 95% (con aditivo). | Agar agua | Cortador de agar |
| Cámara de flujo laminar | Pipetas (1y 10 ml) | Etanol al 95% grado de laboratorio. | Agar (V8) | Parafilm |
| Auto clave | Propipetas (1y 10 ml) | Agua destilada 10L | | Papel toalla |
| Balanza analítica | Erlenmeyer (125ml) | Azul de Lactofenol | | Bolsas Ziploc® |
| Microscopio | Cubre y porta objetos | Hipoclorito de sodio | | Coladores |
| | Viales (20 ml) | | | Cuchilla |
| | Platos Petri | | | Mascarillas |
| | Tubos pequeños con tapa rosca | | | Guantes |

2. Área de estudio:



El muestreo para el presente trabajo de grado se realizó en la Reserva Forestal El Montuoso (RFM) (Ver figura 1). Geopolíticamente se extiende sobre los corregimientos de El Toro, Leones, Quebrada de El Rosario, El Ciprian y Chepo, en el distrito de Las Minas, Provincia de Herrera. Pequeños sectores están ubicados en la divisoria de agua de los corregimientos de Tebario y Mariato, Distrito de Montijo, Provincia de Veraguas (ANAM, 2010). Tomando las muestras en el área inicial del sendero ecológico para visitantes de la reserva.

2.1. Ubicación geográfica por GPS:

La RFM físicamente se localiza en las siguientes coordenadas:

Tabla 2. Coordenadas en UTM de la RFM.

| Longitud EW | Latitud NS |
|-------------|------------|
| 512000 | 856000 |
| 525000 | 859000 |
| 528000 | 850000 |
| 515000 | 847000 |

Fuente: IGNTG. CODESA. 2003.

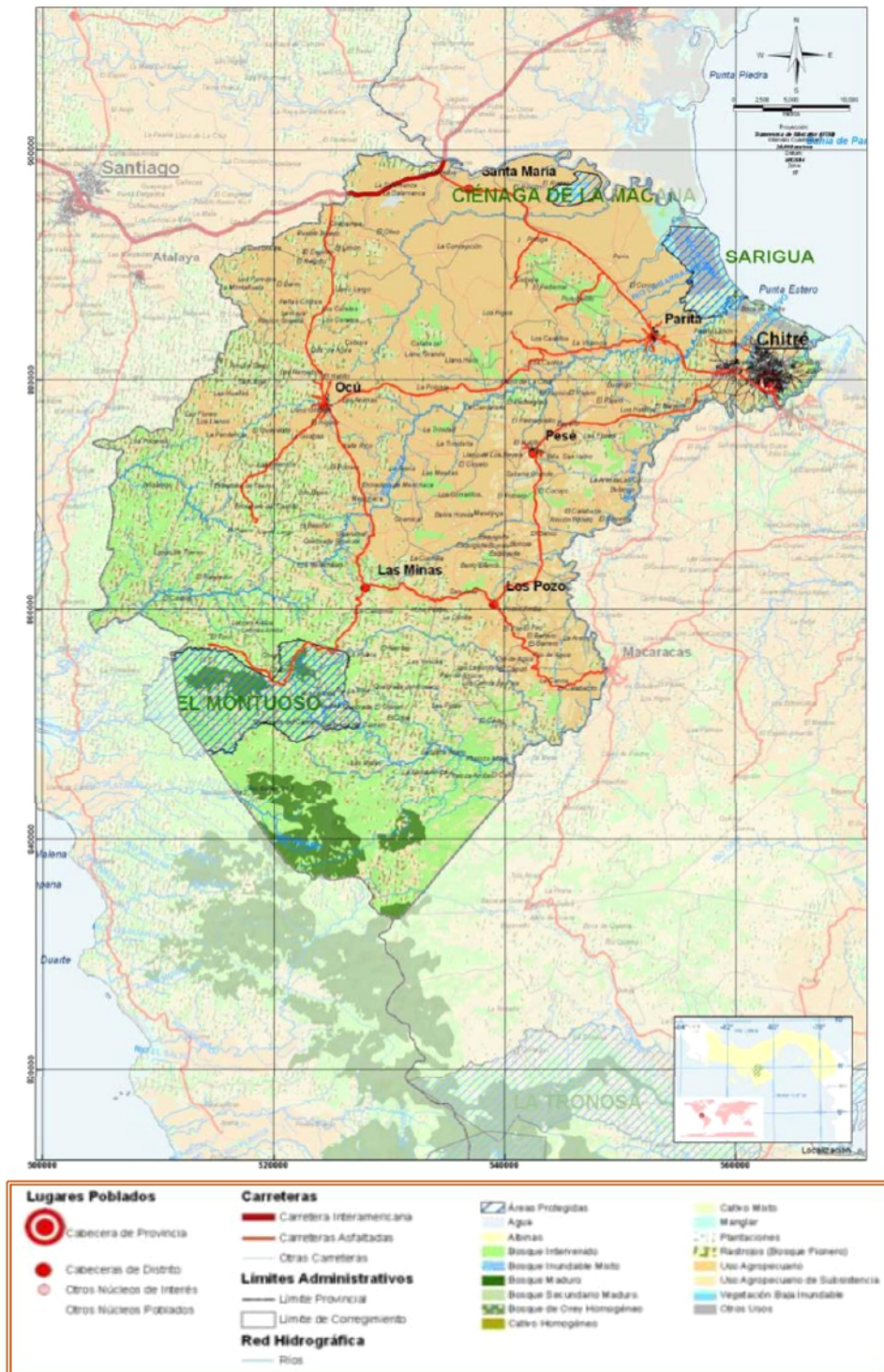


Figura 1. Áreas protegidas y cobertura boscosa. Fuente: CONADES, 2018.

3. Sujetos de estudio:



Se evaluaron y seleccionaron como sujeto de muestreo 5 árboles presentes en la ubicación descrita en el punto anterior (punto 1.) bajo el criterio de interés comercial con el fin de obtener la mayor data recaudada de investigaciones previas sobre afecciones por hongos fitopatógenos descritos para sendos árboles.

Los individuos (árboles) seleccionados fueron las especies descritas a continuación en la tabla #3.

Tabla 3. Especies de árboles seleccionadas para la investigación.

| Nombre común | Nombre científico |
|--------------|--------------------------|
| Cacao | <i>Theobroma cacao</i> |
| Café | <i>Coffea arábica</i> |
| Copé | <i>Clusia divaricata</i> |
| Guaba | <i>Inga punctata</i> |
| Poma rosa | <i>Syzygium jambos</i> |

4. Diseño de investigación:



El estudio realizado, se basó en un componente experimental el cual incluyó obtención de material vegetal infectado (hojas), con el fin de extraer y aislar cepas de hongos y someter a análisis morfológicos (macro y microscópicos) con el propósito de aportar material gráfico útil en la evaluación y reconocimiento de hongos fitopatógenos; Mediante un enfoque descriptivo y soportado en argumentación bibliográfica.

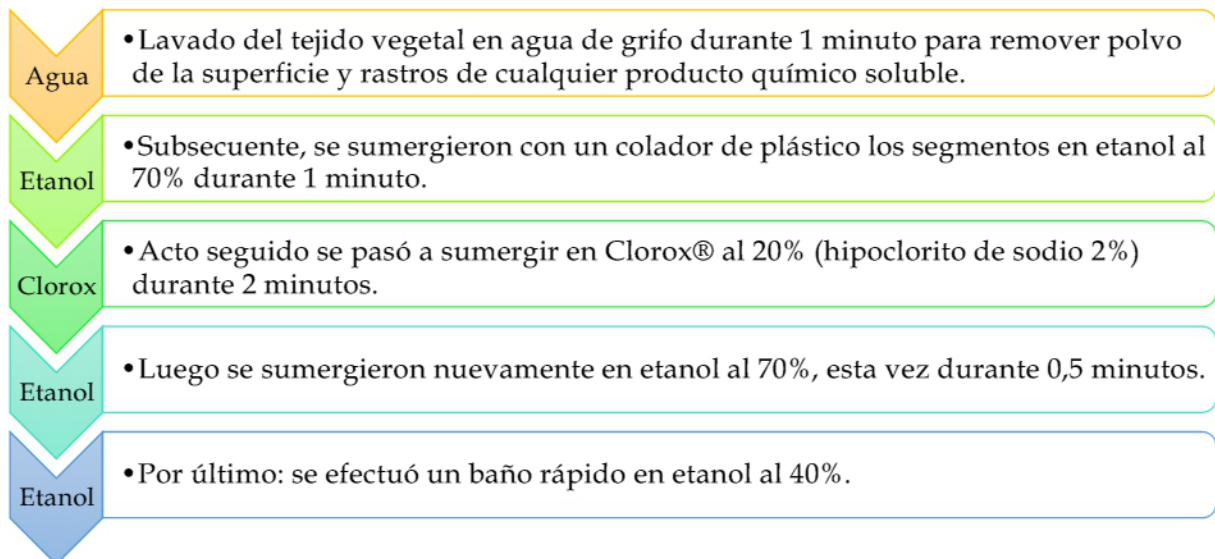
Micología. Estas fueron almacenadas a baja temperatura (4°C) por 24 horas, con la finalidad de inhibir cualquier proceso metabólico hasta su posterior procesamiento.

6. *Procesamiento de muestras:*

De cada lesión visible en las partes foliares colectadas, se procedió a cortar con cuchillas desinfectadas secciones de 4mm x 4mm, dichos fragmentos contenían 50% lesionado y 50% sano, cuidando que las lesiones no provinieran de los bordes de la hoja. El proceso se repitió con todas las muestras colectadas.

El tejido vegetal adquirido y dividido por especie a la que pertenecen y estado (con lesión y sin lesión visible). Fueron sometidos a una batería de desinfección con el propósito de obtener exclusivamente hongos endófitos y no hongos que habiten solo la superficie de las hojas.

La batería constó de los siguientes pasos:



7. Siembra de muestras:

Empleando una pinza estéril, se sembraron los segmentos en platos con agar papa dextrosa (PDA) distribuyéndolos en cuatro (4) segmentos por plato sellando los platos con Parafilm® e incubaron a temperatura ambiente (27°C) por un tiempo comprendido entre 3 a 15 días.

Se aisló muestras de cada hongo crecido a partir de las muestras de tejido vegetal sembradas. Los hongos adquiridos se inocularon a tubos con PDA inclinados por 30 días e incubados a temperatura ambiente, para su posterior clasificación por morfotipos mediante características macroscópicas.

Los aspectos a observar fueron los siguientes:

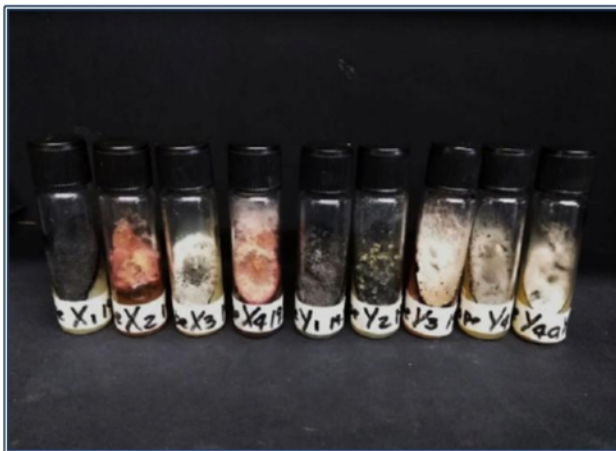


Figura 3. Cepas de hongos en tubos inclinados con PDA. Aislados a partir de muestras foliares de árbol Copé, por: Jonathan Lescure.

- Color del micelio.
- Color del sustrato circundante al micelio.
- Penetración en el sustrato (micelio sumergido).
- Textura del micelio.
- Formación de masas escleróticas.
- Exudados.
- Esporangios visibles.

Una vez clasificados los hongos adquiridos a partir de las muestras de tejido vegetal, se prepararon cultivos en platos con PDA para observaciones preliminares mediante microscopía utilizando elaboraciones de placa fresca por medio de la técnica de cinta

adhesiva, con la finalidad de observar la presencia de más de un morfotipo a nivel microscópico entre las distintas clasificaciones macroscópicas.



Esta técnica es una de las más usadas debido a que se conserva la yuxtaposición original de las esporas y segmentos de hifas (Koneman y Roberts, 1987). Además de permitir observar las estructuras fúngicas casi sin alteración (Arenas, R., 2008).

Figura 4. Microfotografía: Técnica de cinta adhesiva. Cepa de *Pestalotiopsis sp.* aislada en muestra foliar de Guaba, por: Jonathan Lescure.

8. *Microcultivo:*

Al concluir las caracterizaciones macroscópicas de los hongos y las observaciones preliminares mediante microscopía: de cada morfotipo seleccionado dentro del grupo de muestras pertenecientes a cada árbol, se procedió a realizar cultivos en platos de PDA para reactivación de los hongos.

Una vez reactivadas las cepas: se confeccionaron microcultivos, que constaban de un sistema estéril de platos que contenían en su interior una base de papel humedecido con 5mL de agua estéril, sobre el cual descansaban un caballete confeccionados a partir de dos portaobjetos en cruz, en los que reposaban trozos de tres tipos de agar (A. agua, A. PDA, A. V8), inoculados con una misma cepa por sistema de plato, y se cubrían con un cubreobjetos, sellando los platos con Parafil®, con el propósito de tener un sistema

controlado y libre de contaminación biótica externa. Este sistema se almacenó para incubación a temperatura ambiente de siete (7) a nueve (9) días según el crecimiento observable.

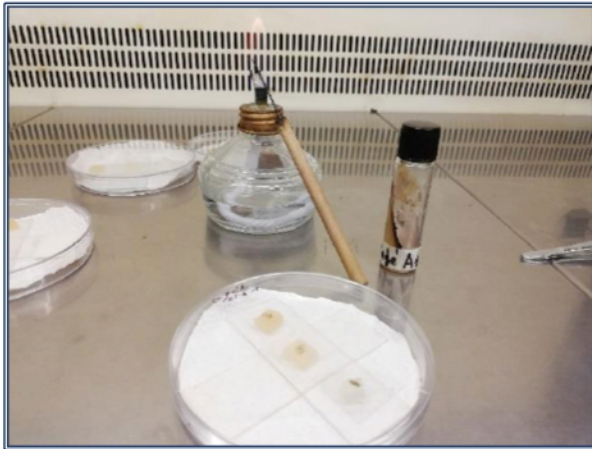


Figura 6. Confección de sistema de microcultivo.
Por: Jonathan Lescure.

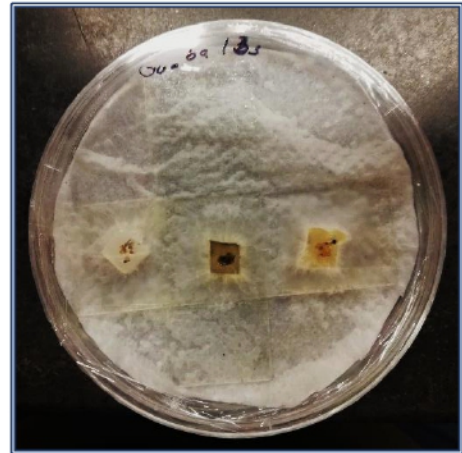


Figura 5. Cepas de Guaba incubadas en microcultivo, luego de 7 días. Por: Jonathan Lescure.

9. *Caracterización por microscopía:*

Las placas frescas obtenidas a partir de microcultivos se examinaron bajo el microscopio utilizando como colorante diferencial un tinte azul de lactoglicerol.

Empleando claves taxonómicas se inquirió identificar cada sepa aislada en búsqueda de fitopatógenos. Una vez identificados se confeccionó una tabla con los resultados obtenidos para cada árbol comparando las características macroscópicas y microscópicas observadas en las cepas.

La observación de las estructuras morfológicas para la identificación de las sepas aisladas, fue realizada a través de microscopio óptico Nikon®, efectuando observaciones con magnificaciones: 20x, 40x, 60x, 100x.

10. Obtención de imágenes:

La obtención de imágenes microscópicas se llevó a cabo mediante cámara digital (Huawei Mate 10 Lite: Cámara: Dual, 16MP+2MP) ajustada sobre los lentes del microscopio óptico en uso. seleccionando la fotomicrografía más representativa de cada género o microestructura de hongo encontrado por muestra de árbol.

11. Método de conservación:

Agua estéril: es un método que consiste en suspender en agua estéril un determinado número de células del microorganismo que se quiera conservar e incubarla de 20°C a 25°C (Castellani, 1939). Se han observado altos porcentajes de viabilidad en periodos a veces superior a 5 años en diversos tipos de microorganismos, tanto en hongos filamentosos como en levaduras y algunas bacterias, así como también se han comprobado una buena estabilidad para caracteres morfológicos y fisiológicos (Arias y Piñeros, 2008).

12. Elaboración de guía ilustrada:

La información resultante se plasmó en una guía ilustrada a modo de compendio de imágenes, esquemas e información relevante de las cepas de hongos endófitos encontrados en las muestras colectadas de los árboles en estudio.

13. Análisis estadístico:

La diversidad endofítica contenida en cada sujeto de estudio (género de árbol), se calculó utilizando el Índice de Simpson (D). La diversidad encontrada en el conjunto

de individuos se calculó mediante el Índice de Margalef (I). Todo esto apoyado en cálculos de frecuencia relativa (f) e Índice de similitud de Jaccar (Ij).

13.1. Índice de Simpson (D): mide la probabilidad de que dos individuos seleccionados aleatoriamente de una muestra pertenezcan a la misma especie.

$$D = \frac{\sum n(n-1)}{N(N-1)} \quad \text{ó} \quad D = \sum (n/N)^2$$

Donde:

n = el número total de organismos de una especie en particular.

N = el número total de organismos de todas las especies.

- El valor de **D** oscila entre 0 y 1.
- Si el valor de **D** da 0, significa diversidad infinita.
- Si el valor de **D** da 1, significa que no hay diversidad.

Reinterpretando el índice de Simpson, para fines más prácticos de la información, podemos calcular el índice de diversidad de Simpson (**1-D**). Este índice representa la probabilidad de que dos individuos seleccionados aleatoriamente de una muestra pertenezcan a diferentes especies. En este caso, el valor del índice también oscila entre 0 y 1, pero ahora, cuanto mayor es el valor, mayor es la diversidad de la muestra. (Simpson, E.H., 1949). Suele expresarse en porcentajes.

13.2. Índice de biodiversidad de Margalef (I): brinda un valor a la biodiversidad de la zona basado en la distribución numérica de los individuos de las diferentes especies en función del número de individuos existentes en la muestra analizada.

$$I = \frac{(s - 1)}{\ln N}$$

Donde:

I = es la biodiversidad.

s = es el número de especies presentes.

N = es el número total de individuos encontrados (pertenecientes a todas las especies).

- Valores inferiores a 2.0 son considerados como relacionados con zonas de baja biodiversidad (en general resultado de efectos antropogénicos).
- valores superiores a 5.0 son considerados como indicativos de alta biodiversidad. (Margalef, D.R., 1958).

13.3. Coeficiente de similitud de Jaccard (Ij): Expresa el grado en el que dos muestras son semejantes por las especies presentes en ellas, por lo que son una medida inversa de la diversidad, que se refiere al cambio de especies entre dos estaciones (Pielou, 1975), permitiéndonos identificar si dichas poblaciones son réplicas unas de otras. El índice oscila entre 0 (sin taxa compartidos) y 1 (todos los taxones compartidos) (Arnold et al., 2000).

Dónde:
$$Ij = \frac{c}{(a + b) - c}$$

a = el número de taxones en la muestra a.

b = el número de taxones en la muestra b.

c = el número de taxones en común entre las dos muestras (Zak & Willig, 2004).

IV.

esultados

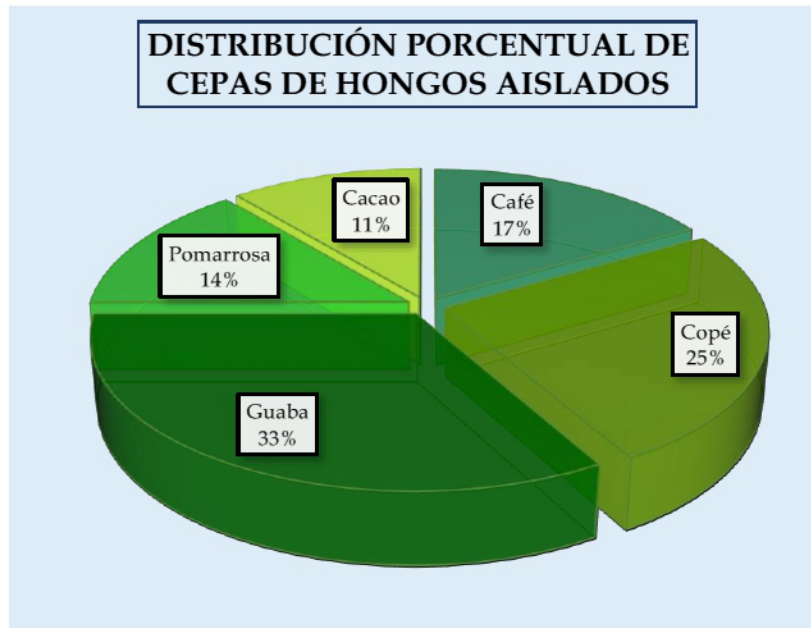
1. Aislamientos fúngicos.

Para el desarrollo de este trabajo de investigación: se planificó clasificar por morfotipos exhibidos en los cultivos de PDA en tubos inclinados los hongos aislados de cada especie de árbol estudiado; basados en las características descritas en el punto 3.4. de la metodología. Ergo, sendos morfotipos exhibían características irrepetibles y coincidentes en muchos casos, haciendo la clasificación una elección que podría sesgar perjudicialmente la muestra de cepas a seleccionar para realizar micro cultivos. Dado lo anterior; se tomó la resolución de efectuar microcultivos para cada hongo aislado que exhibiera al menos una o más características diferentes de la lista antes mencionada, para cada especie de árbol estudiado. Es así como entre de las muestras procedentes de los cinco (5) árboles se realizaron y examinaron micro cultivos de setenta y dos (72) cepas de hongos diferentes, detallados en la tabla a continuación:

Tabla 4. Número de cepas aisladas y examinadas por cada árbol seleccionado.

| Individuo | Cepas De Hongos Endófitos |
|--|----------------------------------|
| <i>Theobroma cacao.</i> (cacao) | 8 |
| <i>Coffea arábica.</i> (café) | 12 |
| <i>Clusia divaricata</i> Maguire. (copé) | 18 |
| <i>Inga punctata</i> (guaba) | 24 |
| <i>Syzygium jambos</i> (Pomarrosa) | 10 |

De un total de 72 cepas de hongo aisladas, la distribución en cantidad varía considerablemente entre cada individuo de estudio, como se muestra en la gráfica a continuación.



Gráfica 1. Distribución porcentual de cepas de hongos aislados.

Tomando las mismas cantidades de muestras foliares por individuo (3), se esperaba un número equivalente entre las cepas aisladas de endófitos para sendos individuos. No obstante, la distribución porcentual mostró una marcada diferencia entre individuos; siendo Guaba quien mayor porcentaje de cepas aisladas obtuvo (33%), y en contraste Cacao el menor número (11%).

2. Identificación de cepas:

Dentro de cada especie de árbol seleccionado, se lograron identificar un número variable de cepas al examinarlas bajo microscopía con tinción diferencial, en búsqueda de encontrar características en sus estructuras microscópicas, sometiéndolas a claves taxonómicas. Algunas cepas presentaban estructuras morfológicas microscópicas que permitían identificarlas hasta género solamente; pues se requieren exámenes

moleculares para una identificación certera en cuanto a especie; aunado a ello macroscópicamente sus crecimientos en platos con PDA exhibían diferencias.

A continuación, se detalla en los cuadros: #5, #6, #7, #8, #9; las cepas examinadas por individuo: las que produjeron solo micelio estéril y las identificadas exitosamente a partir de sus morfotipos microscópicos.

Tabla 5. Cepas aisladas y examinadas de las muestras foliares de *Theobroma cacao* (cacao).

| Cepa | Género |
|-------------|---------------------------|
| Cacao 1 A1 | Micelio estéril |
| Cacao 1 A2 | Micelio estéril |
| Cacao 1 A3a | Micelio estéril |
| Cacao 1 A3b | <i>Pestalotiopsis sp.</i> |
| Cacao 1 A4a | Micelio estéril |
| Cacao 2 A1 | <i>Pestalotiopsis sp.</i> |
| Cacao 2 A2 | Micelio estéril |
| Cacao 2 A3 | Micelio estéril |

Tabla 6. Cepas aisladas y examinadas de *Coffea sp.* (café).

| Cepa | Género |
|-----------|---------------------------|
| Café 3 Ab | <i>Drechslera sp.</i> |
| Café A 1 | <i>Gliocladium sp.</i> |
| Café A 2 | Micelio estéril |
| Café A 3a | <i>Curvularia sp.</i> |
| Café A 3c | <i>Por identificar</i> |
| Café A 4a | <i>Colletotrichum sp.</i> |
| Café A 4b | <i>Pestalotiopsis sp.</i> |
| Café B 1 | <i>Penicillium sp.</i> |
| Café B 2 | <i>Colletotrichum sp.</i> |
| Café B 3 | Micelio estéril |
| Café B 4a | <i>Fusarium sp.</i> |
| Café B 4c | <i>Scedosporium sp.</i> |

Tabla 7. Cepas aisladas y examinadas en las muestras foliares de *Clusia divaricata* (copé).

| Cepa | Género |
|------------|---------------------------|
| Copé 2 A1a | <i>Pestalotiopsis sp</i> |
| Copé 2 A2a | <i>Colletotrichum sp.</i> |
| Copé 2 A3a | <i>Humicola sp.</i> |
| Copé 2 A4a | Micelio estéril |
| Copé 2 B1a | <i>Pestalotiopsis sp</i> |
| Copé 2 B2a | <i>Pestalotiopsis sp</i> |
| Copé 2 B3a | <i>Curvularia sp.</i> |
| Copé 2 B4a | <i>Pestalotiopsis sp</i> |
| Copé X 1 | Micelio estéril |
| Copé X 2 | Micelio estéril |
| Copé X 3 | Micelio estéril |
| Copé X 4 | Micelio estéril |
| Copé Y 1 | Micelio estéril |
| Copé Y 2 | Micelio estéril |
| Copé Y 3 | Micelio estéril |
| Copé Y 4 | <i>Fusarium sp.</i> |
| Copé Y 4a | Micelio estéril |
| Copé Y 4b | <i>Colletotrichum sp.</i> |

Tabla 8. Cepas aisladas y examinadas en las muestras foliares de *Inga punctata* (guaba).

| Cepa | Género |
|------------|---------------------------|
| Guaba 1A1 | Micelio estéril |
| Guaba 1A1a | Micelio estéril |
| Guaba 1A1b | <i>Pestalotiopsis sp.</i> |
| Guaba 1A2 | <i>Curvularia sp.</i> |
| Guaba 1A3 | Micelio estéril |
| Guaba 1A4 | Micelio estéril |
| Guaba 1Ab | Micelio estéril |
| Guaba 1B1 | Micelio estéril |
| Guaba 1B2 | <i>Penicillium sp.</i> |
| Guaba 1B2a | Micelio estéril |
| Guaba 1B3 | Micelio estéril |
| Guaba 1B3a | Micelio estéril |
| Guaba 1B3b | Micelio estéril |
| Guaba 1B3c | Micelio estéril |
| Guaba 1B3d | Micelio estéril |

| | |
|------------|---------------------------|
| Guaba 1B4 | <i>Colletotrichum sp.</i> |
| Guaba 1B4a | Micelio estéril |
| Guaba 1B4b | Micelio estéril |
| Guaba 2A4 | Micelio estéril |
| Guaba 2X1 | Micelio estéril |
| Guaba 2X2 | <i>Nodulisporium sp.</i> |
| Guaba 2X3 | <i>Nodulisporium sp.</i> |
| Guaba 2X4 | <i>Nodulisporium sp.</i> |
| Guaba 2X5 | Micelio estéril |

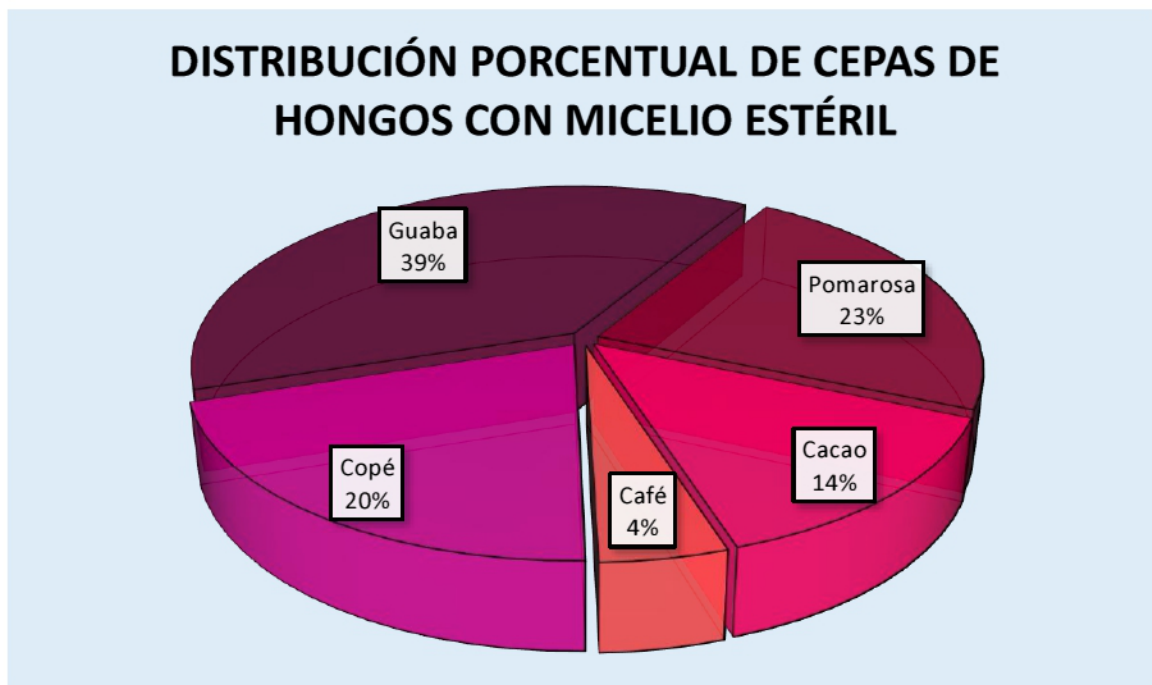
Tabla 9. Cepas aisladas y examinadas en las muestras foliares de *Syzygium jambos* (Pomarrosa)

| Cepa | Género |
|----------------|-----------------|
| Pomarrosa A 1 | Micelio estéril |
| Pomarrosa A 2 | Micelio estéril |
| Pomarrosa A 3a | Micelio estéril |
| Pomarrosa A 3b | Micelio estéril |
| Pomarrosa A 4 | Micelio estéril |
| Pomarrosa B 1 | Micelio estéril |
| Pomarrosa B 2 | Micelio estéril |
| Pomarrosa B 3 | Micelio estéril |
| Pomarrosa B 4a | Micelio estéril |
| Pomarrosa B 4b | Micelio estéril |

Como lo expresa la **tabla #9**: Al examinar las placas de las cepas de Pomarrosa aisladas en microcultivo, no se encontraron estructuras que permitieran identificar mediante claves taxonómicas las cepas.

2.1. Datos acopiados:

Los datos de las tablas: #5, #6, #7, #8, #9. Muestran un número considerable de cepas de microcultivos con micelio estéril (sin estructuras reproductivas visibles). Siendo un total de 44, de las 72 muestras aisladas, que representa un 61.1% de toda la muestra. Dichas cepas no son viables para la identificación por medio de la observación de microestructuras. Su distribución porcentual se muestra en la gráfica a continuación:



Gráfica 2. Distribución porcentual de cepas con micelio estéril.

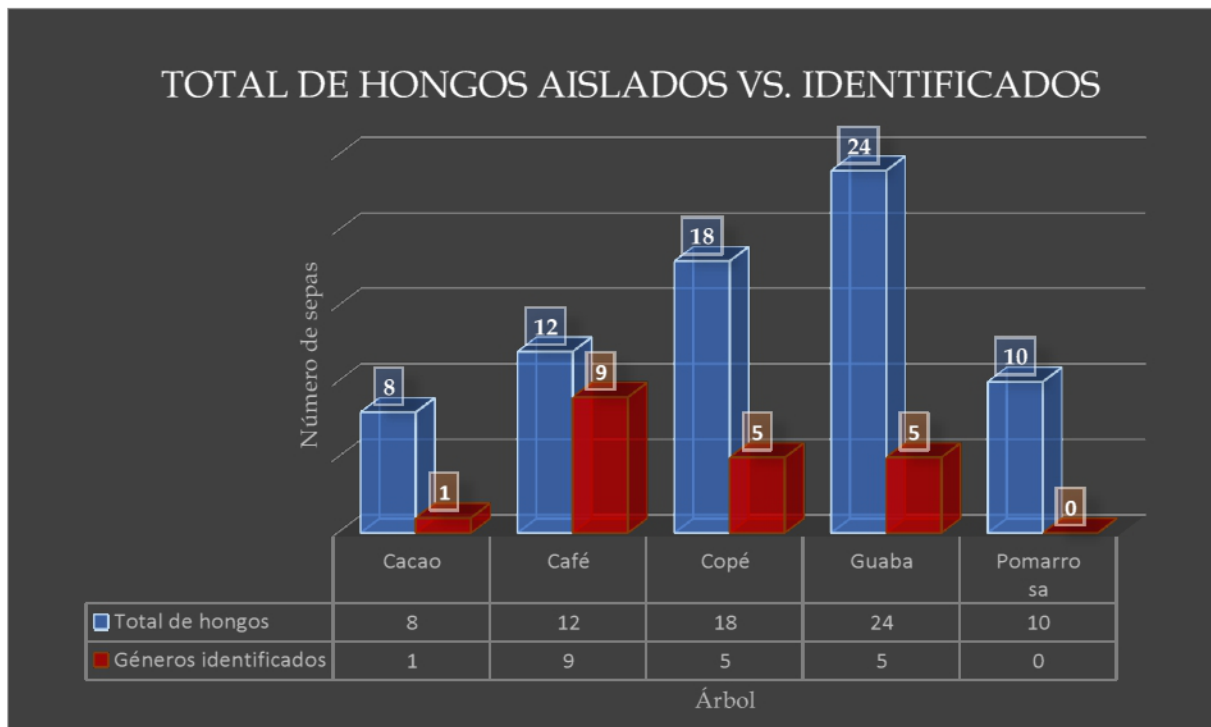
Debemos tener presente que los porcentajes mostrados en la gráfica #2, solo representan la constitución estratificada del total de muestras con micelio estéril dentro del conjunto total de cepas obtenidas a partir de microcultivos, y no representan la frecuencia de cepas con micelio estéril para cada árbol.

Sintetizando los datos de las tablas: #5, #6, #7, #8, #9; podemos agrupar el número de géneros de hongos endófitos identificados para cada individuo de estudio, detallados en la tabla a continuación.

Tabla 10. Número de endófitos identificados por especie de árbol:

| Árbol | Géneros de hongos identificados |
|-----------|---------------------------------|
| Cacao | 1 |
| Café | 9 |
| Copé | 5 |
| Guaba | 5 |
| Pomarrosa | - |

Dado los datos de la tabla anterior, podemos contrastar estos con el total de cepas de endófitos sometidas a microcultivo por cada individuo, como se muestra en la gráfica a continuación.



Gráfica 3. Contraste de hongos endófitos aislados vs. endófitos identificados.

2.2. Géneros identificados:

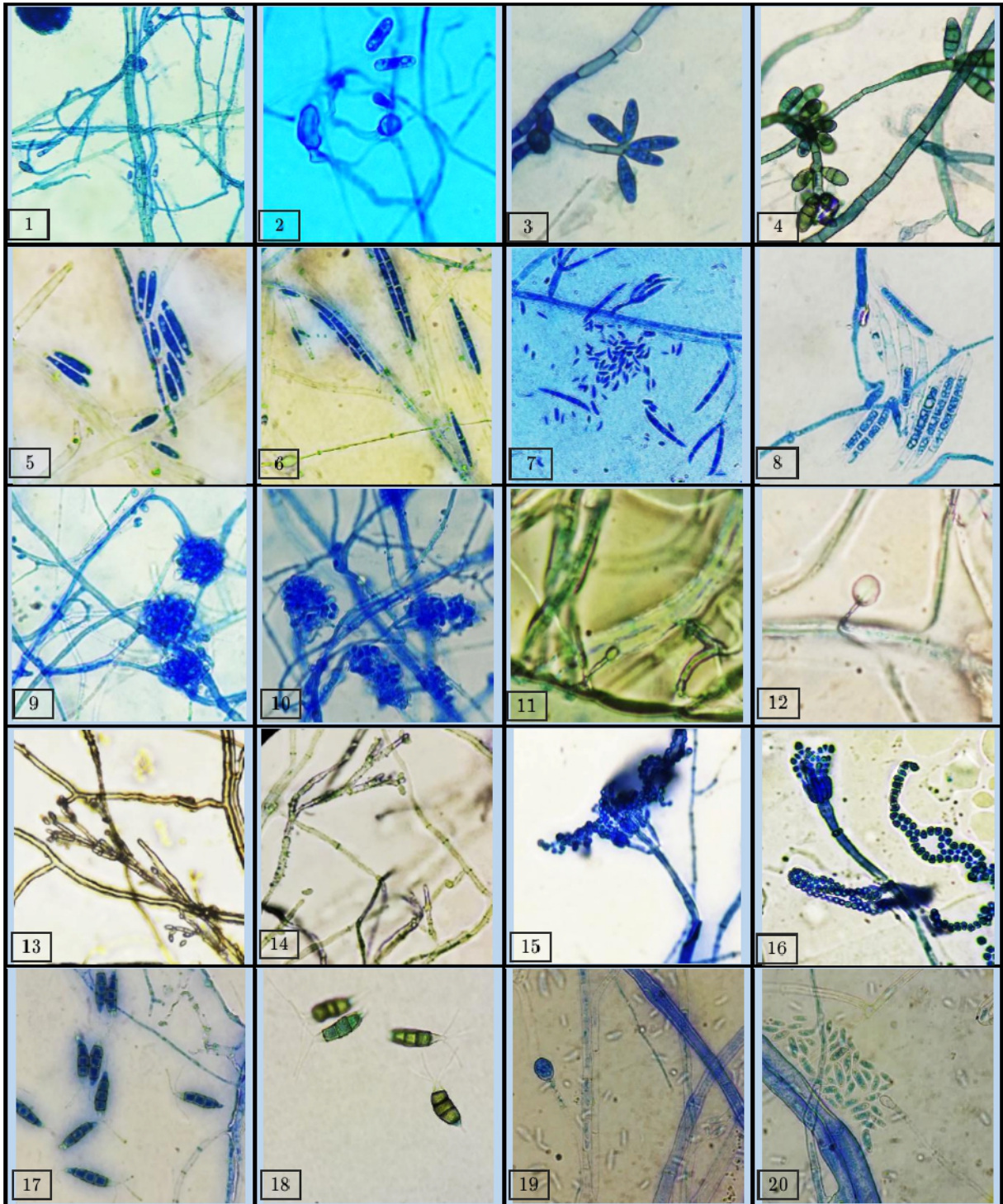
De las 72 cepas de endófitos aisladas en microcultivos, se obtuvieron un total de 11 géneros distintos, cuya distribución se muestra en la tabla a continuación:

Tabla 11 Géneros de las cepas de hongos endófitos aislados por microcultivo.

| Géneros de hongos identificados | Cacao | Café | Copé | Guaba | Pomarrosa |
|---------------------------------|-------|------|------|-------|-----------|
| <i>Colletotrichum</i> | | ■ | ■ | ■ | |
| <i>Curvularia</i> | | ■ | ■ | ■ | |
| <i>Drechslera</i> | | ■ | | | |
| <i>Fusarium</i> | | ■ | ■ | | |
| <i>Gliocladium</i> | | ■ | | | |
| <i>Hemicola</i> | | | ■ | | |
| <i>Nodulisporium</i> | | | | ■ | |
| <i>Penicillium</i> | | ■ | | ■ | |
| <i>Pestalotiopsis</i> | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| <i>Scedosporium</i> | | ■ | | | |
| género X | | ■ | | | |

El cuadro anterior evidencia que: de los 11 géneros de endófitos identificados, el que muestra mayor incidencia entre las 72 cepas aisladas procedentes de las muestras foliares colectadas de los 5 árboles fue: *Pestalotiopsis sp.*, con presencia en 4 de las 5 especies de árboles en estudio. Se denominó "genero X" a la cepa fúngica: *Café A 3c*. Porque a pesar de presentar estructuras reproductivas su identificación al momento no presenta similitud suficiente con diagramas morfológicos que permitan identificarlo.

En la figura #7 se muestran las microfotografías de las estructuras fúngicas que permitieron emplear claves taxonómicas para identificar cada uno de los 11 géneros de hongos endófitos aislados.



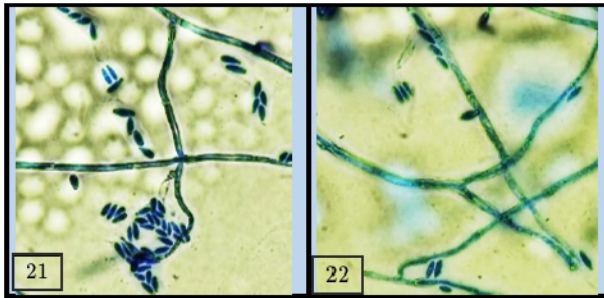


Figura 7. Microfotografías de las estructuras fúngicas identificadas a partir de los microcultivos. (1,2): *Colletotrichum sp.* (3,4): *Curvularia sp.* (5,6): *Drechslera sp.* (7,8): *Fusarium sp.* (9,10): *Gliocladium sp.* (11,12): *Humicola sp.* (13,14): *Nodulisporium sp.* (15,16): *Penicillium sp.* (17,18): *Pestalotiopsis sp.* (19,20): *Scedosporium sp.* (21,22): género X.

Luego de examinadas las cepas por microscopía, se agruparon las muestras por género al que pertenecen: comparando la morfología presentada en cultivo en plato Petri, observándose diferencias en las mismas a pesar de pertenecer a un mismo género; como se muestra en las figuras: #8, #9, #10.



Figura 8. Comparación de morfotipos en cultivos en plato pertenecientes a las cepas de *Colletotrichum sp.* Por: Jonathan Lescure.

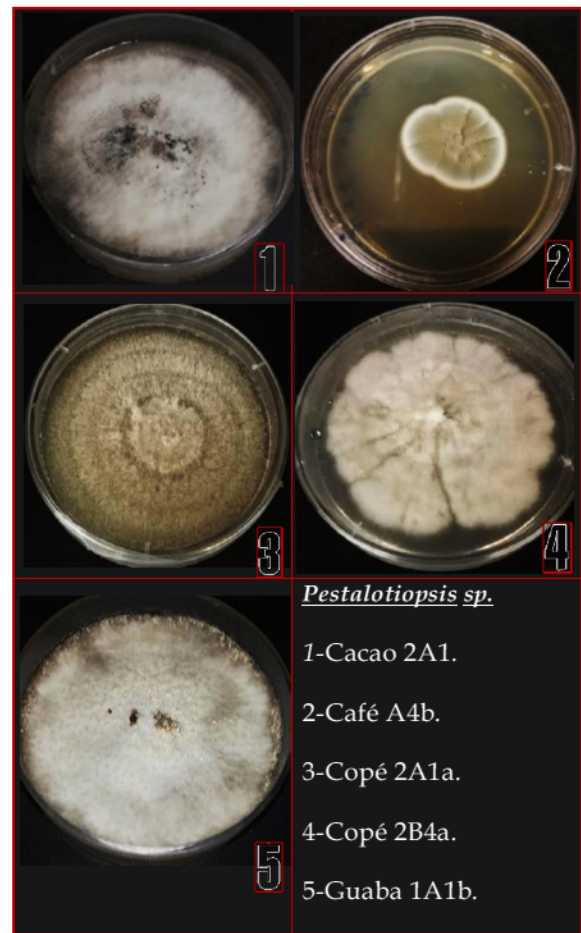


Figura 9. Comparación de morfotipos en cultivos en plato pertenecientes a las cepas de *Pestalotiopsis sp.* Por: Jonathan Lescure.



Figura 10. Comparación de morfotipos en cultivos en plato pertenecientes a las cepas de *Curvularia sp.* Por: Jonathan Lescure.

2.3. Propiedades de los géneros identificados:

Tabla 12. Géneros de las cepas de hongos endófitos aislados por microcultivo.

| Géneros de hongos aislados | Reporte de la actividad fúngica en bibliografías | | | |
|----------------------------|--|-----------|----------|--|
| | Fitopatógeno | Saprófito | Endófito | Biofungicida por metabolitos secundarios |
| <i>Colletotrichum</i> | ■ | | | |
| <i>Curvularia</i> | ■ | ■ | ■ | |
| <i>Drechslera</i> | ■ | | ■ | |
| <i>Fusarium</i> | ■ | ■ | ■ | |
| <i>Gliocladium</i> | | | ■ | ■ |
| <i>Humicola</i> | | ■ | ■ | |
| <i>Nodulisporium</i> | ■ | ■ | ■ | ■ |
| <i>Penicillium</i> | ■ | ■ | ■ | ■ |
| <i>Pestalotiopsis</i> | ■ | ■ | ■ | ■ |
| <i>Scedosporium</i> | | ■ | ■ | |
| Género X | | | ■ | |

Baralt, et al., 2009; Bianchini, C., 1955; Cuervo, et al., 2014; Esquivel, E., 20015; Flores, et al. 2019; Hernández-Medina, C., 2016; Maridueña, M., 2011; Oliveira R. et al., 2014; Salazar, S., 2018; Sánchez R. E., 2016; Urriaga, R., 2011.

La tabla # 12: es un compilado de fuentes e investigaciones con reportes que muestran los diversos comportamientos que pueden presentar los hongos aislados en este proyecto de investigación.

3. Análisis estadístico:



3.1. Simpson: Gracias a los datos del punto #1., podemos calcular la biodiversidad existente dentro del conjunto de cepas procedentes de cada árbol, mediante el índice de Simpson (D), y (1-D) índice de diversidad de Simpson que representa la probabilidad de que dos individuos seleccionados aleatoriamente de una muestra pertenezcan a diferentes especies. Permittiéndonos medir la riqueza de organismos.

Tabla 13. Índice de Simpson (D), Índice de diversidad de Simpson (1-D).

| Géneros de hongos identificados | Cacao | | Café | | Copé | | Guaba | |
|--------------------------------------|-----------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| | N | $n(n - 1)$ | N | $n(n - 1)$ | N | $n(n - 1)$ | N | $n(n - 1)$ |
| <i>Colletotrichum</i> | - | - | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 0 |
| <i>Curvularia</i> | - | - | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| <i>Drechslera</i> | - | - | 1 | 0 | - | - | - | - |
| <i>Fusarium</i> | - | - | 1 | 0 | 1 | 0 | - | - |
| <i>Gliocladium</i> | - | - | 1 | 0 | | - | - | - |
| <i>Humicola</i> | - | - | - | - | 1 | 0 | - | - |
| <i>Nodulisporium</i> | - | - | - | - | - | - | 3 | 6 |
| <i>Penicillium</i> | - | - | 1 | 0 | | - | 1 | 0 |
| <i>Pestalotiopsis</i> | 2 | 2 | 1 | 0 | 4 | 12 | 1 | 0 |
| <i>Scedosporium</i> | - | - | 1 | 0 | - | - | - | - |
| Por identificar | - | - | 1 | 0 | - | - | - | - |
| Total | 2 | 2 | 10 | 2 | 9 | 14 | 7 | 6 |
| $D = \frac{\sum n(n - 1)}{N(N - 1)}$ | 1 | | 0.02 | | 0.19 | | 0.14 | |
| 1 - D | 0% | | 98% | | 81% | | 86% | |

El índice de Diversidad de Simpson calculado para las 4 especies de árboles en las que se pudieron identificar exitosamente las cepas de hongos, deja en evidencia que es el árbol de café quien exhibe la mayor diversidad con un valor de 98%. Siendo el árbol de cacao con un valor de 0% el que presenta la menor diversidad (en este caso sin diversidad) de géneros identificados.

3.2. Margalef: El índice de biodiversidad total, se calculó mediante el índice de Margalef (I) que nos permite calcular la biodiversidad de una comunidad. En nuestro caso: llamamos “comunidad” a nuestro conjunto de 28 cepas identificadas proveniente de los árboles muestreados para esta investigación por pertenecer todos a una misma zona. En consecuencia, el valor de I representa la biodiversidad de endófitos en dicha zona.

$$I = \frac{(11-1)}{\ln 28} \quad I = 3.001$$

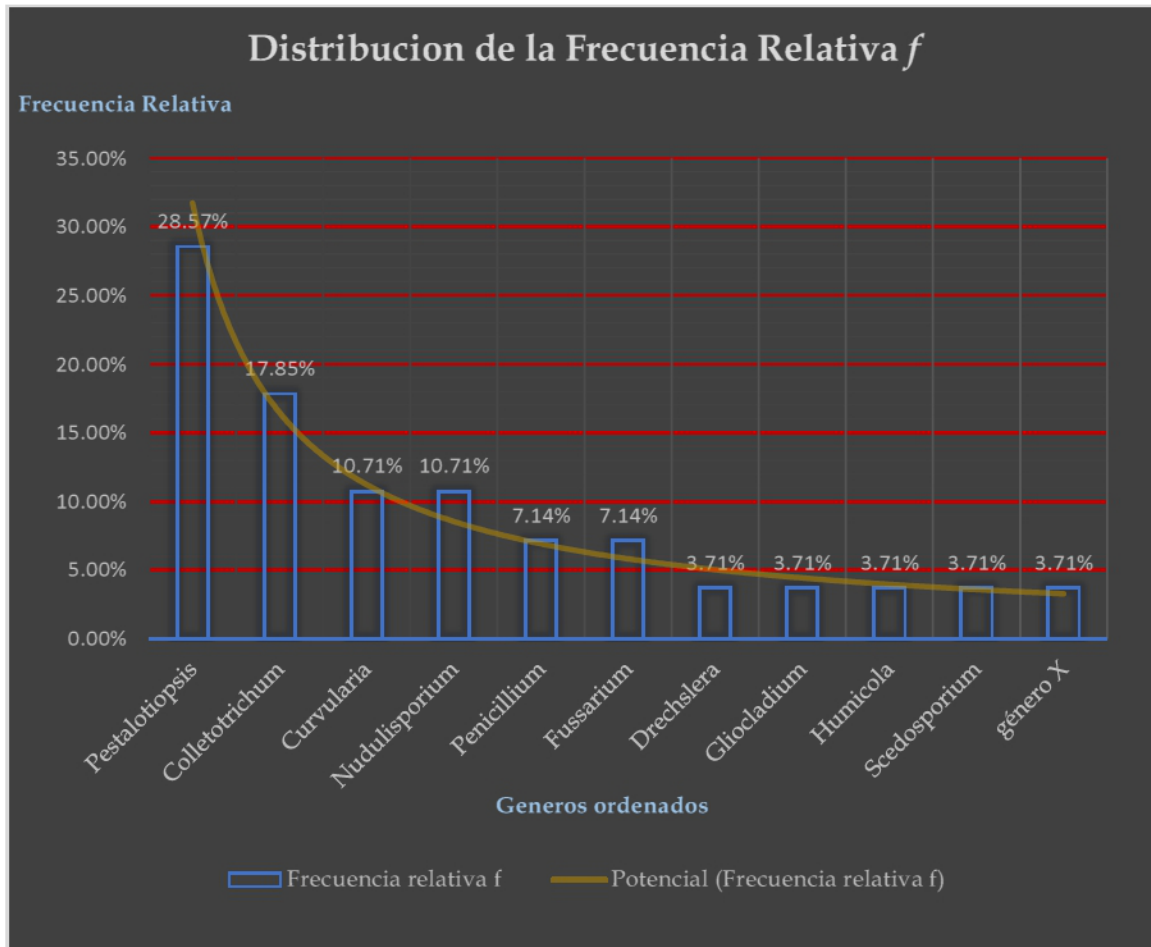
3.3. Frecuencias: Gracias a los datos de número de hongos aislados por género procedentes de la tabla #13. utilizados para calcular el Índice de diversidad de Simpson, podemos extraer el porcentaje de frecuencia relativa, que hace referencia a la proporción presente de un género dentro de la población total de géneros de hongos identificados; con el fin de establecer el género más predominante en la población fúngica. Esta proporción se muestra en la tabla a continuación.

Tabla 14. Frecuencia absoluta y frecuencia relativa de los géneros de hongos identificados.

| Géneros de hongos identificados | Frecuencia absoluta N | Frecuencia relativa f |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>Colletotrichum</i> | 5 | 17.85% |
| <i>Curvularia</i> | 3 | 10.71% |
| <i>Drechslera</i> | 1 | 3.71% |
| <i>Fusarium</i> | 2 | 7.14% |
| <i>Gliocladium</i> | 1 | 3.71% |
| <i>Humicola</i> | 1 | 3.71% |
| <i>Nodulisporium</i> | 3 | 10.71% |
| <i>Penicillium</i> | 2 | 7.14% |
| <i>Pestalotiopsis</i> | 8 | 28.57% |
| <i>Scedosporium</i> | 1 | 3.71% |
| Género X | 1 | 3.71% |
| Total | = 28 | ≈ 100% |

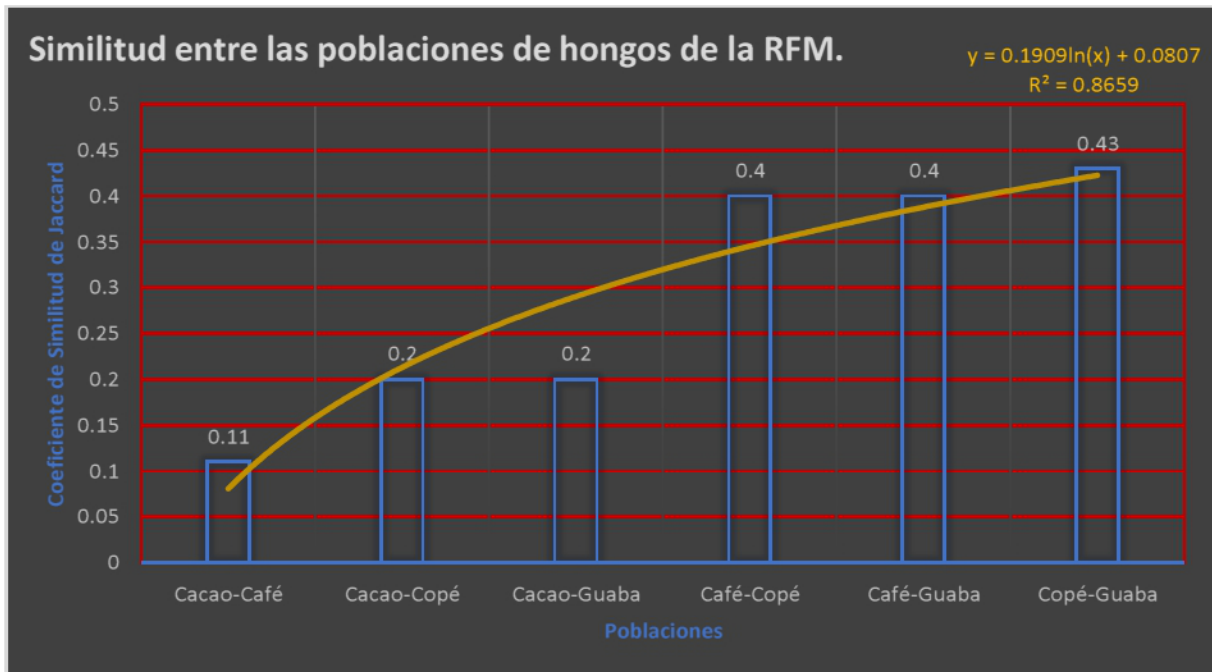
La frecuencia relativa nos ayuda a evidenciar los géneros de hongos con mayor incidencia dentro del conjunto de géneros identificados. Dados los datos de la tabla 14. podemos observar que el género con mayor incidencia es *Pestalotiopsis* con 28%, seguido de *Colletotrichum* con 17.85%. Por el contrario, la menor incidencia de géneros es compartida por: *Drechslera*, *Gliocladium*, *Humicola.*, *Scedosporium.* y género X, con un 3.71% de incidencia (frecuencia relativa).

La grafica #4, a continuación: nos muestra el comportamiento de la frecuencia relativa a través de los géneros de hongos encontrados, lo cual nos brinda una imagen generalizada de la composición de las poblaciones encontradas en las muestras provenientes de la RFM.



Gráfica 4. Distribución de la frecuencia relativa dentro de la población de endófitos identificados

3.4. Similitud entre las poblaciones: La afinidad taxonómica exhibida entre las poblaciones de la comunidad de endófitos, calculada mediante el coeficiente de similitud de Jaccard que oscila entre 0 (sin taxa compartidos) y 1 (todos los taxones compartidos) se expresa en la gráfica a continuación:



Gráfica 5. Similitud entre las poblaciones de hongos de la RFM, mediante el Coeficiente de Similitud de Jaccard.

La similitud entre la composición taxonómica de las 4 poblaciones de endófitos de la comunidad, calculado mediante el I_j muestra valores bajos ($I_j < 0.5$).

V.

 Discusión

A partir de las muestras foliares obtenidas de los 5 árboles en estudio, se lograron aislar un total de 72 cepas de hongos endófitos mediante la técnica de microcultivo, de los cuales se identificaron exitosamente 28 cepas pertenecientes a 11 géneros distintos de hongos. El restante de las cepas aisladas (44), no presentó estructuras reproductivas visibles que permitieran identificar las microestructuras mediante claves taxonómicas. Estos hongos que produjeron micelio estéril, y que representan un 61.1% de las cepas aisladas, no se agruparon por características macroscópicas ni microscópicas, debido a que en ambos aspectos presentaban diferencias entre sí.

Un problema importante es el hecho que muchos hongos endófitos aislados no pueden ser identificados, bien sea porque no esporulan o no pueden ser indudablemente equiparados con especies descritas (Petrini et al., 1995; Gamboa y Bayman, 2001). Muchos microorganismos tienen necesidades de nutrientes complejos y selectivos, que en condiciones normales de laboratorio son difíciles de replicar; Por lo cual es recomendable en futuras investigaciones la realización de análisis moleculares mediante las secuenciaciones de ADN. (Arnold et al., 2000) señala que la alta diversidad encontrada en el microbiota de zonas tropicales, así como lo lento de la identificación tradicional de especies con micelia esterilia, ha obligado a utilizar morfoespecies como unidades taxonómicas operativas.

Las cepas aisladas y observadas a través de microcultivos de *Syzygium jambos* (Pomarrosa), no presentaron microestructuras que hicieran posible su identificación

mediante microscopía. Se estima que los factores antes mencionados jugaron un papel determinante en el crecimiento de dichas cepas, factores que deben ser estudiados a profundidad en posteriores investigaciones. Cabe mencionar que no se estima que el número total de cepas obtenidas por individuo sea un factor a tomar en cuenta para este caso, ya que el número de cepas alcanzadas a partir del árbol de *Theobroma cacao* (cacao) y el de *Coffea arábica* (café), son similares a las obtenidas procedentes del árbol de pomarroza y no exhiben comportamiento similar.

Muchas de las cepas de hongos aisladas presentaron morfotipos diferentes entre sí a nivel macroscópico; tanto en los cultivos de tubos inclinados como en los de plato Petri, a pesar de comprobarse mediante microscopía la pertenencia al mismo género de endófitos. Arias-Jerez (2008), alega que este fenómeno se hace presente dependiendo del medio de cultivo empleado, la variedad de la planta a partir de la cual se aislaron las muestras y el estado de la enfermedad. Mostrando la capacidad de los hongos para producir diferentes pigmentos o formación de estructuras (somáticas o reproductivas) estimulados por los componentes del medio de cultivo.

Los hongos endófitos son un gran recurso de diversidad genética y son capaces de producir metabolitos secundarios novedosos, debido a que crecen en gran variedad de hábitats (Selim et al., 2012; Guzmán-Trampe et al., 2015). Incluso Camargo et al., 2000 se pronuncia al respecto mencionando la influencia que posee sobre los cambios en grosor y color en las hifas. Por lo tanto, no es de sorprender la diversidad de morfotipos

obtenidos de las muestras aisladas, tomando en cuenta que fueron obtenidas de 5 árboles pertenecientes a géneros distintos.

Los hongos identificados dimanantes de las muestras foliares colectadas en la RFM, han sido reportados en gran variedad de especies vegetales incluyendo las estudiadas en esta investigación. (Baralt, et al., 2009; Bianchini, C. 1955; Cuervo, et al., 2014; Esquivel, E. 20015; Flores, et al., 2019; Hernández-Medina, C. 2016; Maridueña, M. 2011; Oliveira R. et al., 2014; Urtiaga, R. 2011). Un total de 28 cepas identificadas, distribuidas en 11 géneros de endófitos foliares. Algunos de estos géneros tienen presencia compartida variable entre las especies vegetales (*Colletotrichum sp.*, *Curvularia sp.*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.* y *Pestalotiopsis sp.*), corroborando lo mencionado por Agrios (2005), señalando que algunos patógenos son capaces de atacar muchas clases (a veces cientos) de plantas hospedantes. Al parecer gracias a que poseen muchos genes diversos para tales fines o su espectro de especificidad es más amplio. También parece que la especificidad de hospedero es menor en las zonas tropicales que en las templadas, aunque los datos son muy escasos y fraccionarios aún (Gamboa-Gaitán., 2006).

De los 11 géneros mencionados, 7 de ellos (*Colletotrichum sp.*, *Curvularia sp.*, *Drechslera sp.*, *Fusarium sp.*, *Nodulisporium sp.*, *Penicillium sp.* y *Pestalotiopsis sp.*) han sido descritos y documentados ampliamente como hongos fitopatógenos para muchas especies vegetales incluidas las 5 estudiadas en esta investigación (Mena Collazo J., et al. 2005; Oliveira R. 2014; Sánchez R. E. 2016; Urtiaga R. 2011).

Infortunadamente los estudios de hongos endófitos y fitopatógenos hasta el momento, son muy escasos para *Clusia divaricata* (copé). Ergo: los reportes de aislamientos de los géneros de hongos mencionados no son abundantes. De los 5 géneros aislados en copé, solo se encontraron reportes en estudios previos de *Pestalotiopsis sp.* (Urutiaga R. 2011).

Si bien, los géneros de endófitos identificados a partir de las muestras aisladas de: cacao, café, copé y guaba; han sido descritos en su mayoría como fitopatógenos. La sola presencia de estos en los tejidos foliares, no es indicativo de sufrir afecciones o si se encuentran en “equilibrio” y no juegan un rol perjudicial. Estos endófitos por lo general están “dormantes” en el interior de la planta, pero pueden tener un rol importante en la defensa de la planta contra patógenos, insectos, mejorar las funciones de absorción de nutrientes, agua, otros (Arnold et al., 2003; Arnold & Engelbrecht. 2007). En consecuencia, para que ambos organismos coexistan se establece entre ellos una relación de antagonismo balanceado, que depende de la virulencia del hongo y de las defensas de la planta (Sánchez, 2016). Estos endófitos pueden volverse patógenos y matar a su hospedero bajo condiciones “favorables” del ambiente para los endófitos (Schulz & Boyle, 2005)

Según la definición de latencia: se refiere a infecciones dormantes, asintomáticas, pudiéndose considerar a los microorganismos en tal situación como endófitos temporales. Gamboa (2006).

La tabla # 12: con su compilado de fuentes e investigaciones de reportes, nos brinda una visión de la amplia capacidad de los hongos endófitos para adaptar su comportamiento y como toman relevancia según dicho papel en el medio.

Humicola sp. a pesar de ser aislado comúnmente en suelos por su actividad saprofita, se asocia a aislamientos en raíces pardas y/o suberizadas de tomates cultivados sin suelo. Su poder patógeno no ha podido ser confirmado hasta el momento (Blancard et al., 2011).

El género *Scedosporium sp.* (en café) se ha reportado como endófito en distintas especies de plantas cultivables, pero no hay reportes de actividad fitopatogena directa ni oportunista a la fecha de este trabajo.

Endófitos comunes como: *Nodulisporium sp.*, se ha reportado como endófito, saprófito o fitopatogeno (Gonzales et al., 2019). Resaltando su extraordinaria capacidad de producción de metabolitos secundarios. Los compuestos aislados de las especies de *Nodulisporium sp.* tienen actividad antifúngica contra fitopatógenos, actividad herbicida, insecticida, alguicida y antibacteriana, así mismo, tienen potencial para ser usados como control biológico de microorganismos fitopatógenos y como productor de biodiesel (Sánchez. 2016).

Estudios con *Gliocladium sp.* han demostrado su eficiencia como agente biológico para el control de hongos, bacterias y nemátodos, todo esto gracias a la enorme cantidad de

metabolitos secundarios que produce y lo transforman en un microorganismo de interés para el descubrimiento de nuevos productos. (Castillo et al., 2015).

El género comúnmente cosmopolita *Fusarium sp.* se reporta en gran variedad de plantas, suelo, líquenes, basura, y hasta en algunos animales, inclusive humanos (Seifert et al., 2011).

Estrada et al., (2004) menciona que el género *Curvularia sp.* agrupa un gran número de especies capaces de ser patógenos facultativos de las plantas y del suelo.

Por otra parte, *Pestalotiopsis sp.* se reporta con frecuencia como fitopatógeno y se conoce también como endófito capaz de producir metabolitos secundarios (Cepero et al., 2012). A pesar de ser frecuentemente aislados como endófitos, se han encontrado saprófitos aislados de suelo y hojas (Guba, 1961). Metabolitos secundarios obtenidos de *Pestalotiopsis sp.* demuestran actividad antifúngica (Strobel et al., 2002; Tejesvi et al., 2007). Actualmente se adelantan múltiples estudios por su papel en la degradación del poliuretano (Ayala, 2015).

Está ampliamente documentado que cepas de una misma especie, pueden exhibir diferentes capacidades para producir toxinas e inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos (Di Pietro et al., 1991; Choi et al., 1999). Según Fernández et al., (2013); esta capacidad de producir compuestos activos que confieren protección a su hospedera contra el ataque de otros patógenos y herbívoros: constituyen una nueva vía

para la obtención de diversos precursores o moléculas novedosas de utilidad en la agricultura y en la medicina.

La relevancia de los hongos identificados en esta investigación de grado, depende las necesidades y enfoque de cada investigador como lo menciona Quispe (2017): algunos representan altos riesgos para la seguridad alimentaria o son modelos de estudio en temas relacionados con factores epidemiológicos y genética vegetal. La mayoría posee mecanismos exitosos de diseminación, variabilidad genética y amplia gama de hospedantes.

Un hongo endófito puede producir metabolitos secundarios que inhiben un patógeno en particular o a otros hongos endófitos. Sin embargo, pueden no inhibir a otros organismos de su mismo entorno (Arnold, A. E. et al., 2003). Esto sumado a otros factores mencionados más adelante, explica la riqueza de géneros obtenidos y la abundancia de individuos por muestra colectada de cada árbol.

Dado nuestros resultados: podemos relacionarla riqueza de hongos dentro de cada hábitat, (en nuestro caso tomando como hábitat cada especie de árbol muestreado) con su abundancia. Esto se logró con el Índice de Simpson: muy utilizado en ecología y que traduce esta relación en biodiversidad de un hábitat (Orellana. 2009). Ya que toma un determinado número de especies presentes en el hábitat y su abundancia relativa. (Pielou. 1969).

La tabla # 13. exhibe altos valores de biodiversidad para las muestras procedentes de: café, copé y guaba ($1-D= 98\%$, 81% , 86% respectivamente), lo cual quiere decir que su composición fúngica es suficientemente heterogénea para considerarse diversa. En cuanto a la conformación de la población de hongos aislados en el árbol de cacao, era de esperar la falta de biodiversidad ($1-D=0\%$), pues esta población solo se conformaba por un solo género de hongos.

Al comparar las poblaciones y sus valores, podemos percibir que se conforman por muchas especies representadas en bajas frecuencias y pocas especies dominantes. Esto coincide con estudios que determinan que las comunidades de hongos, incluidas las de endófitos, siguen una distribución de log-normal, es decir, pocas especies abundantes y muchas especies raras, al igual que sucede con las comunidades de macroorganismos (Gamboa-Gaitán., 2006).

Para comprender la estructura de las poblaciones resultantes de nuestro estudio, debemos observar la frecuencia relativa (probabilidad de encontrar una especie en una unidad muestral particular) de los géneros encontrados. Esta determinación nos muestra los géneros que dan el carácter a nuestras poblaciones y que juegan un papel preponderante en las estimaciones ecológicas. Todo partiendo del hecho de que como lo menciona Sánchez-Márquez (2009): algunas de las especies más comunes aisladas como endófitos son generalistas, capaces de infectar a numerosos huéspedes.

Dados los resultados de la gráfica #4, se evidencia como están estructuradas las poblaciones de hongos; la baja frecuencia que presentan 10 de los 11 géneros aislados,

siendo *Pestalotiopsis sp.* con una frecuencia relativa del 28.57% quien da el carácter predominante entre las cuatro poblaciones resultantes de los aislamientos realizados en la RFM. Lo variable de los géneros encontrados y su baja predominancia ayuda a sustentar lo resultante en los análisis del Índice de Simpson.

Conocida la composición de las 4 poblaciones de hongos aislados en la RFM., es necesario identificar si poblaciones son réplicas unas de otras. Podemos describir la afinidad taxonómica de los hongos aislados entre las diferentes poblaciones mediante el coeficiente de similitud de Jaccard.

La similitud entre la composición de los géneros de hongos aislados en las poblaciones de hongos de la RFM (grafica# 5), mostró valores bajos y alejados de 1 ($I_j < 0.5$), lo que se interpreta como baja similitud entre la composición de las poblaciones, a pesar de compartir entre ellas géneros de hongos en común. Siendo las poblaciones procedentes de los árboles de copé y guaba quienes compartían la mayor afinidad de géneros de hongos aislados ($I_j=0.43$) de entre las poblaciones contrastadas mediante esta herramienta estadística; aun así: su índice no supera un valor mediano ($I_j \geq 5$), manteniéndose en el rango de lo que se considera “baja similitud”.

Estos valores de disparidad entre la composición fúngica de las poblaciones, puede deberse a la dependencia de múltiples factores, incluyendo el huésped vegetal, densidad de plantas, disponibilidad de nutrientes, condiciones ambientales e interacciones con microbiomas externos (hongos del suelo y bacterias) (Porrás-Alfaro et al., 2011).

Determinada la biodiversidad existente en las cuatro poblaciones de hongos, su composición poblacional, carácter y similitud de géneros. Es preciso determinar la biodiversidad de la zona que comparten estas cuatro poblaciones dentro de la RFM. El índice apropiado para determinar la riqueza de géneros en la zona de manera independiente al tamaño de la muestra es el índice de Margalef (I), ya que: puede parecer que un índice apropiado para caracterizar la riqueza de especies de una comunidad sea el 'número total de especies' (S). Sin embargo, es prácticamente imposible enumerar todas las especies de la comunidad, y al depender S del tamaño de la muestra, es limitado como índice comparativo. Margalef (1958).

$I=3.001$ para la zona de muestreo, indica una diversidad media a considerable.

Si bien la composición de las cuatro poblaciones de hongos aislados, son muy diversas con muchos géneros y poca dominancia de los mismos, y que estructuralmente varían las poblaciones entre sí, el valor de la diversidad es medio, esto podría ser un reflejo de las condiciones ambientales y sociales de la zona y el manejo que se le da. Esto corresponde estrechamente con los datos sobre la composición boscosa de la RFM. Que está constituida por bosques semicaducifolios de tierras bajas que ocupan la mayor parte de la vegetación boscosa remanente. Los sectores de bosque mejor conservado aparecen en varios parches separados, de los cuales el mayor es el que rodea la cima del macizo de El Montuoso. También hay numerosos parches de esta clase de vegetación hacia los límites de la reserva, donde se mezclan con potreros, rastrojos y plantaciones forestales. Bosque perennifolio ombrófilo tropical latifoliado submontano

y bosque perennifolio ombrófilo tropical latifoliado nuboso, están restringidos a las cimas y laderas por encima de los 700m de altitud. (Biota Panamá, 2007.) En la actualidad sólo la cubren unas 2,833 hectáreas de bosques maduros. Su clima es tropical lluvioso, con dos zonas de vida: bosque muy húmedo premontano y bosque muy húmedo tropical (Garibaldi, & Arcia 2016).

Aunque el índice no es bajo, la multiplicidad de factores que producen valores bajos de biodiversidad como: comunidades transitorias, explotadas o bajo condiciones ambientales muy fluctuantes; amenazan la RFM. Por lo cual el índice de Margalef ($I=3.001$) describe acertadamente las condiciones de biodiversidad de la zona estudiada.

El estudio de los hongos fitopatógenos es una herramienta ecológica importante por el papel ecológico que juegan, como lo menciona Forest et al., (2015): Los hongos parásitos contribuyen a mantener una diversidad elevada de especies de animales y plantas lo que es importante para la estabilidad de los ecosistemas y su capacidad de recuperarse después de ser perturbados.

A pesar de que estudios anteriores al año 2000, censaron una media de aproximadamente 50 especies de endófitos por cada especie de planta analizada (Stone et al., 2004). Posteriores estudios con métodos moleculares elevo esta cifra al poder identificar especies con micelia esterilia (Arnold et al., 2000; Guo et al., 2000).

Empero, la metodología de colecta y posterior sembrado en medio de cultivo, presenta una gran limitante como lo mencionan Fuhrman y Campbell, (1998): no todos los microorganismos crecen en medios artificiales. Ergo los esfuerzos por seguir los protocolos apropiados que la literatura recomienda no logran la detección de todos los endófitos presentes en la muestra inicial, que según Gamboa (2006) conlleva a una subestimación de la diversidad microbiana endófito.

En consecuencia, el valor del índice de Margalef solo constituye una herramienta (importante) para observar cambios en los sistemas bióticos de la RFM mediante el aislamiento de hongos endófitos y fitopatógenos pertenecientes a la zona, debido a que son susceptibles a la influencia que ejerce el ambiente sobre su metabolismo como: nutrición, humedad, temperatura, luz, acidez y alcalinidad del sustrato (Subero; 2001). Estas son repercusiones fisiológicas que pueden conferir al organismo hospedante, resistencia o susceptibilidad al estrés ambiental entre otros, que son capaces de producir cambios en escalas mayores sobre las poblaciones de árboles y por consecuencia en el paisaje y toda la cadena trófica del bosque.

VI.

onclusión

El mes de febrero de 2018 se realizó con éxito el muestreo de partes foliares procedentes de 5 árboles de interés comercial: *Syzygium jambos* (pomarrosa), *Theobroma cacao* (cacao), *Clusia rosea* (copé), *Inga punctata* (guaba), *Coffea Sp.* (café); Presentes en la Reserva Forestal El Montuoso. Encontrando en dichas muestras presencia de ± 6 géneros distintos de hongos endófitos y fitopatógenos.

Se lograron aislar un total de 72 cepas de hongos utilizando técnicas de: cultivos en platos, agar inclinado y microcultivos; de las cuales se lograron identificar 28 cepas que correspondieron a un total de 11 géneros distintos. Entre los que predominan fitopatógenos; seguido por la presencia de algunos géneros saprófitos y biocontroladores por metabolitos secundarios.

Mediante el índice de Diversidad de Simpson calculado para las 4 especies de árboles en las que se identificaron exitosamente hongos endófitos, las diversidades encontradas en orden de magnitud decreciente son: Café 98%, Guaba 86%, Copé 81% y el árbol de cacao con un valor de 0% de diversidad de géneros identificados.

Adicional estimó la biodiversidad de géneros fúngicos encontrados en la zona de colecta a través de las muestras procedentes de las partes foliares de los 5 árboles. Dicho valor calculado mediante el índice de biodiversidad de Margalef (I), es igual a 3.001, representativo de ecosistemas tropicales con actividad antropogénica y que se considera un valor medio de diversidad.

Se elaboró una guía ilustrada (atlas) con los datos más relevantes de los géneros de hongos encontrados en los árboles de la Reserva Forestal El Montuoso. Dicha guía pretende ser un elemento introductorio de base a futuras investigaciones que logren ampliar el conocimiento de la diversidad existente en la zona.

Los hongos aislados en este trabajo de grado fueron conservados en agua estéril y almacenados en viales con la descripción de la muestra a 25 °C, con la finalidad de posteriores estudios que permitan ampliar y contrastar el conocimiento sobre los endófitos y fitopatógenos aislados en la Reserva Forestal El Montuoso, mediante técnicas de identificación taxonómicas basadas en pruebas moleculares de secuenciación de ADN o determinar la presencia de metabolitos secundarios mediante pruebas de antagonismo.

VII.

ibliografía

1. AGRIOS, G. N. 2002 Fitopatología. Ed. Limusa. Méjico. 838 pág.
2. AGRIOS, G. N. 2005. Fitopatología, 2da edición. México, Limusa, 952 pág.
3. ANAM. 2010. Línea base de la reserva forestal Montuoso. Gobierno de la República de Panamá. 48 pág.
4. ANAM. 2014. Quinto informe nacional de biodiversidad de Panamá ante el convenio sobre diversidad biológica. 114 pág.
5. ANCON. 2017. Catálogo de plantas nativas con potencial para biocomercio y bioprospección de la Reserva Natural Privada Punta Patiño, Darién - Panamá. Ministerio de Ambiente, GIZ, PNUD, GEF, IDIAP, Panamá. 56 pág.
6. ARENAS, R. G. 2008. Micología Médica Ilustrada, 3ra Edición. UAM, Secretaría de Salud. 464 pág.
7. ARIAS, E. Y PIÑEROS, P. 2008. Aislamiento e identificación de hongos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde. Pontificia Universidad Javeriana De Ciencias. Bogotá. 204 pág.
8. ARIAS, J. Y JEREZ, A. 2008. Elaboración de un atlas para la descripción macroscópica y microscópica de hongos fitopatógenos de interés en especies de flores de corte cultivadas en la sabana de Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana. 156 pág.
9. ARNOLD, A. E., & ENGELBRECHT, B. M. J. 2007. Fungal endophytes nearly double minimum leaf conductance in seedlings of a neotropical tree species. *Journal of Tropical Ecology*, 23(3), 369-372 pág.
10. ARNOLD, A. E., L. MEJÍA, D. KYLLO, E. ROJAS, Z. MAYNARD & E. A. HERRE. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 6 pág.
11. ARNOLD, A. E., MAYNARD, Z., GILBERT, G. S., COLEY, P. D. & KURSAR, T. A. 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters* 3:267-274 pág.

12. ARNOLD, A. E. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*. 51-66 pág.
13. AYALA, L. 2015. Estudios en degradación de poliuretano con hongos endófitos del género *Pestalotiopsis*. 37 pág.
14. BARALT, A., FERNÁNDEZ, R., SOSA, D., IZTÚRIZ, M., PARRA, D. Y PÉREZ, S. 2012. Identificación preliminar de hongos endófitos cultivables presentes en hojas y frutos de cacao. Laboratorio de Fitopatología. Instituto de Estudios Avanzados (IDEA) Venezuela. 9 pág.
15. BIANCHINI, C. 1955. Las llagas del café en Costa Rica. *Revista de biología tropical*. 31 pág.
16. BIOTA PANAMÁ. 2007. Vegetación y flora de la Reserva Forestal El Montuoso. <https://biota.wordpress.com/2007/07/07/vegetacion-y-flora-de-la-reserva-forestal-el-montuoso/>.
17. BLANCARD, D., LATERROT, H., MARCHEOUX, G., CANDRESSE, T. 2011. Enfermedades del tomate. Identifica, conocer, controlar. Madrid y México, 671 pág.
18. CABRAL. E., ROMERO. F., SOBRADO. S. 2013. Hongos Diversidad Vegetal. Universidad Nacional Del Noreste. 43 pág.
19. CAMARGO, I., BIEBERACH, F., VILLALOBOS, A., GONZALEZ, P., 2016. Estado de la biodiversidad para la alimentación y la agricultura en Panamá. 284-285 pág.
20. CAMARGO, S.; GARCÍA, V. Y MUCIÑO, R. 2000. ¿Qué es la fitopatología? Hongos fitopatógenos del crisantemo [*Dendranthema morifolium* (Ramat.) Tzvelev], un estudio de caso. *Contactos*. vol. 37, 22 pág.
21. CASTELLANI, A. 1939. Viability of Somen Pathogenic Fungi in Distilled Water. *J*. 226 pág.
22. CASTILLO, H; ROJAS, R; VILLALTA, M. 2015. *Gliocladium sp.*, agente biocontrolador con aplicaciones prometedoras. *Tecnología en Marcha*. Edición Especial Biocontrol. 65-73 pág.

23. CEPERO, M., RESTREPO, S., FRANCO-MOLANO, A., CÁRDENAS, M. Y VARGAS, N. 2012. Biología de hongos. 520 pág.
24. CHOI K., YOUNG C., AN S., YOOK B. 1999. Effects of antagonistic bacteria and soil borne pathogenic fungi on growth of pasture plant seedlings. Korean Journal of Dairy Science 21:41-48 pág.
25. CINCOTTA, R.P., J. WISNEWSKI & R. ENGELMAN. 2000. Human population in the biodiversity hotspots. Nature 404, 990-992 Pág.
26. CODESA. 2004. Plan de Manejo de la Reserva Forestal el Montuoso. 84 pág.
27. CONADES, 2018. Estrategia de desarrollo sostenible de la provincia de Herrera. Ministerio de Presidencia. 132 pág.
28. COOK, R.J. & BAKER, K.F. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minn. 539 pág.
29. CUERVO, J., ROMERO, T., LÓPEZ, P., RAMÍREZ, M. 2014. El cultivo del cacao, enfermedades, identificación de hongos, modelado y métodos de control. UNCa. 8 pág.
30. DI PIETRO D., GUT M. R., PACHLATKO J. P., SCHWINN A. 1991. Role of antibiotics produced by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Pythium ultimum*, a causal agent of damping-off. Phytopathology 82:131-135 pág.
31. ESQUIVEL, E. 2015. Observaciones sobre la flora micológica del filoplano de *Coffea sp.* Infectado de la Roya (*Hemileia vastatrix*) en Panamá. Agro Ciencias Panamensis. <http://agrociencia-panama.blogspot.com/2015/06/observaciones-sobre-la-flora-micologica.html>.
32. ESTRADA, G., SANDOVAL, I. 2004 Patogenicidad de especies de *Curvularia* en arroz Fitosanidad. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Ciudad de La Habana. vol. 8, núm. 23-26 pág.
33. FISHER P.J., GRAF F., PETRINI L.E., SUTTON B.C. AND WOOKEY P.A. 1995. Fungal endophytes of *Dryas octopetala* from a high arctic polar semidesert and from the Swiss Alps. Mycologia. 319-323 pág.

34. FLORES, L., GALINDO, E., GONZÁLEZ, A., OCHOA, Y., RODRÍGUEZ, R., SÁNCHEZ, A. 2019. Primer informe de *Nodulosporium* (*Xylariaceae*) en *Theobroma cacao* L. en Chiapas, México y pruebas de patogenicidad. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas volumen 10 número 4. 10 pág.
35. FOREST, F., CRAVEN, D., CONNOLLY, J., LOREAU, M., et al., SCHMID, B., NIKLAUS, PA. 2015. Biodiversity increases the resistance of ecosystem productivity to climate extremes . University of Zurich. 574-577 pág.
36. FREEMAN S. Y RODRIGUEZ R.J. 1993. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. Science, 260: 75-78 pág.
37. FUHRMAN J., CAMPBELL L. 1998. Marine Ecology: Microbial Microdiversity. Nature. 410-411 pág.
38. GAMBOA MA, BAYMAN P. 2001. Communities of Endophytic Fungi in Leaves of a Tropical Timber Tree (*Guarea guidonia*). Biotropica.352-360 pag.
39. GAMBOA-GAITÁN, M. 2006. Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. 205 pág.
40. GARIBALDI, C. Y ARCIA G., D. 2016. Bienes y servicios ecosistémicos, y su percepción social en la reserva forestal el Montuoso. 59-74 pág.
41. GILBERT, G.S., HUBBELL, S.P. & FOSTER, R.B. 1994. Density and distance-to-adult effects of a canker disease of tres in a moist tropical forest. Oecologia. 100-108 pág.
42. GONZÁLEZ, A., SÁNCHEZ, A., OCHOA, Y., GALINDO, M., RODRÍGUEZ, R. Y FLORES, L. 2019. Primer informe de *Nodulosporium* (*Xylariaceae*) en *Theobroma cacao* L. en Chiapas, México y pruebas de patogenicidad. Departamento de Parasitología-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 10 pág.
43. GUBA, E. F. 1961. Monograph of Monochaetia and Pestalotia, Harvard University Press, Cambridge. 342 pág.
44. GUO, L.D., HYDE, K.D. & LIEW, E.C.Y. 2000. Identification of endophytic fungi from *Livistonia chinensis* base don morphology and rDNA sequences. New Phytologist. 147: 617-630 pág.

45. GUZMÁN-TRAMPE, S., RODRÍGUEZ-PEÑA, K., ESPINOSA-GÓMEZ, A., SÁNCHEZ- FERNÁNDEZ, ROSA E. MACÍAS-RUBALCAVA, M.L., FLORES-COTERA, L.B. & SANCHEZ, S. 2015. Endophytes as a potential source of new antibiotics. In S. Sanches & A. L. Demain, eds. *Antibiotics Current Innovations and future Trends*. Norfolk, UK. Caister Academic Press. 206 pág.
46. HECKADON-MORENO, S. 2009. *De selva a potreros: la colonización Santeña en Panamá: 1850-1980*. Exedra Books, Panamá. 300 pág.
47. HERNÁNDEZ-MEDINA, C. 2016. *Especies de Fusarium y Penicillium asociadas a frutales en los departamentos del Cauca y Valle de Cauca, Colombia*. Universidad Nacional de Colombia. 163 pág.
48. HIDROPONÍA ROSARIO. 2015. *Enfermedades y plagas*. <https://www.hidroponiarosario.com/enfermedades-y-plagas/>. 1 pág.
49. HIGGINS, K.L., ARNOLD, A.E., MIADLIKOWSKA, J., SARVATE, S.D. AND LUTZONI, F. 2007. Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 543-555 pág.
50. JUÁREZ-BECERRA, G. P., SOSA-MORALES, M. E., LÓPEZ-MALO, A. 2010. Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos Vol.4*, 14-23 pág.
51. KONEMAN E, Y ROBERTS G. 1987. *Micología practica de laboratorio*. 3a edición, buenos aires, editorial medica panamericana.221 pág.
52. KUSARI, S., PANDEY, S.P. & SPITELLER, M. 2013. Untapped mutualistic paradigms linking host plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites. *Phytochemistry*. 81-87 pág.
53. LODGE, J. 2001. *Diversidad mundial y regional de hongos*. Instituto De Biología. Universidad Nacional Autónoma De México. 16 pág.
54. MANZO-SÁNCHEZ, G., CANTO-CANCHÉ, B., JAMES-KAY, A. 2005. *Hongos patógenos: enemigos versátiles*. 5 pág.
55. MARGALEF, D.R. 1958. Information Theory in Ecology. *General Systematics*, 3: 36-71 Pág.

56. MARIDUEÑA, M. 2011. Estudio de la microbiota patogénica de “cacao criollo” (*Theobroma cacao*) en cinco provincias de la costa ecuatoriana y evaluación de la efectividad in vitro de los viroles locales para su control. Escuela Superior Politécnica Del Litoral, Ecuador. 154 pág.
57. MAY, R.M. 1980. How many species? Philosophical Transactions of the Royal Society of London B. 293-304 pág.
58. MAY, R.M. 1988. How many species are there in Earth? Science. 1441-1449 pág.
59. MENA COLLAZO J., MENA PORTALES J., PONS PENABAD R. 2005. Estrategia de Conservación de la Diversidad Fúngica en Cuba. <http://www.cybertruffle.org.uk/cubacons/Index.html>
60. MINISTERIO DE AMBIENTE. 2017. Informe final del mapa de cobertura y uso de la tierra 2012, Resolución N° DM-0067-2017. Gobierno de la República de Panamá. 90-92 pág.
61. MINISTERIO DE AMBIENTE. 2019. Gaceta oficial Panamá, R. de Panamá martes 02 de abril de 2019. Decreto Ejecutivo N° 20 (De jueves 28 de marzo de 2019) que aprueba la Estrategia Nacional Forestal 2018-2050. Gobierno de la República de Panamá. 76 pág.
62. MORENO, R. 2018. Diversidad fúngica en *Pinus radiata* en función de la distancia al punto de inoculación con *Fusarium circinatum*. 103 pág.
63. OLIVEIRA R., SOUZA R., LIMA T & CAVALCANTI M. 2014. Endophytic fungal diversity in coffee leaves (*Coffea arabica*) cultivated using organic and conventional crop management systems. *mycosphere*/5/4/4. 523-530 pág.
64. ORELLANA, J. 2009. Determinación de índice de diversidad florística arbórea en las parcelas permanentes de muestreo del valle de Sacta. Universidad Mayor De San Simón. Bolivia. 49 pág.
65. PETRINI O., PETRINI LE, RODRIGUES K. 1995. Xylariaceous endophytes: An Exercise in Biodiversity. *Fitopatol Bras.* 531-539 pág.
66. PIELOU E. 1969. An Introduction to Mathematical Ecology. Wiley Interscience. New York, EE.UU. 98 pág.

67. PIELOU E. 1975. Ecological diversity. John Wiley & Sons, New York. 165 pág.
68. Piepenbring, M. 2006 . checklist fungi Panamá Puente Biológico. Botanical Institute, J.W. Goethe-Universität Frankfurt am Main, 60054 Frankfurt am Main, Germany. 384 pág.
69. PORRAS-ALFARO A., PAUL BAYMAN P. 2011. Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. Annu. Rev. Phytopathol. 2011. 49:291–315 pág.
70. PORRAS-ALFARO, A., HERRERA, J., SINSABAUGH, R.L., ODENBACH, K.J., LOWREY, T. AND NATVIG, D.O. 2008. Novel root fungal consrtium associated with a dominant desert Grass. Applied and Experimental Microbiology. 2805-2813 pág.
71. PROMPUTTHA, I., LUMYONG, S., DHANASEKARAN, V. *et al.* 2007. A Phylogenetic Evaluation of Whether Endophytes Become Saprotrophs at Host Senescence. *Microb Ecol* **53**, 579–590 pág.
72. Quispe, F. 2017. The Top 10 fungal pathogens. Molecular Plant Pathology. <https://www.zamorano.edu/2017/07/07/los-10-hongos-mas-relevantes-fitopatologia/>.
73. REGUEIRA-PAZ, N. 2017. Detección e identificación de hongos fitopatógenos y antagonistas en muestras. 32 pág.
74. ROMÁN, F.; DE LIONES, R.; SAUTU, A.; DEAGO, J., HALL, J. 2012. GUIA PARA LA Propagación de 120 especies de árboles nativos de Panamá y el neotrópico. Smithsonian Tropical Research Institute Panamá. 163 pág.
75. SAIKKONEN, K. 2007. Forest structure and fungal endophytes. Fungal Biology Reviews.67–74 pág.
76. SALAZAR, S., 2018. Aislamiento e identificación de cepas fúngicas de *Stanhopea tigrina* productoras de giberelinas con efecto benéfico para la orquídea. Benemérita Universidad Autónoma De Puebla. 156 pág.
77. SÁNCHEZ R. E. 2016. Actividad antagónica, antifúngica y fitotóxica de hongos endófitos de *Gliricidia sepium* (Fabaceae): identificación de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a. UNAM. 231 pág.

78. SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, R., SÁNCHEZ-ORTIZ, B., SANDOVAL, Y., ULLOA, A., ARMENDÁRIZ, B., GARCÍA, C. Y MACÍAS, M. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, UNAM. 16(2):132-146 pág.
79. SÁNCHEZ-MÁRQUEZ, M.S. 2009. estudio de la micobiota endofítica asociada a las gramíneas *Dactylis glomerata*, *Holcus lanatus*, *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus*. Universidad De Salamanca, Facultad de biología. 272 pág.
80. SCHULZ, B. AND BOYLE, C. 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research*. 661-686 pág.
81. SEIFERT KA, MORGAN-JONES G, GAMS W & KENDRICK B. 2011. The genera of Hyphomycetes. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Países Bajos. 997 pág.
82. SELIM, K., EL-BEIH, A., ABDEL-RAHMAN, T. & EL-DIWANY, A. 2012. Biology of Endophytic Fungi. *Curr. Res. Environ. Appl. Mycol.*, 82 pág.
83. SIMPSON, E.H. 1949. Measurement of Diversity. *Nature*, 163: 688 pág.
84. SMITHSONIAN TROPICAL RESEARCH INSTITUTE. 2020. Árboles, Arbustos y Palmas de Panamá. <http://ctfs.si.edu/webatlas/maintreeatlas.php>.
85. STONE, J.K., POLISHOOK, J.D., AND WHITE, J.F. 2004. Endophytic fungi. In: *Biodiversity of Fungi: Inventory and monitoring methods* (eds. G.M. Muller, G.F. Bills and M.S. Foster). Elsevier Academic Press, USA. 241-270 pág.
86. STROBEL, G. A. 2002. Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnology*. 315-333 pág.
87. SUBERO, L. 2001. Los Hongos: Su Morfología, Reproducción y Fisiología. 46 pág.
88. TEJESVI M., KINI K., PRAKASH H., SUBBIAH V., SHETTY H. 2007. Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. *Fungal Divers* 24:37-54 pág.

89. URBINA, C. M. 2011. Enfermedades causadas por hongos, fitopatología general, Universidad agropecuaria del trópico seco, Estelli. 21 pág.
90. URTIAGA, R. 2011. Índice de enfermedades y desordenes en plantas de Venezuela. 280 pág.
91. ZAK, J.C., WILLIG M.R. 2004. Fungal Biodiversity Patterns. Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods, 59-75 pág.

VIII.



1. Descripción taxonómica:

A continuación, una tabla que agrupa los todos los géneros fúngicos identificados en esta investigación de grado, y muestra su agrupación taxonómica.

Tabla 17. Clasificación taxonómica de los hongos identificados.

| Filo | Clase | Orden | Familia | Género |
|-------------------|------------------------|----------------------|--------------------------|-----------------------|
| <i>Ascomycota</i> | <i>Sordariomycetes</i> | <i>Glomerellales</i> | <i>Glomerellaceae</i> | <i>Colletotrichum</i> |
| <i>Ascomycota</i> | <i>Euascomycetes</i> | <i>Pleosporales</i> | <i>Pleosporaceae</i> | <i>Curvularia</i> |
| <i>Ascomycota</i> | <i>Dothideomycetes</i> | <i>Pleosporales</i> | <i>Pleosporaceae</i> | <i>Drechslera</i> |
| <i>Ascomycota</i> | <i>Sordariomycetes</i> | <i>Hypocreales</i> | <i>Nectriaceales</i> | <i>Fusarium</i> |
| <i>Ascomycota</i> | <i>Sordariomycetes</i> | <i>Hypocreales</i> | <i>Hypocreaceae</i> | <i>Gliocladium</i> |
| <i>Ascomycota</i> | <i>Sordariomycetes</i> | <i>Sordariales</i> | <i>Chaetomiaceae</i> | <i>Humicola</i> |
| <i>Ascomycota</i> | <i>Sordariomycetes</i> | <i>Xylariales</i> | <i>Xylariaceae</i> | <i>Nodulisporium</i> |
| <i>Ascomycota</i> | <i>Euascomycetes</i> | <i>Eurotiales</i> | <i>Trichomaceae</i> | <i>Penicillium</i> |
| <i>Ascomycota</i> | <i>Sordariomycetes</i> | <i>Xylariales</i> | <i>Amphisphaeriaceae</i> | <i>Pestalotiopsis</i> |
| <i>Ascomycota</i> | <i>Sordariomycetes</i> | <i>Microascales</i> | <i>Microascaceae</i> | <i>Scedosporium</i> |

2. Guía descriptiva (atlas) de los géneros fúngicos identificados:

El siguiente Atlas es un compendio de las fotos (macro y micro) más representativas con sus correspondientes descripciones por géneros reportados en esta investigación, con la finalidad de aportar información de rápido acceso a futuras investigaciones a realizar en la RFM y que puede ampliarse con los aportes de otros investigadores.

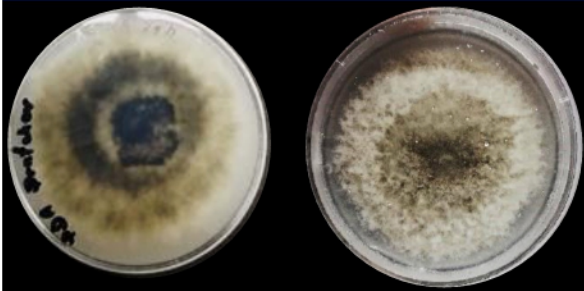
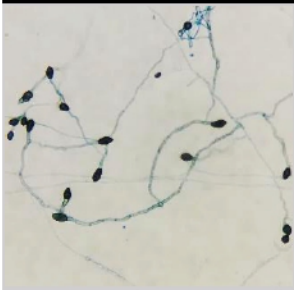

| <i>Colletotrichum sp.</i> | |
|---|--|
| FOTO/ESQUEMA | DESCRIPCION |
|  | <ul style="list-style-type: none"> • Colonias: crecimiento radial, halos concéntricos, color variable. • Micelio: blanco/gris, algodonoso, denso. Color café- rosado- salmón (en cuerpo fructífero). |
|  | <ul style="list-style-type: none"> • Cuerpos fructíferos asexuales cerrados, setosos, en forma de cojines, ubicados en o cerca de la epidermis, que abren en forma irregular. • 7-20 μm x 2,5 a 5μm. |
|  | <ul style="list-style-type: none"> • Estroma basal de color marrón oscuro a incoloro. células poliédricas, casi del mismo diámetro y sin espacios entre ellas. |

Figura 11. *Colletotrichum sp.* Fotografías de la cepa fúngica Copé Y4b. Aislamiento procedente del árbol de Copé en la RFM. Por: Jonathan Lescure.

Curvularia ps.

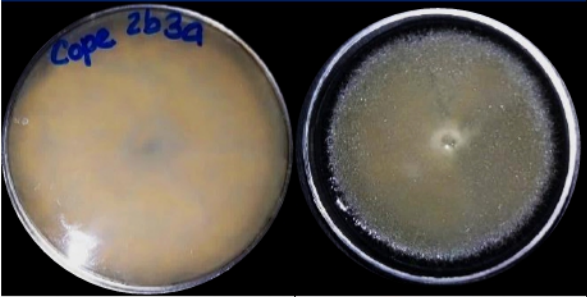
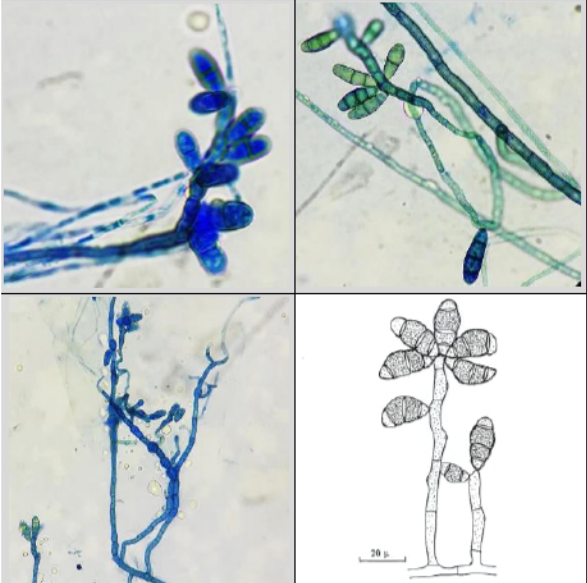
| FOTO7ESQUEMA | DESCRIPCION |
|--|---|
|  | <ul style="list-style-type: none">• Color de la colonia inicialmente blanco a grisáceo y se convierte en pardo oliva o negro a medida que la colonia madura.• El reverso de la colonia es siempre de color oscuro, pardo o negro. |
|  | <ul style="list-style-type: none">• Hifas: septadas, pardo, con conidióforos simples o ramificados y conidias.• conidióforos curvados en los puntos donde se origina la conidia (crecimiento simpodial geniculado).• Conidias (8-14 x 21-35 μm), también denominadas poroconidias, arerectas o poriformes, pardas, con múltiples tabiques y poseen una protuberancia basal oscura.• Septos transversales dividen cada conidio en múltiples células.• Célula central típicamente oscura y más grande. El tabique central puede aparecer también más oscuro que los otros.• El hinchamiento de la celda central, da al conidio un aspecto curvo. |

Figura 12. *Curvularia sp.* Fotografías de la cepa fúngica Copé 2B3a. Aislamiento procedente del árbol de Copé en la RFM. Por: Jonathan Lescure.

| <i>Drechslera sp.</i> | |
|--|--|
| FOTO/ESQUEMA | DESCRIPCION |
|  | <ul style="list-style-type: none"> • Colonias: de crecimiento rápido. • Textura: gamuza a suave. • Color: marrón a marrón negruzco con reverso negro. |
|  | <ul style="list-style-type: none"> • Conidios: de color marrón pálido a marrón oscuro, generalmente cilíndricos o subcilíndricos, rectos, de paredes lisas. • Se forman apicalmente a través de un poro (poroconidios) en un conidióforo geniculado que se alarga de forma simultánea. • Conidios son septados transversalmente (fragmaconidios), con el tabique delimitando la célula basal formada primero durante la maduración del conidio. • La germinación es de cualquiera o de todas las células y el hilio no es protuberante |

Figura 13. *Drechslera sp.* Fotografías de la cepa fúngica Café 3Ab. Aislamiento procedente del árbol de Café en la RFM. Por: Jonathan Lescure.

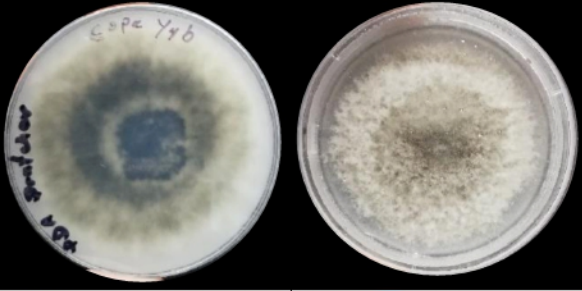
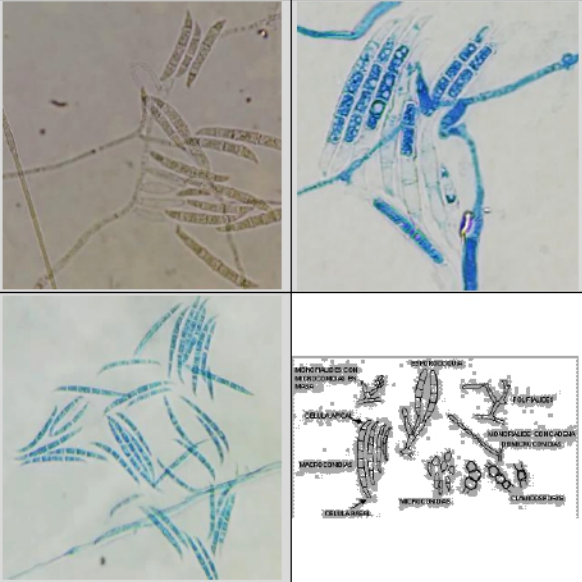
| <i>Fusarium sp.</i> | |
|--|---|
| FOTO/ESQUEMA | DESCRIPCION |
|  | <ul style="list-style-type: none"> • Colonias: crecimiento rápido, suelen ocupar toda la placa (8-9 cm Ø en 1 semana). • Micelio: aéreo suele ser abundante y de aspecto algodonoso. • Color: blanquecino, crema, anaranjado, rosa, rojizo, púrpura, etc. depende de la especie. |
|  | <ul style="list-style-type: none"> • Conidióforos: con fiálides simples o ramificadas, finas y afiladas o con forma de botella. Las esporas pueden salir de un orificio (monofiálides) o varios (polifiálides). • Macroconidias: en forma de canoa, hialinas y septadas. célula apical alargada y la basal con forma de pie. • Microconidios: ausentes en algunas especies, poseen formas (fusiformes, ovales, clavadas, etc.), agrupaciones (estructuras mucoides llamadas “falsas cabezas”), en cadenas largas o cortas. • Mesoconidios: similares, pero de menor tamaño que los macroconidios. no forman estructuras mucoides. |

Figura 14. *Fusarium sp.* Fotografías de la cepa fúngica Copé Y4. Aislamiento procedente del árbol de Copé en la RFM. Por: Jonathan Lescure.

Gliocladium sp.

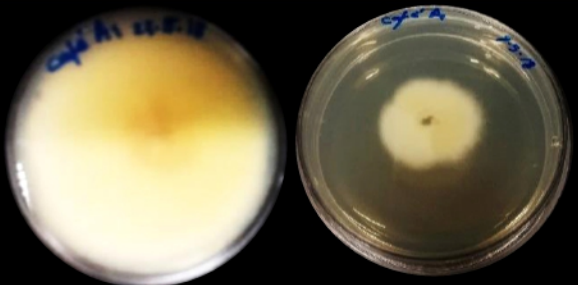
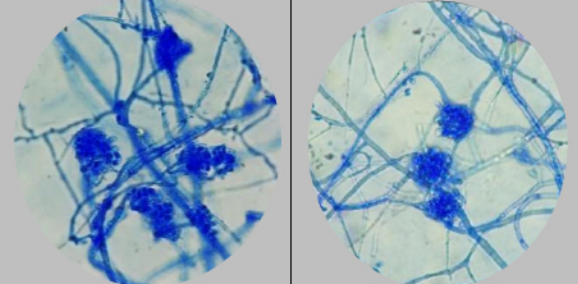
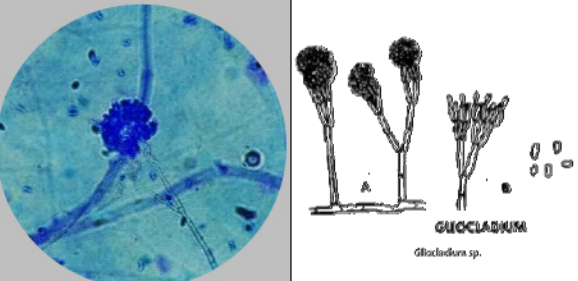
| FOTO/ESQUEMA | DESCRIPCION |
|--|--|
|  | <ul style="list-style-type: none">• Colonias: crecimiento rápido, suelen ocupar toda la placa (8-9 cm Ø en 1 semana).• Color: blancas, pueden cambiar a tonos que varían de rosa a salmón; durante la esporulación se tornan de color verde.• El reverso es incoloro, blanco o amarillento. |
|  | <ul style="list-style-type: none">• Hifas: septadas e hialinas.• Conidióforos: erectos y se ramifican repetidamente en sus vértices. Las ramas terminales dan lugar a fialidas en forma de matraz.• Conidios: unicelulares, ovoides a cilíndricos, se acumulan en una sola bola grande, terminal u ocasionalmente en una columna suelta. |
|  | <ul style="list-style-type: none">• el rasgo más característico del género es su distintivo conidióforo erecto densamente penicilado y con apariencia babosa que lo diferencia de <i>Penicillium</i> |

Figura 15. *Gliocladium sp.* Fotografías de la cepa fúngica Café A1. Aislamiento procedente del árbol de Café en la RFM. Por: Jonathan Lescure.


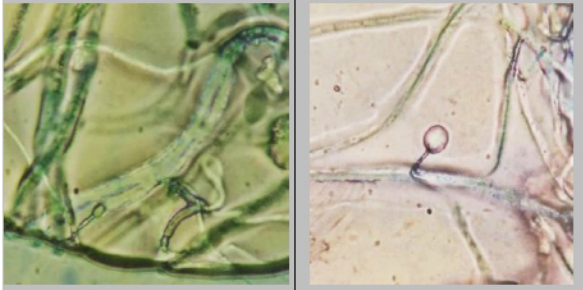
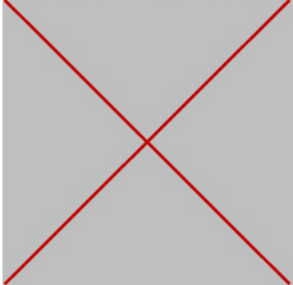
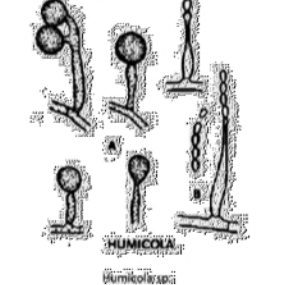
| <i>Humicola sp.</i> | |
|--|--|
| FOTO/ESQUEMA | DESCRIPCION |
|  | <ul style="list-style-type: none"> • Colonias 17–23 mm de diámetro después de 7 días a 25 ° C; borde entero, hifas aéreas raras, • Color: anverso sepia grisáceo grisáceo a oliva en el centro; sepia grisácea inversa a olivacea en el centro. |
|  | <ul style="list-style-type: none"> • Hifas: somáticas hialinas, 1–2.5 μm de ancho. • Conidios: se producen lateralmente en el lado de las hifas vegetativas, ocasionalmente de forma terminal en las ramas cortas de las hifas. • Unicelulares, solitarias, a veces dos en cadena o algunas en racimo, lisas. marrón oliváceo, globosas, subglobosas a oblatas, ocasionalmente ovoides o piriformes, (5–) 6.5–9 (–12.5) μm de alto, (5.5–) 7–9 (–10.5) μm de ancho. |
|  |  |

Figura 16. *Humicola sp.* Fotografías de la cepa fúngica Copé 2A3a. Aislamiento procedente del árbol de Copé en la RFM. Por: Jonathan Lescure.

Nodulisporium sp.

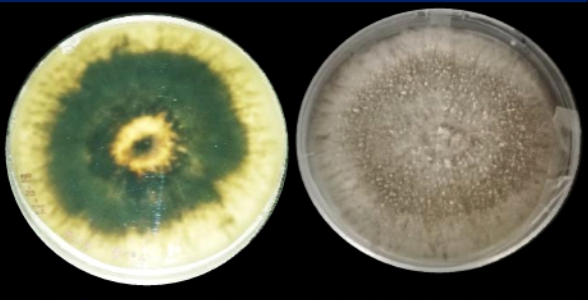
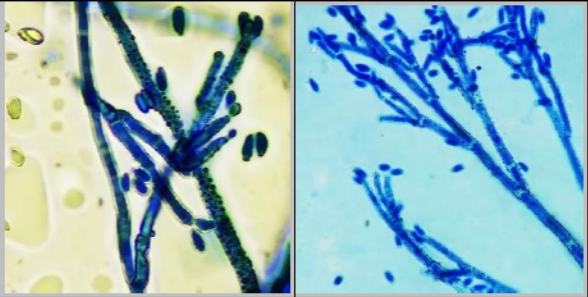

| FOTO/ESQUEMA | DESCRIPCION |
|--|--|
|  | <ul style="list-style-type: none">• Colonias: crecimiento rápido, suelen (8-9 cm Ø en 1 semana).• Color: blanquecino de aspecto algodonoso, tornándose de color beige a café-oscuro al madurar sus conidios. |
|  | <ul style="list-style-type: none">• Hifas: poco septadas• Color: café claro, que se tiñen de color azul claro al centro (efecto del lactofenol y azul de algodón).• Conidioesporas: en el conidióforo de forma sarcinada, hialinas alimonadas, que tomaron un color verde claro (efecto del lactofenol y azul de algodón). |
|  | <ul style="list-style-type: none">• La pared o membrana de la espora ligeramente amarilla. |

Figura 17. *Nodulisporium sp.* Fotografías de la cepa fúngica Guaba 2x2. Aislamiento procedente del árbol de Guaba en la RFM. Por: Jonathan Lescure.

Penicillium sp.

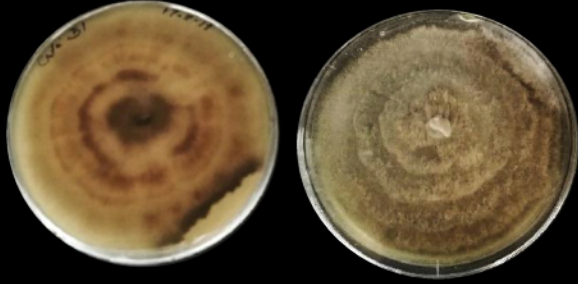
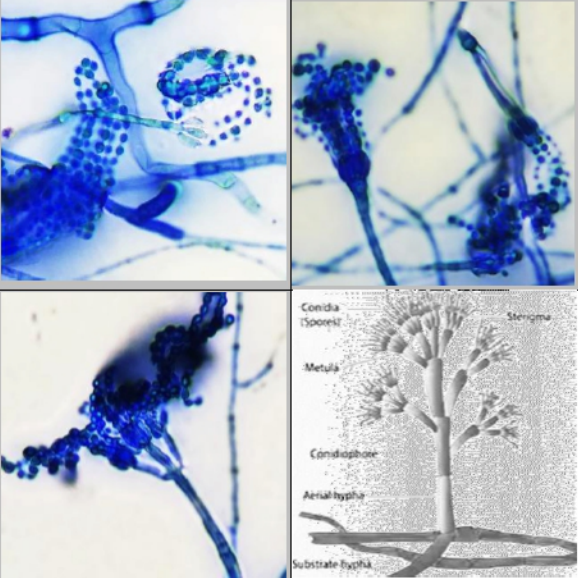
| FOTO/ESQUEMA | DESCRIPCION |
|--|---|
|  | <ul style="list-style-type: none"> • Colonias: crecimiento rápido • Micelio: filamentoso y veloso, lanoso o de textura algodonosa. • Color: inicialmente blanco y luego se convierten en verde azuladas, gris verdosas, gris oliva, amarillentas o rosadas con el tiempo. • Reverso: pálido o amarillento. |
|  | <ul style="list-style-type: none"> • Hifas: septadas hialinas (1.5-5 μ de diámetro). • Conidióforos: simples o ramificadas, métulas, fiálides y conidias. • Métulas: (ramificaciones secundarias que se forman sobre los conidióforos) acarrear conidias en forma de frasco. • La organización de las fiálides en la punta de los conidióforos es típica (llamadas "penicilli" o pincel). • Las conidias (2.5-5μ de diámetro) son redondas, unicelulares y observadas como cadenas no ramificadas en el extremo de las fiálides. |

Figura 18. *Penicillium sp.* Fotografías de la cepa fúngica Café B1. Aislamiento procedente del árbol de Café en la RFM. Por: Jonathan Lescure.

Pestalotiopsis sp.


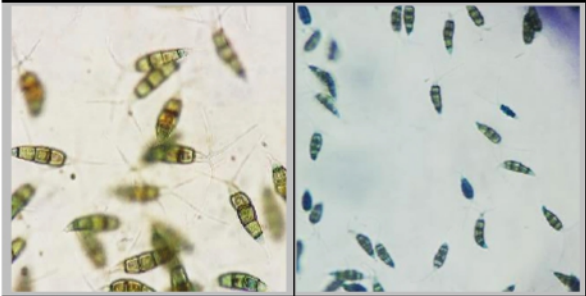

| FOTO/ESQUEMA | DESCRIPCION |
|--|--|
|  | <ul style="list-style-type: none">• colonia: cubre una placa Petri de 9 cm en a 15 días.• Color: blanco cremoso, algodonoso a afelpado.• Crecimiento, presenta sobre y dentro del micelio cirros. Estos son masas de conidios unidos por un gel. |
|  | <ul style="list-style-type: none">• Conidios: de forma fusoide y septados, de tres a seis células, la célula apical presenta de dos a cuatro apéndices largos y la célula basal presenta un solo apéndice mucho más corto.• células centrales del conidio de color oscuro, y las extremas hialinas. |
|  | |

Figura 19. *Pestalotiopsis sp.* Fotografías de la cepa fúngica Cacao 1A3b. Aislamiento procedente del árbol de Cacao en la RFM. Por: Jonathan Lescure.

Scedosporium sp.

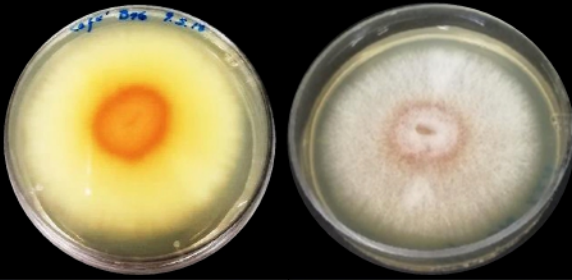
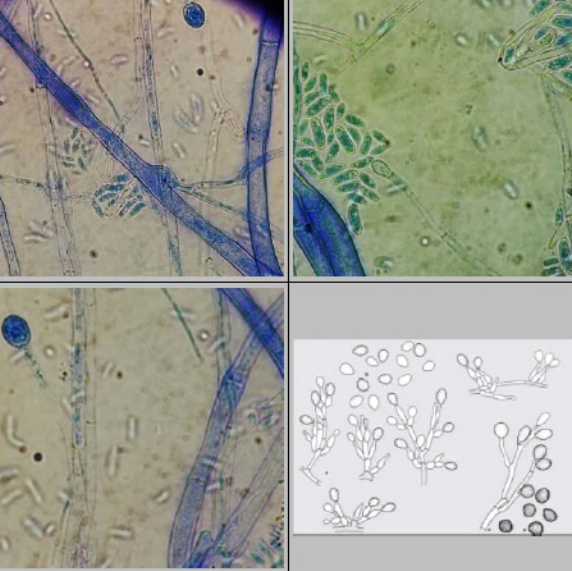
| FOTO/ESQUEMA | DESCRIPCION |
|--|---|
|  | <ul style="list-style-type: none">• Colonias: crecen rápidamente y maduran dentro de 3 a 5 días.• Textura: húmeda o algo algodonosa.• Color: varía dependiendo de la especie; pero en general los colores fluctúan desde gris pálido a negro. |
|  | <ul style="list-style-type: none">• Hifas hialinas septadas• Células conidiógenas (anélidos) y conidios.• Anélidos: con conidios en los extremos, que se distribuyen de forma solitaria o en agrupaciones ramificadas y que pueden surgir directamente de las hifas o se forman en las puntas de los conidióforos.• Conidios: los mismos suelen aparecer solos o agrupados, hialinos, ovoides a piriformes, paredes lisas, tamaño y color varían dependiendo de la especie.• Color: marrón o negro en las paredes de las hifas, conidias o ambas. |

Figura 20. *Scedosporium sp.* Fotografías de la cepa fúngica Café B4c. Aislamiento procedente del árbol de Café en la RFM. Por: Jonathan Lescure.