

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

**Hongos endófitos foliares en *Psychotria cuspidata* Bredem ex Schult. y  
*Podocarpus guatemalensis* Standl. de la Reserva Forestal El Montuoso,  
Panamá.**

Presentado por:

Omayra Aimeé Meléndez Peñalba

Trabajo de graduación presentado  
como requisito para optar por el  
título de Licenciatura en Biología  
con orientación en Microbiología y  
Parasitología.

Panamá, República de Panamá

2020

## DEDICATORIA

A Dios, por estar conmigo en cada momento importante de mi vida brindándome salud, fuerza y cada virtud para permitirme alcanzar esta importante meta en mi vida.

A mis padres: Manuel Alexis Meléndez Pitty Q.P.D. quien, en vida me dio todo su inmenso amor, esfuerzo, tiempo, apoyo extraordinario, sé que desde el cielo me observa y me invade un orgullo y una alegría muy grande el que Dios me haya concedido la dicha de ser su hija para toda la vida y Omaira Peñalba de Meléndez quien con su constante esfuerzo me anima a levantarme y seguir adelante sin quebrantarse ante cualquier actitud de mi parte, a ustedes por su incondicional amor y apoyo, por ser mi luz, mi guía, mi fuerza, mi inspiración, la razón por la que vivo, mi ejemplo a seguir a lo largo de toda mi vida, a ustedes les debo todo lo que soy hoy en día.

A mi hermana Mabel Edith Meléndez Peñalba por saber tratarme, siempre, muy especial y cariñosamente a su manera, me brinda su apoyo inigualable.

A mi novio Reinaldo Xavier Pérez García, quien ha estado a mi lado brindándome su cariño y apoyo excepcional y desinteresado.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco:

Infinitamente a Dios por llenarme de salud, paciencia, dedicación y cada factor crucial en mi vida para culminar este importante propósito.

De manera muy especial a las profesoras Ariadna Bethancourt, Rita Bethancourt, Brenda de Mayorga, prominentes y destacadas profesionales, quienes, con su dedicada asesoría, atinada orientación y ayuda desinteresada hicieron posible la culminación satisfactoria de mi trabajo de graduación, gracias por su inagotable apoyo.

Al Magíster Jorge Ceballos del Instituto Smithsonian por facilitarme acceso a su área de trabajo para obtener imágenes de buena calidad de los hongos endófitos en mi estudio.

A las Licenciadas Isis Jeannette González y Maryuri Estrada por su maravilloso apoyo moral y laboral en el laboratorio en función de tiempo y espacio durante el desarrollo de mi trabajo de graduación.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco:

A mis padres, Omaira de Meléndez y Manuel Meléndez Q.P.D. por su amor y apoyo incondicional.

A cada uno de mis tíos, primos y demás familiares por estar pendiente de mí en este importante trabajo, su apoyo ha sido y es de suma importancia.

A mis amistades por brindarme ese apoyo emocional, moral y profesional que solo, cada uno de ellos, sabe compartir conmigo para animarme a seguir adelante.

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA .....	I
AGRADECIMIENTO .....	II
AGRADECIMIENTO .....	III
ÍNDICE GENERAL.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	IX
RESUMEN .....	XIV
INTRODUCCIÓN .....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
Los hongos y su relación con las plantas.....	5
Potencial de la diversidad de los hongos endófitos .....	6
Hongos endófitos en zonas templadas y en zonas tropicales .....	7
Especies vegetales muestreadas en el estudio .....	8
Sitio de colecta: Reserva Forestal El Montuoso .....	9
Observaciones en cuanto a los hongos endófitos en el laboratorio .....	10
OBJETIVOS.....	12
Objetivos Generales .....	12
Objetivos Específicos .....	12

<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>13</b>
<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>14</b>
<b>I.- Sitio de colecta de las muestras .....</b>	<b>14</b>
<b>II.- Procesamiento de las muestras.....</b>	<b>15</b>
<b>III.- Agrupación de hongos endófitos aislados en la reserva forestal el montuoso .....</b>	<b>16</b>
<b>iv.- Codificación de los morfotipos representativos .....</b>	<b>18</b>
<b>V.- Clonación de los hongos endófitos para conservación.....</b>	<b>19</b>
<b>VI.- Curva de crecimiento de los hongos endófitos representativos .....</b>	<b>22</b>
<b>VII.- Identificación morfológica de los hongos endófitos mediante la técnica de microcultivo.....</b>	<b>23</b>
• Fase I:.....	24
• Fase II:.....	25
<b>VIII.- Fotografías de los hongos endófitos captadas en microscopio .....</b>	<b>30</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
<b>I.- Total de hongos endófitos por cada hoja de las respectivas plantas ..</b>	<b>31</b>
<b>II.- Densidad de hongos endófitos aislados en la reserva forestal el montuoso .....</b>	<b>33</b>
<b>III.- Diversidad porcentual de hongos endófitos aislados en la reserva forestal el montuoso .....</b>	<b>35</b>

IV.- Curva de crecimiento fúngico.....	40
V.- Hongos identificados mediante la técnica de microcultivos .....	50
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>61</b>
Densidad porcentual de hongos endófitos en <i>Psychotria cuspidata</i> frente a otros estudios similares. ....	62
Densidad porcentual de hongos endófitos en <i>Podocarpus guatemalensis</i> frente a otros estudios similares.....	62
Densidad de hongos endófitos en las plantas estudiadas .....	63
Estudios de hongos endófitos en plantas de hoja perenne .....	64
Diversidad de hongos endófitos en <i>Psychotria cuspidata</i> frente a otros estudios similares. ....	65
Diversidad de hongos endófitos en <i>Podocarpus guatemalensis</i> frente a otros estudios similares. ....	66
Densidad y Diversidad de hongos endófitos en ambas plantas .....	66
Clonación de hongos endófitos en agua destilada estéril.....	68
Curva de crecimiento de hongos endófitos en <i>Psychotria cuspidata</i> .....	69
Curva de crecimiento de hongos endófitos en <i>Podocarpus guatemalensis</i> .....	69
Curva de crecimiento de hongos endófitos en ambas especies vegetales pertenecientes a la Reserva Forestal El Montuoso .....	70

Identificación de hongos endófitos .....	71
Identificación de hongos endófitos en <i>Psychotria cuspidata</i> .....	72
Identificación de hongos endófitos en <i>Podocarpus guatemalensis</i> .....	73
Identificación de hongos endófitos en ambas plantas .....	75
Importancia de la tasa de duplicación del micelio a nivel de género identificado en el estudio.....	76
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>78</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>79</b>
<b>APÉNDICE</b> .....	<b>80</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>83</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>96</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Coordenadas en utm (universal transversal de Mercator) de la RFM. .... 15
- Tabla 2. Hongos endófitos por cada muestra de *Psychotria cuspidata*. ..... 31
- Tabla 3. Hongos endófitos por cada muestra de *Podocarpus guatemalensis*. ..... 32
- Tabla 4. Hongos endófitos de *Psychotria cuspidata* según su categoría. .... 41
- Tabla 5. Hongos endófitos de *Podocarpus guatemalensis* según su categoría. .... 43
- Tabla 6. Hongos codificados que fueron identificados, a nivel de género, en *Psychotria cuspidata*. .... 52
- Tabla 7. Hongos codificados que fueron identificados, a nivel de género, en *Podocarpus guatemalensis*. .... 53
- Tabla 8. Tasa de duplicación de micelio de cada hongo endófito aislado de *Psychotria cuspidata*. .... 96
- Tabla 9. Tasa de duplicación de micelio de cada hongo endófito aislado de *Podocarpus guatemalensis*. .... 97
- Tabla 10. Algunas fórmulas utilizadas en esta investigación ..... 98

## ÍNDICE DE FIGURAS

- **Figura 1. A la izquierda, dos hongos diferenciados morfológicamente por colores además de patrones distintos en el micelio de cada uno y a la derecha, dominancia de un hongo endófito sobre otro donde el dominado crece a manera de una cuña. .... 10**
- **Figura 2. Hongo Podo 117 con dos meses de diferencia donde se encuentran dos hongos distintos y fue posible saberlo observando muestras en el microscopio..... 11**
- **Figura 3. Ubicación de la Reserva Forestal El Montuoso..... 14**
- **Figura 4. Muestras de las hojas colectadas..... 15**
- **Figura 5. Aislamiento de hongos endófitos en plato Petri con PDA . 16**
- **Figura 6. Características morfológicas visibles empleadas para agrupar los morfotipos de hongos endófitos en cada planta. .... 18**
- **Figura 7. Morfotipos representativos de hongos endófitos codificados ..... 19**
- **Figura 8. Proceso de la clonación de los hongos endófitos codificados ..... 21**
- **Figura 9. Proceso de la curva de crecimiento de los hongos endófitos codificados ..... 23**
- **Figura 10. Medios de cultivo utilizados para los microcultivos..... 24**
- **Figura 11. Medio de cultivo cortado con bisturí ..... 25**

- **Figura 12. Materiales que forman parte del sistema de microcultivos**  
..... 26
- **Figura 13. Preparación del sistema de microcultivo**..... 26
- **Figura 14. Ensamblaje de los sistemas para los microcultivos**..... 28
- **Figura 15. Sistemas de microcultivo debidamente armados** ..... 29
- **Figura 16. Observación en el microscopio** ..... 29
- **Figura 17. Observación y captura de imágenes de los hongos endófitos identificados en el microscopio Nikon E600 con cámara integrada**..... 30
- **Figura 18. Abundancia porcentual de hongos endófitos por cada hoja de *Psychotria cuspidata***..... 31
- **Figura 19. Abundancia porcentual de hongos endófitos por cada hoja de *Podocarpus guatemalensis***. ..... 32
- **Figura 20. Porcentaje de densidad de los hongos endófitos en *Psychotria cuspidata***..... 33
- **Figura 21. Porcentaje de densidad de los hongos endófitos en *Podocarpus guatemalensis***..... 34
- **Figura 22. Densidad porcentual de hongos endófitos en *Psychotria cuspidata* y en *Podocarpus guatemalensis***..... 34
- **Figura 23. Número de morfotipos grupales e individuales de los hongos endófitos en *Psychotria cuspidata***..... 35

- **Figura 24. Diversidad porcentual de hongos endófitos en *Psychotria cuspidata* ..... 36**
- **Figura 25. Número de morfotipos grupales e individuales de los hongos endófitos en *Podocarpus guatemalensis* ..... 37**
- **Figura 26. Diversidad porcentual de hongos endófitos en *Podocarpus guatemalensis*..... 38**
- **Figura 27. Número de morfotipos grupales e individuales de los hongos endófitos en *Psychotria cuspidata* y en *Podocarpus guatemalensis*. ..... 39**
- **Figura 28. Diversidad porcentual de hongos endófitos en *Psychotria cuspidata* y en *Podocarpus guatemalensis*..... 40**
- **Figura 29. Densidad porcentual de hongos endófitos en *Psychotria cuspidata* por categoría..... 42**
- **Figura 30. Densidad porcentual de hongos endófitos en *Podocarpus guatemalensis* por categoría..... 44**
- **Figura 31. Densidad porcentual de hongos endófitos de ambas plantas en estudio por categorías..... 45**
- **Figura 32. Curva de crecimiento: hongo endófito de rápido crecimiento..... 46**
- **Figura 33. Curva de crecimiento: hongo endófito de moderado crecimiento..... 46**

- **Figura 34. Curva de crecimiento: hongo endófito de lento crecimiento.**  
..... 47
- **Figura 35. Curva de crecimiento: hongo endófito de crecimiento rápido.**..... 47
- **Figura 36. Curva de crecimiento: hongo endófito de crecimiento moderado.**..... 48
- **Figura 37. Curva de crecimiento: hongo endófito de crecimiento lento.**  
..... 48
- **Figura 38. Pendiente que ubica a cada hongo endófito en su categoría.**  
..... 49
- **Figura 39. Pendiente que ubica a cada hongo endófito en su categoría.**  
..... 50
- **Figura 40. Porcentaje total de hongos endófitos representativos identificados a nivel de género en cada planta.**..... 50
- **Figura 41. Hongos endófitos identificados en *Psychotria cuspidata*.**54
- **Figura 42. Hongos endófitos identificados en *Podocarpus guatemalensis*.**..... 54
- **Figura 43. Hongo endófito Psy 100 identificado, género *Colletotrichum* (fase asexual o anamorfo) donde la vista macroscópica corresponde a su crecimiento en plato Petri.**..... 56

- **Figura 44. Hongo endófito Psy 105 identificado, género *Glomerella* (fase sexual o teleomorfo) donde la vista microscópica fue captada en microscopio Nikon E600 con cámara integrada..... 56**
- **Figura 45. Hongo endófito Psy 117 identificado, género *Xylaria*, este se identificó inmediatamente por la presencia de cuerpos fructíferos del hongo en Agar Papa Dextrosa dentro del plato Petri. .... 57**
- **Figura 46. Hongo endófito Podo 114 identificado, género *Phyllosticta* (anamorfo) ..... 58**
- **Figura 47. Hongo endófito Podo 103 identificado, género *Guignardia* (teleomorfo) en la vista microscópica se aprecian estructuras alargadas en formas de saco llamadas ascos, los cuales a su vez contienen ascosporas en su interior, como la de la imagen en la esquina superior derecha..... 58**
- **Figura 48. Podo 108 identificado, género *Dothiorella* (anamorfo).... 59**
- **Figura 49. Podo 108 identificado, género *Botryosphaeria* (teleomorfo) ..... 59**
- **Figura 50. Podo 112 identificado, género *Colletotrichum* (anamorfo) ..... 60**
- **Figura 51. Micelio estéril en ambas plantas donde Psy 123 pertenece a *Psychotria cuspidata* y Podo 119 a *Podocarpus guatemalensis*..... 60**

## RESUMEN

La Reserva Forestal El Montuoso no sólo se encarga del cuidado del patrimonio ecológico, hídrico y económico de los colonos habitantes de la Reserva y de los más de 100 000 habitantes de Herrera y Los Santos beneficiando también a la provincia de Veraguas sino que también es considerada el último refugio de la biodiversidad en la provincia de Herrera velando por la conservación de recursos ambientales y diferentes tipos de organismos que allí habitan. La gran diversidad vegetal encontrada en la Reserva y el escaso conocimiento de las interacciones microbiológicas, más específicamente micológicas, presente en hojas de dos de las especies de plantas que allí habitan fueron las principales razones que motivaron este ensayo. Los hongos endófitos aislados de las especies, *Psychotria cuspidata* (arbusto) y *Podocarpus guatemalensis* (árbol), fueron agrupados empleando características morfológicas observables en cada colonia. De un total de 57 aislamientos en *Psychotria cuspidata* se pudieron obtener 20 morfotipos de los que se seleccionaron 25 hongos para el estudio; las curvas de crecimiento efectuadas a los hongos seleccionados mostraron una dominancia de hongos de rápido crecimiento (84%). En cuanto a *Podocarpus guatemalensis* se aislaron 47 hongos endófitos agrupados en 21 morfotipos y 20 hongos fueron elegidos para los ensayos posteriores, en esta planta hubo dominancia de hongos de rápido crecimiento (45%) aunque en menor proporción que en el arbusto. El estudio micro-morfológico de los hongos endófitos permitió identificar el 36% de los hongos a nivel de género en *Psychotria cuspidata*, resultando el hongo *Colletotrichum* sp. más frecuente en tanto que en *Podocarpus guatemalensis* el 55% de los hongos endófitos fue identificado, resultando *Guignardia* sp. con más muestras dentro de la colección. A pesar de no contar con acceso a técnicas moleculares se obtuvieron resultados destacados con grandes aportes a través de métodos tradicionales como lo son: conteo, agrupación, curvas de crecimiento y sistema de microcultivos de hongos endófitos. Este estudio es importante debido al alto impacto que ejercen los hongos endófitos no sólo en beneficio de las plantas sino también a nivel de nuestra sociedad en diferentes áreas como la agricultura y la medicina, además de su potencial como herramienta de conservación de la reserva en cuestión; también se representa el valor que aún sigue vigente en los métodos tradicionales para el estudio de hongos endófitos sugiriéndonos que es posible obtener enriquecedores y satisfactorios resultados aún con el ahorro de costos y un bajo número de muestras como en este estudio donde se procesaron únicamente cinco hojas de cada especie de planta.

## INTRODUCCIÓN

Los organismos endófitos, especialmente los hongos, han recibido una creciente atención en los años recientes. Actualmente se estimó una diversidad fúngica entre 2.2 (enfoque aditivo) y 3.8 millones (enfoque de relación global), muy parecido a las estimaciones previamente actualizadas entre 2.3 y 3 millones (Hawksworth y Lücking, 2017). Los hongos endófitos son un grupo de microorganismos que vive asintomáticamente dentro de tejidos vegetales sanos, a manera de mutualistas, comensalistas, patógenos o saprófitos latentes en algunos casos, pues estudios más recientes sugieren que las interacciones de la planta, endófito-hospedador, son variables y van desde antagónicas hasta mutualistas, estos hongos también han mostrado poseer un gran potencial económico en áreas como la agronomía y la medicina (Gamboa-Gaitán, 2006; Saikkonen *et al.*, 1998; Porras-Alfaro y Bayman, 2011). La relación planta-endófito otorga mayor habilidad competitiva a las plantas y permite una plena expresión de su potencial genético traducido en altas tasas de germinación, mejor densidad, más biomasa en los tejidos y mayor producción de semilla (Abello y Kelemu, 2006). La estrecha relación que existe entre el endófito y su planta hospedera se considera de gran importancia, ya que el hongo es capaz de producir metabolitos bioactivos, así como modificar los mecanismos de defensa de su hospedera, permitiendo e incrementando la sobrevivencia de ambos organismos (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

Esta investigación estará sujeta a la búsqueda de hongos endófitos en dos especies vegetales de la Reserva Forestal El Montuoso, las cuales se describen a continuación:



*Psychotria cuspidata* Bredem ex Schult. (Bredemeyer, 1819), su sinónimo es *Psychotria acuminata* Benth. (Bentham, 1845), este es un arbusto de hasta 3 metros de altura, ramificado y *Podocarpus guatemalensis* Standl. (Standley, 1924) que es un árbol de 20-35 metros de altura, erecto.

A través de los años, desde la prehistoria hasta la actualidad, hemos sido testigos de la importancia que tiene la diversidad vegetal que nos rodea, sin embargo, esta relevancia se ha incrementado aún más con los estudios realizados recientemente en donde se hace referencia a la presencia de hongos endófitos, es decir, microorganismos que viven en los espacios intercelulares o intracelulares de hojas, tallos y flores, absorbiendo nutrientes que la planta sintetiza y a cambio la hospedera se beneficia de los metabolitos bioactivos que ellos producen (Bacon C.W. *et al.*, 1997). Estudios recientes demuestran la enorme capacidad que tienen los hongos endófitos para producir compuestos activos que le confieren protección a su hospedera contra el ataque de patógenos y herbívoros, constituyendo una nueva vía para la obtención de diversos precursores o moléculas novedosas de utilidad en la agricultura y en la medicina (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013), sin embargo, una de las mayores dificultades para estos simbioses y el descubrimiento de productos naturales es la acelerada disminución de las selvas tropicales que poseen el mayor recurso para adquirir dichos hallazgos (Strobel y Daisy, 2003) ya que se ha comprobado que la eliminación de plantas silvestres de su ecosistema forestal natural causa una drástica disminución de las poblaciones endófitas (Restrepo, 2007). Con esta investigación se pretende estimar la diversidad microfúngica foliar en dos especies vegetales, *Psychotria cuspidata* y *Podocarpus guatemalensis*, de la Reserva Forestal El

Montuoso, utilizando como herramienta de estudio la densidad de hongos endófitos; adicionalmente se realizará una comparación de la tasa de crecimiento entre los hongos endófitos aislados en cada una de las especies mencionadas anteriormente.

Si bien extensas áreas de Panamá aún están cubiertas de bosques, estos se encuentran bajo una amenaza inmediata y sustancial, por lo que este es un momento particularmente crítico en el cual una vigorosa organización aún puede marcar una diferencia en su conservación (Kursar *et al.*, 1999), es interesante acotar que, al pertenecer la Reserva Forestal El Montuoso al sistema nacional de áreas protegidas, la misma es motivo de conflictos frecuentes por la utilización de suelo, ya que el área fue declarada legalmente como Reserva con comunidades que estaban establecidas antes de la creación de la misma, algunos poseen títulos de propiedad otorgados por Reforma Agraria y otros derechos posesorios, lo que ha traído como consecuencia una mala relación entre la población y Mi Ambiente, la cual es mal vista por no permitir algunas actividades prohibidas por la Ley y las necesidades agropecuarias de la población (Barrios *et al.*, 2010). Se hace imperativo demostrar a las comunidades que la conservación del bosque podría ofrecer beneficios incalculables a la sociedad, pues según Pedreschi *et al.*, 2013, las comunidades ubicadas tanto dentro como fuera, en la zona de amortiguamiento de la Reserva dependen de los beneficios directos que obtienen de este ecosistema. Los beneficios que brinda la Reserva están siendo amenazados, producto de una vinculación negativa de las comunidades con la misma, lo que se refleja en la degradación de su ecosistema, explicado por la pérdida de la cobertura boscosa, el uso de la tala y quema como método de preparación del suelo y control de malezas, y la no incorporación de tecnologías de conservación del suelo, a raíz de este tipo de problemática se ha recalcado la necesidad e importancia de

priorizar esfuerzos de conservación hacia reservas o parques nacionales grandes, con mayor superficie, basado en el criterio de que protegiendo las áreas se protegen las especies; con base en resultados previos para la Reserva Forestal El Montuoso, con bosques mayormente fragmentados, se han obtenido cifras sorprendentes de riqueza biológica y aportes en servicios ambientales hacia las comunidades locales y globales (Garibaldi, 2004). Estos problemas podrían ser abordados científicamente, ofreciendo a la población diferentes alternativas y de esta manera evitar la tala, quema de suelos y demás problemas mencionados anteriormente. Los hongos endófitos podrían repercutir positivamente en la economía de la población al detener la relación negativa existente entre los residentes de la comunidad y la Reserva en cuestión a través del descubrimiento y el valor de compuestos novedosos producidos por ellos.

La elección de las especies vegetales tomó en cuenta la altura del individuo, considerando que, *Psychotria cuspidata* es un arbusto y *Podocarpus guatemalensis* es un árbol (Davidse, G., Sousa M., 2009).

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Los hongos y su relación con las plantas

En su mayoría, el cuerpo de los hongos es micelio el cual corresponde a una masa entrelazada de filamentos de una célula de espesor, semejantes a hilos, llamados hifas, la pared celular micótica está reforzada con quitina, la misma sustancia presente en el exoesqueleto de los artrópodos. En cuanto a su reproducción, los hongos presentan la fase sexual o teleomorfo y la fase asexual o anamorfo y al encontrarse ambas fases en una misma especie el nombre del teleomorfo cubre ambos estados, además recibe el nombre de holomorfo por contar con las dos fases (Audesirk *et al.*, 2008; Cepero de García, 2012). El término endófito se refiere a la ubicación del organismo, endo: dentro y Phyte: planta, que es un organismo viviendo dentro de una planta, por tanto, los endófitos son hongos o bacterias que, durante todo o parte de su ciclo de vida, invaden los tejidos vegetales sanos causando infecciones inaparentes y asintomáticas. Además de la descripción de la ubicación de un organismo, el término endófito, también hace énfasis en la asociación real entre dicho organismo y su planta hospedadora adaptando sus estrategias de infección y colonización a no causar, en esta, efectos negativos ni evocar sus mecanismos de defensa (Kriel *et al.*, 2000; Wilson, 1995). Los hongos endófitos juegan un papel decisivo en diferentes procesos biológicos (Macaya-Sanz *et al.*, 2017), la evidencia limitada indica que pueden influir en la dinámica de la población, la diversidad de la comunidad vegetal y la función del ecosistema (Saikkonen *et al.*, 1998), se les considera implicados en la resistencia de las plantas ante diferentes tipos de estrés (Macaya-Sanz *et al.*, 2017) sean estos de tipo abiótico (salinidad, acidez) o biótico (ataque de plagas). La ubicuidad de estos

simbiontes crípticos es clara, pero se desconoce la escala de su diversidad, rango de hospedador y distribución geográfica. Las comunidades endófitas de latitudes más altas se caracterizan por tener relativamente pocas especies de muchas clases diferentes de Ascomycota, mientras que las asociaciones de endófitos tropicales están dominadas por un pequeño número de clases con un gran número de especies endófitas (Arnold y Lutzoni, 2007).

### **Potencial de la diversidad de los hongos endófitos**

Las especies forestales albergan una gran diversidad de hongos endófitos, cuyo modo de interacción con la planta hospedante y su entorno biótico y abiótico es aún poco conocido. Esta diversidad varía en función del genotipo de la planta hospedante, y parece guardar cierta relación con el grado de tolerancia de la planta hacia el estrés biótico (Macaya-Sanz *et al.*, 2017). Los datos sugieren que entre más pequeños y esparcidos sean los fragmentos foliares muestreados, mayor será la probabilidad de aproximarse a los valores reales de diversidad de las comunidades de hongos endófitos (Gamboa y Bayman, 2001). Los hongos endófitos representan un componente importante de la biodiversidad fúngica (Baayen *et al.*, 2002), con respecto a su planta hospedadora, pues existen estudios que lo respaldan como el de Romeralo *et al.*, 2013 donde todos los hongos endófitos aislados de *Pinus halepensis* redujeron la necrosis producida por los aislados de *Gremmeniella abietina*, un hongo patógeno en las plántulas de *Pinus halepensis*; las interacciones endófito-planta pueden variar de antagonistas a mutualistas siendo importantes en sistemas naturales por sus efectos y capacidades competitivas inducidas en plantas adultas de diferentes entornos ambientales (Saikkonen *et al.*, 1998), incluso se ha sugerido utilizar a los

hongos endófitos como bioindicadores, al mostrar los efectos de la contaminación del aire y la lluvia ácida (Kriel *et al.*, 2000).

### **Hongos endófitos en zonas templadas y en zonas tropicales**

La presencia de hongos endófitos en tejido foliar de diferentes plantas muestreadas ha sido estudiada en diferentes ocasiones con variación en los lugares muestreados con un clima determinado o la temperatura a la que se encuentran. Todas las especies de plantas examinadas hasta la fecha albergan hongos endófitos dentro de sus tejidos aéreos asintomáticos (Arnold *et al.*, 2003) y aumentan en incidencia, diversidad y amplitud de hospedantes desde sitios árticos a tropicales (Arnold y Lutzoni, 2007; Del Olmo-Ruiz y Arnold, 2017). En la investigación de Zhang *et al.*, 2013 la densidad de los hongos endófitos va desde 8.7%, pasando por 12.1% hasta 12.3% en tres plantas en un área de baja temperatura (Antártida marítima). En la Isla King George, Antártica se hizo un estudio de *Deschampsia antarctica* donde la densidad de hongos endófitos fue de 9.5% (Rosa, L. *et al.*, 2009); para un lugar más caluroso como lo es el desierto de Sonora (suroeste de Estados Unidos y norte de México) la densidad total de hongos endófitos fue de 2% y esto tomando en cuenta cuatro plantas distintas (Massimo *et al.*, 2015), pues con base en los resultados de Suryanarayanan *et al.*, 2003 los bosques tropicales secos no son hiperdiversos en cuanto a endófitos; para ambos valores de temperatura extremos, la densidad de hongos endófitos no es tan alta como la que se ha reportado hasta la fecha en áreas tropicales, por ejemplo, en la investigación de Tiscornia, 2012 se reporta una densidad de 74% de hongos endófitos en *Myrrhinium atropurpureum* planta ubicada en un área de Uruguay con una temperatura ambiental de 30°C.

## **Especies vegetales muestreadas en el estudio**

Las plantas de las cuales fueron aislados los hongos endófitos se describen a continuación:

*Psychotria cuspidata* Bredem ex Schult. (Bredemeyer, 1819), su sinónimo es *Psychotria acuminata* Benth. (Bentham, 1845), su nombre común es cafecillo (Ortiz *et al.*, 2013), es una angiosperma perenne del género *Psychotria* que posee la mayor diversidad dentro de la familia Rubiaceae con 1834 especies (Davis *et al.*, 2009), este es un arbusto de hasta 3 metros de altura, ramificado; ramitas pubérulas a glabras, presenta flores distilas, sésiles y pediceladas en címulas con 5-11 flores, infrutescencias tornándose purpúreas, los ejes con frecuencia engrosados (Davidse, G., Sousa M., 2009), esta planta es medicinal y produce los alcaloides emetina, cephaelina y psychotrina, usados como expectorantes y eméticos; hoy día estos alcaloides son extraídos de plantas silvestres, pues esta especie no ha sido domesticada (Lara *et al.*, 2003). En cuanto a su taxonomía pertenece a la clase Equisetopsida (Agardh, 1825), subclase Magnoliidae (Novák, 1967), superorden Asteranae (Takhtajan, 1967), orden Gentianales (Jussieu, 1820), familia Rubiaceae (Jussieu, 1789) y género *Psychotria* (Linnaeus, 1759).

*Podocarpus guatemalensis* Standl. (Standley, 1924), su nombre común es ciprés (Hazlett, 1979) es una gimnosperma de hoja perenne, esta especie corresponde a un árbol de 20-35 metros de altura sin embargo el ejemplar del cual provienen las muestras de este estudio es de aproximadamente 5 metros de altura, es erecto, monopodial, corteza lisa, de color marrón rojizo que se vuelve gris oscuro y fisurada. Ramas que se extienden, formando una corona amplia o a veces piramidal; presenta

conos de semilla axilares (Davidse, G., Sousa M., 2009). Entre los usos con respecto a este árbol se utiliza la madera, empleada en la fabricación de cajas, cajones, formaletas, carpintería y ebanistería, además, por su follaje lustroso los árboles de Pinotea pueden emplearse como plantas ornamentales (Pérez, 2008). Con respecto a su taxonomía pertenece a la clase Equisetopsida (Agardh, 1825), subclase Pinidae (Cronquist *et al.*, 1966), orden Podocarpaceales (Pulle, 1992), familia Podocarpaceae (Endlicher, 1847) y género *Podocarpus* (L'Héritier de Brutelle, 1807).

### **Sitio de colecta: Reserva Forestal El Montuoso**

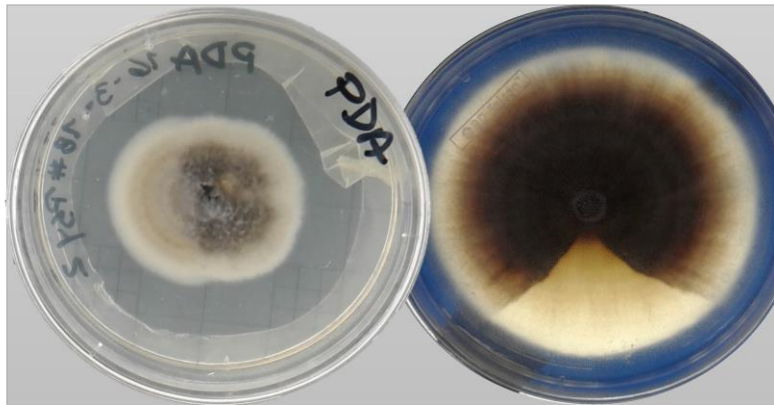
La Reserva Forestal El Montuoso (RFM) fue creada mediante la Ley N°12 del 15 de marzo de 1977, la temperatura media anual varía entre los 21-25°C, siendo de 24.5°C para esta área, más del 80% de su superficie estaba cubierta por bosques, es considerada el último refugio de la biodiversidad en la provincia 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, está compuesta principalmente por ecosistemas interconectados por diferentes sistemas de vegetación riberena o bien bosques de galería y se estima que la vegetación nativa cubre unas 400 ha. Entre los ríos que nacen en esta Reserva destacan los siguientes que además son importantes cuencas hidrográficas: La Villa que abastece de agua a más de 100,000 personas de Herrera y Los Santos, Mariato y Tebario de mucha utilidad en la provincia de Veraguas y el río Suay (Barrios *et al.*, 2010; Pedreschi *et al.*, 2013).



## Observaciones en cuanto a los hongos endófitos en el laboratorio

En base a mis observaciones en el laboratorio, existen hongos endófitos con la capacidad de crecer en presencia de otro hongo endófito de dos maneras:

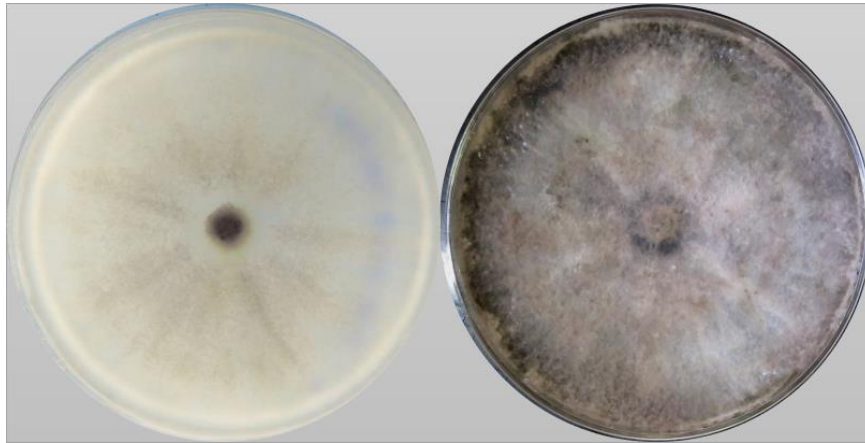
- Delimitando el espacio entre cada uno, es decir, que se ve en el plato Petri un límite visible entre los dos hongos que se logra distinguir, macroscópicamente o a simple vista, por medio del color y una línea notable entre ambos hongos, de otra manera, se observa la entrada de uno de los hongos a manera de cuña y esto ocurre cuando uno de los dos domina sobre el otro, pero ambos luchan por sobrevivir con los nutrientes disponibles. Fig.1.



**Figura 1.** A la izquierda, dos hongos diferenciados morfológicamente por colores y patrones distintos en el micelio de cada uno, a la derecha, dominancia de un hongo endófito sobre otro donde el que domina crece formando una cuña.

- Cuando los hongos endófitos se unen tanto que se mezclan en el plato Petri, sin más evidencia macroscópica que coloraciones intensas en algunas partes. Como ambos hongos se reproducen mediante esporulación en diferentes puntos del Plato Petri no se sospecha que en realidad hay dos hongos hasta que se observa, microscópicamente, con presencia de conidias que difieren en forma y tamaño.

Fig.2.



**Figura 2. Hongo Podo 117 con dos meses de diferencia donde se encuentran dos hongos distintos y fue posible saberlo observando dos tipos de conidias diferentes en el microscopio.**

## OBJETIVOS

### Objetivos Generales

- Estimar la densidad y diversidad de hongos endófitos en dos especies vegetales: *Psychotria cuspidata* y *Podocarpus guatemalensis* presentes en la Reserva Forestal El Montuoso.
- Caracterizar morfológica y fisiológicamente los hongos endófitos aislados del tejido foliar de las dos especies vegetales.

### Objetivos Específicos

- Calcular porcentualmente la densidad y diversidad de hongos endófitos foliares en *Psychotria cuspidata* y *Podocarpus guatemalensis*.
- Agrupar morfológicamente todos los hongos endófitos foliares recuperados de ambas especies vegetales.
- Establecer la curva de crecimiento de los hongos endófitos y clasificarlos en tres categorías: rápido, moderado y lento crecimiento.
- Preservar, mediante clonación en agua estéril, todos los hongos endófitos aislados para garantizar su sobrevivencia y usos posteriores.

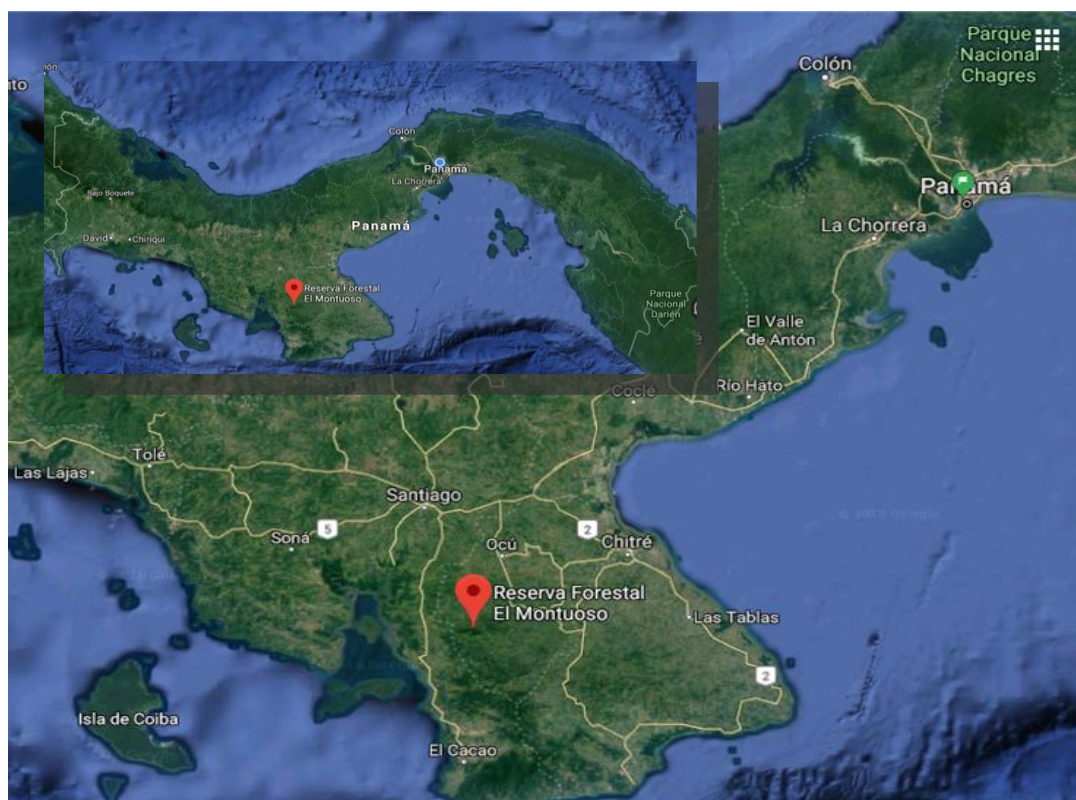
## HIPÓTESIS

Ho: Los hongos endófitos foliares del arbusto: *Psychotria cuspidata* y el árbol: *Podocarpus guatemalensis* no varían en cuanto a densidad, diversidad y tasa de crecimiento.

H<sub>1</sub>: Los hongos endófitos foliares del arbusto: *Psychotria cuspidata* y el árbol: *Podocarpus guatemalensis* varían en cuanto a densidad, diversidad y tasa de crecimiento.

## METODOLOGÍA

### I.- SITIO DE COLECTA DE LAS MUESTRAS



**Figura 3. Ubicación de la Reserva Forestal El Montuoso**

Mediante la Ley No. 12 del 15 de marzo de 1977, Gaceta Oficial 18,302 del 28 de marzo de 1977, se crea la Reserva Forestal El Montuoso (RFM), un área del distrito de Las Minas, provincia de Herrera (Mi Ambiente, 2010).

La Reserva Forestal El Montuoso, físicamente, se localiza en las siguientes coordenadas:

**Tabla 1. Coordenadas en utm (universal transversal de Mercator) de la RFM.**

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

**Fuente:** IGNTG. CODESA. 2003. Plan de manejo de la Reserva Forestal El Montuoso

La principal vía de acceso es por la carretera que conduce a Las Minas provincia de Herrera; de allí hacia la comunidad de Chepo, Las Minas, principal sitio poblado dentro de la Reserva Forestal El Montuoso (Barrios *et al.*, 2010).

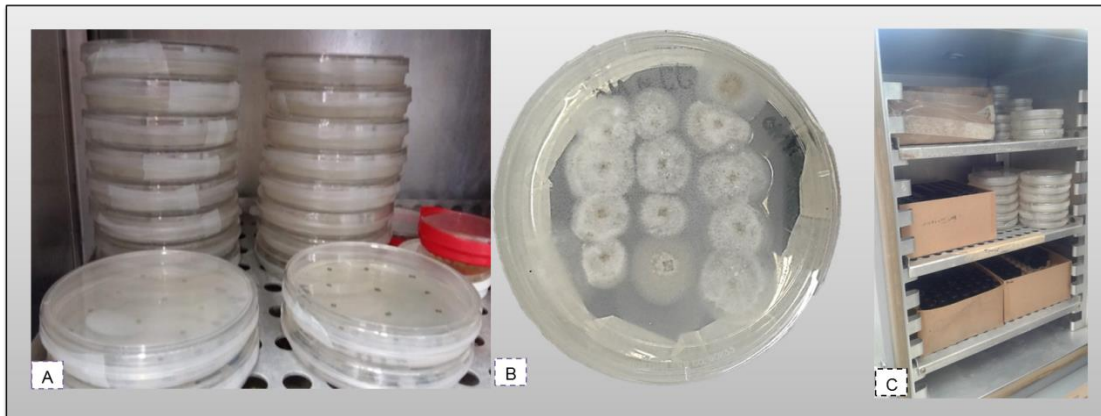
## II.- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Se colectaron 5 hojas maduras y sanas de las especies *Psychotria cuspidata* y *Podocarpus guatemalensis*, Figuras 4A y 4B, respectivamente, en febrero de 2018 (estación seca). Las plantas están localizadas en la Reserva Forestal El Montuoso, Distrito de las Minas, Provincia de Herrera.



**Figura 4. Muestras de las hojas colectadas**

Las muestras provenientes del tejido foliar sano fueron desinfectadas y luego sembradas en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) como se observa en la Fig. 5A. En la medida que fueron emergiendo los hongos de los fragmentos sembrados, Fig. 5B, estos se aislaron colocándolos en tubos de ensayo con medios de cultivo (PDA) y permanecieron en cajas dentro de la incubadora durante aproximadamente 6 semanas, Fig. 5C. Este procedimiento fue realizado por las Profesoras Ariadna Bethancourt y Rita Bethancourt.



**Figura 5. Aislamiento de hongos endófitos en plato Petri con PDA**

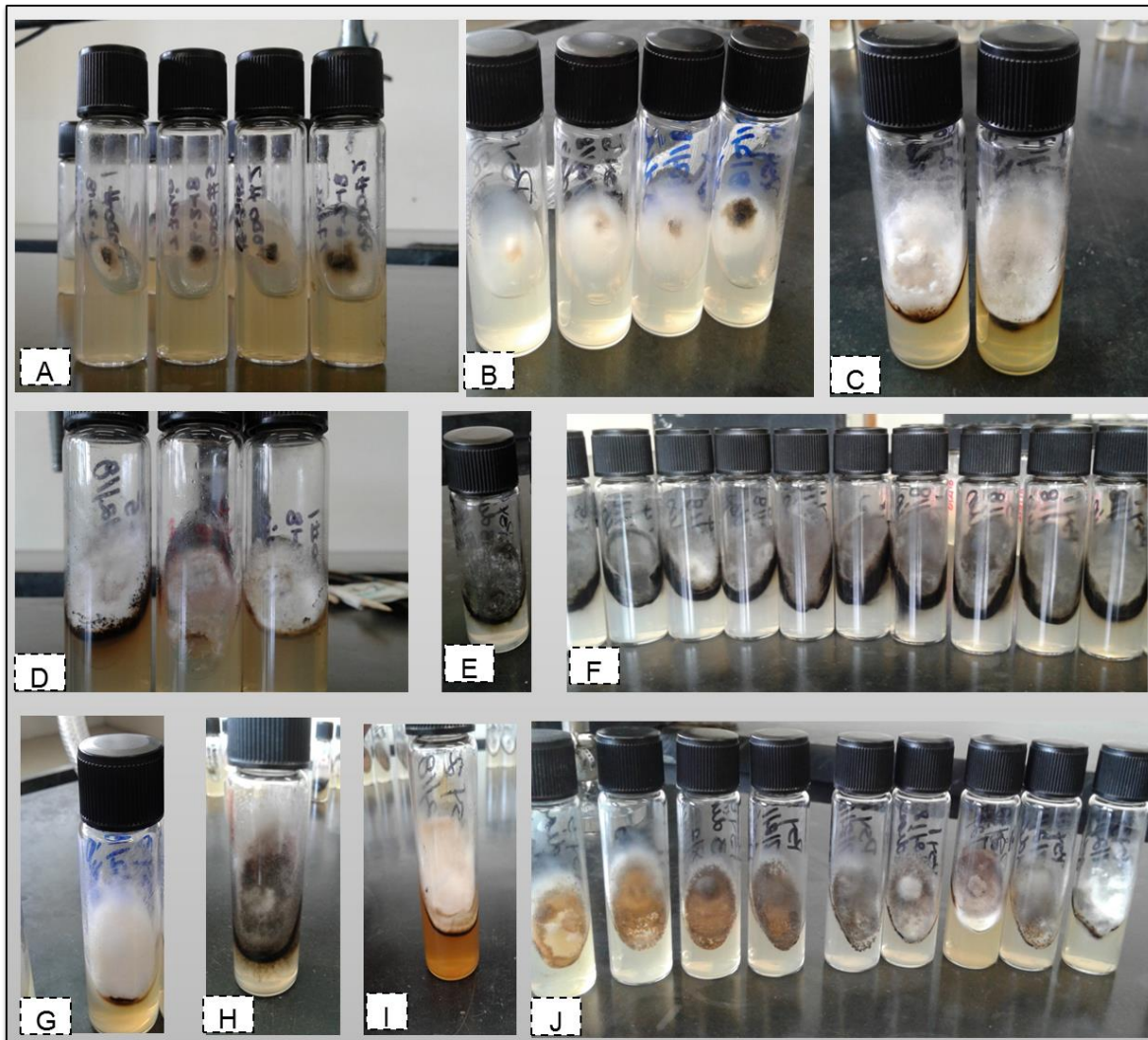
### **III.- AGRUPACIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS AISLADOS EN LA RESERVA FORESTAL EL MONTUOSO**

Transcurridas seis semanas de crecimiento de los hongos endófitos en los tubos de ensayo con PDA, se realizó el proceso de agrupación. Se compararon entre sí, todos los hongos endófitos aislados en tubos de ensayo por cada planta y luego fueron agrupados en diferentes morfotipos dependiendo de las características morfológicas visibles.

Los criterios empleados para la agrupación de los hongos endófitos en morfotipos incluyeron: la tasa de crecimiento (lento, moderado o rápido), Aspectos de colonia (color, textura, margen), micelio (aéreo o inmerso), pigmentación del medio de cultivo inducida por el hongo, presencia de estructuras reproductivas y su coloración, todos los criterios mencionados anteriormente se pueden distinguir, respectivamente, desde la Fig. 6A hasta la Fig. 6J.

Basados en los criterios antes expuestos, se generaron morfotipos que incluyeron desde dos hasta un máximo de trece individuos por agrupación (morfotipos grupales). Un número significativo de hongos solo se presentaron una vez en las respectivas colecciones (morfotipos individuales), por lo que cada planta seleccionada para el ensayo contó con morfotipos grupales y morfotipos individuales de hongos endófitos. Pasadas dos semanas se volvieron a revisar las agrupaciones de morfotipos grupales e individuales con el objetivo de confirmar los grupos. Tomando en cuenta, la cantidad de morfotipos grupales, se procedió a seleccionar la mitad de la cantidad total y todos los morfotipos individuales para continuar la caracterización e identificación de estos.



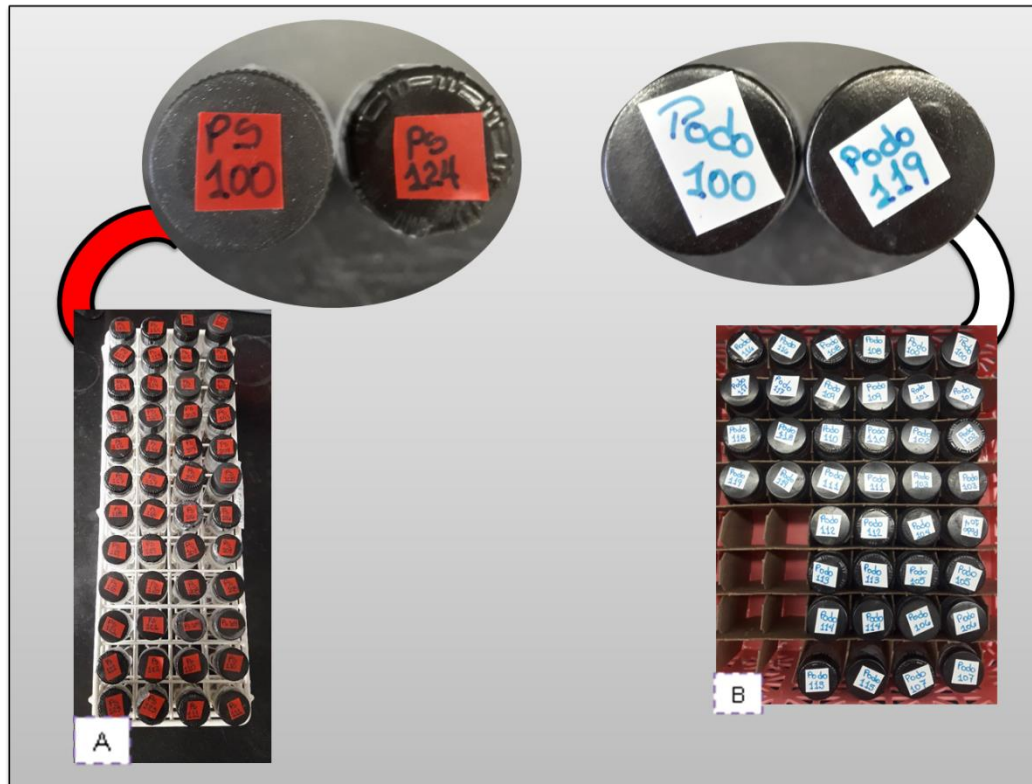


**Figura 6. Características morfológicas visibles empleadas para agrupar los morfotipos de hongos endófitos en cada planta.**

#### **IV.- CODIFICACIÓN DE LOS MORFOTIPOS REPRESENTATIVOS**

En la Fig. 7A se pueden ver los morfotipos representativos de hongos endófitos foliares en *Psychotria cuspidata*, los cuales fueron nombrados con las letras P, s, y (Psy) seguidas de la numeración corrida que inició con el número 100 hasta el 124.

Por otro lado, en la Fig. 7B se pueden distinguir los morfotipos representativos de hongos endófitos foliares en *Podocarpus guatemalensis*, donde las letras empleadas para su codificación fueron cuatro P, o, d, o (Podo) seguidas de la numeración corrida desde el número 100 hasta el 119.



**Figura 7. Morfotipos representativos de hongos endófitos codificados**

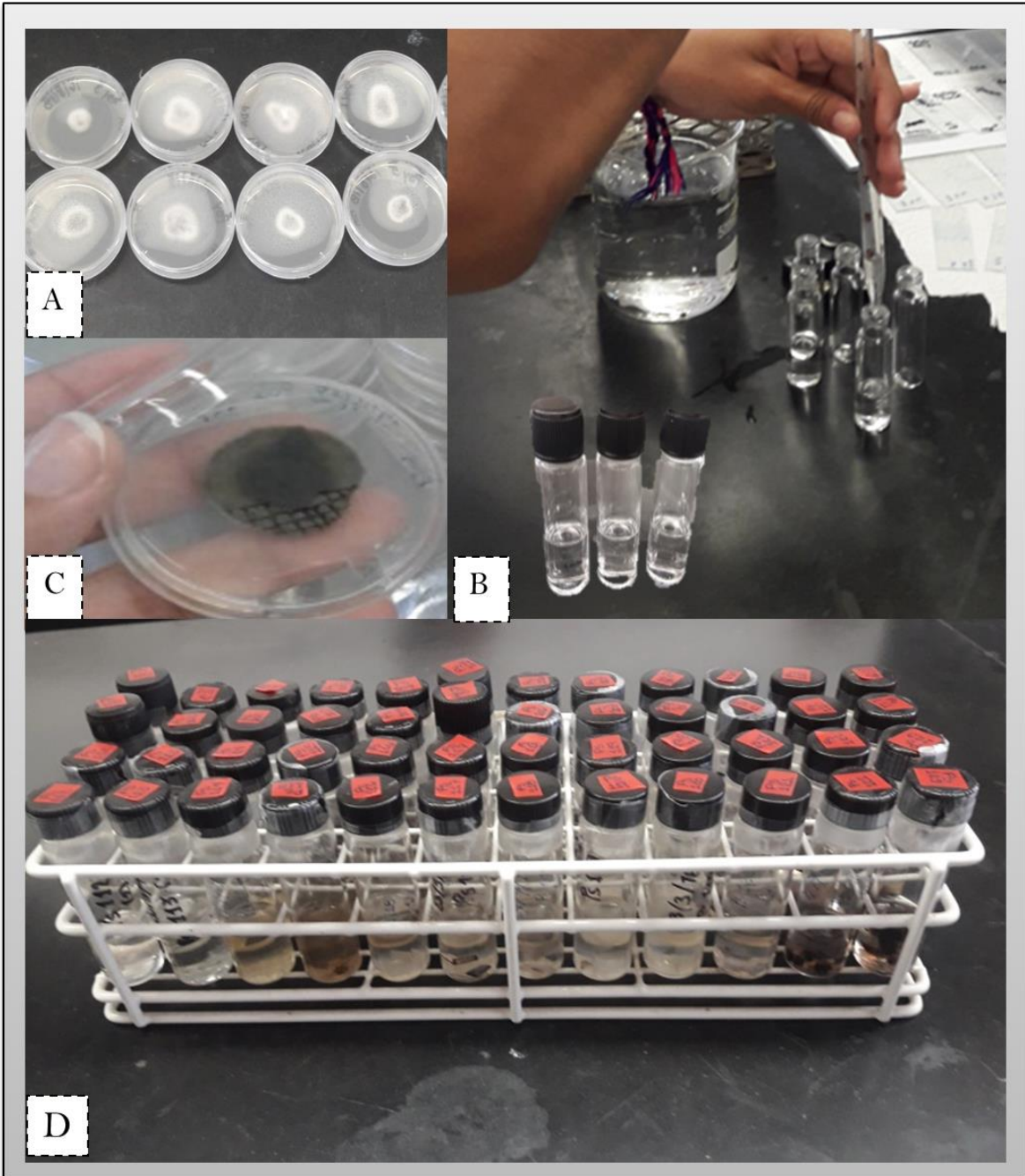
#### **V.- CLONACIÓN DE LOS HONGOS ENDÓFITOS PARA CONSERVACIÓN**

Platos Petri pequeños (55x14mm) preparados con PDA se emplearon para esta etapa. Estos fueron servidos en la cámara de flujo laminar y se usaron tres días después de su preparación como método de control de calidad para prevenir la contaminación por hongos ambientales. Como muestra la Fig. 8A se sembraron los hongos endófitos

representativos de cada morfotipo procedente de cada planta, se incubó y se esperó a que estos hongos crecieran lo suficiente para utilizarlos en posteriores procedimientos. Luego de esto se procedió a cortar el hongo a la mitad. Una parte del hongo cortado se utilizó para la clonación de este. La otra mitad del hongo cortado se empleó en la curva de crecimiento, procedimiento que se detallará más adelante.

En la Fig. 8B se puede observar el siguiente paso donde se prepararon dos tubos de ensayo con 5mL de agua destilada para cada hongo endófito, luego todos los tubos fueron esterilizados en autoclave para ser usados como depósito de fragmentos de medio de cultivo con micelio fúngico proveniente de las muestras. Por otra parte, en la Fig. 8C se aprecian los fragmentos que fueron cortados con un bisturí estéril y depositados con la ayuda de un asa micológica dentro de los tubos de ensayo. Con este procedimiento se garantiza la preservación de los hongos endófitos mediante clonación en agua estéril.

Los tubos se sellaron con parafilm con el propósito de prevenir la evaporación del agua con el paso del tiempo y para finalizar se puede notar cómo todos los clones preparados fueron almacenados en gradillas a temperatura ambiente (no mayor de 30°C) para su posterior uso durante la investigación, ver Fig. 8D.



**Figura 8. Proceso de la clonación de los hongos endófitos codificados**

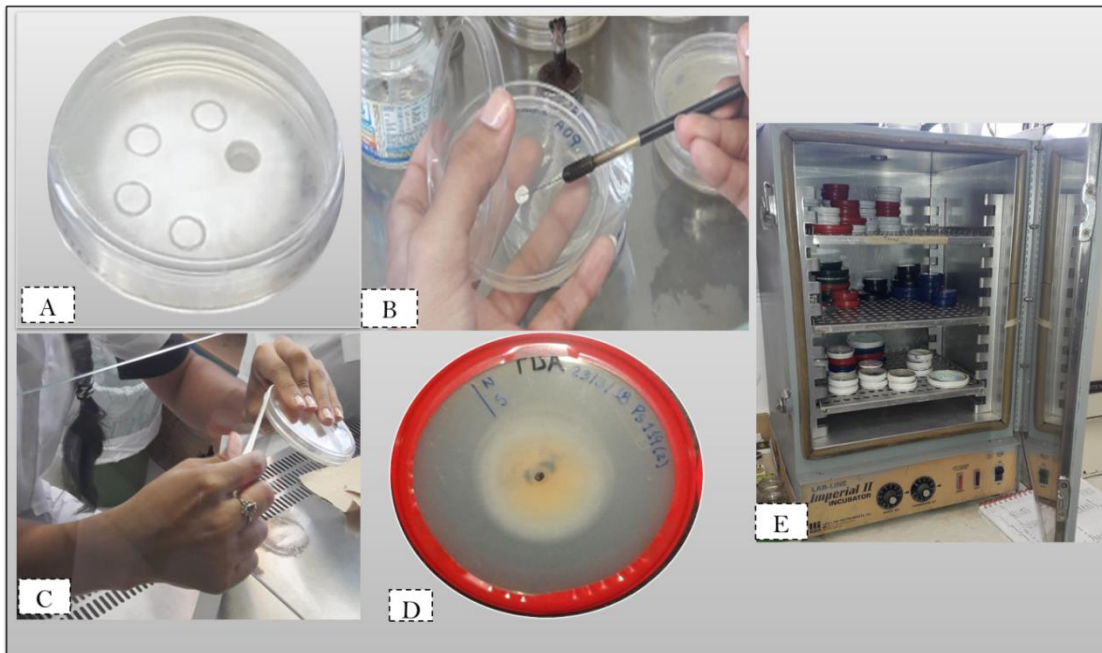
## **VI.- CURVA DE CRECIMIENTO DE LOS HONGOS ENDÓFITOS REPRESENTATIVOS**

La tasa de crecimiento se define como el aumento medio del diámetro de la colonia de un hongo (Arnold & Herre, 2003). Para el inicio de este método, empleando una pipeta Pasteur estéril se hicieron varios cortes circulares (discos) de aproximadamente 6 mm de diámetro de los hongos endófitos crecidos en PDA como inóculo para las curvas como los que se pueden distinguir en la Fig.9A. La Fig. 9B ilustra el siguiente paso en el que, con el asa micológica, previamente flameada, se tomaron uno a uno discos que fueron colocados en el centro de un plato Petri grande (90x14mm) con medio PDA repitiendo este procedimiento en tres ocasiones, ya que se hicieron tres réplicas por cada hongo. Para terminar de organizar el sistema de curva se sellaron los platos Petri con cinta adhesiva eléctrica como se aprecia en la Fig. 9C.

Tal como se observa en la Fig. 9D luego de sembrar cada hongo endófito y para tener un control de lectura en la medida de cada hongo, se trazó con un marcador, una línea recta en la parte inferior del plato Petri con PDA para así mantener una sola dirección de lectura durante todo el ensayo. Dependiendo del crecimiento del hongo se determinó el tiempo que transcurría entre una medida de lectura y otra. En la Fig. 9E se observa cómo fueron colocados los hongos endófitos en la incubadora para favorecer su crecimiento. En el caso de los hongos de crecimiento muy lento, la tasa de crecimiento se midió cada 24 horas y los de crecimiento más rápido se midieron cada dos a seis horas.

El tiempo máximo de duración para culminar la curva de crecimiento de cada hongo endófito fue de 15 días, es decir, si el hongo endófito no completaba el crecimiento

dentro del plato Petri en el tiempo estipulado los datos se recopilaron solamente hasta dicha fecha límite.



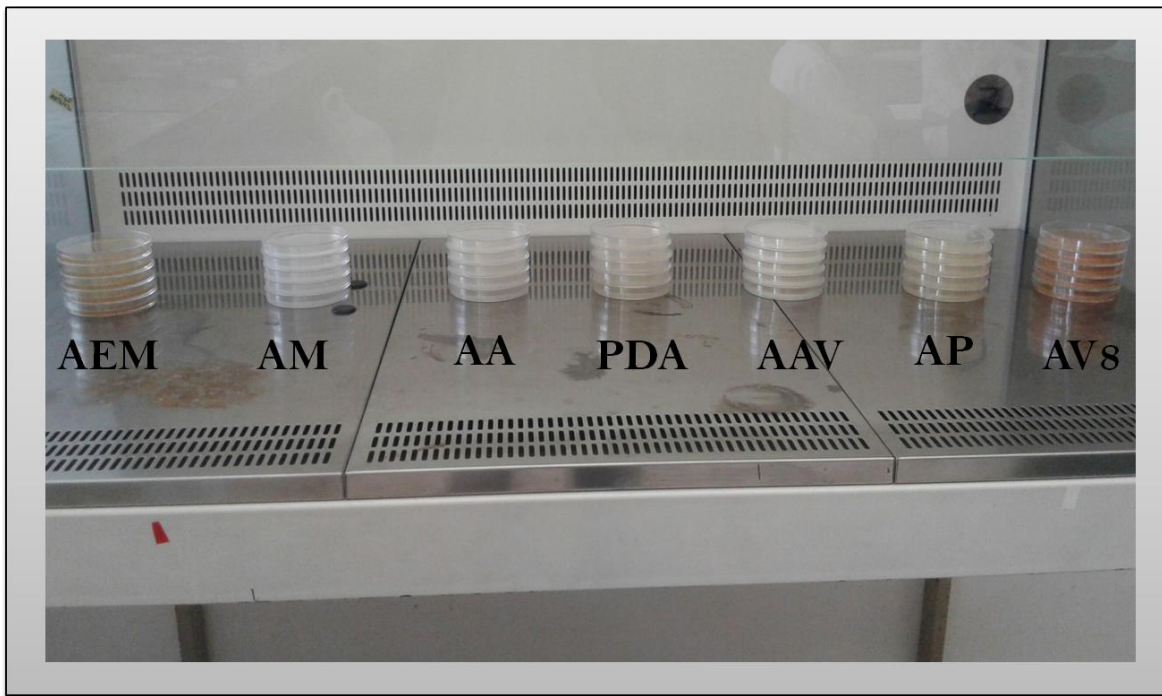
**Figura 9. Proceso de la curva de crecimiento de los hongos endófitos codificados**

## **VII.- IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS HONGOS ENDÓFITOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE MICROCULTIVO**

La técnica de microcultivo en plato Petri fue usada para la identificación morfológica de los hongos, al menos a nivel de género; para tal fin se empleó como referencia la guía *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* y también *Illustrated Genera of Ascomycetes*, volumen I y II (Barnett, H., 1998; Hanlin, R., 2000).

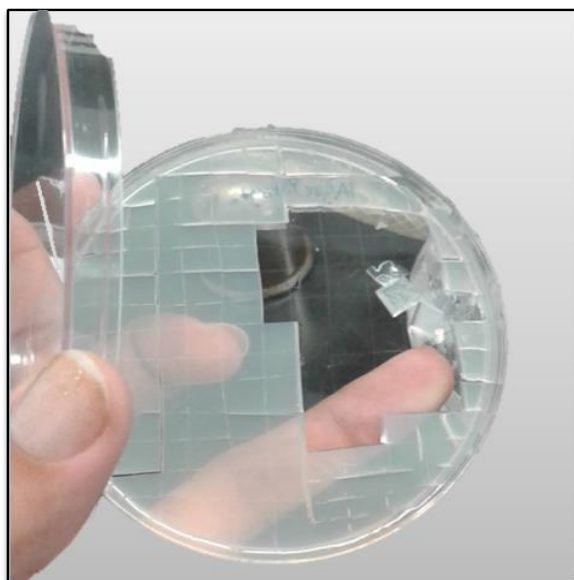
**Fase I:** Preparación y esterilización de los medios de cultivo para el sistema de microcultivos.

Se utilizaron siete medios de cultivos, que se ilustran en la Fig. 10, los cuales fueron: Agar Extracto de Malta (AEM), Agar de Maíz (AM), Agar Agua (AA), Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Avena (AAV), Agar de Papaya (AP), Agar V8 (AV8).



**Figura 10. Medios de cultivo utilizados para los microcultivos**

Luego de que los medios de cultivo salieron de la autoclave se sirvieron en platos Petri grandes, y pasados los 3 días de control de calidad, con un bisturí estéril se hicieron cortes horizontales y verticales en cada medio de cultivo, en la Fig.11 se pueden observar dichos cortes.



**Figura 11. Medio de cultivo cortado con bisturí**

**Fase II:** Preparación y esterilización de los materiales que forman parte del sistema de microcultivos.

El sistema de microcultivos requirió de los siguientes materiales en condición estéril: platos Petri de vidrio, papel toalla, platos Petri de plástico, botellas y frascos de vidrio, agua destilada, portaobjetos, cubreobjetos, pinza, además cinta adhesiva eléctrica y mechero de alcohol como se ilustra en la Fig. 12.

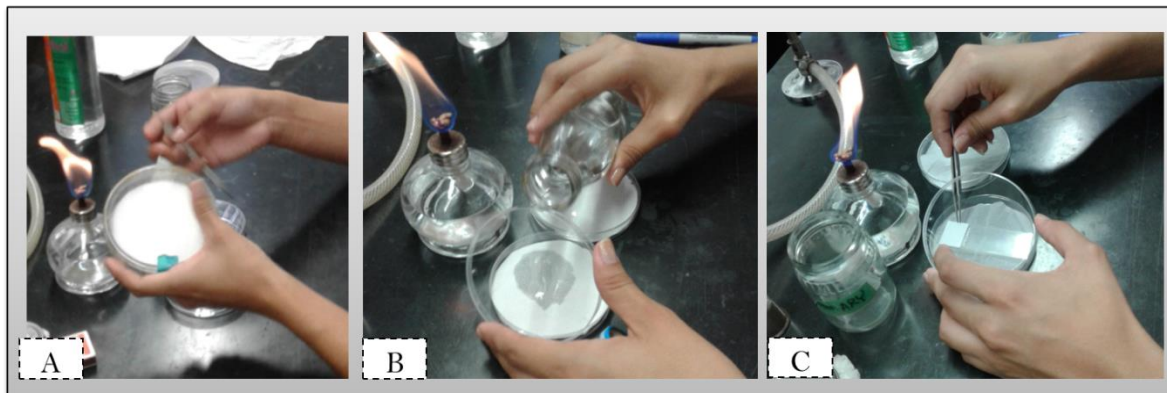
Para la técnica de microcultivos se cortaron numerosas unidades de papel toalla con forma circular y se situaron en el fondo de un plato Petri de vidrio, se colocaron portaobjetos dentro de recipientes de vidrio, se tomaron algunos cubreobjetos para ubicarlos dentro de un plato Petri de vidrio, también se añadió agua destilada dentro de una botella de vidrio. Todos estos materiales fueron esterilizados a 121°C, 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante 15 minutos en autoclave antes de ser utilizados.





**Figura 12. Materiales que forman parte del sistema de microcultivos**

El proceso de armado de los sistemas se inició empleando platos Petri estériles en los cuales se depositó, con la ayuda de una pinza previamente desinfectada, un papel toalla circular (Fig.13 A), a continuación, se humedeció el papel toalla con agua destilada estéril, Fig.13B. Luego como se aprecia en la Fig. 13C, se procedió a apilar sobre el papel húmedo tres portaobjetos de forma vertical y un portaobjeto más, colocado horizontalmente, formando una cruz dentro del plato Petri.



**Figura 13. Preparación del sistema de microcultivo**

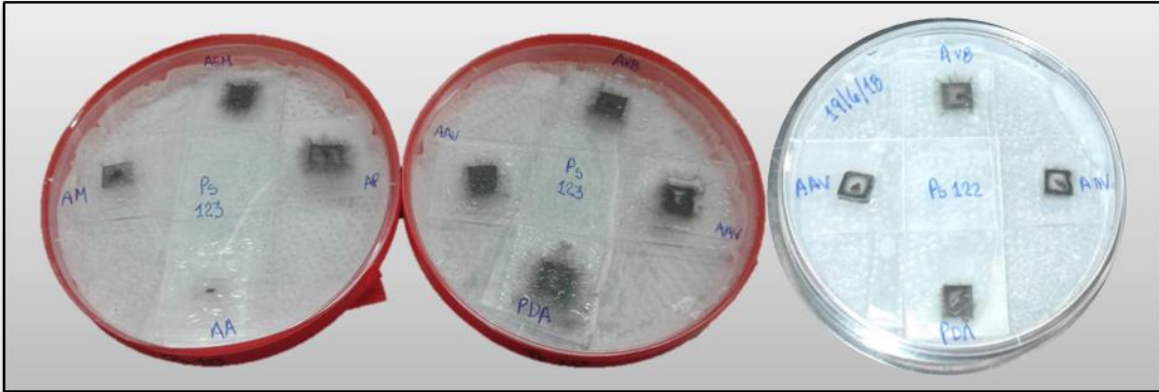
Los segmentos de medio de cultivo, cortados en la fase I, fueron colocados como soporte nutricional para los hongos endófitos dentro del sistema de microcultivo en los cuatro extremos de los portaobjetos que conforman la cruz, Fig. 14A. Para cada hongo endófito evaluado se prepararon dos sistemas, considerando que se usaron 7 medios de cultivo distintos. Una vez se completó esta parte se procedió a rotular cada plato, Fig. 14B y trabajar con los hongos endófitos codificados de cada planta. Empleando un asa micológica, previamente flameada, se depositó una pequeña muestra de cada hongo en los siete medios de cultivo preparados, Fig. 14C, después de colocar las muestras, con la pinza desinfectada se tomó un cubreobjetos y se situó sobre la muestra del hongo en cuestión. Finalmente, los platos Petri fueron sellados, con mucho cuidado, empleando cinta adhesiva, ver Fig. 14D y los platos se introdujeron en la incubadora para darles tiempo de crecimiento a cada hongo, Fig. 14E.



**Figura 14. Ensamblaje de los sistemas para los microcultivos.**

Los sistemas de microcultivos que se ilustran en la Fig.15 fueron revisados periódicamente después de 5 días y hasta los 15 días siendo el tiempo promedio para evaluar las muestras. Se retiró la cinta adhesiva del plato Petri, y con una pinza previamente desinfectada se tomó el cubreobjetos con crecimiento fúngico e inmediatamente se colocó sobre un portaobjetos limpio, que contenía una gota de azul de lactoglicerol previamente dispensada como se muestra en la Fig. 16A. Seguidamente se llevó al microscopio de luz tal como se observa en la Fig. 16B, y bajo el lente de 40X se revisaron las estructuras presentes en la muestra en busca primordialmente de cuerpos fructíferos. Una vez obtenido el resultado deseado, se

selló con esmalte de uñas los bordes del cubreobjetos, procedimiento que se muestra la Fig.16C, y las placas fueron almacenadas en cajas selladas.



**Figura 15. Sistemas de microcultivo debidamente armados**

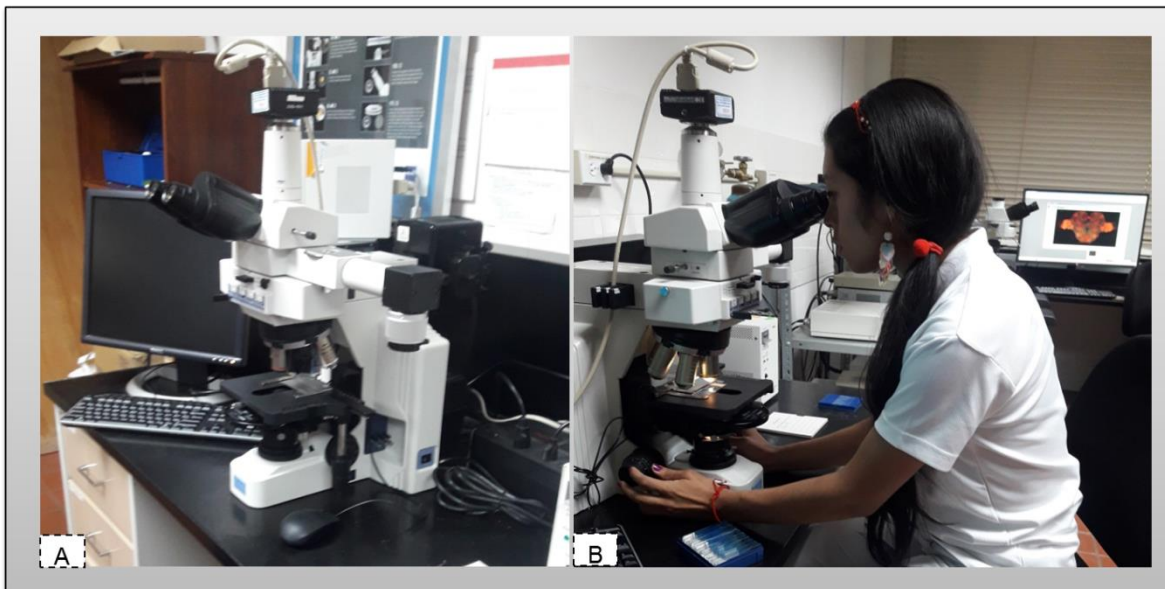


**Figura 16. Observación en el microscopio**

### VIII.- FOTOGRAFÍAS DE LOS HONGOS ENDÓFITOS CAPTADAS EN MICROSCOPIO

Para tomar fotografías con mejor resolución de los hongos endófitos identificados a nivel de género, se acudió a las instalaciones del Instituto Smithsonian donde se utilizó el microscopio Nikon E600 con cámara integrada como se aprecia en la fig. 17A, el cual fue facilitado por el Magíster Jorge Ceballos.

En la fig. 17B se puede resaltar la manipulación del microscopio al observar una placa bajo el lente 10X.



**Figura 17. Observación y captura de imágenes de los hongos endófitos identificados en el microscopio Nikon E600 con cámara integrada.**

## RESULTADOS

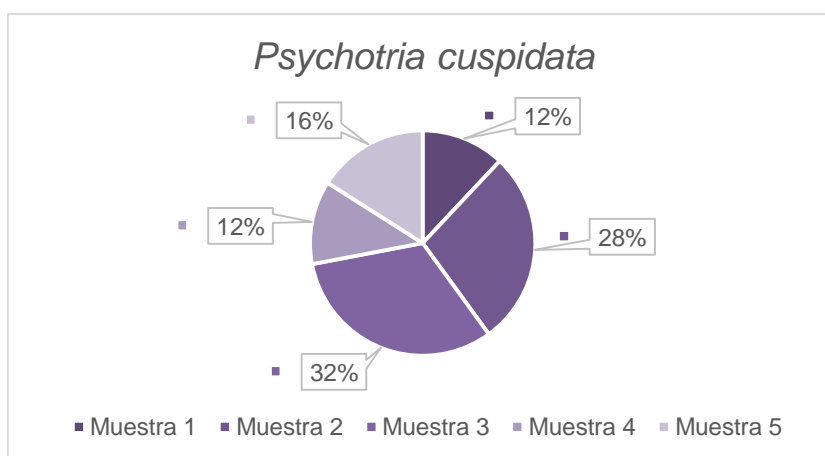
### I.- TOTAL DE HONGOS ENDÓFITOS POR CADA HOJA DE LAS RESPECTIVAS PLANTAS

Un hongo endófito se encontró en cada hoja muestreada de ambas plantas del estudio. En la tabla 2 se muestra el total de hongos endófitos representativos (25), es decir, los hongos seleccionados para el ensayo que fueron aislados en cada hoja de *Psychotria cuspidata*.

**Tabla 2. Hongos endófitos por cada muestra de *Psychotria cuspidata*.**

Hoja de <i>Psychotria cuspidata</i>	Número de hongos endófitos
Muestra 1	3
Muestra 2	7
Muestra 3	8
Muestra 4	3
Muestra 5	4
<b>Total de hongos representativos</b>	<b>25</b>

En la Fig. 18 se reflejan los datos porcentuales de la abundancia de hongos endófitos por muestra en *Psychotria cuspidata*.



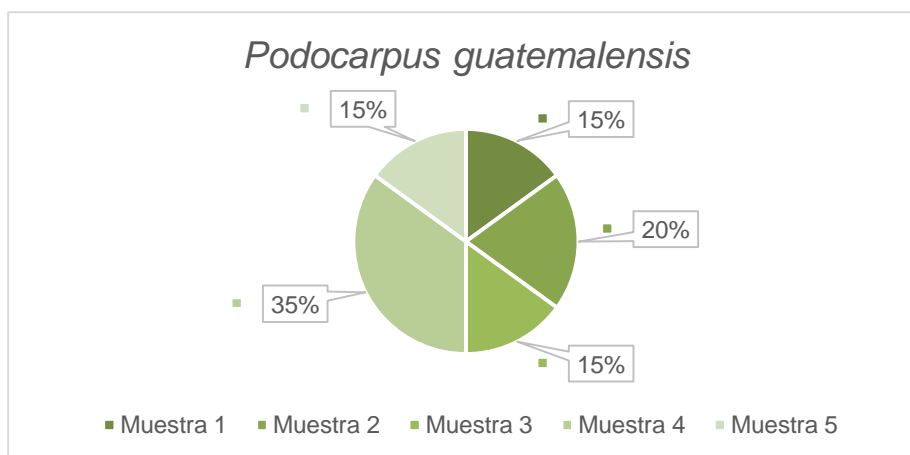
**Figura 18. Abundancia porcentual de hongos endófitos por cada hoja de *Psychotria cuspidata*.**

En la tabla 3 se observa la cantidad total de hongos endófitos representativos (20), fueron los hongos endófitos seleccionados para el estudio, aislados de cada hoja en *Podocarpus guatemalensis*.

**Tabla 3. Hongos endófitos por cada muestra de *Podocarpus guatemalensis*.**

Hoja de <i>Podocarpus guatemalensis</i>	Número de hongos endófitos
Muestra 1	3
Muestra 2	4
Muestra 3	3
Muestra 4	7
Muestra 5	3
<b>Total de hongos representativos</b>	<b>20</b>

En la Fig. 19 se aprecian los datos porcentuales de la abundancia de hongos endófitos por muestra en *Podocarpus guatemalensis*, dentro de los que fueron escogidos como el número representativo para este estudio.

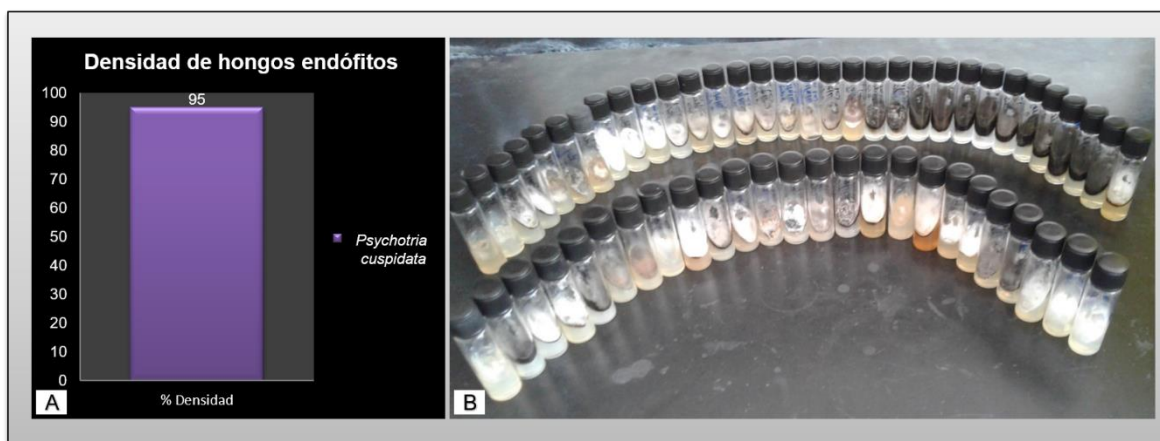


**Figura 19. Abundancia porcentual de hongos endófitos por cada hoja de *Podocarpus guatemalensis*.**

## II.- DENSIDAD DE HONGOS ENDÓFITOS AISLADOS EN LA RESERVA FORESTAL EL MONTUOSO

De las cinco hojas procesadas en *Psychotria cuspidata* se obtuvo un total de 57 hongos endófitos recuperados de 60 fragmentos foliares en total que se sembraron en PDA, lo que representa una densidad de 95%.

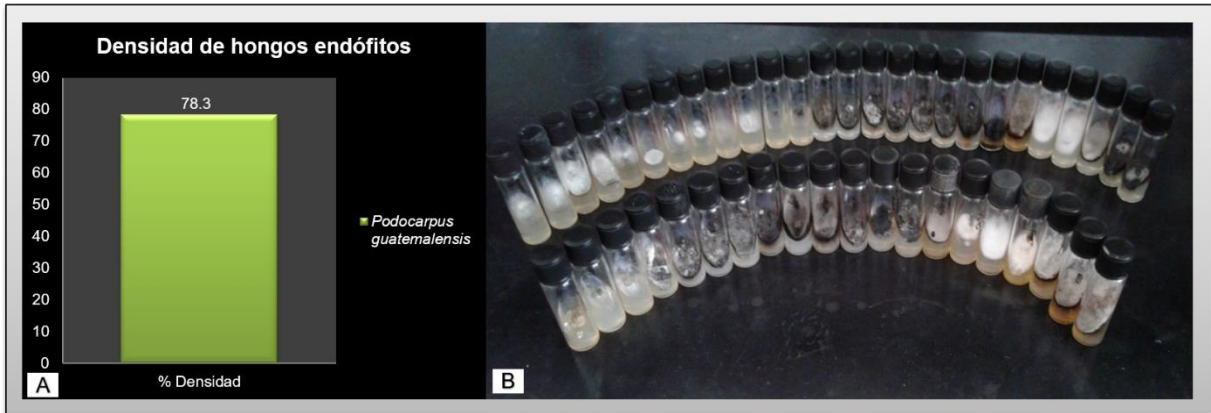
En la Fig. 20A se representa gráficamente la densidad porcentual de hongos endófitos en *Psychotria cuspidata*, en la Fig. 20B también se aprecia la cantidad total recuperada de hongos endófitos en esta planta.



**Figura 20. Porcentaje de densidad de los hongos endófitos en *Psychotria cuspidata*.**

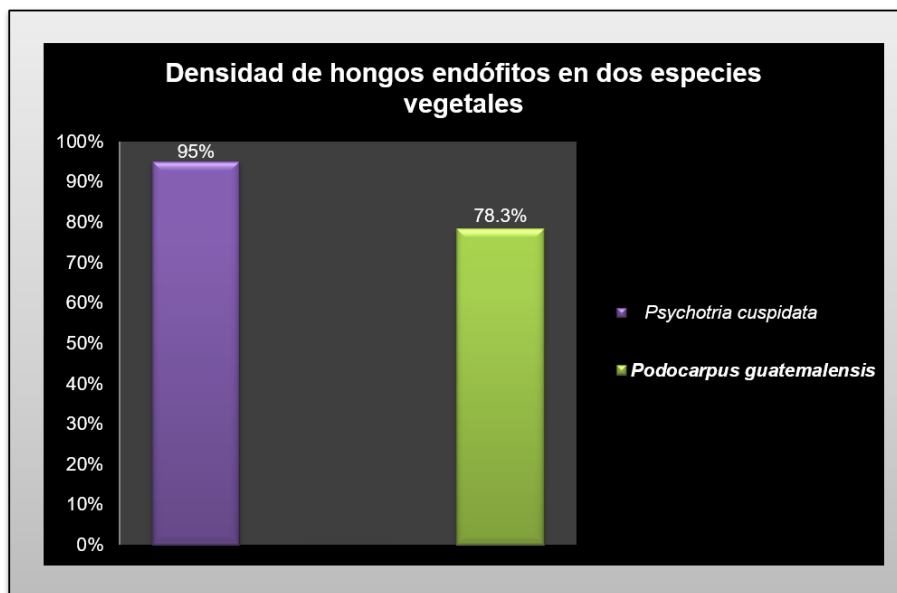
Con respecto a *Podocarpus guatemalensis*, de las cinco hojas procesadas se recuperaron 47 hongos endófitos de 60 fragmentos foliares en total que fueron sembrados en PDA, lo que representa una densidad de 78.3%. En la Fig. 21A se contempla gráficamente la densidad porcentual de hongos endófitos en *Podocarpus guatemalensis*, en la Fig. 21B se aprecian los hongos endófitos recuperados de dicha planta.





**Figura 21. Porcentaje de densidad de los hongos endófitos en *Podocarpus guatemalensis*.**

Ahora se muestra la densidad de hongos endófitos calculada en *Psychotria cuspidata* y en *Podocarpus guatemalensis*. En la Fig.22 se aprecia gráficamente la densidad porcentual en ambas plantas.



**Figura 22. Densidad porcentual de hongos endófitos en *Psychotria cuspidata* y en *Podocarpus guatemalensis*.**

### III.- DIVERSIDAD PORCENTUAL DE HONGOS ENDÓFITOS AISLADOS EN LA RESERVA FORESTAL EL MONTUOSO

Tomando en cuenta los datos de las respectivas agrupaciones morfológicas de todos los hongos endófitos recuperados de cada planta multiplicado por 100 se obtuvo la diversidad.

En *Psychotria cuspidata* se presentó una ligera diferencia entre los números de morfotipos, siendo menores los individuales que los grupales; los respectivos números son 10 y 11. Podemos observar la representación gráfica de estos morfotipos en la Fig.23.

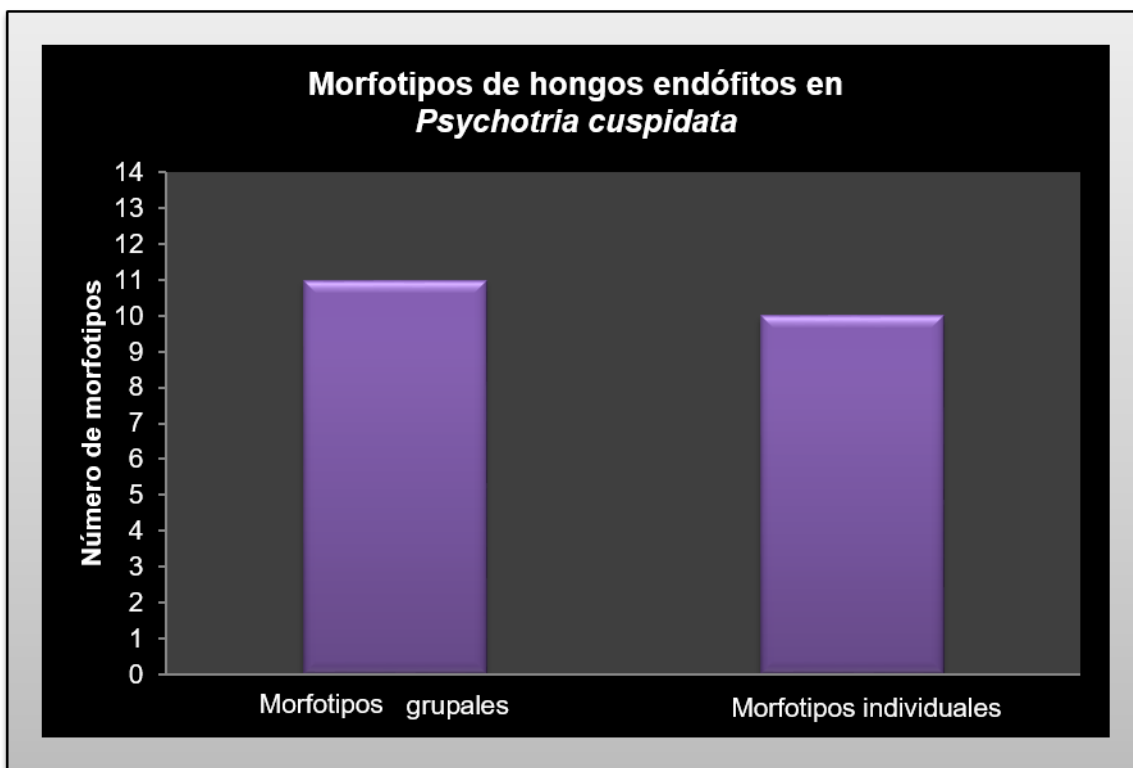
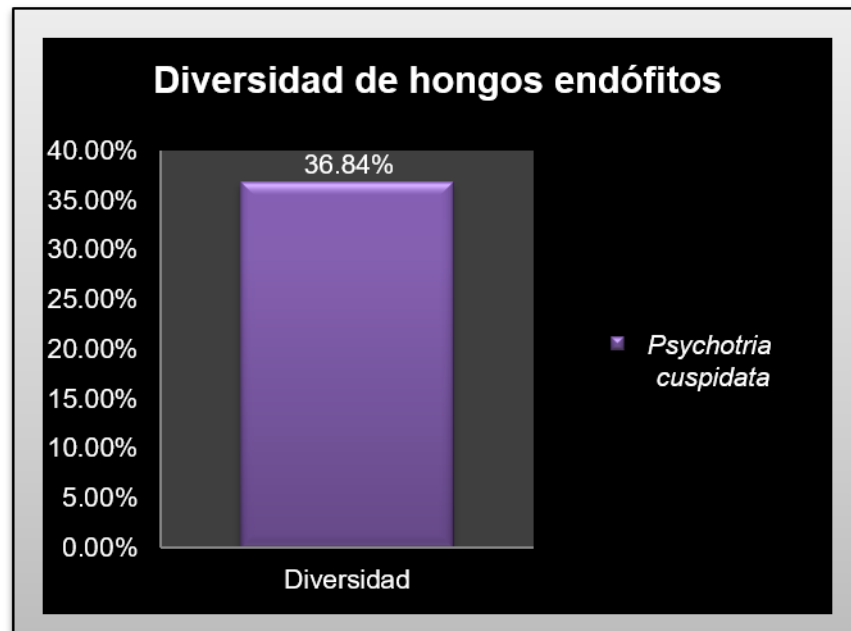


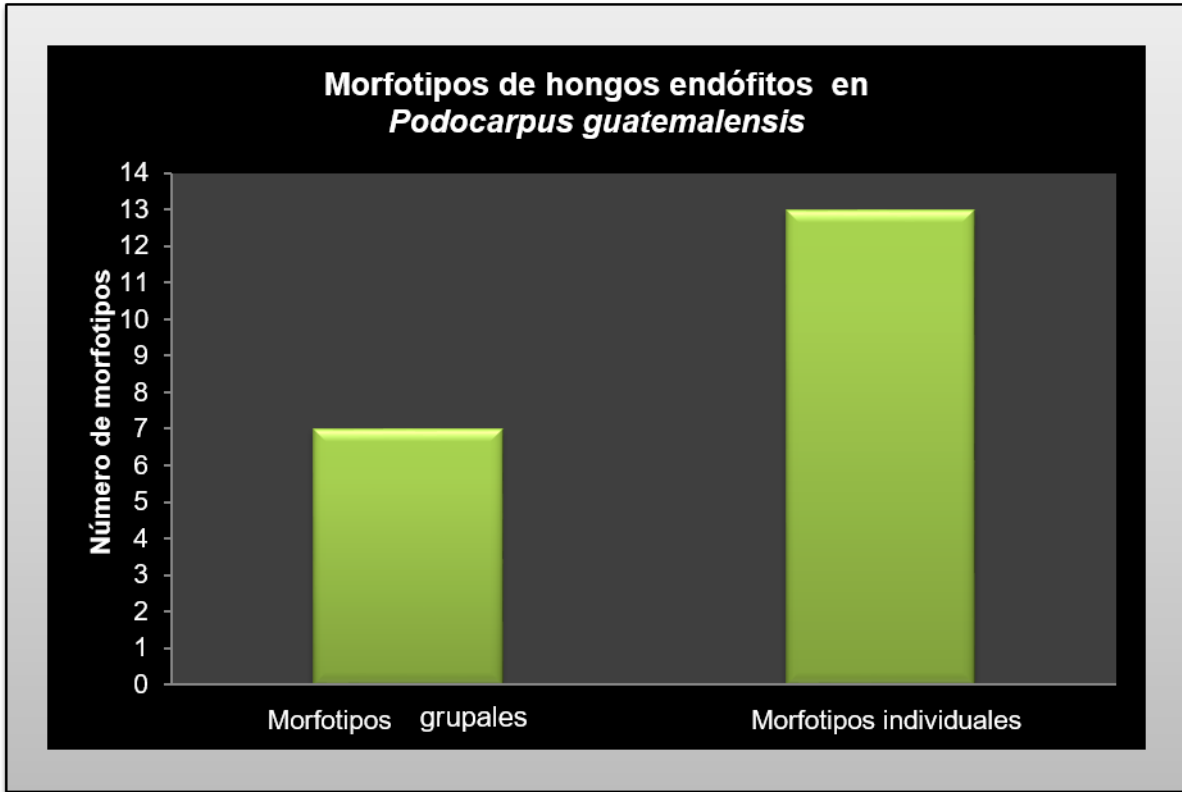
Figura 23. Número de morfotipos grupales e individuales de los hongos endófitos en *Psychotria cuspidata*.

Una vez conocidos los números de morfotipos, estos se emplean para determinar la diversidad porcentual, la cual mostró ser de 36.84% de hongos endófitos en *Psychotria cuspidata* que se ve representado gráficamente en la Fig. 24.



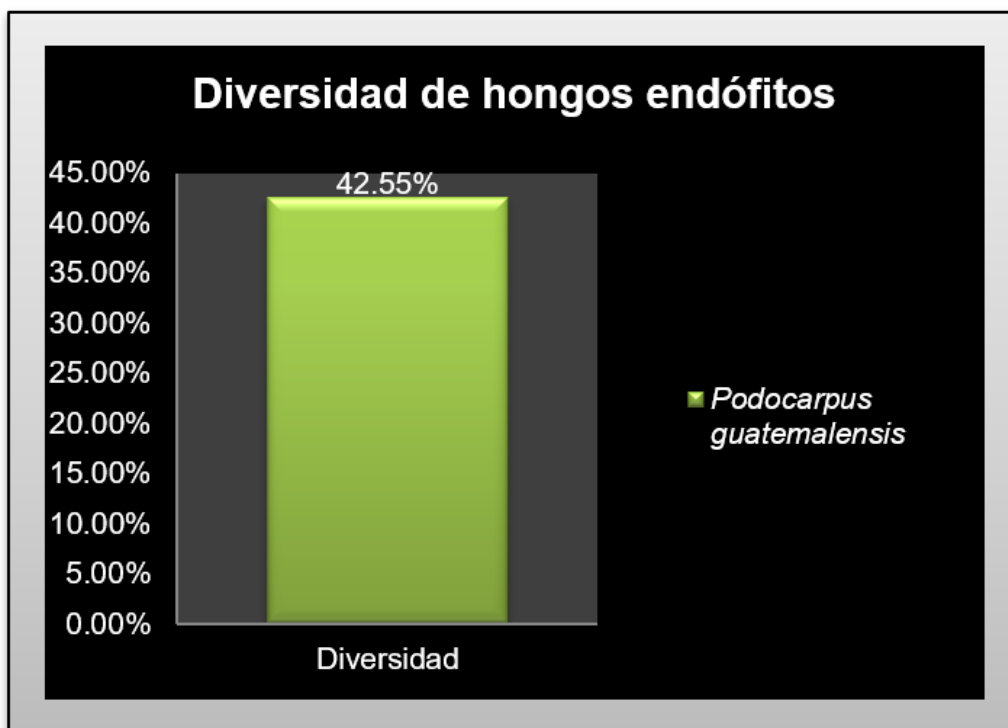
**Figura 24. Diversidad porcentual de hongos endófitos en *Psychotria cuspidata*.**

En el caso de *Podocarpus guatemalensis* se obtuvieron más morfotipos individuales que morfotipos grupales siendo los resultados 13 y 7, respectivamente. En la Fig. 25 observamos los morfotipos gráficamente representados.



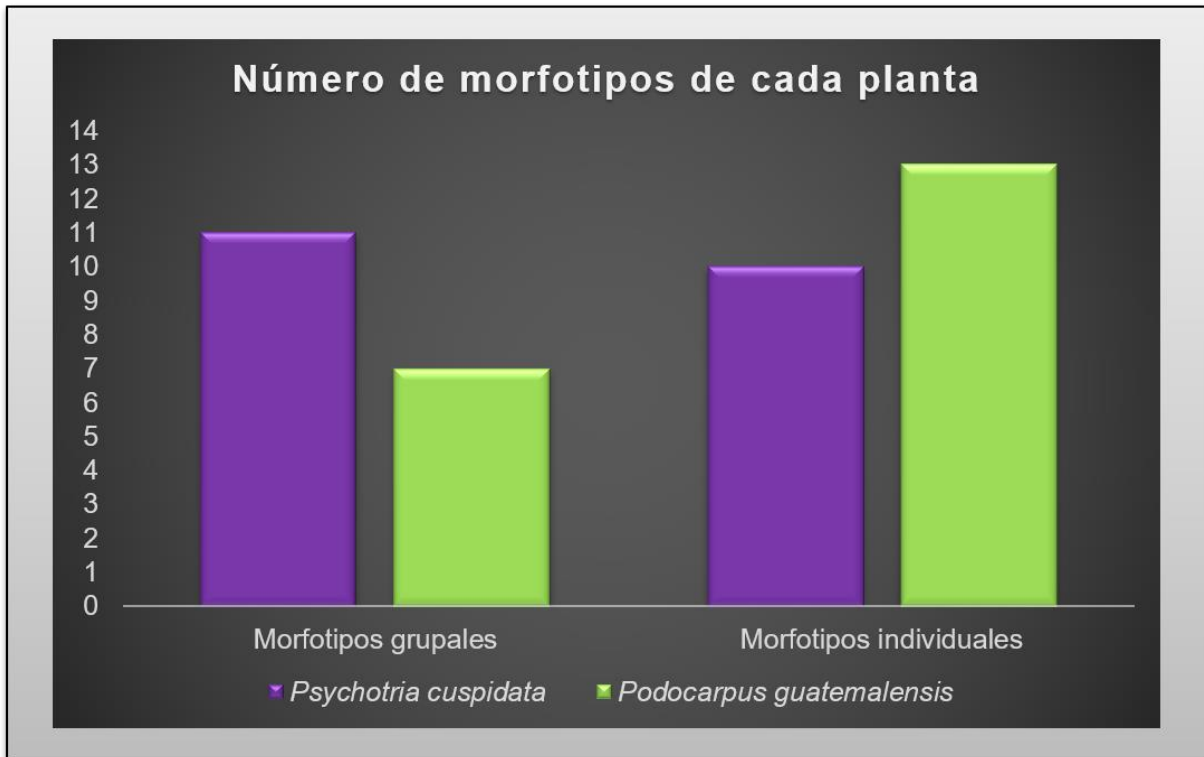
**Figura 25. Número de morfotipos grupales e individuales de los hongos endófitos en *Podocarpus guatemalensis*.**

Con el número de morfotipos de hongos endófitos en *Podocarpus guatemalensis* se obtuvo 42.55% de diversidad de hongos endófitos en esta gimnosperma. En la Fig. 26 se aprecia el porcentaje gráfico de diversidad en esta planta.



**Figura 26. Diversidad porcentual de hongos endófitos en *Podocarpus guatemalensis*.**

Tomando en cuenta el número de morfotipos de ambas plantas, se pudo establecer que en *Psychotria cuspidata* hubo mayor cantidad de hongos endófitos en morfotipos grupales y en *Podocarpus guatemalensis* hubo mayor cantidad de hongos endófitos en morfotipos individuales. Estos resultados se reflejan gráficamente en la Fig. 27.



**Figura 27. Número de morfotipos grupales e individuales de los hongos endófitos en *Psychotria cuspidata* y en *Podocarpus guatemalensis*.**

Para tener una idea de la diferencia de diversidad porcentual entre los hongos endófitos tanto en *Psychotria cuspidata* como en *Podocarpus guatemalensis* se presenta una comparación gráfica del porcentaje de diversidad entre los respectivos hongos de ambas plantas en estudio, donde se vio claramente que los hongos endófitos en *Podocarpus guatemalensis* presentan mayor diversidad que los hongos endófitos en *Psychotria cuspidata*. Esto se aprecia en la Fig. 28.

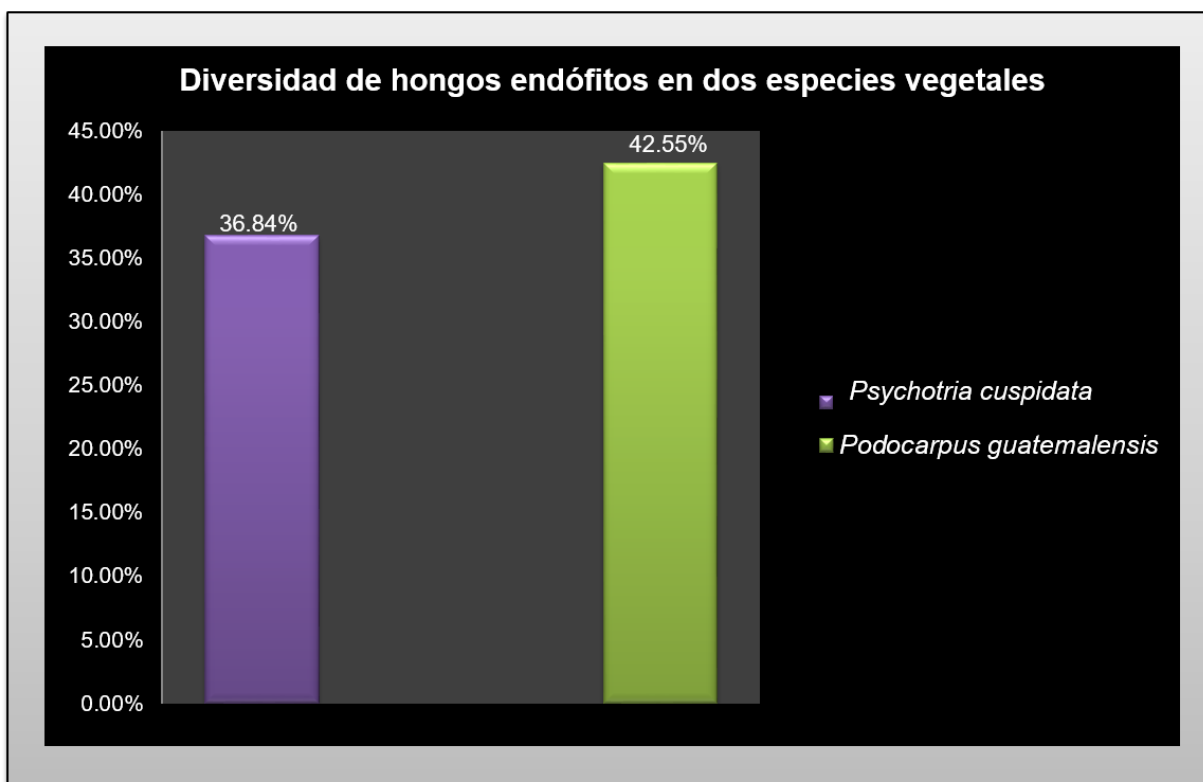





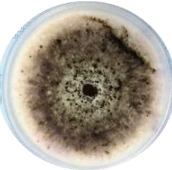
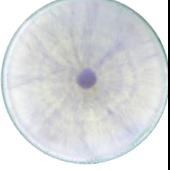


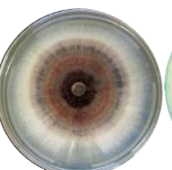
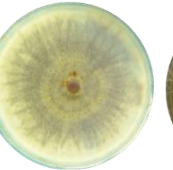

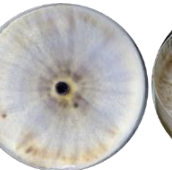

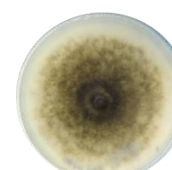
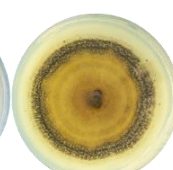
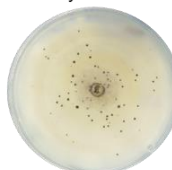
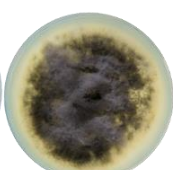




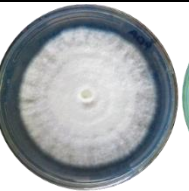
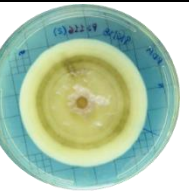
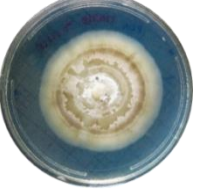


Figura 28. Diversidad porcentual de hongos endófitos en *Psychotria cuspidata* y en *Podocarpus guatemalensis*.

#### IV.- CURVA DE CRECIMIENTO FÚNGICO

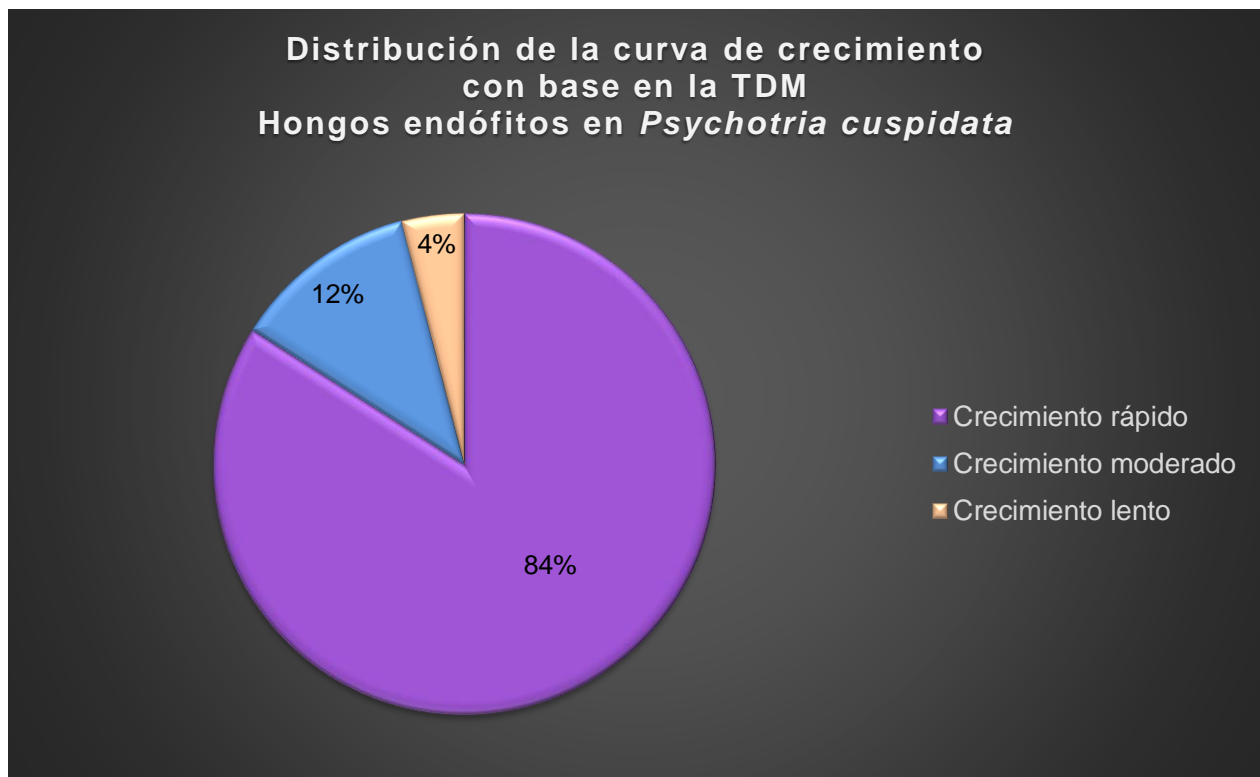
Los datos obtenidos en este procedimiento se utilizaron para colocar en una de tres respectivas categorías (rápido, moderado y lento crecimiento) a cada uno de los hongos endófitos del estudio. A partir de la curva de crecimiento en medio sólido, se calculó el tiempo o tasa de duplicación (pendiente), la tasa de duplicación del micelio (TDM) como se observa en la tabla 4. La escala control para ubicar a cada hongo endófito en *Psychotria cuspidata* dentro de su respectiva categoría fue elegida arbitrariamente de la siguiente manera: crecimiento rápido (0 a 3.99 horas), crecimiento moderado (4.0 a 7.99 horas) y crecimiento lento (8.0 horas en adelante).

**Tabla 4. Hongos endófitos de *Psychotria cuspidata* según su categoría.**

Hongos endófitos con crecimiento rápido aislados de <i>Psychotria cuspidata</i>						
						
Psy 100	Psy 101	Psy 103	Psy 104	Psy 105	Psy 106	Psy 107
						
Psy 108	Psy 109	Psy 110	Psy 112	Psy 114	Psy 115	Psy 117
						
Psy 118	Psy 119	Psy 120	Psy 121	Psy 122	Psy 123	Psy 124
Hongos endófitos con crecimiento moderado aislados de <i>Psychotria cuspidata</i>						
						
Psy 102			Psy 113			Psy 116
Hongos endófitos con crecimiento lento aislados de <i>Psychotria cuspidata</i>						
						
Psy 111						



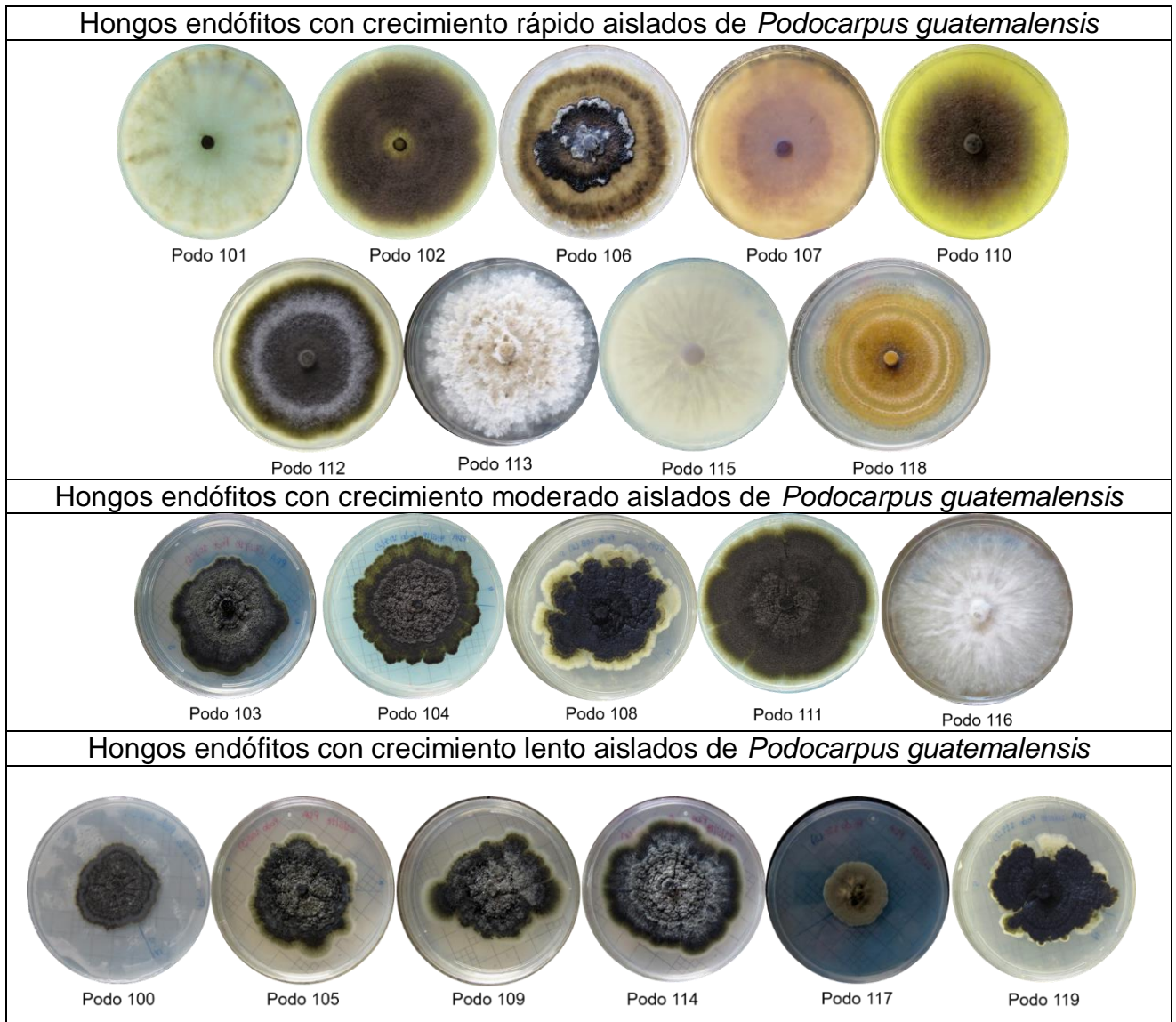
Los resultados para *Psychotria cuspidata* nos muestra que dominan los hongos endófitos de crecimiento rápido. Se diferenciaron 21 hongos de crecimiento rápido, 3 hongos de crecimiento moderado y 1 hongo de crecimiento lento lo que equivale porcentualmente, de manera respectiva, a 84%, 12% y 4%. En la Fig. 29 se aprecia la densidad porcentual de hongos endófitos por cada categoría.



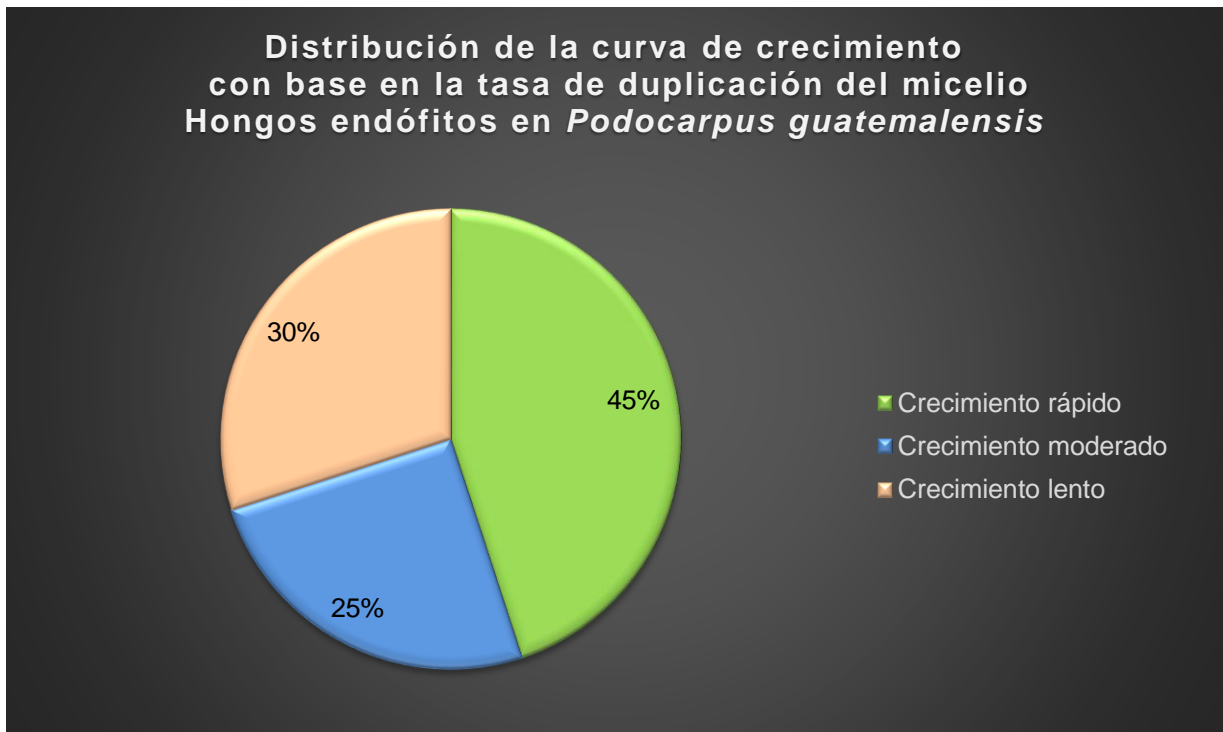
**Figura 29. Densidad porcentual de hongos endófitos en *Psychotria cuspidata* por categoría.**

En la tabla 5 figuran los hongos endófitos encontrados en *Podocarpus guatemalensis* que corresponden a cada categoría la cual fue seleccionada arbitrariamente con base en la TDM de la siguiente manera: crecimiento rápido (0 a 3.99 horas), crecimiento moderado (4.0 a 7.99 horas) y crecimiento lento (8.0 horas en adelante).

**Tabla 5. Hongos endófitos de *Podocarpus guatemalensis* según su categoría.**

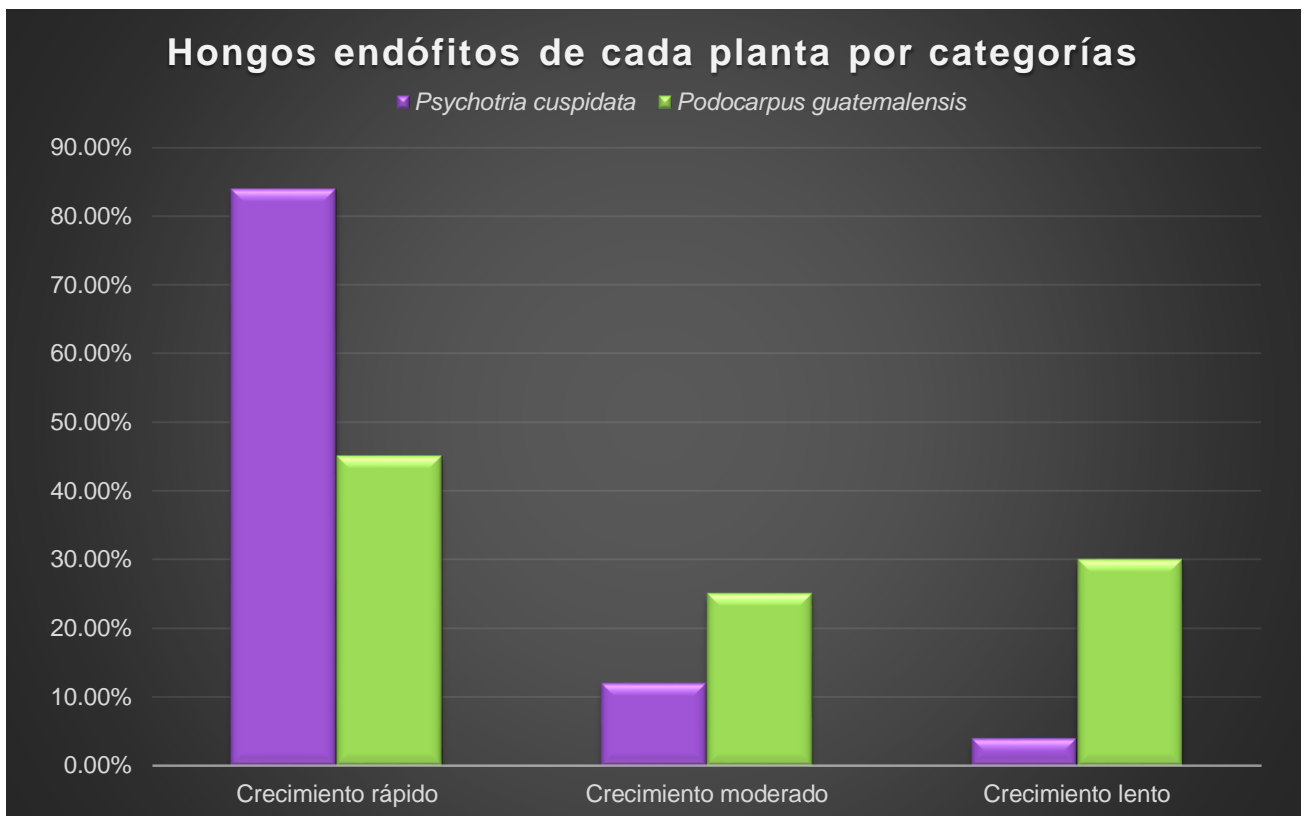


En *Podocarpus guatemalensis* se mantuvo la dominancia de los hongos endófitos de crecimiento rápido sin embargo se presentaron en un número menor (9) que en el arbusto, 5 hongos endófitos de crecimiento moderado y finalmente 6 hongos endófitos de crecimiento lento, esto equivale a los porcentajes, respectivamente, de 45%, 25% y 30%. Tales resultados se aprecian gráficamente en la Fig. 30.



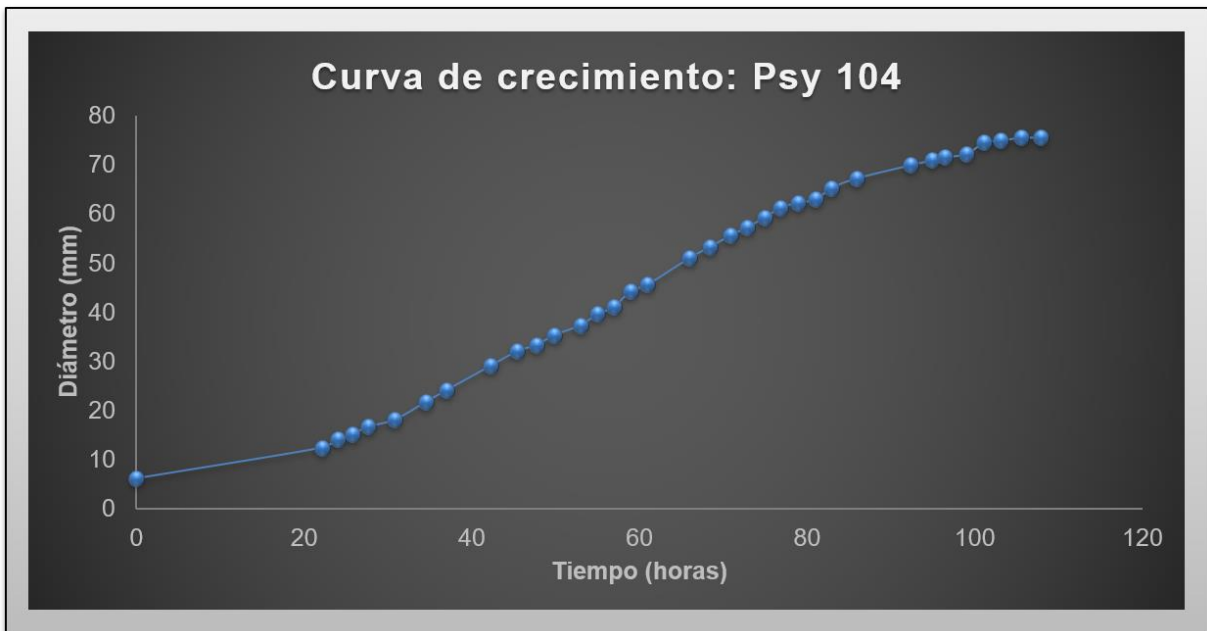
**Figura 30. Densidad porcentual de hongos endófitos en *Podocarpus guatemalensis* por categoría.**

De manera general podemos contemplar que en *Psychotria cuspidata* la tasa de crecimiento en la mayoría de los hongos estuvo representado por un crecimiento rápido con 84%, en *Podocarpus guatemalensis* los hongos endófitos con crecimiento rápido se presentó en un 45%; dentro de la categoría de hongos endófitos de crecimiento moderado la densidad fue de 12% en *Psychotria cuspidata*, en *Podocarpus guatemalensis* los hongos endófitos de crecimiento moderado fueron representados con 25%; finalmente en los hongos endófitos de crecimiento lento se presentó un 4% para *Psychotria cuspidata* y 30% para *Podocarpus guatemalensis*. Estos resultados se observan, gráficamente, en la Fig. 31.

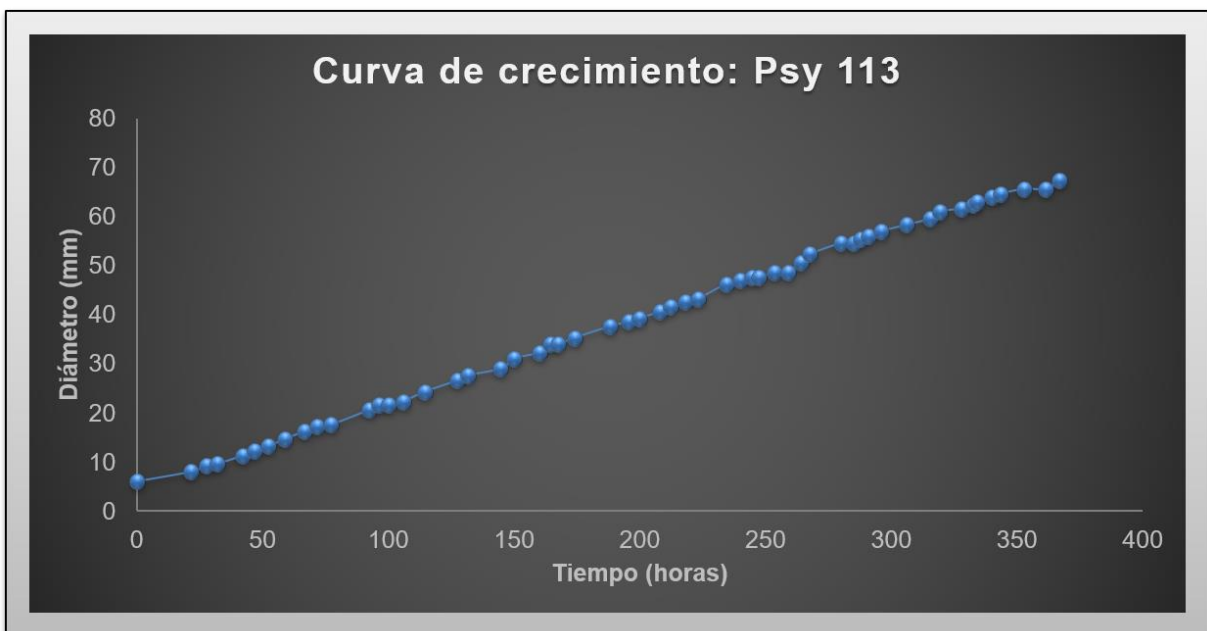


**Figura 31. Densidad porcentual de hongos endófitos en ambas plantas en estudio por categorías.**

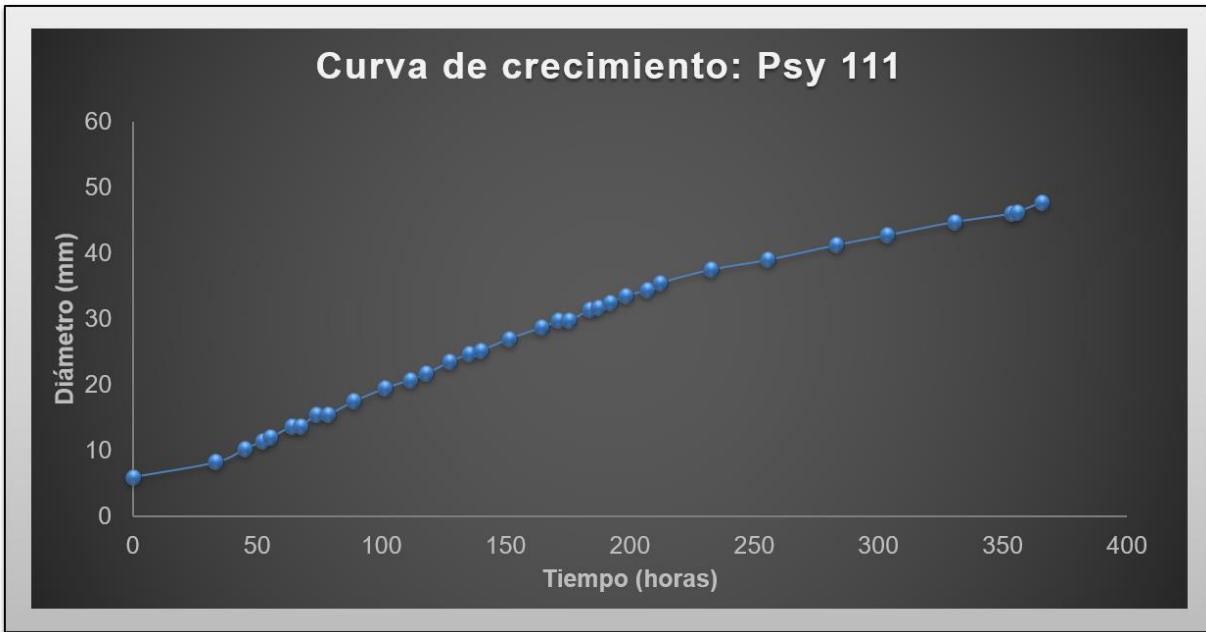
A continuación, se presentan los modelos de curva de crecimiento para cada categoría (rápido, moderado y lento) en *Psychotria cuspidata*. Figuras 32, 33, 34, respectivamente.



**Figura 32. Curva de crecimiento: hongo endófito de rápido crecimiento.**

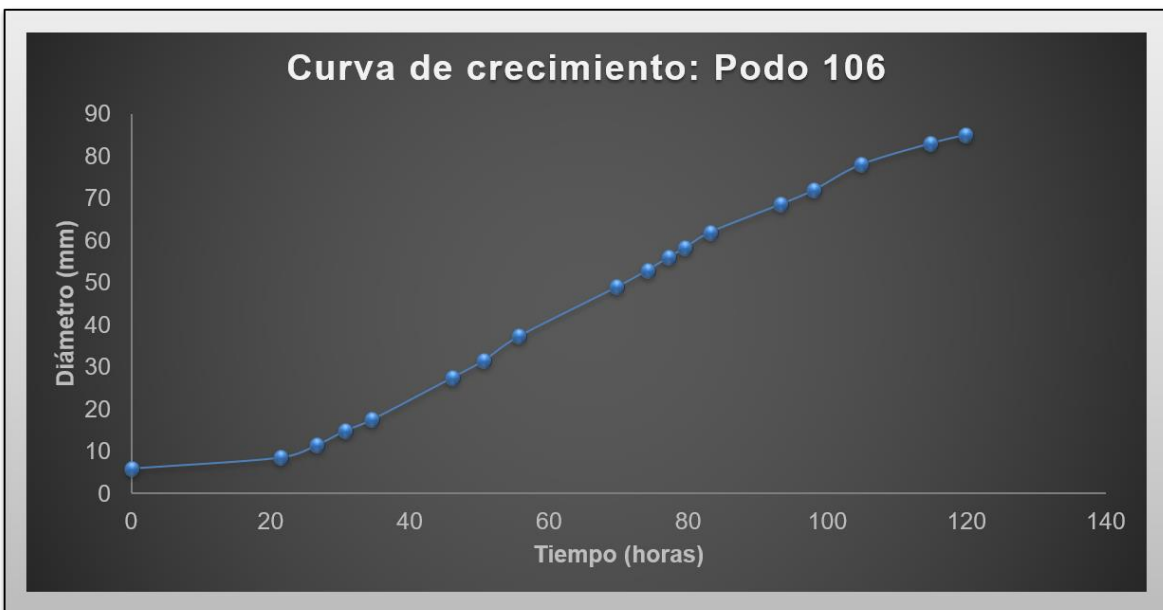


**Figura 33. Curva de crecimiento: hongo endófito de moderado crecimiento.**



**Figura 34. Curva de crecimiento: hongo endófito de lento crecimiento.**

De igual manera se muestran las curvas de crecimiento para las tres categorías obtenidas en *Podocarpus guatemalensis*. Figuras 35, 36, 37.



**Figura 35. Curva de crecimiento: hongo endófito de crecimiento rápido.**

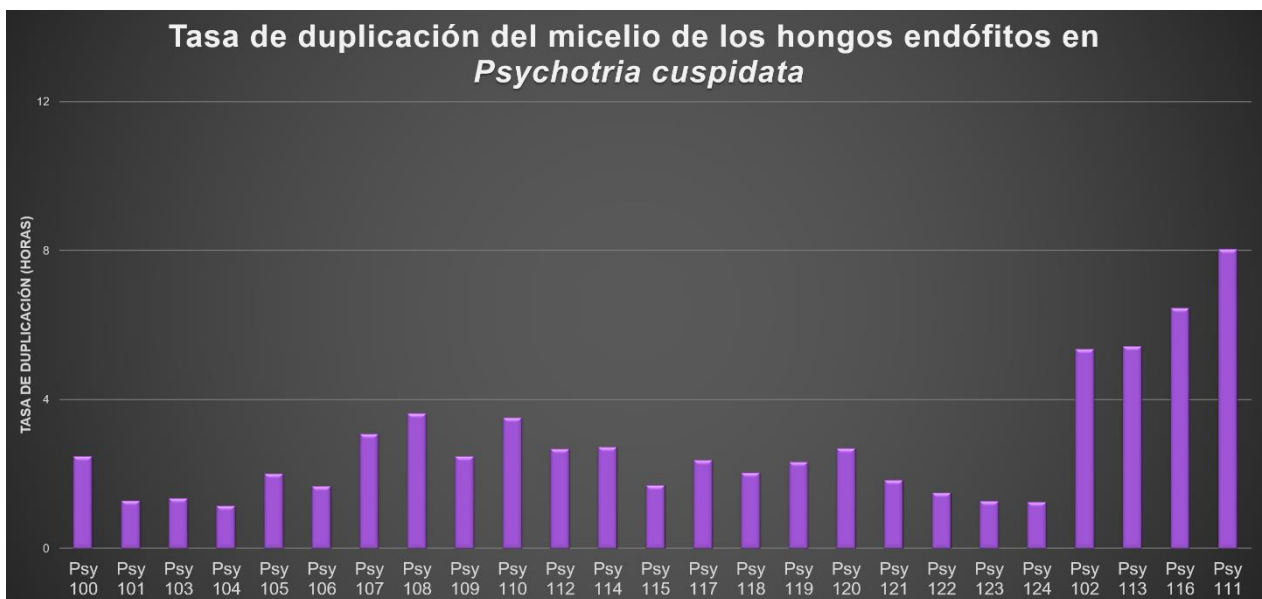


**Figura 36. Curva de crecimiento: hongo endófito de crecimiento moderado.**



**Figura 37. Curva de crecimiento: hongo endófito de crecimiento lento.**

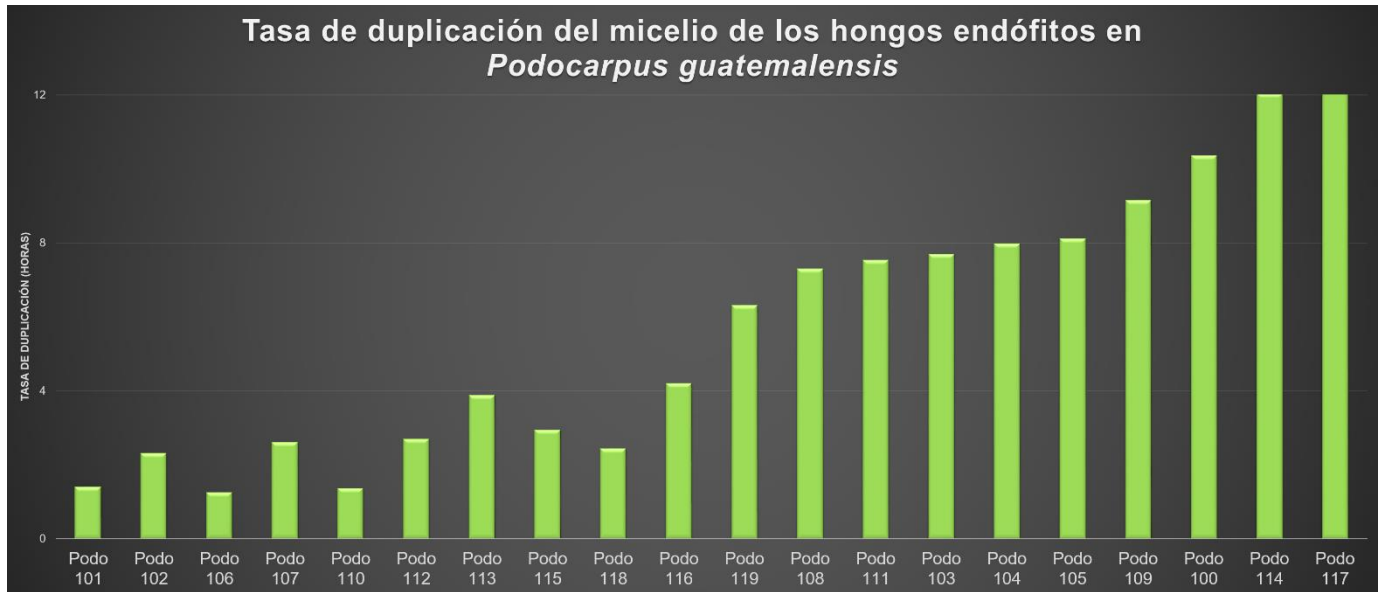
En las siguientes figuras se presenta la medida que se utilizó para ubicar a cada hongo dentro de su correspondiente categoría, con base en la tasa de duplicación del micelio (TDM). Como se mencionó anteriormente para el caso de *Psychotria cuspidata* la escala fue escogida arbitrariamente de la siguiente manera: crecimiento rápido (0 a 3.99 horas), crecimiento moderado (4.0 a 7.99 horas) y crecimiento lento (8.0 horas en adelante). Ver fig. 38.



**Figura 38. Pendiente que ubica a cada hongo endófito en su categoría.**

En el caso de *Podocarpus guatemalensis* se emplearon los mismos criterios de crecimiento de TDM establecidos y mencionados para la primera planta (*Psychotria cuspidata*), es decir, crecimiento rápido (0 a 3.99 horas), crecimiento moderado (4.0 a 7.99 horas) y crecimiento lento (8.0 horas en adelante). Fig. 39.

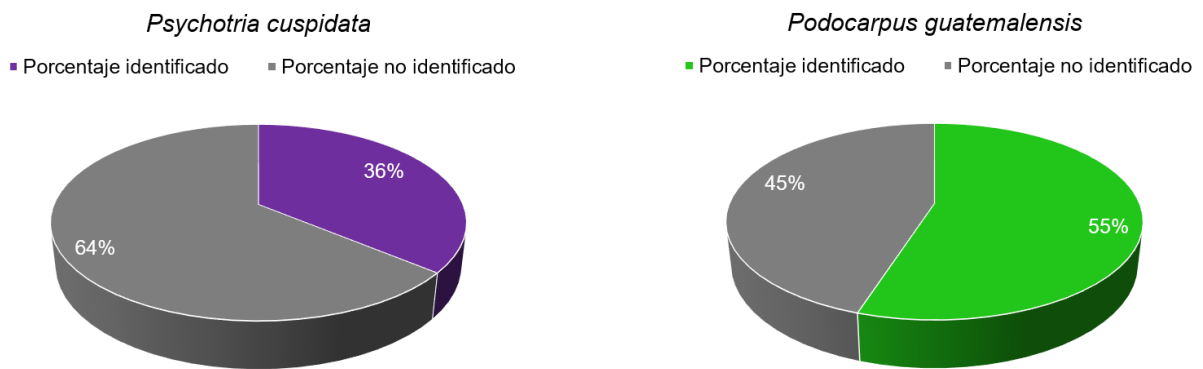




**Figura 39. Pendiente que ubica a cada hongo endófito en su categoría.**

#### V.- HONGOS IDENTIFICADOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE MICROCULTIVOS

Los hongos endófitos fueron identificados a nivel de género a través de la técnica de microcultivos y por placa directa, es decir, se realizaron las observaciones en el microscopio de las estructuras reproductivas previamente teñidas con el colorante azul de lactoglicerol. La figura 40 indica el porcentaje total de identificaciones alcanzadas en los hongos endófitos de *Psychotria cuspidata* y en *Podocarpus guatemalensis*.



**Figura 40. Porcentaje total de hongos endófitos representativos identificados a nivel de género en cada planta.**

En *Psychotria cuspidata*, los hongos endófitos Psy 100, Psy 105, Psy 106, Psy 109, Psy 118, Psy 119, Psy 120 y Psy 121 se identificaron como la fase asexual o anamorfo, *Colletotrichum*, en el caso de Psy 100 y Psy 105 se logró la identificación de la fase sexual o teleomorfo del hongo, que corresponde a *Glomerella*; igualmente Psy 117 demostró ser del género *Xylaria* con base a los cuerpos fructíferos desarrollados sobre el medio de cultivo pasado un lapso de cuatro (4) meses de crecimiento (figura 45). En la tabla 6 se presentan los hongos endófitos codificados que se pudieron identificar mediante las técnicas anteriormente mencionadas, además se distingue claramente la dominancia del género *Colletotrichum* entre los hongos endófitos en *Psychotria cuspidata*. Ver el porcentaje de cada género en la fig. 41.

Para *Podocarpus guatemalensis* se pudo lograr la identificación en los siguientes platos codificados como: Podo 100, 103, 104, 105, 109 111 y 114 de las fases sexual y asexual del hongo. Se pudo establecer y observar la presencia del anamorfo *Phyllosticta* y el teleomorfo que correspondió al hongo *Guignardia*; Un hecho muy parecido ocurrió en el plato codificado como Podo 108 en donde se pudo identificar tanto el anamorfo *Dothiorella* como el teleomorfo del endófito llamado *Botryosphaeria*. Finalmente, en Podo 102, Podo 112, Podo 118 se identificó el anamorfo *Colletotrichum*. El género con mayor frecuencia entre los hongos endófitos en *Podocarpus guatemalensis* fue *Guignardia*, estos resultados se aprecian en la tabla 7. Ver el porcentaje de cada género en la fig. 42.

**Tabla 6. Hongos codificados que fueron identificados, a nivel de género, en *Psychotria cuspidata*.**

Hongo codificado	Género
Psy 100	<i>Glomerella</i>
Psy 101	Micelio estéril
Psy 102	Micelio estéril
Psy103	Micelio estéril
Psy 104	Micelio estéril
Psy 105	<i>Glomerella</i>
Psy 106	<i>Colletotrichum</i>
Psy107	Micelio estéril
Psy 108	Micelio estéril
Psy 109	<i>Colletotrichum</i>
Psy 110	Micelio estéril
Psy 111	Micelio estéril
Psy 112	Micelio estéril
Psy 113	Micelio estéril
Psy 114	Micelio estéril
Psy 115	Micelio estéril
Psy 116	Micelio estéril
Psy 117	<i>Xylaria</i>
Psy 118	<i>Colletotrichum</i>
Psy 119	<i>Colletotrichum</i>
Psy 120	<i>Colletotrichum</i>
Psy 121	<i>Colletotrichum</i>
Psy 122	Micelio estéril
Psy 123	Micelio estéril
Psy 124	Micelio estéril

**Tabla 7. Hongos codificados que fueron identificados, a nivel de género, en *Podocarpus guatemalensis*.**

Hongo codificado	Identificación
Podo 100	<i>Guignardia</i>
Podo 101	Micelio estéril
Podo 102	<i>Colletotrichum</i>
Podo103	<i>Guignardia</i>
Podo 104	<i>Guignardia</i>
Podo 105	<i>Guignardia</i>
Podo 106	Micelio estéril
Podo107	Micelio estéril
Podo 108	<i>Botryosphaeria</i>
Podo 109	<i>Guignardia</i>
Podo 110	Micelio estéril
Podo 111	<i>Guignardia</i>
Podo 112	<i>Colletotrichum</i>
Podo 113	Micelio estéril
Podo 114	<i>Guignardia</i>
Podo 115	Micelio estéril
Podo 116	Micelio estéril
Podo 117	Micelio estéril
Podo 118	<i>Colletotrichum</i>
Podo 119	Micelio estéril

*Colletotrichum* fue el género en común para ambas plantas en estudio, presentándose con 24% en *Psychotria cuspidata* y 15% en *Podocarpus guatemalensis*. *Guignardia* se presentó exclusivamente en *Podocarpus guatemalensis* con 35% entre las muestras.

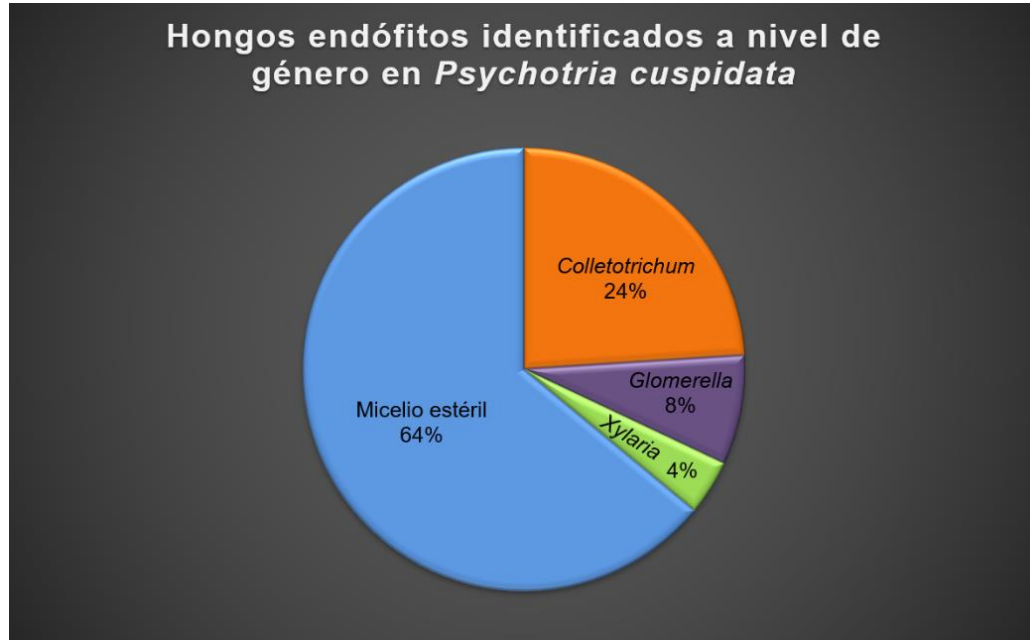


Figura 41. Hongos endófitos identificados en *Psychotria cuspidata*.

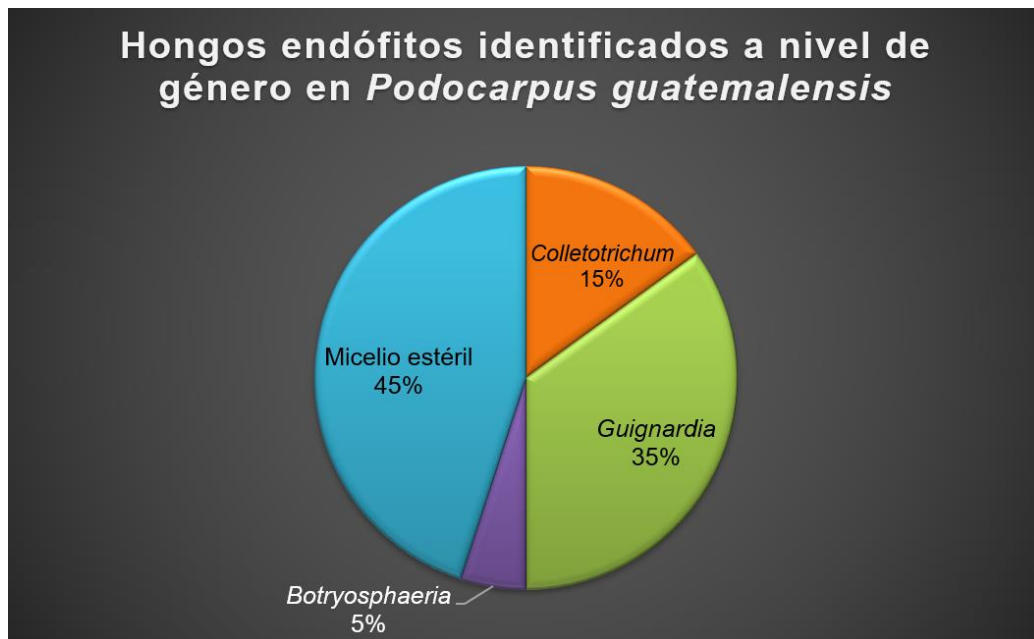


Figura 42. Hongos endófitos identificados en *Podocarpus guatemalensis*.

### **TDM a nivel de género en *Psychotria cuspidata***

En *Psychotria cuspidata* se repitió el género *Colletotrichum* entre las muestras procesadas, si cotejamos la TDM de cada uno, mostrados en la tabla 8, con respecto a dicho hongo se puede sugerir que hay dos especies de *Colletotrichum* tomando en cuenta las diferencias entre la TDM que oscilan entre los rangos de una a menos de una hora y en el caso de *Glomerella* el resultado de las diferencias del TDM nos permite identificar solo una especie.

### **TDM a nivel de género en *Podocarpus guatemalensis***

En *Podocarpus guatemalensis* se presentó el género *Guignardia* en más de una ocasión entre las muestras trabajadas, si contrastamos sus valores de TDM, mostrados en la tabla 9, en relación al mencionado hongo se podría decir que probablemente existen en este estudio cuatro especies distintas de *Guignardia* tomando como referencia sus respectivos valores que se incluyen los de siete horas, nueve horas, 10 horas y 12 horas para duplicar su micelio; por su parte, *Colletotrichum* presentó su valor en el intervalo de dos horas por lo que se puede señalar que únicamente se trata de una especie dentro de las muestras del árbol.

Imágenes de los hongos endófitos que se pudieron identificar mediante placa directa y la técnica de microcultivos:

*Psychotria cuspidata*

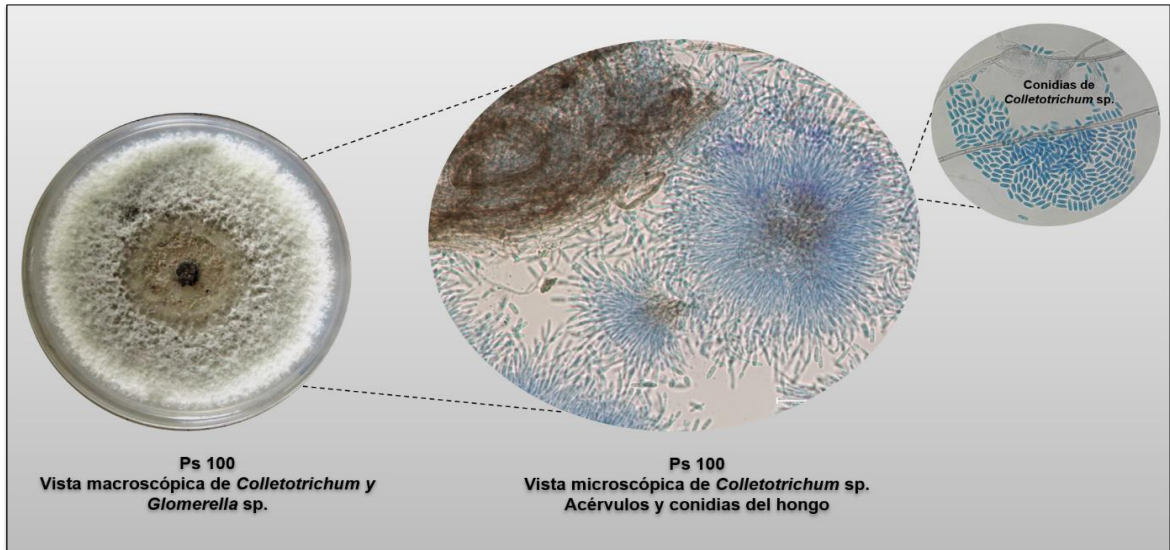


Figura 43. Hongo endófito Psy 100 identificado, género *Colletotrichum* (fase asexual o anamorfo) donde la vista macroscópica corresponde a su crecimiento en plato Petri.

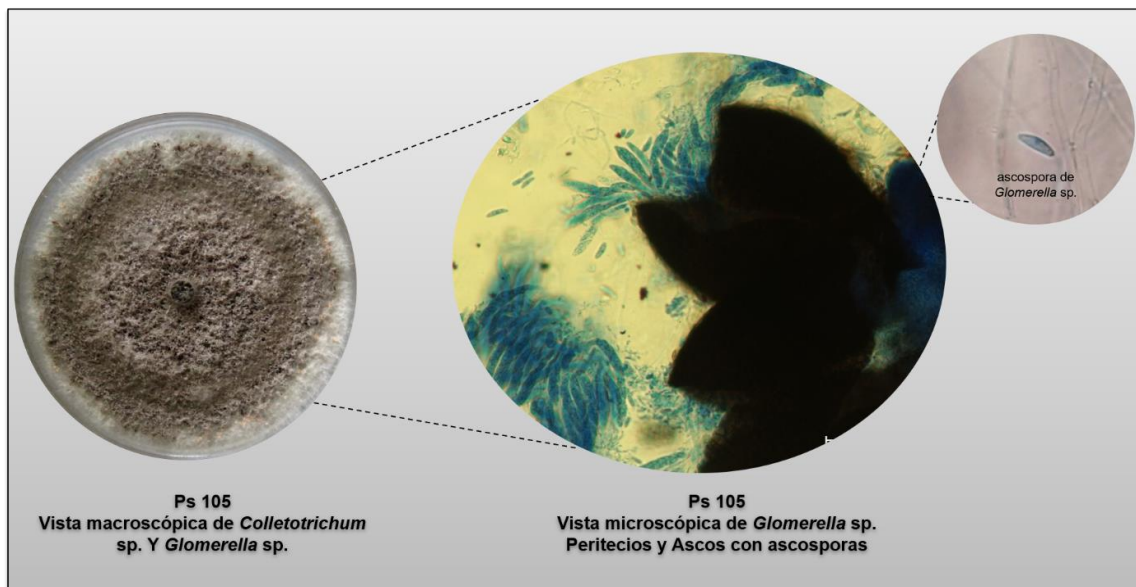
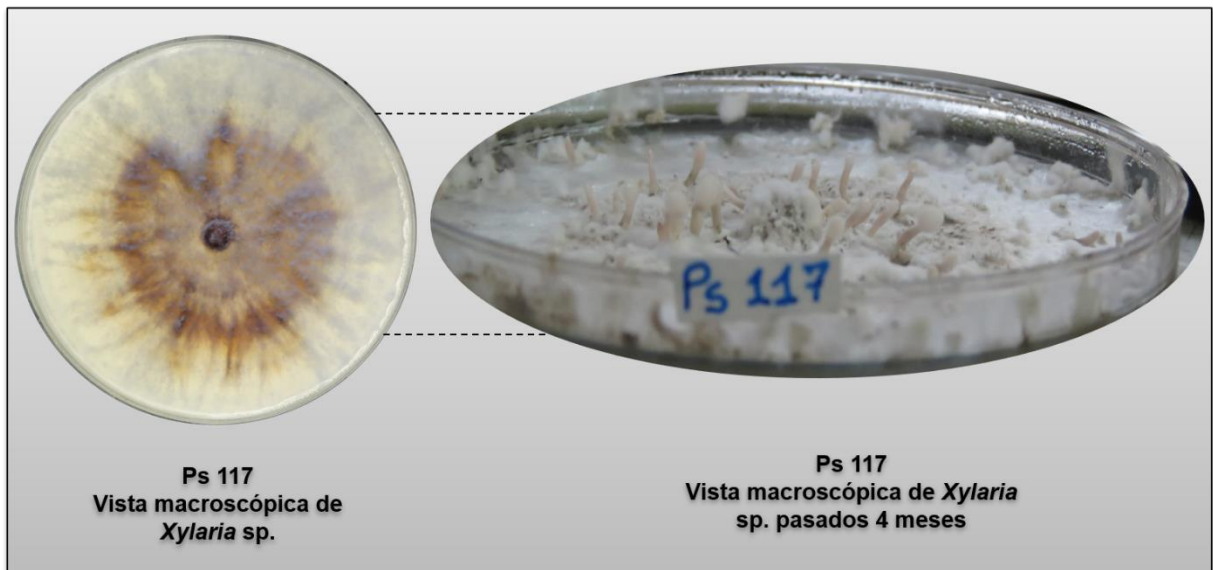


Figura 44. Hongo endófito Psy 105 identificado, género *Glomerella* (fase sexual o teleomorfo) donde la vista microscópica fue captada en microscopio Nikon E600 con cámara integrada.



**Figura 45. Hongo endófito Psy 117 identificado, género *Xylaria*, este se identificó inmediatamente por la presencia de cuerpos fructíferos del hongo en Agar Papa Dextrosa dentro del plato Petri.**



*Podocarpus guatemalensis*

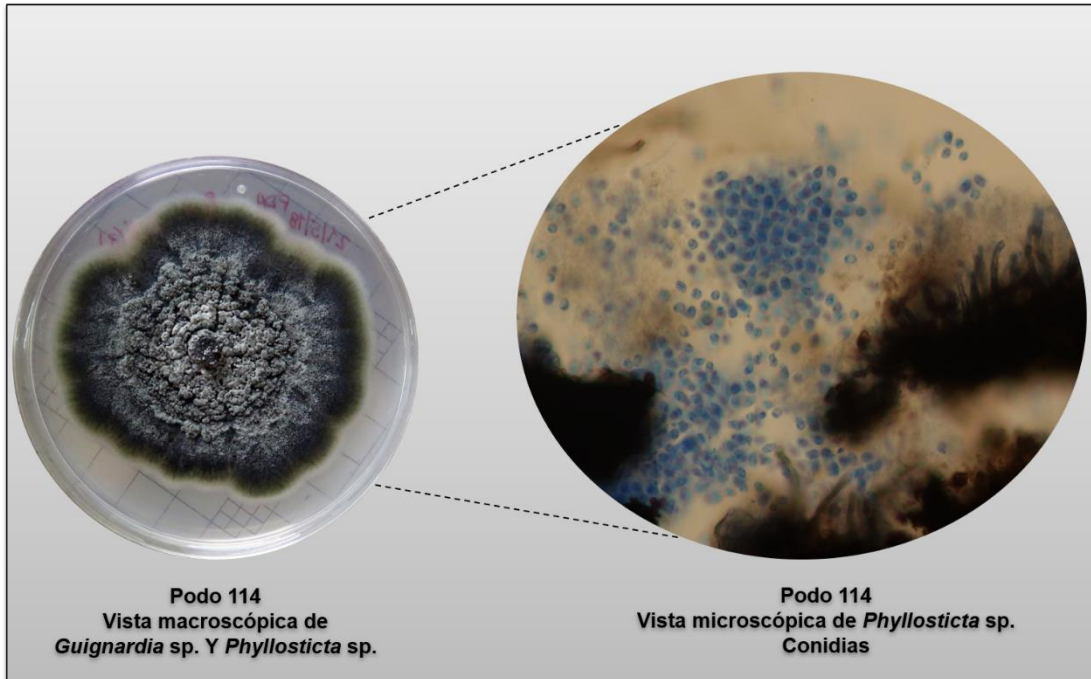


Figura 46. Hongo endófito Podo 114 identificado, género *Phyllosticta* (anamorfo)

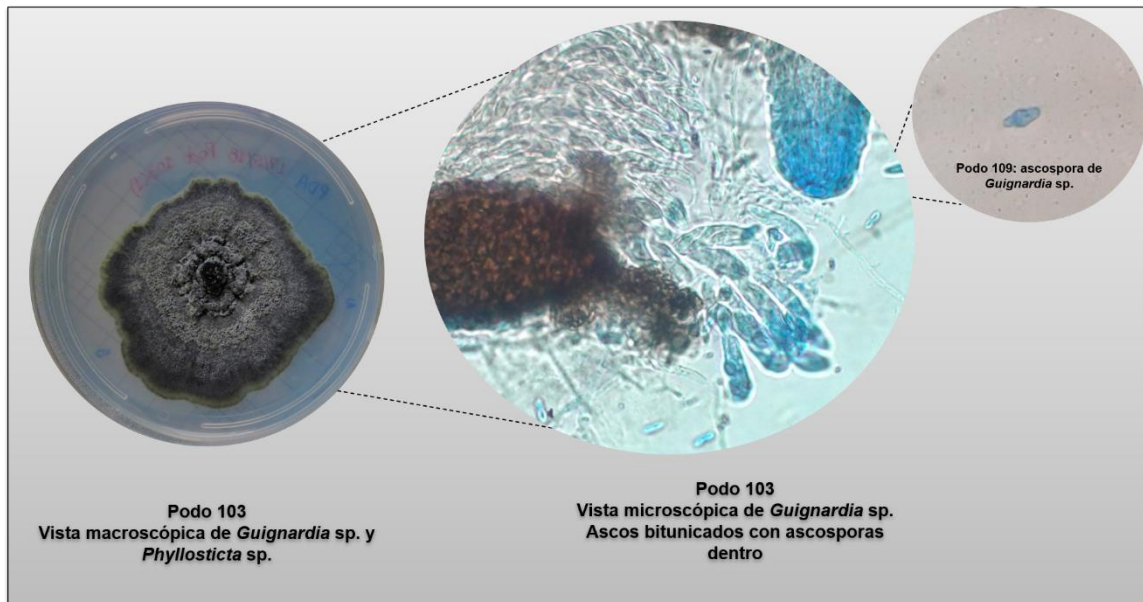


Figura 47. Hongo endófito Podo 103 identificado, género *Guignardia* (teleomorfo) en la vista microscópica se aprecian estructuras alargadas en formas de saco llamadas ascos, los cuales a su vez contienen ascosporas en su interior, como la de la imagen en la esquina superior derecha.

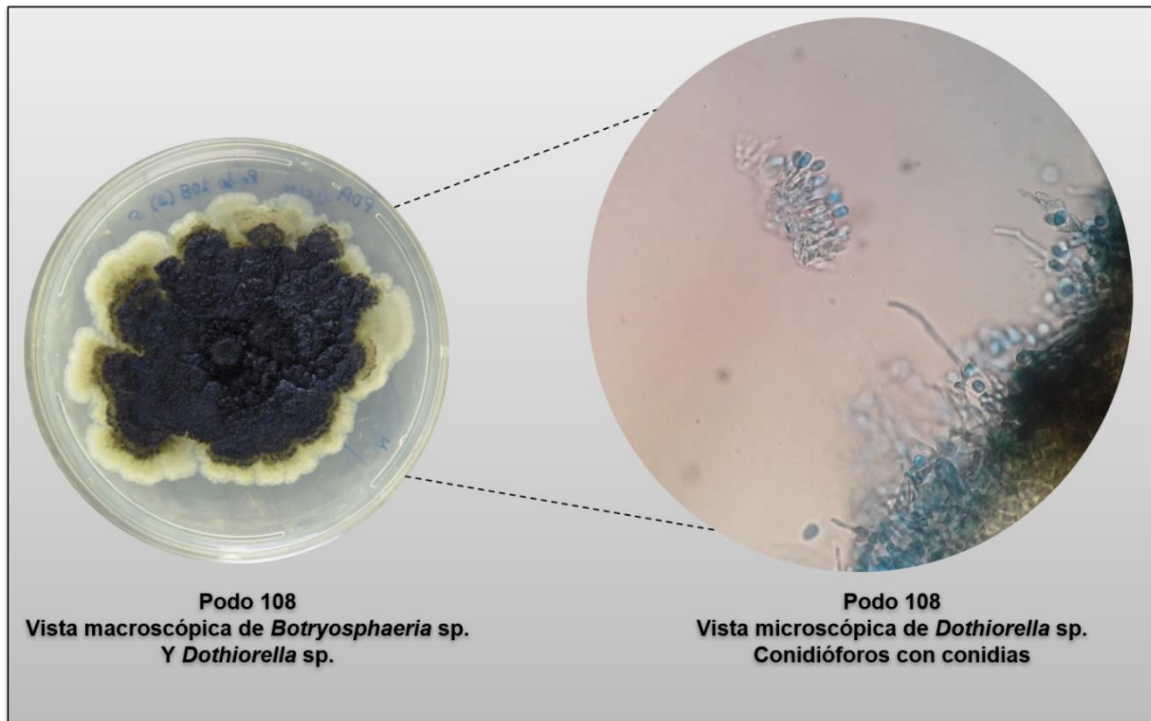


Figura 48. Podo 108 identificado, género *Dothiorella* (anamorfo).

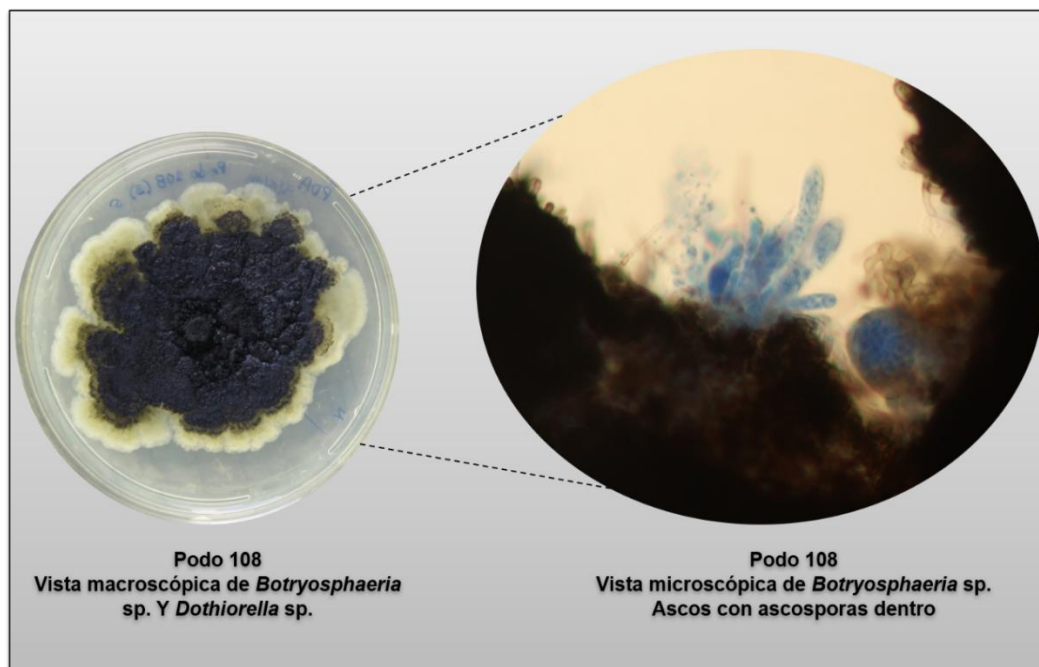


Figura 49. Podo 108 identificado, género *Botryosphaeria* (teleomorfo)

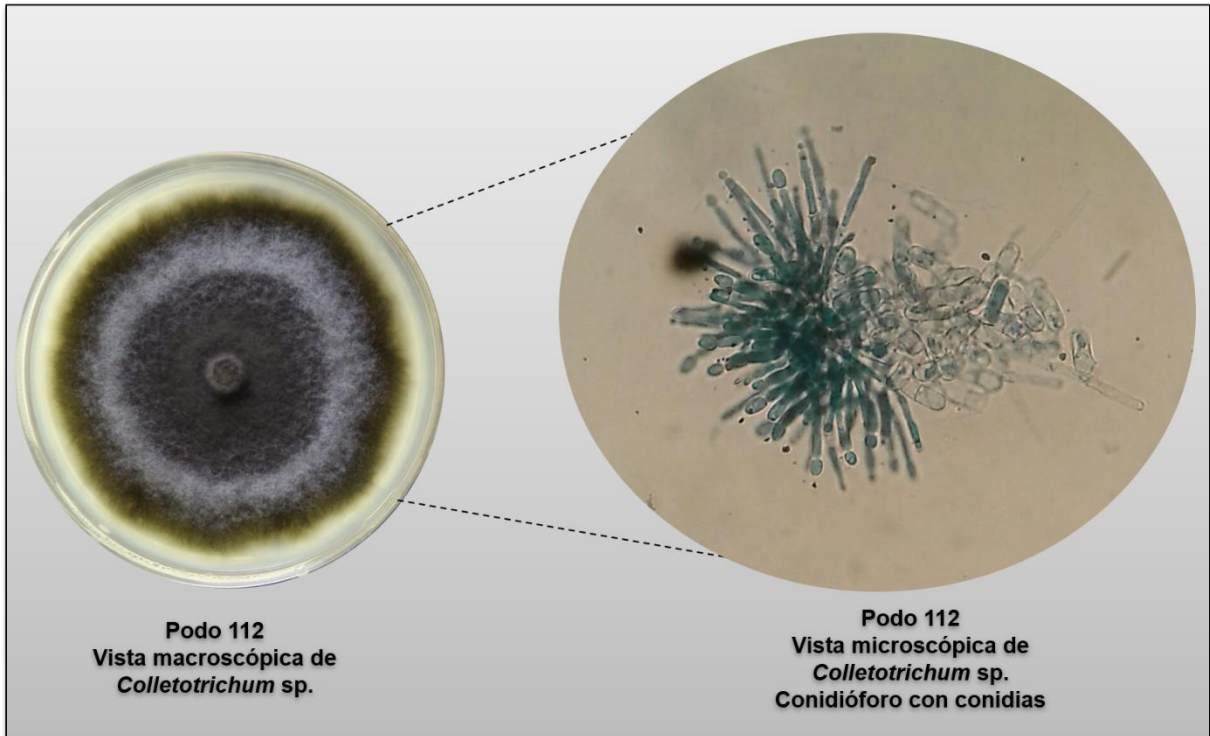


Figura 50. Podo 112 identificado, género *Colletotrichum* (anamorfo)

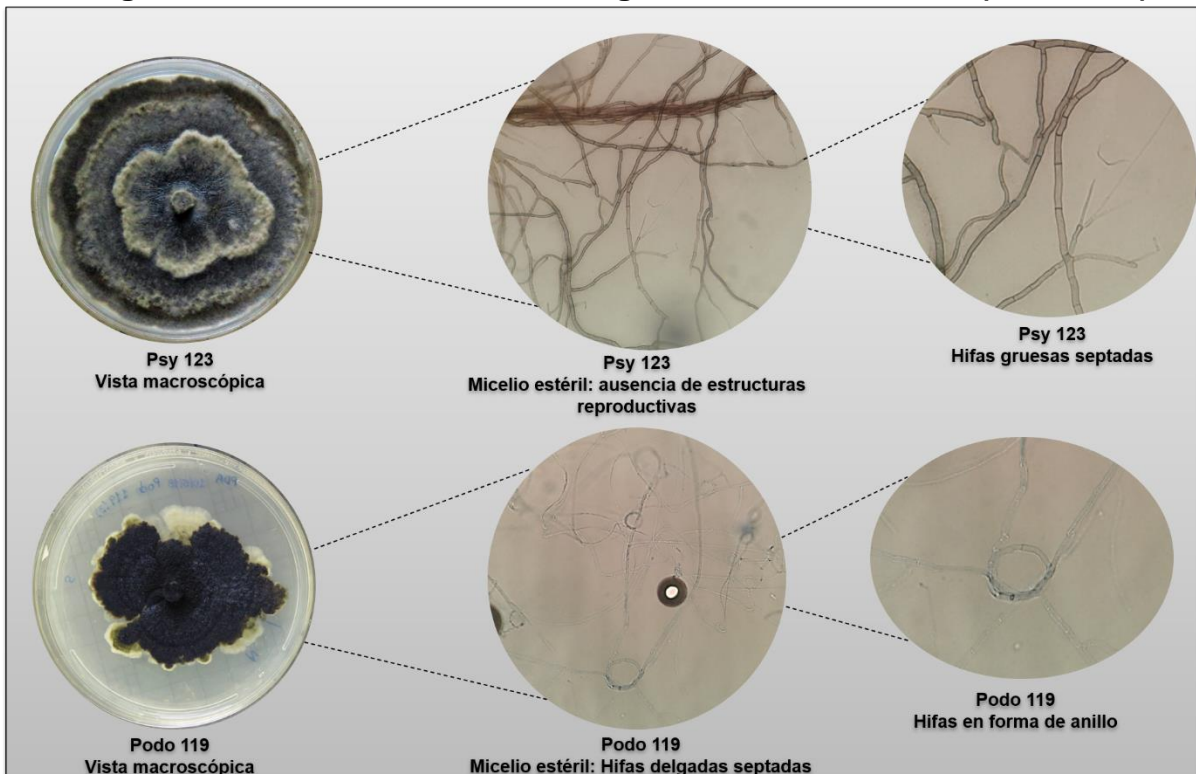


Figura 51. Micelio estéril en ambas plantas donde Psy 123 pertenece a *Psychotria cuspidata* y Podo 119 a *Podocarpus guatemalensis*.

## DISCUSIÓN

Por la falta de acceso a una fuente ampliamente ilimitada de investigaciones científicas no se puede afirmar que este estudio es reportado como único a la fecha, sin embargo, La Reserva Forestal del Montuoso es una zona compuesta principalmente por ecosistemas interconectados por diferentes sistemas de vegetación, centro de una gran biodiversidad y zona donde nacen los ríos que abastecen de agua a la provincia de Herrera. Es un área sometida a mucha presión producto de las comunidades que se encuentran dentro de los límites de la reserva y que necesitan sembrar para obtener su sustento diario (Garibaldi y Arcia, 2016; Pedreschi *et al.*, 2013). Es aquí donde se inicia este estudio que podemos destacar como el primer reporte de la biodiversidad microscópica representada por hongos endófitos presentes en dos plantas ubicadas en el lugar *Psychotria cuspidata* y *Podocarpus guatemalensis*.

En esta investigación se emplearon métodos tradicionales para el aislamiento y caracterización de los hongos endófitos recuperados y a pesar de tener limitantes, muchos laboratorios no siempre cuentan con una estructura y equipo disponible para aplicarles técnicas moleculares dado el costo que este procedimiento representa (Giusiano *et al.*, 2010); se lograron los objetivos lo que nos indica que es posible obtener enriquecedores y satisfactorios resultados aún con un bajo presupuesto, siempre y cuando se trabaje con mucho esmero y dedicación. Este pequeño ensayo mostró datos tan significativos y nuevas preguntas que indican la necesidad de realizar más investigaciones en el área.

**Densidad porcentual de hongos endófitos en *Psychotria cuspidata* frente a otros estudios similares.**

La densidad de hongos endófitos en *Psychotria cuspidata* fue de 95%, esto corresponde a una alta abundancia de hongos endófitos en las muestras colectadas de este arbusto lo que se puede explicar por la baja altura de la planta al encontrarse próximo al suelo donde la descomposición se produce en el piso del bosque y los primeros colonizadores de la hojarasca fresca son bacterias y hongos favoreciendo una alta actividad de diferentes microorganismos (Thaiutsa y Granger, 1979); la densidad porcentual de hongos endófitos en este trabajo concuerda con los de otros estudios realizados, también en zonas tropicales, como el de Gómez-Rivera *et al.*, 2016 en donde se reporta 76.67% de abundancia de hongos endófitos en *Hamelia patens* y 43.3% en *Lantana cámara*; en Isla Coiba se estudió la planta *Desmotes incomparabilis*, una angiosperma de hábito arbustivo, de la cual se obtuvo una densidad de 84.6% de hongos endófitos provenientes de hojas maduras de dicha planta (Escobar e Iturrado, 2007) mientras que en *Theobroma cacao* se registró 98.09% de densidad de hongos endófitos (Villarreal y Pérez, 2008).

**Densidad porcentual de hongos endófitos en *Podocarpus guatemalensis* frente a otros estudios similares.**

La densidad de hongos endófitos en *Podocarpus guatemalensis*, una especie gimnosperma, fue de 78.3% lo que nos indica que también fue bastante alta y coincide con lo reportado por Ryoko Oono *et al.*, 2015 con 76.7% de densidad de hongos endófitos foliares en árboles de *Pinus taeda*, mientras que la densidad para las

plántulas de la misma especie fue de 14% indicando que la colonización de hongos endófitos en coníferas aumenta con la edad de la hoja basado en la postulación de que las hojas mueren tan pronto como la densidad de colonización de hongos alcanzan un valor mínimo dentro de la misma (Sieber, 2007), pues la tasa de colonización de hongos endófitos fue mayor en una hoja de tres años que en otra de un año, en muestras pertenecientes a *Pinus tabulaeformis* (Guo *et al.*, 2008); la densidad de hongos endófitos en *Zamia obliqua* igualmente fue parecida a la del estudio actual con 73.91% (Villarreal y Pérez, 2008).

### **Densidad de hongos endófitos en las plantas estudiadas**

En este proyecto de investigación, todos los fragmentos de las hojas sembradas muestreadas, tanto en *Psychotria cuspidata* como en *Podocarpus guatemalensis*, fueron colonizados por más de un hongo endófito, este hecho coincide con la investigación de Bethancourt, 2000 donde el 100% de las muestras foliares procesadas de bosques tropicales presentaron al menos un hongo endófito y también con el estudio de Bernardi-Wenzel *et al.*, 2010 donde todos los segmentos sembrados muestreados de plantas medicinales *Luehea divaricata* presentaron crecimiento fúngico.

El hecho de que en *Podocarpus guatemalensis* se presentara una menor densidad de hongos endófitos, con respecto a *Psychotria cuspidata*, guarda relación con factores climáticos y la edad de la hoja muestreada durante su desarrollo que afectan o no la sucesión de hongos endófitos en la misma como se ha estudiado en gimnospermas (Kriel *et al.*, 2000), los factores climáticos pueden variar, considerando que *Psychotria*

*cuspidata* se encuentra cerca del suelo por ser de hábito arbustivo y *Podocarpus guatemalensis* se aleja del mismo por ser un árbol con mayor altura (Davidse, G., Sousa M., 2009), puede que se conserve mayor humedad en algunas partes de las hojas más que en otras favoreciendo la proliferación de los hongos endófitos; además del azar que juega un papel importante al momento de recolectar las muestras de ambas plantas a pesar de que son visiblemente maduras y sanas.

### **Estudios de hongos endófitos en plantas de hoja perenne**

En general, se hizo un estudio con base en plantas de hoja perenne donde la densidad fue de 76% en *Mahonia nervosa*, 44% en *Arctostaphylos uva-ursi*, 37% en *Gaultheria shallon*, 29% en *Mahonia aquifolium* y 25% en *Umbellularia californica* (Petrini et al., 1982) esta gama de porcentaje de infección tan variada puede estar influenciada por la temperatura del lugar de muestreo, pues no es apta para la proliferación de los hongos endófitos y además, como los mismos autores mencionan, las tasas de infección fueron mayores en las muestras de los sitios densamente arbolados donde las colectaron que en las muestras de sitios abiertos; el porcentaje de infección varía entre diferentes especies colectadas en diversos sitios de los trópicos, pero en general es mucho mayor que en zonas templadas (Valencia, 2006) como un estudio en España (región mediterránea) de *Pinus halepensis* donde las hojas presentaron una densidad de 36.24% de hongos endófitos (Botella y Diez, 2011).

## **Diversidad de hongos endófitos en *Psychotria cuspidata* frente a otros estudios similares.**

La diversidad de hongos endófitos en *Psychotria cuspidata* fue de 36.84%, esta es baja frente a estudios en donde se reporta 78% de diversidad de hongos endófitos en *Desmotes incomparabilis*, Panamá; 60.8% en *Hamelia patens*, 76.9% en *Lantana camara*, México (Escobar e Iturrado, 2007; Gómez-Rivera *et al.*, 2016) y 84.5% provenientes de cuatro muestras foliares de *Hyptis recurvata* (González Murillo, 2013). La baja diversidad de hongos endófitos encontrada pudiera estar relacionada con la estación climática en la que se desarrolló el muestreo (temporada seca) y con la situación geográfica de esta reserva, que se encuentra dentro del llamado arco seco del istmo (Jaén y Hernández, 1998). Considerando que la humedad juega un papel significativo en la reproducción de estos microorganismos como se demostró en el estudio de Mosquera, 2010 donde se obtuvo una mayor cantidad de morfotipos de hongos endófitos en temporada lluviosa que en temporada seca y las muestras para el presente estudio fueron colectadas durante estación seca de nuestro país, este pudo ser un factor limitante en la diversidad obtenida de hongos endófitos. Otros autores relacionan la baja diversidad a la cantidad de hojas colectadas señalando que entre más hojas se coleccionen habrá mayor diversidad de hongos endófitos, hasta que se llega a una fase de estabilización después de un determinado número de colecta de muestras (Villarreal y Pérez, 2008; Bethancourt, 2000; Valencia, 2006) lo que exhorta a nuevos estudios en el área.



## **Diversidad de hongos endófitos en *Podocarpus guatemalensis* frente a otros estudios similares.**

La diversidad de hongos endófitos en *Podocarpus guatemalensis* fue de 42.55%. Este valor es cercano al obtenido para el arbusto *Psychotria cuspidata*, lo que los hace relativamente más bajos de los encontrados en otros sitios, esto quizás se debe, como se mencionó anteriormente, a la estación del año en que fueron colectadas las muestras pues en los pinos se han estudiado diversos factores que influyen en la frecuencia y distribución de hongos endófitos recuperados como la estación en que se colectan las muestras, el estado en que se encuentra el tejido muestreado y la metodología empleada para el aislamiento (Zamora *et al.*, 2008). Además, recientemente se ha demostrado que el sitio y la edad de la hoja muestreada son factores altamente significativos en cuanto al número de aislamientos y el número de especies únicas obtenidas en diferentes estudios (Anderson *et al.*, 2019), este último número puede ser subestimado cuando se utilizan solo características morfológicas de los cultivos debido a que hay colonización múltiple de fragmentos (Cannon y Simmons, 2002) es decir, cuando en un fragmento sembrado hay más de un hongo, el cual no se puede notar con observación a simple vista.

## **Densidad y Diversidad de hongos endófitos en ambas plantas**

La densidad y diversidad de hongos endófitos son herramientas subestimadas con mucha frecuencia en los estudios ambientales por el hecho de que no todos los microorganismos dentro de la planta tienen la capacidad de crecer en medios de cultivo artificiales cuando se procesan en laboratorio (Gamboa-Gaitán, 2006), no

obstante, muchos de los que si poseen dicha capacidad podrían ser empleados como indicadores del estado ecológico de un bosque por ejemplo, la comprensión de su función ecológica en gimnospermas podría conllevar a su uso en el manejo holístico de ecosistemas forestales mixtos como bioindicadores revelando los efectos de la contaminación del aire y la lluvia ácida; además muchos son fuente de compuestos bioactivos brindados a la población en términos de economía, en áreas como lo son la medicina, la agricultura, la industria (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

En el presente estudio, la densidad y la diversidad de hongos endófitos en las especies vegetales dentro de la Reserva Forestal El Montuoso son inversas, ya que en *Psychotria cuspidata* se dio una densidad alta pero la diversidad de hongos endófitos fue inferior a la de los resultados en *Podocarpus guatemalensis* donde se obtuvo una densidad de hongos endófitos más baja y la diversidad fue mayor que la del arbusto; este último guarda relación con una planta también gimnosperma dentro de la investigación de Ryoko Oono *et al.*, 2015 donde se afirma que, a pesar de la menor o baja frecuencia de infección en las plántulas de *Pinus taeda* estas fueron receptivas a una comunidad más diversa de hongos endófitos en comparación a las muestras foliares de árboles de la misma especie.

La razón por la que hubo mayor diversidad de hongos endófitos en *Podocarpus guatemalensis* puede estar relacionada con la clasificación taxonómica de la planta ya que las gimnospermas tienen tipos de hojas bastante únicos, albergando su propio grupo particular de especies de endófitos foliares, por otra parte, con su altura debido a un aumento en el número de nichos diferentes para los hongos, pues las esporas de una gran variedad de hongos pueden encontrar sustratos adecuados en el dosel del

árbol aumentando la diversidad de hongos además de condiciones climáticas diferentes a la que se encuentra por debajo del dosel (Piepenbring *et al.*, 2016; Kriel *et al.*, 2000) como es el caso de la angiosperma arbustiva *Psychotria cuspidata*. Esto indica que las comunidades de hongos endófitos pueden variar dependiendo de los diferentes estratos donde se encuentren pues de acuerdo con Gamboa-Gaitán, 2006 es común encontrar su variación con los estratos dentro del dosel y el sotobosque por ejemplo, los hongos que se encuentran cerca del suelo pueden tener diferentes microambientes a los hongos que se encuentran a una altura mayor siendo más o menos diversos dependiendo en gran medida de microclimas y microhábitats que se generan porque los bosques tropicales tienen mayor complejidad estructural que muchos otros ecosistemas.

### **Clonación de hongos endófitos en agua destilada estéril**

La clonación de los hongos endófitos en tubos de ensayo con agua destilada estéril, posteriormente sellados con parafilm, es un método de conservación bastante sencillo y seguro que garantiza la supervivencia del hongo a través del tiempo tal como lo demostraron Bueno y Gallardo, 1998 al trabajar con hongos filamentosos y confirmar 100% de viabilidad de los mismos después de preservarlos durante dos años en agua destilada estéril, además aseguran no haber observado cambios aparentes en la morfología y caracteres macroscópicos en ninguno de los cultivos estudiados, Benítez, 2017 también asegura estar de acuerdo con este método ya que a pesar de que entre sus muestras habían hongos endófitos preservados en agua estéril por más de cinco años resultaron ser viables.

### **Curva de crecimiento de hongos endófitos en *Psychotria cuspidata***

Los hongos endófitos en *Psychotria cuspidata* mostraron, mayormente, crecimiento rápido con 84%, siendo Psy 104 el hongo más rápido con tasa de duplicación de micelio de 1:16 horas y Psy 111 el hongo más lento con tasa de duplicación de micelio de 8:04 horas. En esta angiosperma, los hongos endófitos más rápidos presentaron una tasa de duplicación de micelio hasta de una hora, mientras que dentro de los de lento crecimiento tardaron ocho horas para duplicar su micelio. En la tabla 8 se diferencia la pendiente de cada hongo endófito aislado de dicha planta (anexo).

### **Curva de crecimiento de hongos endófitos en *Podocarpus guatemalensis***

Entre los hongos endófitos en *Podocarpus guatemalensis* la mayoría fueron de crecimiento rápido pero esto varió con menor densidad porcentual de hongos que en el arbusto con 45%, siendo Podo 117 el hongo más lento con tasa de duplicación de 16:81 horas y Podo 106 el hongo más rápido con tasa de duplicación de 1:26 horas. En esta gimnosperma, los hongos endófitos más rápidos presentaron una tasa de duplicación de micelio hasta de una hora, en tanto que dentro de los de lento crecimiento un hongo tardó 16 horas para duplicar su micelio. En la tabla 9 se aprecia la pendiente de cada hongo endófito aislado de dicha planta (anexo).

## **Curva de crecimiento de hongos endófitos en ambas especies vegetales pertenecientes a la Reserva Forestal El Montuoso**

La curva de crecimiento para los hongos endófitos es una propuesta metodológica de suma importancia antes de llevar a cabo procesos como el levantamiento de microcultivos para la identificación de hongos endófitos. Por otra parte, los datos que se obtienen con la curva de crecimiento también aportan información valiosa cuando se pretenden realizar ensayos de antagonismo ya que sugiere la ventaja adaptativa o tiempo de acción del hongo filamentoso en cuestión frente a una bacteria patógena o ambiental (Benítez, 2017), también es posible calcular la tasa de duplicación de micelio de cada hongo, valor que se obtiene con base en la pendiente resultante de cada gráfico entre el diámetro de crecimiento de cada organismo y el tiempo transformado en horas. La pendiente representa la cantidad de horas que le toma al hongo duplicar su micelio para continuar su crecimiento, en otras palabras, la tasa de duplicación del micelio.

La variación en el porcentaje de hongos endófitos en función de la tasa de crecimiento puede tener relación con la diferencia en el tamaño entre ambas plantas y su distancia del suelo del bosque, puesto que en el arbusto, *Psychotria cuspidata*, hubo mayor porcentaje de hongos endófitos de crecimiento rápido esto se puede dar por su proximidad al suelo donde hay mucha actividad de microorganismos por incrementos de materia orgánica y nutrientes edáficos asociados a los aportes de hojarasca, favoreciendo su proliferación (Flórez-Flórez *et al.*, 2013) y competencia por diferentes nichos incluyendo tejidos foliares de la planta, mientras que en el árbol, *Podocarpus guatemalensis*, no hay tanta competencia por lo que aquí resultó un porcentaje inferior

de hongos endófitos de crecimiento rápido, pero hubo mayor porcentaje de hongos de crecimiento moderado y lento que en el arbusto, pues no muchos hongos pueden llegar a la altura a la que se encuentran sus hojas en el dosel posiblemente porque las gimnospermas albergan sus propios grupos en cuanto a especies de endófitos foliares debido a sus peculiares tipos de hojas bastante exclusivos (Kriel *et al.*, 2000) por lo que los hongos que llegan al árbol se establecen en sus tejidos foliares de manera indefinida.

### **Identificación de hongos endófitos**

Los hongos endófitos identificados en esta investigación pertenecen a la división Ascomycota, lo que concuerda con el estudio de Arnold y Lutzoni, 2007 quienes estudiaron los hongos endófitos de distintas plantas en ocho localidades diferentes desde el ártico canadiense hasta tierras bajas de Panamá y los hongos representativos de todos los bosques fueron dominados por Ascomycota. Los hongos endófitos fueron procesados con el uso de métodos tradicionales donde aquellos que no esporularon en los medios de cultivo seleccionados se reportaron como micelio estéril; es poco lo que se puede concluir acerca de la especificidad de hospederos de los hongos endófitos tropicales, pues la mayoría de los postulados en diferentes estudios no son más que especulaciones basadas en escasas observaciones (Gamboa-Gaitán, 2006).

### **Identificación de hongos endófitos en *Psychotria cuspidata***

Se lograron identificar los géneros de hongos endófitos en *Psychotria cuspidata*, siendo estos: *Glomerella* (con su estado anamorfo, *Colletotrichum*) y *Xylaria*, de estos *Colletotrichum* y *Glomerella* fueron reportados en plantas medicinales (Mussi-Dias *et al.*, 2012), este último género tiene una especie endófito que a menudo es encontrada en hojas sanas la cual es *Glomerella cingulata* (Van Bael *et al.*, 2009) siendo reportada también en *Hyptis recurvata* con 5% entre las muestras (González Murillo, 2013). *Colletotrichum* y *Xylaria* se aislaron en muestras de *Guarea guidonia*, Meliaceae (Gamboa y Bayman, 2001) y este último género en *Hyptis recurvata* con 48% entre las muestras (González Murillo, 2013). Dentro los hongos endófitos en la planta medicinal, *Psychotria cuspidata*, la mayoría fueron hongos con micelio estéril, esto coincide con la investigación de Ramírez *et al.*, 2006 donde trabajaron con plantas medicinales reportando los hongos endófitos con micelio estéril como la mayor dominancia en el estudio. Esto sugiere que los nutrientes brindados a estos simbiontes a través de diferentes medios de cultivo no son suficientes para inducir el desarrollo de sus estructuras reproductivas, las cuales son la clave principal de identificación microscópica cuando no se cuenta con tecnología molecular para procesar estos hongos. *Colletotrichum* es un género con diferentes especies comúnmente reportado como patógeno de diferentes cultivos, plantas y frutas, por ejemplo las especies *Colletotrichum fragariae*, *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloeosporioides* están asociadas a enfermedades en fresa (Xiao *et al.*, 2004) y *Colletotrichum gloeosporioides* en tomate de árbol (Ríos Madril, 2010). Adicionalmente, en México se reportaron especies de los géneros *Colletotrichum*, *Glomerella*, *Xylaria* e incluso *Guignardia* (encontrado en *Podocarpus guatemalensis*) en cuatro plantaciones de

*Coffea arabica* el cual es un arbusto de hoja perenne (Saucedo-García et al., 2014) al igual que *Psychotria cuspidata*.

### **Identificación de hongos endófitos en *Podocarpus guatemalensis***

En el caso de *Podocarpus guatemalensis* se pudieron identificar los géneros: *Guignardia* (con su estado anamorfo, *Phyllosticta*), *Botryosphaeria* (con su estado anamorfo, *Dothiorella*) y *Colletotrichum* sp. Los hongos endófitos se han estudiado en coníferas incluyendo *Pinus* spp., *Taxus* spp., y *Juniperus* spp. (Wang et al., 2008). La especie *Guignardia* sp. se ha reportado en la planta medicinal *Luehea divaricata* (Bernardi-wenzel et al., 2010), en *Bletilla ochracea* (orquídea) (Tao et al., 2012) también en *Spondias mombin* (Rodrigues et al., 1999) con base en los resultados de Okane et al., 2003 ha quedado claro que este hongo endófito vive dentro de varias plantas vasculares, angiospermas, gimnospermas y pteridófitas. El anamorfo de *Guignardia* sp. es *Phyllosticta* sp. y ha sido comúnmente aislado como endófito en arbustos de hojas perenne (hongo endófito: *Phyllosticta pyrolae*) (Petrini et al., 1982) pues, aunque no se conocen las especies de los géneros identificados en el estudio actual, existen investigaciones donde estas si son detalladas principalmente mediante técnicas moleculares. *Phyllosticta* sp. fue uno de los taxones fúngicos dominantes en un estudio de 19 hospedadores de coníferas (Carroll y Carroll, 1978). Los géneros *Guignardia* sp. y *Phyllosticta* sp. se han aislado de gimnospermas como *Podocarpus macrophyllus*, *Podocarpus nagi*, *Taxus cuspidata*, *Tsuga sieboldii*, *Thujopsis dolabrata* (Okane et al., 2003).



*Botryosphaeria* sp. fue identificado en semillas de *Podocarpus falcatus* y *Prunus africana*, árboles forestales afro-montanos nativos de Etiopía (Gure *et al.*, 2005) y aislado de eucaliptos sanos, algunas especies de *Botryosphaeria* sp. se consideran patógenos latentes, de hecho, la especie *Botryosphaeria dothidea* es uno de los patógenos más importantes de eucalipto en Sudáfrica y fue el taxón más destacado como endófito en *Eucalyptus grandis* (Smith *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1996), también se aisló de tejidos asintomáticos a partir de peral, duraznero y arándano donde no solo se confirmó su patogenicidad, sino también su alta virulencia por lo que fue considerada una de tantas especies patógenas latentes (Sessa, 2016). El anamorfo de *Botryosphaeria* es el género *Dothiorella*, la especie *Dothiorella dominicana* es reportada como un importante patógeno del mango, *Mangifera indica*, en Sudáfrica (Darvas, 1992); ambos géneros (*Botryosphaeria* y *Dothiorella*) tuvieron representantes que fueron aislados de árboles nativos de Hawái, *Acacia heterophylla* y *Acacia koa*, estudio centrado en la búsqueda de miembros de la familia Botryosphaeraceae debido a que se encuentran comúnmente en plantas leñosas y algunos son patógenos importantes (Jami *et al.*, 2019).

*Colletotrichum* sp. no ha sido reportado como un endófito específico por rango de hospedadores aislándose en muestras de 12 especies de árboles en la Reserva Forestal Iwokrama, Guyana (Lu, G. *et al.*, 2004). *Colletotrichum gloesporioides* fue aislado de cinco muestras de *Taxus mairei*, esta gimnosperma es importante debido a su producción de taxol y la producción de este por al menos alguno de sus endófitos (Wang *et al.*, 2008; Barrales-Cureño y Soto-Hernández, 2012) este último compuesto

es muy eficaz en la destrucción y contención de neoplasias o distintos tipos de cáncer (Luz y Adami, 2019).

### **Identificación de hongos endófitos en ambas plantas**

Entre los hongos endófitos en *Psychotria cuspidata* y *Podocarpus guatemalensis* fue difícil identificar el género de muchos hongos debido a que estos no producen estructuras reproductivas en los medios de cultivo a pesar de que se brindaron siete opciones nutricionales a través de medios de cultivo distintos, esto no fue suficiente para inducir la formación de esporas en algunos hongos endófitos por lo que se reportan como micelio estéril como ocurrió en la investigación de Polanco Guerrero, 2017 donde se utilizaron 6 medios de cultivo diferentes y fue imposible la identificación a causa de la ausencia de cuerpos fructíferos por parte de los hongos.

El género de hongos endófitos en común encontrado tanto en *Psychotria cuspidata* como en *Podocarpus guatemalensis* fue *Colletotrichum* encontrándose en menor proporción en la gimnosperma que en la angiosperma lo que concuerda con los hallazgos de Villarreal y Pérez, 2008 donde también se trabajó con una planta gimnosperma (*Zamia obliqua*) y una planta angiosperma (*Teobroma cacao*) y hubo baja colonización por el morfotipo *Colletotrichum* por lo que los autores mencionan que *Zamia obliqua* (gimnosperma) parece poseer alguna característica que limita la colonización de dicho género y podría ser también el caso de *Podocarpus guatemalensis*. Entre las muestras de *Colletotrichum* halladas en las dos plantas en estudio hubo una variedad total de morfología macroscópica de los cultivos dentro del plato Petri, es decir, todas las colonias de dicho género variaron en cuanto a forma,

color, micelio y distribución de estructuras reproductivas, esto es muy comúnmente reportado en especies de este género, por ejemplo en *Colletotrichum gloeosporioides* se registró un elevado grado de variabilidad revelando una amplia plasticidad genética de adaptación a diferentes condiciones (Alonso *et al.*, 2001), también se reportó variabilidad morfológica macroscópica en cepas de *Colletotrichum* sp. aisladas de ñame (*Dioscorea* sp.) en Colombia y *Colletotrichum gloeosporioides* aisladas en Aguacatero (*Persea americana*) en México (Castro *et al.*, 2003; Rodríguez-López *et al.*, 2009). En cuanto a los géneros de hongos endófitos hallados de manera exclusiva en cada planta fueron *Xylaria* en *Psychotria cuspidata*; *Guignardia* y *Botryosphaeria* en *Podocarpus guatemalensis*.

### **Importancia de la tasa de duplicación del micelio a nivel de género identificado en el estudio**

La tasa de duplicación del micelio (TDM) es una herramienta implementada en esta investigación como alternativa para el estudio de la tasa de crecimiento de los hongos endófitos para ubicarlos dentro de la respectiva categoría (rápido, moderado y lento crecimiento) brindándonos un valor más específico del tiempo que tarda un hongo en duplicar su micelio dentro del plato Petri con PDA en condiciones de laboratorio, pues en trabajos previos los hongos endófitos se han categorizado con base en el tiempo en intervalo de días de crecimiento de cada hongo endófito lo que ofrece un punto de vista demasiado general e inexacto, una herramienta cualitativa (Benítez, 2017; Polanco Guerrero, 2017) frente al de la TDM cuyo valor se determina mediante mediciones constantes de la tasa de crecimiento en función del tiempo en período de

horas lo que implica mayor especificidad al ubicar a cada hongo en su correspondiente categoría. Por esta razón, se propone el uso de esta herramienta en la diferenciación de especies dentro de un género de hongos endófitos, no obstante, la forma más segura de conocer las diferentes especies de hongos endófitos presentes es con la aplicación de técnicas moleculares, pues la manipulación genética es una de las opciones más viables en la actualidad (Landeró-Valenzuela *et al.*, 2016).

## CONCLUSIONES

- La densidad de hongos endófitos en *Psychotria cuspidata* fue de 95% y la diversidad de 36.84%.
- La densidad de hongos endófitos en *Podocarpus guatemalensis* fue de 78.3% y la diversidad de 42.55%.
- Los hongos endófitos, en *Psychotria cuspidata*, se agruparon en 21 morfotipos.
- Los hongos endófitos, en *Podocarpus guatemalensis*, se agruparon en 20 morfotipos.
- El 84% de los hongos endófitos en *Psychotria cuspidata* presentó crecimiento rápido, 12% crecimiento moderado y 4% crecimiento lento.
- El 45% de los hongos endófitos en *Podocarpus guatemalensis* resultó con crecimiento rápido, 25% crecimiento moderado y 30% crecimiento lento.
- La densidad, diversidad y tasa de crecimiento varió entre los hongos endófitos del árbol y el arbusto, pues hubo mayor densidad en el arbusto, mayor diversidad en el árbol y la tasa de crecimiento fúngica varió con un mayor porcentaje de hongos de crecimiento rápido en el arbusto que en el árbol y mayor porcentaje de hongos con crecimiento moderado y lento en el árbol que en el arbusto, por lo que se acepta la  $H_1$ .

## RECOMENDACIONES

- Continuar esta línea de investigación mediante técnicas moleculares para la identificación de los hongos endófitos a nivel de especie.
- Extender el estudio con base en los metabolitos secundarios que puedan producir los hongos endófitos de las plantas de la RFM y la aplicación práctica en beneficio de la sociedad.
- Aplicar pruebas de antagonismo entre los hongos endófitos de las especies vegetales del presente estudio y hongos fitopatógenos de cultivos importantes a nivel nacional.
- Repetir el estudio actual llevando a cabo la colecta de muestras en temporada lluviosa para el estudio de la diversidad de hongos endófitos y de igual manera aumentar el número de muestras colectadas.

## APÉNDICE

- Cámara de flujo laminar: en buen funcionamiento garantiza un bajo nivel de contaminación por parte de hongos y bacterias ambientales en los platos Petri con los hongos endófitos del estudio. Las muestras de hongos se manipulan dentro de la cámara de flujo laminar debido a que esta cuenta con filtros de aire que mantienen su interior libre de partículas que puedan contaminar a los hongos endófitos.
- Preparación del medio de cultivo, Agar Papa Dextrosa (PDA): se prepara el medio de cultivo según los cálculos correspondientes, en este caso, se agrega 100 mL de agua destilada en un recipiente de vidrio, se pesan 6 gramos de PDA el cual se adiciona al recipiente mencionado anteriormente, se mezcla y finalmente se coloca en autoclave que debe estar programado para una presión de 15 libras/pulgadas<sup>2</sup>, temperatura de 121°C y duración de 15 minutos, una vez el medio de cultivo esté a temperatura moderada para controlar el recipiente se sirven 20 platos Petri pequeños (55x14mm) con PDA.
- Control de calidad de los medios de cultivo en platos Petri: cuando los medios de cultivo se han servido adecuadamente permanecen en la cámara de flujo laminar por, aproximadamente, tres días, se observa dentro de los platos para descartar cualquier posible contaminación, esta se da generalmente por la colonización de hongos y bacterias ambientales.
- Asa micológica: al momento de usarla se impregna de alcohol al 70%, luego se incinera en el mechero de alcohol y se espera a que se refresque para manipular el hongo, de esta manera el asa micológica es flameada.

- Bisturí: cuando se va a utilizar se sumerge en alcohol, se flamea en el mechero y se espera a que se enfríe, sin alejarlo demasiado del calor del mechero para manipular el hongo.
- Para el Agar de Maíz: se agrega 100 mL de agua destilada en un recipiente de vidrio, a este se añade 1.7 gramos (g) de Corn Meal Agar y 1.8 g de agar – agar; finalmente se revuelve ligeramente el recipiente con el medio de cultivo y el agar dentro que luego se coloca en autoclave para ser esterilizado.
- Para el Agar de Papaya: se corta una parte de la fruta que contenga tanto cáscara como pulpa de la misma, luego se licúa para tomar de este concentrado 49 mL y agregarlo en un recipiente de vidrio con 100 mL de agua destilada, además se añade 1.8 g de agar-agar; esto se mezcla brevemente y se lleva a autoclavar para su posterior esterilización.
- Para la preparación del medio Agar Agua: se agrega 1.8 g de agar-agar en 100 mL de agua destilada para posteriormente autoclavar este medio.
- En el caso de la preparación de Agar Avena: se agregan 9 gramos de hojuelas de avena en 300 mL de agua destilada y se hierve durante 45 minutos, aproximadamente, luego de esperar a que se enfríe la avena, se agrega en un matraz aforado y se afora hasta llegar a los 300 mL que había inicialmente; también se añade 4.5 g de agar-agar y, posteriormente, se autoclava.
- Para el medio de cultivo Agar V8: se llena un recipiente de vidrio con 223 mL de agua destilada donde se agrega 49 mL de jugo V8, 6 g de agar-agar y 0.6 g de Carbonato de Calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), esta mezcla se revuelve para luego ser esterilizado en autoclave.



- Para el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa: se agrega, en un recipiente de vidrio, 3.9 g PDA en 100 mL de agua destilada, se agita un poco y se lleva a autoclavar.
- Con respecto a la preparación de Agar Extracto de Malta (AEM): se agrega 100 mL de agua destilada en un recipiente de vidrio al cual se añade 1.7 g de AEM y 1.8 g de agar-agar, se agita brevemente y se esteriliza en autoclave.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abello, J. F., y Kelemu, S. 2006. Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas, 7, 55–57.
- Agardh, C. A. 1825. Tropicos | Name - Equisetopsida C. Agardh. Retrieved July 23, 2018, from <http://www.tropicos.org/Name/43000109>.
- Alonso, J. G., Ángel, D. N., Ortiz, D. T., Mejía, E. Z., Huerta, H. V., Damián, T. M., & Sánchez, F. D. 2001. Características de crecimiento, germinación, esporulación y patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. obtenidos de frutos de mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19(1), 90-93.
- Anderson Stewart, C. R., Doilom, M., y Taylor, J. E. 2019. Analysis of fungal endophytes in Scottish Sitka spruce plantations shows extensive infections, novel host partners and gives insights into origins. *Forest Pathology*, 49, 18.
- Arnold, A. E., y Lutzoni, F. 2007. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*, 88(3), 541–549. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17503580>
- Arnold, A. E., & Herre, E. A. 2003. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia*, 95(3), 388-398.
- Arnold, A. E., Mejía, L. C., Kyllö, D., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N., y Herre, E. A. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100, 15649-15654.

- Audesirk, T., Audesirk, G., y Byers, B. 2008. Biología La vida en la tierra (octava edición ed.). México: Pearson 424-425.
- Baayen, R. P., Bonants, P. J., Verkley, G., Carroll, G. C., Van der Aa, H. A., De Weerd, M., Azevedo, J. L. 2002. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). *Phytopathology*, 92, 464-477.
- Bacon C.W., Hinton, D.M. 1997. Isolation and culture of endophytic bacteria and fungi. *Manual of Environmental Microbiology*. Washington, ASM Press, Pages: 413 - 425.
- Barnett, H. I., y Hunter, B. B. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. American Phytopathological Society Press, Saint Paul-Minnesota. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN. [Google Scholar].
- Barrales-Cureño, H. J. y Soto-Hernández, R. M. 2012. Taxoides: Metabolitos secundarios del árbol del Tejo (*Taxus* spp.). *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 18(2), 207-218.
- Barrios, M., Estrada, E., Vásquez, F., Álvarez, G., Rodríguez, F.; Beroy, V. 2010. Fortalecimiento Institucional de La ANAM en el manejo integrado del fuego en los bosques tropicales de panamá título del informe: línea base de la Reserva Forestal Montuoso. 1-48.

- Benítez Gómez, J. D. 2017. Búsqueda de actividad antagónica de hongos endófitos foliares de *Zamia* y *Guazuma* frente a microorganismos patógenos y ambientales. Tesis de grado, 70-71.
- Bentham, G. 1845. Tropicos | Name - *Psychotria acuminata* Benth. Retrieved July 23, 2018, from <http://www.tropicos.org/Name/27903355>
- Bernardi-Wenzel, J., García, A., Filho, C. J., Prioli, A. J., y Pamphile, J. A. 2010. Evaluation of foliar fungal endophyte diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini). Scielo Analytics, 377.
- Bethancourt, A. 2000. Un método de muestreo para el estudio de la diversidad de hongos endófitos asociados a especies arbóreas en un bosque tropical. Tesis de grado, 18, 31, 32.
- Botella, L., y Diez, J. J. 2011. Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. Fungal Diversity, 47, 9-18.
- Bredemeyer, Franz. 1819. Tropicos | Name *Psychotria cuspidata* Bredem. from: <http://tropicos.org/Name/27901920>
- Bueno, L. y Gallardo, R. 1998. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. Rev. Iberoam. Micol., 15, 166-168.
- Carroll, G. C., y Carroll, F. E. 1978. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. Canadian Journal of Botany, 3034-3043.
- Castro, L. M., Saquero, M. J., & Herrera, J. D. 2003. Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum* sp. como agente causal de la antracnosis en ñame *Dioscorea* sp. Revista colombiana de Biotecnología, (1), 24-35.

- Cepero de García, M. C. 2012. *Biología de hongos*. Universidad de los Andes, Bogotá: Ediciones Uniandes. 68.
- Cronquist, A. J., Takhtajan, A. L., y Zimmermann, W. M. 1966. Tropicos | Name - Pinidae Cronquist, Takht. & W. Zimm. Retrieved July 23, 2018, from <http://www.tropicos.org/Name/50324780>
- Darvas, J. 1992. *Dothiorella dominicana*, un importante patógeno del mango en Sudáfrica. En el IV Simposio Internacional del Mango 341, 321-328.
- Davidse, G., Sousa M., K. S. & Chiang F. 2009. Podocarpaceae, 2(1), 6–11. Retrieved from <http://www.tropicos.org/docs/meso/podocarpaceae.pdf>
- Davidse, G., Sousa M., K. S. & Chiang F. 2009. Rubiaceae. Retrieved from <http://www.tropicos.org/docs/meso/rubiaceae.pdf>
- Davis, A., Govaerts, R., Bridson, D., Ruhsam, M., Moat, J., & Brummitt, N. 2009. A Global Assessment of Distribution, Diversity, Endemism, and Taxonomic Effort in the Rubiaceae<sup>1</sup>. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 96(1), 68-78.
- Del Olmo-Ruiz, M., y Arnold, A. E. 2017. Community structure of fern-affiliated endophytes in three neotropical forests. *Journal of Tropical Ecology*, 60-73.
- Endlicher, S. F. L. 1847. Tropicos | Name - Podocarpaceae Endl. Retrieved July 23, 2018, from <http://www.tropicos.org/Name/50126585>
- Escobar, P., e Iturrado, L. 2007. Caracterización morfológica y molecular de hongos endófitos aislados a partir de la planta *Desmodium incomparabilis*. Tesis de licenciatura, 22.
- Flórez-Flórez, C. P., León-Peláez, J. D., Osorio-Vega, N. W., & Restrepo-Llano, M. F. 2013. Dinámica de nutrientes en plantaciones forestales de *Azadirachta*

*indica* (Meliaceae) establecidas para restauración de tierras degradadas en Colombia. *Revista de Biología Tropical*, 61(2), 515-529.

- Gamboa, M. A., y Bayman, P. 2001. Communities of Endophytic Fungi in Leaves of a Tropical Timber Tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). *Biotropica*, 352-360.
- Gamboa-Gaitán, M. A. 2006. Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. *Acta Biológica Colombiana*, 11, 3-20.
- Garibaldi, Cristina. 2004. Diversidad biológica y servicios ambientales de los fragmentos de bosques en la Reserva Forestal El Montuoso, Panamá. Panamá: Universal Book. Pág. 19.
- Garibaldi, C., y Arcia, D. I. 2016. Bienes y servicios ecosistémicos, y su percepción social en la Reserva Forestal el Montuoso. *Tecnociencia*, 59-74.
- Giusiano, G., Rodolfi, M., Mangiaterra, M., Piontelli, E., & Picco, A. M. 2010. Hongos endófitos en 2 plantas medicinales del nordeste argentino. I: análisis morfotaxonómico de sus comunidades foliares. *Boletín Micológico*, 25, 15 - 27.
- Gómez-Rivera, Á. S., López, C. Y., Burgos, M. M., y Mis, X. J. 2016. Caracterización morfológica de hongos endófitos aislados de *Hamelia patens* Jacq. y *Lantana camara* L. de Chetumal, Quintana Roo, México. *Teoría y Praxis*, 33-44.
- González Murillo, O. M. 2013. Aislamiento de hongos endófitos presentes en *Hyptis recurvata* Poit y su actividad antagónica frente a dos fitopatógenos de importancia agrícola. Tesis de grado, 20-26.

- Guo, L. D., Huang, G. R., Wang, Y. 2008. Seasonal and tissue age influences on endophytic fungi of *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in the Dongling Mountains, Beijing. *Journal of Integrative Plant Biology*, 998.
- Gure, A., Slippers, B., y Stenlid, J. 2005. Seed-borne *Botryosphaeria* spp. from native *Prunus* and *Podocarpus* trees in Ethiopia, with a description of the anamorph *Diplodia rosulata* sp. nov. *Mycological Research*, 109, 1005-1014.
- Hanlin, R.T. 2000 *Illustrated Genera of Ascomycetes*. Vol. I y II. Universidad de Virginia: American Phytopathological Society Press.
- Hawksworth, D., & Lücking, R. (2017). Diversidad de hongos revisada: 2.2 a 3.8 millones de especies. *El reino de los hongos*, 79-95.
- Hazlett, D. L. 1979. Árboles maderables y otros árboles desconocidos de la cordillera Nombre de Dios. Estación Experimental de Lancetilla. Escuela Nacional de Ciencias Forestales. 76-84.
- Jaén, B. S., & Hernández, M. 1998. Informes técnicos de Arco Seco, Panamá 1992/1993 (No. PRIAG-IICA IT No. 4). IICA, San José (Costa Rica). Programa Regional de Reforzamiento a la Investigación Agronómica sobre los Granos en Centroamérica-PRIAG.
- Jami, F., Marincowitz, S., Slippers, B., Crous, P. W., Le, J. J., Richardson, D. M., y Wing, M. J. 2019. Botryosphaeriaceae associated with *Acacia heterophylla* (La Reunion) and *Acacia koa* (Hawaii). *Fungal Biology*, 123, 783-790.
- Jussieu, A. L. de. 1789. Tropicos | Name - !!Rubiaceae Juss. Retrieved July 23, 2018, from <http://www.tropicos.org/Name/42000315>

- Jussieu, A. L. de. 1820. Tropicos | Name - Gentianales Juss. ex Bercht. & J. Presl. Retrieved July 23, 2018, from <http://www.tropicos.org/Name/43000072>
- Kriel, W. M., Swart, W. J., y Crous, P. W. 2000. Foliar endophytes and their interactions with host plants, with specific reference to the gymnospermae. *Advances in Botanical Research*, 28-29.
- Kursar, T., Capson, T., Coley, P. D., Corley, D. G., Gupta, M. B., Harrison, L. A., & Windsor, D. M. 1999. Ecologically guided bioprospecting in Panama. *Pharmaceutical Biology*, 37(1), 114-126.
- L'Héritier de Brutelle, C. L. 1807. Tropicos | Name - Podocarpus L'Hér. ex Pers. Retrieved July 23, 2018, from <http://www.tropicos.org/Name/40012551>
- Landero-Valenzuela, N., Lara-Viveros, F. M., Andrade-Hoyos, P., Aguilar-Pérez, L. A., & Aguado Rodríguez, G. J. 2016. Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(5), 1189-1198.
- Lara, A.; Valverde, R.; Gómez, L.; Hidalgo, N. 2003. Micropropagación de la planta medicinal *Psychotria acuminata*.
- Linnaeus, C. von. 1759. Tropicos | Name - !!Psychotria L. Retrieved July 26, 2018, from <http://www.tropicos.org/Name/40019204>
- Lu, G., Cannon, P. F., Reid, A., y Simmons, C. M. 2004. Diversity and molecular relationships of endophytic *Colletotrichum* isolates from the Iwokrama. *Investigación micológica*, 108, 53-63.
- Luz, A. V., & Adami, E. R. 2019. Uso dos Taxanos no tratamento do câncer de mama. Centro Universitário Cesumar de Curitiba.



- Macaya-Sanz, D., Eugenio M.E., Martín-Sampedro, R., Fillat, U., Ibarra, D., Del Barrio, A., y Sobrino-Plata, J., Medel, D., Collada, C., Gil, L Y Martin, J. A. 2017. Diversidad de hongos endófitos en especies forestales y su posible papel en la defensa de su hospedante y la degradación de la madera. 7° Congreso Forestal Español. 1-14.
- Massimo, N. C., Devan, M. M., Arendt, K. R., Wilch, M. H., Riddle, J. M., Furr, S. H., Arnold, A. E. 2015. Fungal Endophytes in Aboveground Tissues of Desert Plants: Infrequent in Culture, but Highly Diverse and Distinctive Symbionts. *Microbial Ecology*, 70, 61–76.
- Mi Ambiente. 2010. Gaceta Oficial Digital. Retrieved from [http://www.gacetaoficial.gob.pa/pdfTemp/26450/GacetaNo\\_26450\\_20100119.pdf](http://www.gacetaoficial.gob.pa/pdfTemp/26450/GacetaNo_26450_20100119.pdf)
- Mosquera, T. R. 2010. Densidad y diversidad de hongos endófitos en flores, frutos y semillas de *Anacardium excelsum*: Anacardiaceae. Universidad de Panamá, 34-35.
- Mussi-Dias, V., Araujo, O., Silveira, S., y Rocabado, J. 2012. Fungos endofíticos asociados a plantas medicinales. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 261-266.
- Novák, F. A. 1967. Tropicos | Name - Magnoliidae Novák ex Takht. Retrieved July 23, 2018, from <http://www.tropicos.org/Name/43000013>
- Okane, I., Lumyong, S., y Nakagiri, A. 2003. Extensive host range of an endophytic fungus, *Guignardia endophyllicola* (anamorph: *Phyllosticta capitalensis*). *Mycoscience*, 353-363.

- Ortiz, O., Mercado, L., Mendieta, J., & Carrasquilla, L. 2013. Composición Florística Arbórea de una Parcela de Bosque Tropical de Tierras Bajas en el Parque Nacional Darién. *Scientia*, 23(2), 7-26.
- Pedreschi M.E, Pereira de Herrera A., A. D. 2013. Reserva Forestal El Montuoso: Vinculación económica de las comunidades de influencia con su ecosistema. *Visión Antataura*, 1(1), 87-100.
- Pérez, R. 2008. Árboles de los bosques del Canal de Panamá. Panamá: BOSKI, S.A. Smithsonian Tropical Research Institute.
- Petrini, Orlando, Stone, Jeffrey, y Carroll, Fanny E. 1982. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. *Canadian Journal of Botany*, 789-796.
- Piepenbring, M., López, F., & Cáceres, O. 2016. Colaboradores escondidos—La Importancia de los Hongos en los Ecosistemas Información para Educación Ambiental. *Puente Biológico*, 8(1), 57-91.
- Polanco Guerrero, S. R. 2017. Determinación de compuestos volátiles provenientes de hongos endófitos y su actividad antagónica frente a bacterias patógenas. Tesis de grado, 45.
- Porrás-Alfaro, A., y Bayman, P. 2011. Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. *Annual Review of Phytopathology*, 291-315.
- Pulle, A. A. 1992. Tropicos | Name - Podocarpaceae Pulle ex Reveal. Retrieved July 26, 2018, from <http://www.tropicos.org/Name/100001012>

- Ramírez R., J., Delgado Fernandez, E., Rodolfi, M., y Solveig, T. 2006. Actividad antagónica de hongos endófitos de plantas medicinales del ecuador sobre bacterias patógenas. *Boletín Micológico*, 21, 52.
- Restrepo, S. 2007. Histological analyses of the fungal endophytes in *Rosa hybrida*. *Rev Iberoam Micol*, 24, 323-324.
- Ríos Madril, M. I. 2010. Control biológico de la Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) en tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en el ecotipo: amarillo puntón, mediante hongos endófitos antagonistas. *Tesis de Licenciatura*.
- Rodrigues, K. F., y Samuels, G. J. 1999. Fungal endophytes of *Spondias mombin* leaves in Brazil. *Journal of Basic Microbiology*, 132.
- Rodríguez-López, E. S., González-Prieto, J. M., & Mayek-Pérez, N. 2009. La infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos bioquímicos y genéticos. *Revista mexicana de fitopatología*, 27(1), 53-63.
- Romeralo, C., Botella, L., Santamaría, O., y Diez, J. 2013. Control biológico de *Gremmeniella abietina* en plántulas de *Pinus halepensis* en invernadero mediante el uso de hongos endófitos. *Sociedad Española de Ciencias Forestales*, 7-8.
- Rosa, L. H., Vaz, A. B., Caligiorne, R. B., Campolina, S., y Rosa, C. A. 2009. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). *Polar Biology*, 32, 161-167.

- Ryoko, O., Lefèvre, E., Simha, A., Lutzoni, F. 2015. A comparison of the community diversity of foliar fungal endophytes between seedling and adult loblolly pines (*Pinus taeda*). *Fungal Biology*, 917-928.
- Saikkonen, K., Faeth, S. H., Helander, M., y Sullivan, T. J. 1998. Fungal Endophytes: A Continuum of Interactions with Host Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29, 336.
- Sánchez-Fernández, R. E., Lorena Sánchez-Ortiz, B., Monserrat Sandoval-Espinosa, Y. K., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., Claudia García-Méndez, M., y Lydia Macías-Rubalcava, M. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Tip*, 16(2), 132–146.
- Saucedo-García, A., Anaya, A. L., Espinosa-García, F. J., & González, M. C. 2014. Diversity and communities of foliar endophytic fungi from different agroecosystems of *Coffea arabica* L. in two regions of Veracruz, Mexico. *PLOS one*, 9(6), e98454.
- Sessa, L. J. 2016. Enfermedades de cultivos frutales del Uruguay: hongos endófitos, patógenos latentes y fitopatógenos. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Microbiología, 78.
- Sieber, T. N. 2007. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews*, 75-89.
- Smith, H., Wingfield, M. J., y Petrini, O. 1996. *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus nitens* in South Africa. *Forest Ecology and Management*, 189-195.

- Smith, H., Wingfield, M. J., Crous, P., y Coutinho, T. A. 1996. *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Pinus* spp. and *Eucalyptus* spp. in South Africa. South African Journal of Botany, 88.
- Standley, P. C. 1924. Tropicos | Name - Podocarpus guatemalensis Standl. Retrieved July 23, 2018, from <http://www.tropicos.org/Name/25600030>
- Strobel, G., y Daisy, B. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. Microbiology and molecular biology reviews, 67(4), 491-502.
- Suryanarayanan, T. S., Venkatesan, G., y Murali, T. S. 2003. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: Diversity and distribution patterns. Current Science, 85, 489-493.
- Takhtajan, A. L. 1967. Tropicos | Name - Asteranae Takht. Retrieved July 23, 2018, from <http://www.tropicos.org/Name/100352415>
- Tao, G., Liu, Z., Sun, B., Zhu, Y., Cai, L., y Liu, X. 2012. Occurrence and diversity of endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae) in Guizhou, China. African Journal of Microbiology Research, 6, 2861.
- Thaiutsa, B., y Granger, O. 1979. El clima y la descomposición de la hojarasca en el bosque tropical. Unasyva, 31(126), 121-129.
- Tiscornia, S. 2012. Comunidades de hongos endófitos de Myrtaceae neotropicales: evaluación de la producción de enzimas y metabolitos bioactivos. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, 46.
- Van Bael, S. A., Valencia, M. C., Rojas, E. I., Gómez, N., Windsor, D. M., y Herre, E. A. 2009. Effects of Foliar Endophytic Fungi on the Preference and

Performance of the Leaf Beetle *Chelymorpha alternans* in Panama. *Biotropica*, 41(2), 221-225.

- Villarreal, L. A., y Pérez Jaén, C. L. 2008. Estudio comparativo de las poblaciones de hongos endófitos foliares en dos especies de plantas: *Zamia obliqua* y *Theobroma cacao*. Tesis, 16, 21.
- Wang, Y.-t., Lo, H.-s., y Wang, P.-h. 2008. Endophytic fungi from *Taxus mairei* in Taiwan: first report of *Colletotrichum gloeosporioides* as an endophyte of *Taxus mairei*. *Botanical Studies*, 39-43.
- Wilson, D. 1995. Endophyte: The Evolution of a Term and Clarification of Its Use and Definition. *Oikos*, 274-275.
- Xiao, C. L., MacKenzie, S. J., & Legard, D. E. 2004. Genetic and pathogenic analyses of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from strawberry and noncultivated hosts. *Phytopathology*, 94(5), 446-453.
- Zamora, P., Ruiz, C. M., y Diez, J. 2008. Fungi in needles and twigs of pine plantations from northern Spain. *Fungal Diversity*, 171-184.
- Zhang, T., Zhang, Y. Q., Liu, H. Y., Wei, Y. Z., Li, H. L., Su, J., Yu, L. Y. 2013. Diversity and cold adaptation of culturable endophytic fungi from bryophytes in the Fildes Region, King George Island, maritime Antarctica. *FEMS Microbiology Letters*, 52-61.

## ANEXOS

**Tabla 8. Tasa de duplicación de micelio de cada hongo endófito aislado de *Psychotria cuspidata*.**

Código	Hongos endófitos	Pendiente
Psy 106	<i>Colletotrichum</i> sp.	1.682580082
Psy 121	<i>Colletotrichum</i> sp.	1.841914336
Psy 105	<i>Glomerella</i> sp.	2.024597237
Psy 118	<i>Colletotrichum</i> sp.	2.056384181
Psy 119	<i>Colletotrichum</i> sp.	2.345491553
Psy 100	<i>Glomerella</i> sp.	2.494796696
Psy 109	<i>Colletotrichum</i> sp.	2.499545309
Psy 120	<i>Colletotrichum</i> sp.	2.70098716
Psy 117	<i>Xylaria</i> sp.	2.394722856
Psy 104	Micelio estéril	1.167346464
Psy 124	Micelio estéril	1.265170881
Psy 123	Micelio estéril	1.288257729
Psy 101	Micelio estéril	1.308184463
Psy 103	Micelio estéril	1.365436945
Psy 122	Micelio estéril	1.514919059
Psy 115	Micelio estéril	1.710656793
Psy 112	Micelio estéril	2.695589873
Psy 114	Micelio estéril	2.739737934
Psy 107	Micelio estéril	3.081312042
Psy 110	Micelio estéril	3.528288489
Psy 108	Micelio estéril	3.639931977
Psy 102	Micelio estéril	5.365601622
Psy 113	Micelio estéril	5.449495967
Psy 116	Micelio estéril	6.476161209
Psy 111	Micelio estéril	8.045698419

**Tabla 9. Tasa de duplicación de micelio de cada hongo endófito aislado de *Podocarpus guatemalensis*.**

Código	Hongos endófitos	Pendiente
Podo 111	<i>Guignardia</i> sp.	7.549009709
Podo 103	<i>Guignardia</i> sp.	7.703288669
Podo 104	<i>Guignardia</i> sp.	7.997995645
Podo 105	<i>Guignardia</i> sp.	8.121054259
Podo 109	<i>Guignardia</i> sp.	9.167128463
Podo 100	<i>Guignardia</i> sp.	10.37913462
Podo 114	<i>Guignardia</i> sp.	12.04925455
Podo 102	<i>Colletotrichum</i> sp.	2.32869242
Podo 118	<i>Colletotrichum</i> sp.	2.443354954
Podo 112	<i>Colletotrichum</i> sp.	2.70873248
Podo 108	<i>Botryosphaeria</i> sp.	7.31520979
Podo 106	Micelio estéril	1.268769676
Podo 110	Micelio estéril	1.372982695
Podo 101	Micelio estéril	1.412809328
Podo 107	Micelio estéril	2.614310261
Podo 115	Micelio estéril	2.955576587
Podo 113	Micelio estéril	3.88865397
Podo 116	Micelio estéril	4.214584453
Podo 119	Micelio estéril	6.32780518
Podo 117	Micelio estéril	16.81801428



**Tabla 10. Algunas fórmulas utilizadas en esta investigación**

Ecuaciones	Descripción
$\% = \frac{\text{Número total de hongos endófitos aislados de la respectiva hoja}}{\text{Número total de hongos endófitos representativos de la colección}} \times 100$	Abundancia porcentual de hongos endófitos por hoja
$\% = \frac{\text{Número total de hongos endófitos recuperados en el aislamiento}}{\text{Número total de fragmentos de hojas sembradas}} \times 100$	Densidad de hongos endófitos
$\% = \frac{\text{Número de morfotipos individuales + morfotipos grupales de hongos endófitos}}{\text{Número total de hongos endófitos recuperados en el aislamiento}} \times 100$	Diversidad de hongos endófitos
$m = \frac{Y_2 - Y_1}{X_2 - X_1}$	Pendiente usando dos puntos en línea recta del gráfico para conocer la TDM
$\% = \frac{\text{Número total de hongos endófitos dentro del respectivo rango}}{\text{Número total de hongos endófitos representativos de la colección}} \times 100$	Abundancia porcentual de hongos endófitos para cada categoría