

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

Estudio molecular de comunidades de hongos endófitos foliares asociados a 16 especies de plantas muestreadas en cafetales de Renacimiento y Parque Internacional la Amistad (PILA), Chiriquí, Panamá

KARINA EMPERATRIZ VÍQUEZ RÍOS

TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ 2024

Luis C. Mejía, Investigador del Centro de Biodiversidad y Descubrimiento de Drogas del Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT-AIP), y profesor del Departamento de Genética y Biología Molecular de la Universidad de Panamá.

CERTIFICA QUE: Karina Emperatriz Víquez Ríos

Ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis de Maestría, con el título:

Estudio molecular de comunidades de hongos endófitos foliares asociados a 16 especies de plantas muestreadas en cafetales de Renacimiento y Parque Internacional la Amistad (PILA), Chiriquí, Panamá

Revisado este trabajo, autorizan su presentación para ser juzgado, y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Panamá el ____ de _____ de _____

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al todo poderoso, al omnipotente, por haberme creado y darme esta oportunidad de crecimiento profesional.

Al Dr. **Luis C. Mejía, Investigador** del Centro de Biodiversidad y Descubrimiento de Drogas del Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT-AIP) por aceptarme como estudiante tesista, guiarme durante este largo proceso de aprendizaje y apoyarme con todos los recursos para la realización de este trabajo. A su equipo de trabajo el **Fungi Lab**, conformado por un grupo excelente de profesionales de diversas áreas, que durante la realización de este trabajo de tesis me apoyaron de alguna u otra manera. Agradezco a la Estudiante de doctorado Hilda Castillo, la Dra. Librada Atencio, Licenciada Masiel Barrios, Mgtr. Indira Quintero, Licenciado Ariel Rachella, Estudiante de doctorado Kesia Barrows, Estudiante de Mgtr. Evangelina López y al Mgtr. Alejandro Almanza.

Agradezco a los profesores Ada Rodríguez, Jorge Mendieta, Naida Flores y al Dr. Yves Basset por apoyarme en los inicios de este programa de maestría. Al Departamento de Genética y Biología Molecular de la Universidad de Panamá por aceptarme como estudiante en su programa de maestría.

Igualmente, a la profesora Dra. María Stapf, a la profesora Lucila Guillen, al profesor José De Gracia y al licenciado Adrián Jiménez.

Agradezco a mi familia: A mi esposo Robert Duarte, mis hijas Susanna y Sahily por aceptar y comprender mi sueño de querer seguir creciendo profesionalmente.

A mi hermana Zuleika Rodríguez, mi madre Lucinda Ríos, mi tía Eleiza Ríos y a mis suegros Rosa Alonso y Omar Duarte por el apoyo que me brindaron durante mis estudios de maestría.

Por último, agradezco a todas las instituciones y asociaciones por todo el apoyo brindado durante el desarrollo de esta tesis: al Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT-AIP), al Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales (STRI), al Fondo para el Medio Ambiente Mundial (GEF) y a la Asociación de Cafés Especiales de Panamá (SCAP).

DEDICATORIA

A mis hijas Susanna Karina y Sahily Rose por comprender que no les pude brindar todo el tiempo que quisieron, al momento de cumplir con este trabajo de tesis. En un futuro cuando sean adultas tomen de ejemplo y de superación profesional este trabajo. A mi amigo, compañero, cómplice, amante, esposo y socio Robert Duarte A.

Con amor,

Karina Viquez R.

Contenido

Introducción	1
CAPÍTULO I	3
<i>Antecedentes</i>	4
Generalidades de hongos endófitos	4
Identificación de microorganismos aislados.....	5
Estudios de comunidades de microorganismos	6
Generalidades de las plantas incluidas en este estudio.....	8
.....	10
Identificación molecular a través de códigos de barras de ADN (barcoding DNA)	21
Planteamiento del problema.....	24
Hipótesis de trabajo.....	25
Objetivos	25
Objetivo General	25
Objetivos Específicos	26
CAPÍTULO II	27
<i>Materiales y Métodos</i>	28
Área de estudio	28
Colecta de muestras y procesamiento inicial de muestras. Ver Figura 6	29
Extracción de ADN total.....	30
PCR, preparación de librería y secuenciación ADN.....	30
Análisis de datos	31
Generación de códigos de barras molecular para plantas	32
Amplificación y secuenciación de ADN cloroplástico (matK y rbcL).....	32
Análisis de datos para secuencias de plantas	33
CAPÍTULO III	35
<i>Resultados</i>	36
.....	36
<i>Comunidades de hongos endófitos foliares asociados a plantas que ocurren en un cafetal</i>	37
• Análisis estructural de las comunidades fúngicas	37
• Diversidad alfa de comunidades fúngicas asociados a plantas que ocurren en un cafetal.....	41
• Diversidad beta de comunidades fúngicas asociados a plantas que ocurren en un cafetal.....	45
<i>Código de barra generados para cinco especies de plantas asociados a un cafetal</i>	47
CAPÍTULO IV	48
<i>Discusión</i>	49
CAPÍTULO V	52
<i>Conclusiones</i>	53
CAPÍTULO VI	55

RECOMENDACIONES56
REFERENCIAS..... 57
ANEXOS 70

Índice de Cuadros

TABLA 1. Especies de plantas que se utilizaron en el estudio.....	28
TABLA 2. Códigos de barra de ADN generados para especies de plantas muestreadas dentro y fuera de cafetales.....	42

Índice de Figuras

Figura 1. Fotografías representativas de especies de la familia Rubiaceae.....	8
Figura 2. Distribución mundial del género <i>Coffea</i> L.	10
Figura 3. Genes ribosomales y espaciadores intergénicos (IGS e ITS).	22
Figura 4. Imagen representativa de la ubicación de genes cloroplásticos dentro de la célula y utilizados como código de barra de ADN de plantas en este estudio.	24
Figura 5. Área de estudio.....	27
Figura 6. Metodología de colecta y procesamiento de muestras.....	34
Figura 7. Fotografías representativas de especies de plantas muestreadas en este estudio.....	36
Figura 8. Abundancia relativa de hongos endófitos foliares de <i>Coffea arabica</i> y 15 especies de plantas dentro y cerca de cafetales muestreados en Chiriquí.....	38
Figura 9. Abundancia relativa de géneros de hongos endófitos foliares de <i>Coffea arabica</i> y 15 especies de plantas dentro y cerca de cafetales muestreados en Chiriquí.....	40
Figura 10. Diversidad alfa de comunidades fúngicas de <i>Coffea arabica</i> y 15 especies de plantas dentro y cerca de cafetales muestreados en Chiriquí.....	42
Figura 11. Análisis de coordenadas principales basada en Distancia de Bray-Curtis.....	46

Resumen

Los árboles tropicales tienen una alta diversidad de hongos simbioses y se consideran puntos críticos para la diversidad de especies de hongos endófitos. El término endófito es utilizado para referirse a organismos (principalmente hongos y bacterias), que viven de manera asintomática dentro de los tejidos de las plantas.

Con el fin de identificar la composición taxonómica de comunidades de hongos endófitos foliares de *Coffea arabica* L. y comparar estos taxones con los encontrados en otras especies de plantas presentes en cafetales y bosques circundante, se utilizó la herramienta de metabarcoding de hongos. Se colectaron y analizaron muestras de hojas de 16 especies de plantas pertenecientes a cinco divisiones: Magnoliophyta, Pinophyta, Monilophyta, Bryophyta, y Cycadophyta. Ubicadas dentro y cerca de cafetales (Zona de amortiguamiento y Parque Internacional La Amistad) en Renacimiento, Chiriquí, mediante una secuenciación masiva del locus ITS2. Las plantas fueron identificadas mediante claves taxonómicas (basadas en caracteres morfológicos) y mediante secuenciación de los loci Rubisco (*rbcL*) y maturasa (*MatK*) (códigos de barra de ADN) y posterior comparación con base de datos de secuencias de ADN.

Se identificaron un total de 9435 variantes de secuencias de amplicones (ASVs), destacando las clases de hongos: Dothideomycetes, Sordariomycetes y Eurotiomycetes, como las más dominantes.

Las estimaciones de diversidad alfa mostraron diferencias significativas entre especies. Del mismo modo, los análisis de beta diversidad mostraron diferencias significativas entre sitios. En la caracterización molecular, se obtuvo secuencias para barcoding de los genes *matK* y *rbcL* para *Cojoba valerioi*, *Pouteria juruana*, *Ocotea whitei*, *Desmopsis maxonii* y *Zamia pseudomonticola*.

Los resultados de este estudio nos brindan una mejor comprensión sobre la distribución de especies de hongos endófitos en plantas de café y plantas nativas. Además, nos permite hacer recomendaciones acerca de qué especies de plantas nativas podrían actuar como donantes de hongos endófitos benéficos para el cultivo de *C. arabica*, y entender las relaciones ecológicas entre estas comunidades y con sus plantas hospederas.

Abstract

Tropical trees have a high diversity of symbiotic fungi and are considered hotspots for the diversity of endophytic fungal species. The term endophyte is used to refer to organisms (mainly fungi and bacteria) that live asymptotically within plant tissues.

In order to identify the taxonomic composition of foliar endophytic fungal communities of *Coffea arabica* L. and compare these taxa with those found in other plant species present in coffee plantations and surrounding forests, the fungal metabarcoding tool was used. Leaf samples from 16 plant species belonging to five divisions: Magnoliophyta, Pinophyta, Monilophyta, Bryophyta, and Cycadophyta were collected and analyzed.

They were located in and near coffee plantations (Buffer Zone and La Amistad International Park) in Renacimiento, Chiriquí, by massive sequencing of the ITS2 locus. The plants were identified by taxonomic keys (based on morphological characters) and by sequencing of the Rubisco (*rbcL*) and maturase (*MatK*) loci (DNA barcodes) and subsequent comparison with DNA sequence databases.

A total of 9435 amplicon sequence variants (ASVs) were identified, with the fungal classes Dothideomycetes, Sordariomycetes and Eurotiomycetes standing out as the most dominant. Alpha diversity estimates showed significant differences between species. Similarly, beta diversity analyses showed significant differences between sites. In the molecular characterization, barcoding sequences of the *matK* and *rbcL* genes were obtained for *Cojoba valerioi*, *Pouteria juruana*, *Ocotea whitei*, *Desmopsis maxonii* and *Zamia pseudomonticola*.

The results of this study provide us with a better understanding of the distribution of endophytic fungal species in coffee plants and native plants. In addition, it allows us to make recommendations about which native plant species could act as donors of beneficial endophytic fungi for the cultivation of *C. arabica*, and to understand the ecological relationships between these communities and with their host plants.

Introducción

Los bosques tropicales alojan una gran riqueza de vida y las plantas que en ellas ocurren albergan una alta diversidad de hongos endófitos. Adicionalmente, estos bosques presentan alta complejidad y diversidad de microhábitats y microclimas tanto horizontal como verticalmente, para insectos y hongos (Hammond 1992; Lodge y Cantrell, 1995; Gamboa 2006). Todas las plantas terrestres mantienen una simbiosis con una gran diversidad de especies de hongos. Particularmente los árboles tropicales tienen una alta diversidad entre los hongos simbioses que se asocian con tejidos vivos de sus hojas. Las hojas de los árboles tropicales se consideran puntos críticos para la diversidad de especies de hongos endófitos (Arnold y Lutzoni, 2007; Arnold et al., 2003).

Desde el siglo XIX se conoce el término endófito y se utilizó para agrupar organismos fúngicos que viven dentro de las plantas (Gamboa, 2006; Lévillé, 1846; de Bary, 1866). Petrini (1991) refiere el término endófitos a cualquier organismo, sea bacterias u hongos que se encuentren dentro de tejidos vegetales sin causar daño aparente. En este trabajo se siguió la definición de Petrini (1991) y se enfocó sobre hongos endófitos foliares.

Diversos estudios respaldan los diferentes roles ecológicos o funcionales de endófitos foliares. En el 2020 Christian y colaboradores sugirieron que los endófitos foliares inducen cambios en los perfiles químicos secundarios de sus plantas hospederas y esto fue fundamentado en estudios utilizando hongos endófitos foliares asociados a plantas del género *Psychotria* y al árbol *Theobroma cacao*. Los endófitos foliares muestran beneficios a sus hospederos como aumentar la resistencia al daño a causa de patógenos y herbívoros (Arnold et al., 2003; Mejia et al., 2008) induciendo o aumentando de manera directa o indirecta las defensas de las plantas (Van Bael et al., 2009). Por ejemplo, plantas inoculadas con el endófito *Colletotrichum tropicale* inducen la expresión de genes de la planta que son efectivos para mejorar la resistencia a enfermedades (Mejia et al., 2014). También se puede mencionar que se ha demostrado que algunos hongos endófitos benefician a las plantas hospederas al facilitar la adquisición de nutrientes (Hiruma et

al., 2016; Christian et al., 2019; Christian et al., 2020) y promover la tolerancia al estrés abiótico (Bae et al., 2009; Yamaji et al., 2016; Christian et al., 2020).

Generalmente los hongos adquieren sus nutrientes a través de la degradación de restos de animales y vegetales, por tanto, contribuyen al mantenimiento y el funcionamiento de los ecosistemas, desempeñando un importante papel en las cadenas tróficas. También tienen aplicaciones en la industria biotecnológica para la producción de enzimas, bebidas alcohólicas, medicamentos, fertilizantes, pigmentos naturales, cosméticos, alimentos y también son utilizados como biocontroladores (Lange, 2010; Muzzarelli et al., 2012; Bandara et al., 2015; Chi, 2020).

Según Harrison y Griffin (2020), en un estudio basado en referencias bibliográficas de trabajos sobre endófitos; desde finales de los 70s se han incrementado los estudios de estos organismos (bacterias y hongos), con un mayor interés en endófitos fúngicos.

Sin embargo, las estadísticas realizadas en su conteo, de estudios sobre endófitos, indican un incremento en estudios de endófitos bacterianos.

Adicionalmente, estos autores sugieren que es posible que falte por describir gran parte de la diversidad de endófitos, ya que señalan que aproximadamente un tercio de las familias de plantas han sido utilizadas en busca de endófitos fúngicos.

Arnold y Lutzoni (2007) y Suryanarayanan y colaboradores (2018) argumentan que la biodiversidad de endófitos no depende de un muestreo exhaustivo en busca de potenciales hospederos (plantas). Harrison y Griffin (2020), expresan que los hospederos, pudiesen ser predictores de nuevos taxones de endófitos. Esto sugiere la posibilidad; de encontrar nuevos grupos de endófitos muestreando más u otras plantas que no hayan sido estudiadas para este fin.

CAPÍTULO I

Antecedentes

Antecedentes

Generalidades de hongos endófitos

Desde hace dos siglos los endófitos han sido estudiados; y aparecen mostrándose sobre el panorama de todos como un término conocido. Cuando uno hace búsqueda del término endófito, diversos escritores acentúan su publicación, dando a conocer que algunos autores son los primeros en utilizar y crear el término y otros han agregado su perspectiva respecto al tema.

No cabe duda que diferentes autores han contribuido a definir el término endófito. Actualmente estos organismos que eran casi desapercibidos por la ciencia y el mundo, ahora son conocidos por muchos.

Entre los autores relevantes a destacar se encuentran los siguientes:

J.H. Léveillé observó filamentos de hongos (que les llamó parásitos) en epidermis y deajo al descubierto que no estaban solamente en hojas o frutos muertos o en descomposición sino también en tejidos vivos y que algunos no causaban daño (Léveillé, 1846).

A. De Bary expres  que había algunos hongos parásitos que viven en las plantas. Aquellos que habitan total o parcialmente dentro de la planta huésped (endófitos) y los que sólo viven en la superficie del huésped (parásitos epífitos) (Bary, 1866).

Orlando Petrini propuso que la definición de Carroll (1986) se ampliara, de << organismos que causan infecciones asintomáticas dentro de los tejidos de las plantas, excluyendo los hongos patógenos y los mutualistas como los hongos micorrízicos >> a que se incluya a todos los organismos que habitan los órganos de las plantas, en algún momento de su vida y que colonicen los tejidos internos de las plantas sin causar daño aparente a su huésped (Petrini, 1991).

Dennis Wilson expres  que los endófitos son hongos o bacterias que, durante todo o parte de su ciclo de vida, invaden los tejidos de las plantas vivas y causan infecciones no aparentes y asintomáticas dentro de los tejidos de las plantas, es decir sin síntomas de enfermedad (Wilson, 1995).

Barbara Schulz y Christine Boyle propusieron que los endófitos incluyen un conjunto de microorganismos con diferentes estrategias de vida. Expusieron que habían dos tipos: microorganismos que después de una fase de crecimiento endofítico, crecen saprófitamente en tejido muerto o senescente. Y los microorganismos avirulentos, incidentales, pero también patógenos latentes y patógenos virulentos en las primeras etapas de la infección.

Además las autoras propusieron que los microorganismos tiene interacciones flexibles con su hospedero o socio; tanto mutualistas y comensalistas dependiendo de las disposiciones genéticas de los dos organismos, sus etapas de desarrollo, sus estados de nutrición; y también influyen los factores ambientales (Barbara Schulz & Christine Boyle, 2006).

Rusty J. Rodríguez y colaboradores concluyeron en su artículo que los hongos endófitos comprenden un grupo diverso de especies que varían en funciones simbióticas y ecológicas (Rodriguez et al., 2009)

Los estudios sobre los endófitos continuaron y tomaron su auge con los años. La perspectiva de los científicos se fue moldeando.; En la actualidad la visión va desde, querer caracterizarlos como organismos que son a contestar preguntas sobre interacción, beneficios ecológicos, diversidad, estructura y dinámica de las comunidades fúngicas, distribución, taxonomía, relaciones filogenéticas con sus hospederos, entre otras.

Identificación de microorganismos aislados

Se puede decir que el estudio de P.J. Fisher y colaboradores sobre endófitos bacterianos y fúngicos en plantas de maíz sanas (P. J. Fisher et al., 1992); Paul Bayman y J. Tupac Otero con su capítulo de endófitos microbianos de las raíces de las orquídeas (Paul Bayman & J. Tupac Otero, 2006); Miguel A. Gamboa y Paul Bayman con su artículo sobre comunidades de hongos endófitos en hojas de un árbol maderable tropical (Guarea guidonia: Meliaceae) en Puerto Rico (Gamboa & Bayman, 2001); Johanna Santamaría & Paul Bayman con su artículo sobre epífitas y endófitas fúngicas de las hojas del café (*Coffea arabica*) en Puerto Rico con cultivo y secuenciación de ITS (Santamaría & Bayman, 2005).

Estudios de comunidades de microorganismos

Rodríguez et al., (2009) y Pfenning y Magalhães de Abreu (2012) hicieron una reseña de las metodologías para el estudio de los endófitos fúngicos, entre los siglos XX y XXI en donde se empezó a visualizar las ejecuciones de los científicos en sus temas de estudio.

A continuación, algunas de las técnicas mencionadas:

- Electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE). Ésta técnica también se empezó a aplicar y adaptar para estudiar la diversidad genética de las comunidades microbianas (Muyzer et al., 1993) y la electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE) para la ecología microbiana (Muyzer & Smalla, 1998);
- Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP) acomodada por Lui y colaboradores (1997) para el análisis de comunidades bacterianas de muestras ambientales. Ésta técnica se empleó en estudios relacionados con hongos (Brodie et al., 2003) donde se compararon DGGE y T-RFLP en la estructura de la comunidad de hongos del suelo en pastizal templado de tierras altas;
- El análisis automatizado del espaciador intergénico ribosomal (ARISA) para bacterias (M. M. Fisher & Triplett, 1999) y también usado para hongos (Ranjard et al., 2001);
- Polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP) utilizada en análisis de estructura de comunidades fúngicas (Lowell & Klein, 2001).

Hace casi 13 años que Taş y colaboradores (2021) en su artículo dan una historia muy sustanciosa sobre metagenómica sus inicios y como fue logrando resultados positivos en análisis sobre los microbios en diferentes ambientes. Poco a poco los científicos y los desarrolladores de programas bioinformáticos fueron mejorando su funcionalidad, sus rutas y la calidad del trabajo que se iba generando (Ye et al., 2019).

El término metagenómica se refiere a la obtención de secuencias de ADN (genómico) de muchos organismos al mismo tiempo (meta) donde se estudia una comunidad específica de microorganismos de una muestra por ejemplo como los que residen en la piel humana (*Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano Glosario Metagenomics | NHGRI, s. f.*).

Varios autores (Bonilla-Rosso et al., 2008; Hernández-León et al., 2010; Taş et al., 2021) mencionan a Jo Handelsman y colaboradores (Handelsman et al., 1998) como los primeros en publicar el término Metagenoma. En este estudio se presenta un análisis funcional de los genomas colectivos de la microflora, dando respuesta a la premisa de que muchos microorganismos no se pueden cultivar, vislumbrándose aquí, una nueva frontera entre la biología y la química. Todo esto solo lo enmarcaron en muestras de suelo y para microorganismos como bacterias respectivamente.

El enfoque metagenómico se ha aplicado a otros ecosistemas como océanos, arrecifes de coral, fuentes termales; y a comunidades microbianas asociadas con diferentes organismos. Ya no enfocado a bacterias específicamente sino también a una mezcla de ADN de comunidades de células que puede incluir especies arqueales, eucariotas y virales en diferentes niveles de diversidad y abundancia. (National Research Council et al., 2007).

Forsman y colaboradores sitúan fuertemente la metagenómica como algo distinto del término metabarcoding. Definiendo al metabarcoding como cualquier secuenciación de alto rendimiento basada en amplicones, donde se realizan comparaciones de lecturas con una base de datos de referencia para clasificar los miembros de la comunidad. Mencionan que éste término lo proponen por primera vez Pierre Taberlet y colaboradores y lo explican como un proceso donde se identifica múltiples taxones en un solo experimento (Forsman et al., 2022). En este trabajo se usó el término metabarcoding para referirse a la secuenciación masiva del locus ITS 2 de los hongos presentes en las muestras, el cual es ampliamente utilizado como código de barra de ADN para identificación de hongos.

Generalidades de las plantas incluidas en este estudio

- *Coffea arabica* L.

El café pertenece taxonómicamente a la familia de plantas Rubiaceae, esta familia es reportada dentro del orden Gentianales, como una de las más ricas y grandes del grupo de las angiospermas con un poco más de 14,000 especies reportadas, encontrándose en regiones pantropicales con diversos hábitos de las cuales se conoce su valor comercial por la generación de productos de consumo humano y para paisajismo (Figura1).

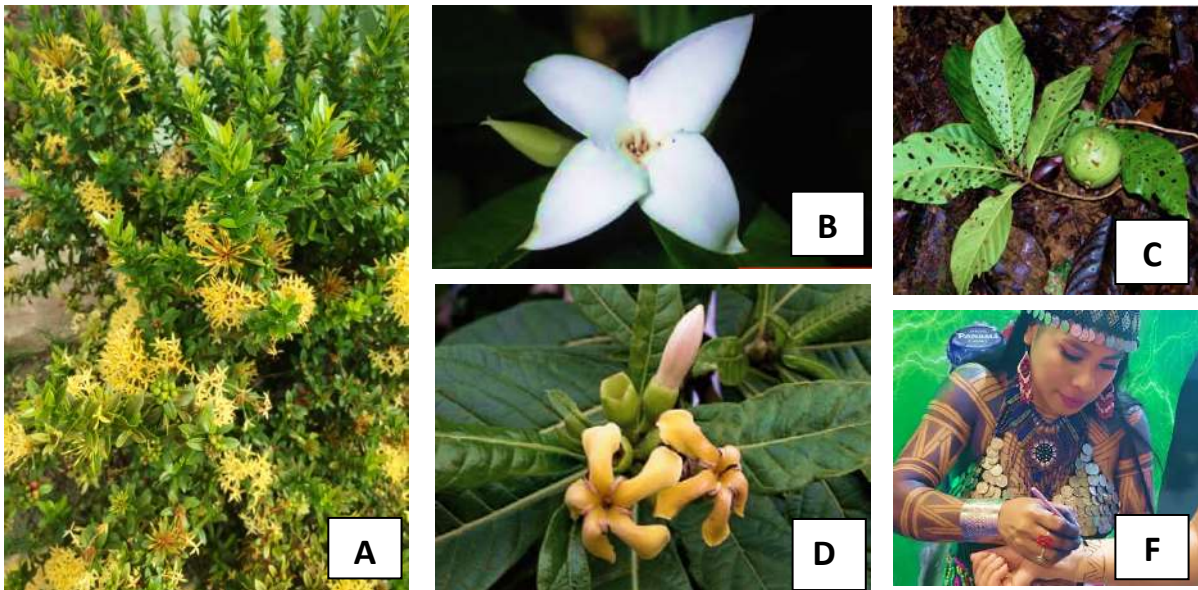


Figura 1. Fotografías representativas de especies de la familia Rubiaceae. A) *Ixora* sp. Comúnmente llamada en Panamá Buqué de novia utilizada como ornamental, B) *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich. ex DC. Los frutos son comestibles; C) *Alibertia patinoi* (Cuatrec.) Delprete & C.H. Perss. Comúnmente llamada Borojó, en Panamá es popular por una bebida energizante y afrodisíaca hecha a base de la pulpa; D y F) *Genipa americana* L. Llamada Jagua, el fruto es usado como un tipo de tinte para costumbres indígenas. Se observa en la imagen una joven de la Comarca Emberá-Wounaan con su cuerpo decorando y realizando el mismo trabajo. Tomado de En Segundos (2023). Foto por Belkis Hidalgo Hoyos, (Chizmar et al 2009).

El café está dentro del género *Coffea* este género cuenta con aproximadamente 130 especies de las cuales tres son conocidas por ser usadas para la producción del café. Sin embargo, hasta la

fecha una cuarta especie, *Coffea excelsa* paso a ser sinónimo. Estas especies son: *Coffea arabica* L., *Coffea canephora* Pierre ex A.Froehner y *Coffea liberica* W.Bull (*WFO Plant List | World Flora Online*, s. f.) conocidas como café arábica, café robusta y café liberica o excelsa respectivamente (Wintgens, 2004; Davis et al., 2006; Duong et al., 2020).

Según datos de la Organización Internacional de Café (OIC) a mayo de 2024 las exportaciones de arábica y robusta se incrementaron a 80.5 millones de sacos, y 51.58 millones de sacos, frente a los 49.3 y 34.27 millones de sacos del 2023. Al parecer solo se reporta producción de *C. arabica* y *C. canephora*. Pero para Wintgens (2004) la producción mundial de café liberica en África y Asia, es de 1 a 2 % ; esto es corroborado por el Perfect Daily Grind (SanMax, 2021) donde comunican que la producción de este café liberica o excelsa, no se considera comercialmente significativo para la OIC.

Origen

Coffea arabica tiene su orígenes en África oriental en un evento de hibridación natural con dos especies de café (*Coffea canephora* y *Coffea eugenioides*) entre 1.08 millones y 543 mil años (Bawin et al., 2020). En la figura 2 se muestra la distribución actual en el mundo del género *Coffea*.



Figura 2. Distribución mundial del género *Coffea* L.

Tomado y editado de <https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-4000008851>

- *Cojoba catenata* (Donn.Sm.) Britton & Rose

Esta especie pertenece a la familia Fabaceae la cual está dentro del orden Fabales. Esta familia es una de las más ricas en diversidad de especies después de la Asteraceae y Orchidaceae, en cuanto a árboles y arbustos de Panamá. Es un arbusto o árbol, de 1.5–20 m, con ramitas ferrugíneo-pubescentes y lenticeladas. Hojas bipinnadas; pecíolo 2–6 cm, con 1 nectario glandular en el ápice o en el par de pinnas; raquis nulo; pinna 1 par; folíolos elípticos a obovados, asimétricamente agudos a obtusos en la base, agudos en el ápice, glabros o glabrados en ambas caras. Inflorescencias péndulas. Flores blancas, sésiles; cáliz 2.5–4.5 mm; corola ca. 16 mm (Hammel et al., 2010).

- *Ocotea whitei* Woodson

Esta especie pertenece a la familia Lauraceae y está dentro del orden Laurales. Los miembros de esta familia se utilizan como alimento (aguacate) y muchas son maderables. *Ocotea whitei*

se caracteriza por ser arbustos o árboles; plantas hermafroditas. Hojas elípticas, ápice acuminado hasta 2 cm de largo y frecuentemente curvado, base aguda o la lámina ligeramente decurrente a lo largo del pecíolo, la base no involuta, cartáceas, glabras en el haz, con algunos tricomas largos y aplicados en el envés. Inflorescencias más cortas que las hojas, densamente pubescentes, los tricomas ascendentes; tépalos largos. Frutos elipsoides, ancho en la madurez; cúpula cupuliforme a pateliforme. Una característica sobresaliente en los especímenes secos son los ápices de las hojas largos y recurvado (*Flora de Nicaragua* | *Ocotea whitei* Woodson, 2024) Distribución América del Sur, América Central Costa Rica Honduras Nicaragua Panamá , Colombia Ecuador y Perú (Govaerts, 2024). Esta especie se encuentra en preocupación menor para la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN.

- *Pouteria juruana* K. Krause

Esta especie pertenece a la familia Sapotaceae y están dentro del orden Ericales. Los miembros de esta familia son usados para la alimentación. *Pouteria juruana* se caracteriza por crecer hasta 35 metros de alto, el fuste muy acanalado y algo retorcido, con contrafuertes delgados y empinados; corteza ligeramente escamosa, pardo-grisáceas descamándose en piezas longitudinales; corteza interna rosada con látex blanco. Vástagos jóvenes con pelosidad corta, adpresa, pálidos al principio, grisáceos, descamándose ligeramente. Hojas cartáceas, el envés esparcidamente adpreso-pubérulo o glabro, la base y el ápice angostamente atenuados (Davidse. G et al., 2009). Esta especie se encuentra en peligro para la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN (Calderon, 1998).

- *Zamia pseudomonticola* LDGómez ex DWStev. & Sabato

Esta especie pertenece a la familia Zamiaceae y están dentro del orden Cycadales. Se encuentra en Costa Rica (Provincia de Puntarenas) y Panamá (Provincia de Chiriquí). Su hábitat natural

son los bosques montanos húmedos subtropicales o tropicales. Se encuentra amenazada por la pérdida de hábitat en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN. 2010 (Bösenberg, 2022).

- *Desmopsis maxonii* Saff.

Esta especie pertenece a la familia Annonaceae y están dentro del orden Magnoliales. Son árboles entre 5 y 7 metros de altura con ramitas adpresas-pilosas. Inflorescencia con pedúnculo largo, llevando cerca del ápice una bráctea suborbicular o anchamente ovada, flor solitaria, amarillo pálido, Sépalos anchamente triangulares, Pétalos todos uniformes revestidos exteriormente con diminutos pelos adpresos de color gris, Pistilos 10-15, óvulos 2-5. Monocarpos globosos u obovoides, de unos 8 mm. de ancho, subsésiles o cortamente estipitados, los estípites de 1-3 mm. de largo y 1,5-2,0 mm. de espesor (*Tropicos |Flora de Panamá D. maxonii* Saff., 2024)

Solo la podemos encontrar en América Central, Costa Rica y Panamá. Ha sido evaluada por última vez para la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN en 2018. *Desmopsis maxonii* figura como de Preocupación Menor (Botanic Gardens Conservation International (BGCI) & IUCN SSC Global Tree Specialist Group, 2018)

- *Alchornea latifolia* Sw.

Esta especie pertenece a la familia Euphorbiaceae y está dentro del orden Malpighiales. Son árboles y arbustos entre 5 y 15 metros de altura, monoico o dioico, con indumento de tricomas simples, la savia incolora; estípulas hasta 0.3 cm, subuladas, deciduas. Hojas alternas, el pecíolo con 2 apéndices semejantes a estipelas en el ápice; lámina simple ovado-elíptica, cuneada a redondeada en la base, con 2–4 glándulas basales. Inflorescencias unisexuales, las masculinas terminales, espigadas, las femeninas axilares, racemosas, a veces ramificadas. Flores estaminadas fasciculadas, sésiles, sostenidas por brácteas pequeñas, sin disco; sépalos 2 ó 3, valvados; pétalos ausentes; estambres (3)4(5), los filamentos connatos basalmente; pistiloide ausente. Flores pistiladas solitarias o (raramente) pareadas, con pedicelo 1.5–7 mm, sostenidas

(1 ó 2 juntas) por brácteas biglandulares, sin disco; sépalos 4–6; pétalos ausentes; ovario trilocular; óvulos 1 por lóculo; estilos 3, connatos basalmente, diminutamente bilobulados en el ápice (*Tropicos | Flora de Panamá Alchornea latifolia Sw., 2024; Tropicos | Flora de Nicaragua Alchornea latifolia Sw., 2024.*)

La encontramos reportada en Brasil (Norte Acre, Amapí Amazonas, Pará, Rondonia, Roraima, Nordeste de Brasil, Bahía Marañón, Pernambuco Sergipe Brasil Sur, Paraná, Santa Catarina, Sudeste de Brasil, Espírito Santo, Minas Gerais Río de Janeiro, San Pablo Brasil, Brasil Centro-Oeste, Mato Grosso), América Central, Costa Rica Norte de Sudamérica, Guayana Francesa, Guayana Surinam, Venezuela, Sudamérica occidental, Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú.

Esta especie ha sido evaluada recientemente como Preocupación Menor para la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN en 2018 (Botanic Gardens Conservation International (BGCI) et al., 2018).

- *Magnolia poasana* (Pittier) Dandy

Planta con tamaño entre 5 y 30 metros. Hojas 4–20 X 2–10 cm, elípticas a elíptico-oblongas. Polifolículo en fr. 4–5 X 1.7–2.3 cm; folículos (abiertos) 12–20 X 5–10 mm. Se reconoce por su follaje, flores y folículos enteramente glabros (Hammel et al., 2007).

La encontramos reportada en Central América Costa Rica y Panamá, *M. poasana* ha sido evaluada por última vez para la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN en 2012. *M. poasana* está catalogada como casi Amenazada (Khela, 2012)

- *Polytrichaceae sp.* Schwägrichen

Plantas pequeñas, medianas a grandes, densamente a ligeramente cespitosas o dispersas entre otras briofitas. Tallos erectos, acrocápicos, de un rizoma subterráneo ± desarrollado, simples o raramente ramificados, bracteados proximalmente, graduándose gradual o abruptamente hasta hojas maduras. Hojas variadas, con una base cartácea, envainadora y una lámina divergente, de textura firme (politricoide), o toda la hoja membranosa y vaina no o débilmente diferenciada, la lámina rara vez ondulada transversalmente, crujiente y contorsionada cuando está seca;

superficie adaxial de la lámina con numerosas láminas fotosintéticas longitudinales muy juntas en la mayor parte de la lámina, la lámina marginal estrecha, o las láminas restringidas a la costa, flanqueada por una lámina ancha, 1 (raramente 2)-estratosa, rara vez con láminas abaxiales; márgenes 1(-3)-estratosados, enteros, dentados, serrados o dentados (en *Atrichum* bordeados por células lineales de paredes gruesas); costa estrecha en la porción basal, en la lámina abruptamente ensanchada y difusa, lisa o dentada adaxialmente, raramente con láminas abaxiales, en sección transversal con un arco prominente de células guía de gran diámetro y una banda estereida abaxial; láminas enteras, finamente serruladas, crenuladas o toscamente serradas, el margen libre liso o cuticular-papiloso, las células marginales en sección transversal indiferenciadas o claramente distintas en tamaño y/o forma de las de abajo; transición en la areolación de la vaina a la lámina gradual o abrupta, con “tejido de bisagra” en los hombros (excepto *Atrichum* y *Psilopilum*); células de la parte posterior de la costa (o células de la lámina membranosa) típicamente en filas longitudinales, \pm isodiamétricas a transversalmente alargadas-hexagonales. Reproducción vegetativa: ninguna o por proliferación de un rizoma subterráneo.

Condición sexual: dioica o raramente monoica; inflorescencia masculina: indeterminada, innovando desde el centro y continuando el crecimiento del tallo, a menudo varios perigonios sucesivos por brote; inflorescencia femenina: terminal, hojas periqueciales envainadas largas o poco diferenciadas. Seta: solitaria o raramente varias del mismo periquecio. Cápsula: obtusa a agudamente (2-)4(-6)-angulada, con ángulos o crestas longitudinales indistintos, o terete; hipófisis ahusada e indistinta o delimitada por una constricción en la base de la cápsula; exotecio: liso, mamiloso o escabroso; estomas presentes (ausentes en *Atrichum* y *Pogonatum*); peristoma pálido o fuertemente pigmentado, nematodonte, con una única serie de [16-]32-64 dientes rígidos, no articulados, compuestos de células sinuosas alargadas y fibrosas, los dientes simples o compuestos, unidos por sus puntas al epifragma (tímpano) que cubre la boca de la cápsula. Caliptra cuculada, con una maraña de pelos que surgen de su punta y cubren toda o parte de la cápsula, o caliptra escasamente ciliada a lisa. Esporas diminutas y equinuladas, o más grandes y finamente papilosas (Smith Merrill, s. f.)

- *Jungermanniales sp.*

Es un orden que aparece en casi todos los ecosistemas terrestres y algunos dulceacuícolas, aunque su máxima diversidad y presencia ocurre en las selvas tropicales. No obstante, su diminuto tamaño y semejanza con los musgos, las hace pasar frecuentemente inadvertidas.

Son plantas desde unos pocos milímetros a más de 50 cm, con tallos con expansiones con forma de hoja, aunque estas carecen de nervios que transporten el agua. Estas hojas se disponen aisladas, solapando por encima a las delanteras o solapándolas por debajo. El tallo tiene tres hileras de hojas, aunque en las especies que viven postradas en el suelo, una de esas hileras queda con frecuencia reducida a escamas pequeñas, a veces apenas perceptibles o filiformes, llamadas amfigastos. En el punto donde aparecen los amfigastos también pueden aparecer rizoides unicelulares que fijan la planta al sustrato. En muchas especies las dos hileras de hojas desarrolladas se disponen en un único plano. Con frecuencia las hojas están divididas o lobuladas, a veces de una forma complicada, generalmente con el lóbulo menor dorsal, raramente adaptado para formar cavidades donde se retiene el agua. Los órganos reproductivos generalmente constan de un único esporangio levantado por un pie filiforme, que suele estar rodeado en su base por hojas modificadas que lo abrazan y protegen durante el desarrollo. El esporangio típicamente se abre en cuatro valvas, libreamente esporas entremezcladas con células con forma de muelles que ayudan a su dispersión. Son plantas generalmente asociadas a superficies frecuentemente húmedas, ya que cuando no están mojadas se deshidratan y entran en periodo de latencia al no tener haces vasculares desarrollados. En ambientes húmedos, como las selvas tropicales, crecen prácticamente sobre cualquier superficie (*Order Jungermanniales*, s. f.).

- *Inga oerstediana* Benth

Árbol pequeño o moderado en tamaño, las ramillas ferruginosas-tomentosas oscuras, volviéndose menos densas con la edad. Hojas grandes, normalmente 8-folioladas; pecíolos de hasta 5 cm. de largo, teretes, densamente ferruginosas-tomentosas oscuras; raquis de hasta 15 cm. de largo, tomentoso como el pecíolo excepto muy ligeramente tomentoso en las alas, conspicuamente alado en el entrenudo raquial superior, progresivamente menos alado en el

penúltimo y sucesivo entrenado(s) raquial(es) inferior(es), teniendo entre la inserción de los peciolulos glándulas sésiles grandes o pequeñas (o estas a veces faltan), las glándulas extendidas lateralmente y marcadamente cóncavas; folíolos 4 (a veces 3 o 5) pares, asimétricamente elípticos, oblongos u ovados, de 7-16 cm. de largo y 3-8 cm. anchas, redondeadas o subtruncadas en la base, desigualmente agudas en el ápice, ligeramente pubescentes en el haz excepto en las venas donde lo son mucho, moderadamente pubescentes en el envés excepto densamente tomentosas en las venas elevadas, reticuladas; estípulas caducas. Inflorescencia de 1 a pocas espigas pedunculadas de nudos foliados o desfoliados jóvenes, las espigas de 3-7 cm. de largo, floríferas en los 1-3 cm superiores, densamente tomentosas como el pecíolo; brácteas ovadas, pequeñas, rápidamente caducas. Flores bastante congestionadas, blancas; cáliz campanulado-cupuliforme, de 3-6 mm. de largo, ferruginoso-hirsuto o piloso, los dientes algo desiguales; corola subtubular, de alrededor de 1 cm. de largo, algo ensanchada apicalmente aunque constreñida en la mitad inferior de su longitud; densamente ferruginoso-hirsuto o piloso, los lóbulos de alrededor de 2 mm. de largo; estambres de 2,0-2,5 cm. de largo, el tubo estaminal incluido dentro de la corola; ovario linear, el estilo sobrepasando los estambres. Legumbre aparentemente linear, de 12 o más cm. de largo y menos de 1 cm. de ancho, subcilíndrica y longitudinalmente sulcada, sésil, ferruginoso-tomentosa (*Tropicos | Flora de Panamá Inga oerstediana Benth. ex Seem., s. f.*).

La encontramos en el norte de Centroamérica, Costa Rica y Panamá; norte de Sudamérica. Esta planta ha sido evaluada por última vez para la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN en 2018. *Inga oerstediana* figura como de Preocupación Menor (Botanic Gardens Conservation International (BGCI) et al., 2018)

- *Cavendishia atrovioleacea* Luteyn

Arbustos. Hojas (3-)8-15(-18) × 1-5(-6) cm, elíptico-, oblongo-, u ovado-lanceoladas, rara vez oblanceoladas, esencialmente glabras, la nervadura (3-)5(-7)-plinervia, la base redondeada, obtusa, anchamente cuneada, o rara vez subtruncada o subcordata, el ápice acuminado; pecíolos (4-)6-15 mm, glabros. Inflorescencias con (7-)11-20(-30) flores; raquis 3-8(-9) cm, glabro;

brácteas florales 20-40(-50) mm, oblongas a oblanceoladas, glabras, violetas a purpúreo-parduscas, frecuentemente en apariencia negras, rara vez translúcidas cuando secas; pedicelos (6-)9-13(-16) mm, glabros; bractéolas 1-4(-5.5) mm, basales o submediales, lanceoladas a lineal-lanceoladas rara vez ovadas, el ápice calloso-glandular. Flores con el cáliz 5.5-11(-13.5) mm, glabro, el tubo 10-acostillado, apofísado en la base con los bordes profundamente 5-lobados, los lobos 1-2(-2.5) mm, triangulares, erectos después de la antesis, calloso-glandulares; corola 20-38(-45) mm, a veces translúcida cuando seca, pelosa, de un púrpura-blanquecino en la base, de púrpura a púrpura oscuro o lavanda hacia los lobos; estambres 19-39 mm; filamentos alternadamente 3.5-6 mm y 7-14.5 mm, subglabros o moderadamente pelosos; anteras alternadamente 18-35,5 mm y 13-27,5 mm (Davidse et al., 2009).

La encontramos en América Central Costa Rica y Panamá, ha sido evaluada por última vez para la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN en 2019. *Cavendishia atrovioleacea* figura como de Preocupación Menor (Rodríguez et al., 2019).

- *Quercus salicifolia* Née

Arboles 10x30 m de alto, corteza áspera, gris a negra; tallos escasa a densamente tomentosos con tricomas multirradiados cuando jóvenes, pero pronto glabros, cafés oscuros volviéndose grises al envejecer, con prominentes lenticelas blancas, grises o café-rojizas; yemas ovado-elípticas, 2.5x5 mm de largo y 1.5x2.5 mm de ancho. Hojas lanceoladas a angostamente ovado-elípticas, 5x22 cm de largo y 1.5x4 cm de ancho, ápice agudo a cuspidado, base angostamente cuneada o atenuada a redondeada, margen entero, nervio marginal plano o ligeramente involuto, haz glabra excepto por los tricomas multirradiados esparcidos cerca de la base del nervio principal, envés glabro u ocasionalmente con fascículos de tricomas multirradiados en las axilas de los nervios secundarios, 14x24 pares de nervios secundarios, hundidos o ligeramente impresos en la haz, el nervio principal y los nervios secundarios prominentes en el envés, los nervios terciarios hundidos en ambas superficies, subcoriáceas; pecíolos 1x6 (x10) mm de largo, estípulas liguladas, 5x8 mm de largo, escasamente pubescentes, ciliadas. Inflorescencias estaminadas 4x8 cm de largo, perianto 1.2x1.6 mm de largo, pubescente a lo largo de los márgenes de los lobos, bractéola 1.5x2.5 mm de largo; inflorescencias pistiladas 0.5x2.5 cm de largo, con 1x4 (x9) flores. Frutos 1x3 madurando en el raquis, pedúnculo 3x10 mm de largo;

cúpula levemente hemisférica a turbinada, 5x15 mm de alto y 12x16 mm de ancho en el orificio, escamas triangular-ovadas, 2.5x5 mm de largo y 2x3 mm de ancho en la base, ápice agudo a acuminado, ligeramente pubescentes a lo largo del margen y en el centro, planas en la base, café lustrosas; nuez 10x16 mm de largo y 8x14 mm de ancho, 20x40% incluida en la cúpula, ápice redondeado, apiculado; pericarpo pubescente en la superficie interior (*Tropicos | Flora de Nicaragua Quercus salicifolia Née, 2024*)

La encontramos desde México hasta Panamá. Esta especie ha sido evaluada recientemente para la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN en 2018. Ésta especie figura como Preocupación Menor (Jerome, 2018).

- *Citharexylum donnell-smithii* Greenm.

Arbustos o árboles hasta 20 m; ramas obtusamente cuadrangulares, estriadas o más o menos lenticeladas, estrigulosas a glabras, más o menos lustrosas. Hojas 4-21 × 2-6.5cm, lanceoladas u oblongolanceoladas, coriáceas, glabras y algunas veces con puntos en ambas superficies, con 5-10 pares de nervaduras secundarias, la vena media algunas veces diminutamente estriguloso-puberulenta en el haz, la base aguda o cuneada, frecuentemente con 1-3 pares de glándulas pequeñas, discoides, el margen entero o rara vez con dientes cortos, agudos cerca del ápice, el ápice acuminado o atenuado; pecíolos 1-3 cm, glabros o puberulentos. Inflorescencias 5-35 cm, axilares o terminales, frecuentemente formando panículas laxas, simples o con 1-3 pares de ramas laterales más cortas; flores numerosas; raquis glabro o puberulento; pedúnculos 1.5-6 mm, glabros o esparcidamente estrigulosos; pedicelos 1-3 mm, glabros o esparcidamente estrigulosos; brácteas diminutas y subuladas; bractéolas c. 5 mm, pocas, lineares; profilos 1-2 mm, sésiles, setáceos; cáliz 2-3.5 mm, 5-angulado, 5-dentado y ciliado en el ápice, tubular-campanulado; corola 5-9 mm, blanca a blanco-verdosa, tubular-campanulada, generalmente 2 veces más larga que el cáliz, el tubo 5-8 mm, glabro externamente, pubescente internamente, los lobos 1-2 mm, desiguales, glabro externamente y pubescentes internamente; estambres 4, ligeramente exsertos; ovario y estilo glabros. Drupas 6-7 mm, anaranjadas a rojizas y negras al madurar, oblongo-globosas; cáliz fructífero herbáceo, 5-lobado, cupuliforme a pateliforme. Selvas altas perennifolias, selvas bajas caducifolias y sitios alterados. Se encuentra en bosques y pastizales, en laderas cubiertas de matorrales y bordes de

caminos, cafetales, potreros y quebradas, desde el sur de México hasta Panamá (Davidse et al., 2009).

Ha sido evaluado por última vez para la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN en 2018. *Citharexylum donnell-smithii* figura como de preocupación menor (Botanic Gardens Conservation International (BGCI) et al., 2018)

- *Podocarpus oleifolius* D.Don

Hasta 28 m de alto. Hojas lanceoladas, ápices agudos hasta redondeados y a veces falcados, hojas de ramitas adultas 2.5–11 cm de largo y 6–15 mm de ancho, más grandes en ramitas de plantas juveniles o de crecimiento rápido, coriáceas. Estructuras maduras axilares y solitarias, con pedúnculos de 5–20 mm de largo, receptáculo carnoso al madurar, escama más grande y fértil de 6–12 mm de largo. Semilla y su cubierta 8–12 mm de largo y 4–6 mm de diámetro. Común, bosques nublados (*Tropicos | Flora de Nicaragua Quercus salicifolia Née, 2024*)

Lo encontramos en México, América, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras Nicaragua, Panamá, Venezuela, Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú
<https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000485135>

Podocarpus oleifolius ha sido evaluado más recientemente para la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN en 2011. *Podocarpus oleifolius* está catalogado como de Preocupación Menor (Gardner, 2013).

- *Dicksonia sellowiana* Hook.

Tronco ca 75 cm de largo; hojas ca 2 m de largo, patentes a ascendentes, caducas; pecíolo 15–45 cm de largo, pajizo a café oscuro, liso excepto por algunos agujijones romos o papilas gruesas en la base y los restos subpersistentes de tricomas ásperos; lámina ampliamente lanceolada, reducida hacia ambos extremos; raquis liso a ligeramente muricado, comúnmente pajizo,

ligeramente tricomatoso; pinnas ca 60 cm de largo y 20 cm de ancho, agudas a acuminadas; últimos segmentos crenado-serrados a profundamente lobulados, con pocos tricomas sobre los ejes abaxialmente, ligera a fuertemente revolutos, ápice agudo a cuspidado; nervios 5–7 (8) o más pares por segmento, simples o bifurcados (en los segmentos profundamente lobulados 1–3-bifurcados); soros marginales. La combinación de frondes marcescentes y pelos café-dorados la identifican en el campo. Varios nombres han sido aplicados a esta especie a través de su rango, pero realmente parece que se trata de una sola especie de *Dicksonia* de amplia distribución (*Tropicos* | *Flora de Nicaragua Dicksonia sellowiana Hook.*, s. f.)

Distribución: Guatemala, Honduras, Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Brazil, Bolivia, Uruguay

<https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0001112345>

Identificación molecular a través de códigos de barras de ADN (barcoding DNA)

The International Barcode of life Consortium hace referencia a que el código de barra de ADN es una pequeña sección del ADN utilizada como región estándar para la identificación o como un sistema de clasificación. Fue propuesto por primera vez por Paul Herbert y colaboradores en 2003 (Herbert et al. 2003).

Códigos de barra para identificación de hongos

- Espaciador transcrito interno (ITS)

En eucariotas, el arreglo del ADN ribosomal nuclear (nrADN), consiste de algunos cientos de copias repetidas en tandem. Cada una de estas copias se compone de una unidad transcrita y de la región de los espaciadores externos no transcritos (NTS) o también denominadas espaciador intergénico (IGS) (Quijada et al. 1997). Aquí nos concentraremos de la unidad transcrita. Figura 3.

Dentro de la unidad transcrita encontraremos el espaciador transcrito interno denominado ITS. La localización del ITS ocurre entre los genes del ARN ribosomal de la subunidad mayor (28S) y menor (18S) del ADN nuclear. El ITS contiene dos regiones (ITS1 e ITS2) separadas por el gen 5,8S. Ambas regiones pueden ser amplificadas mediante el uso de pares de cebadores (Guevara et al., 2004; Sánchez, 2016).

Según White (1990) tanto la región espaciadora transcrita interna y el espaciador intergénico de las unidades repetidas de ARNr nuclear evoluciona más rápido y pueden variar entre especies dentro de un género o entre especies dentro de una población.

Se han encontrado varias ventajas del ITS como una región conveniente para la identificación molecular de hongos. Entre ellas podemos mencionar que: en los hongos, la región ITS completa suele tener entre 600 y 800 pb (pares de bases) y se puede amplificar fácilmente con cebadores universales que son complementarios a las secuencias dentro de los genes de ARNr (White et al. 1990). La naturaleza multicopia de la repetición del ADNr hace que la región ITS sea fácil de amplificar a partir de muestras de ADN pequeñas, diluidas o altamente degradadas; la región ITS suele ser muy variable entre especies de hongos morfológicamente distintas, pero, con una

excepción conocida la variación intraespecífica es baja (Gardes & Bruns, 1993); y por último, ITS tiene la mayor probabilidad de identificación exitosa dentro del gran conjunto que representan los hongos, proponiéndola con la secuencia universal para el código de barras de los organismos fúngicos (Schoch et al., 2012). En este trabajo se utilizó la región ITS2 como código de barra de ADN para la identificación de hongos endófitos foliares. En particular se utilizó un enfoque de metabarcoding de la comunidad debido a que la región ITS2 fue amplificada a partir de muestras de ADN total de las hojas de plantas muestreadas y secuenciado masivamente. Es decir, se secuenció la región ITS2 para todos los hongos presentes en la muestra y que fueron amplificados por los cebadores empleados, lo cual se detalla en el capítulo II de materiales y métodos.

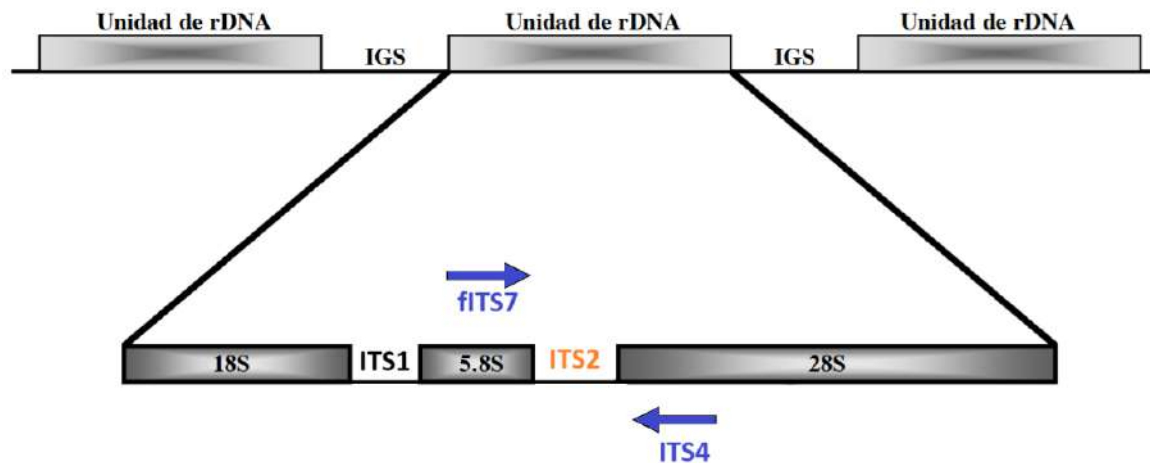


Figura 3. Genes ribosomales y espaciadores intergénicos (IGS e ITS). Detalle de la ubicación de los espaciadores transcritos internos (ITS1 a la izquierda del gen de ARN ribosomal 5.8S e ITS2 a su derecha. El locus ITS2es el utilizado en este estudio (color naranja). Tomado y editado de (Rodríguez-Tovar et al., 2004)

Códigos de barra para identificación de plantas

- Subunidad grande de la ribulosa, 1-5-bifosfatasa carboxilasa/oxigenasa (RUBISCO) o Subunidad mayor de RuBisCO (rbcL)

Esta enzima cataliza dos reacciones: la carboxilación de la D-ribulosa 1,5-bisfosfato, el evento primario en la fijación de dióxido de carbono, así como la fragmentación oxidativa del sustrato pentosa en el proceso de fotorrespiración. Se encuentra en el cloroplasto (UniProtKB, 2024). Ver figura 4.

rbcL fue propuesto por el grupo de trabajo de plantas Consortium for the Barcode of Life (CBOL) como código de barras de ADN para plantas por mostrar ser de mejor rendimiento para discriminación de especies, ser universal y tener un buen poder de discriminación (CBOL Plant Working Group et al., 2009).

- Madurasa K (matK)

Funciona para eliminar sus propios intrones y otros intrones del grupo II del cloroplasto (*matK - Maturase - Oryza sativa (Rice) | UniProtKB | UniProt, s. f.*).

Para el 2020 Michelle Barthelet y colaboradores realizaron un estudio detallado sobre esta enzima y proponen lo siguiente: las madurasas son enzimas procariotas que ayudan a la autoescisión de intrones en los ARN precursores y tienen vínculos evolutivos con el espliceosoma nuclear. Ayudan a la escisión de siete intrones diferentes del grupo IIA del cloroplasto que residen dentro de los ARN precursores para elementos esenciales de la función del cloroplasto (Barthelet et al., 2020).

El tamaño del gen es de 1,500 pb de longitud y se encuentra dentro del intrón del gen tRNA Lys (UUU) (trnK) (Selvaraj et al., 2008) Figura 4.

matK es una de las regiones codificantes de plástidos que evoluciona más rápidamente y mostró altos niveles de discriminación entre especies de angiospermas. Pero, su amplificación y alineación necesitan mucho trabajo (CBOL Plant Working Group et al., 2009; Niizawa, 2020).

La combinación de ambos loci (*rbcL* y *matK*) fue propuesta como códigos de barras estándar para plantas terrestres porque ofrecen equilibrio complejo entre universalidad, calidad de la secuencia, discriminación y costo (CBOL Plant Working Group et al., 2009).

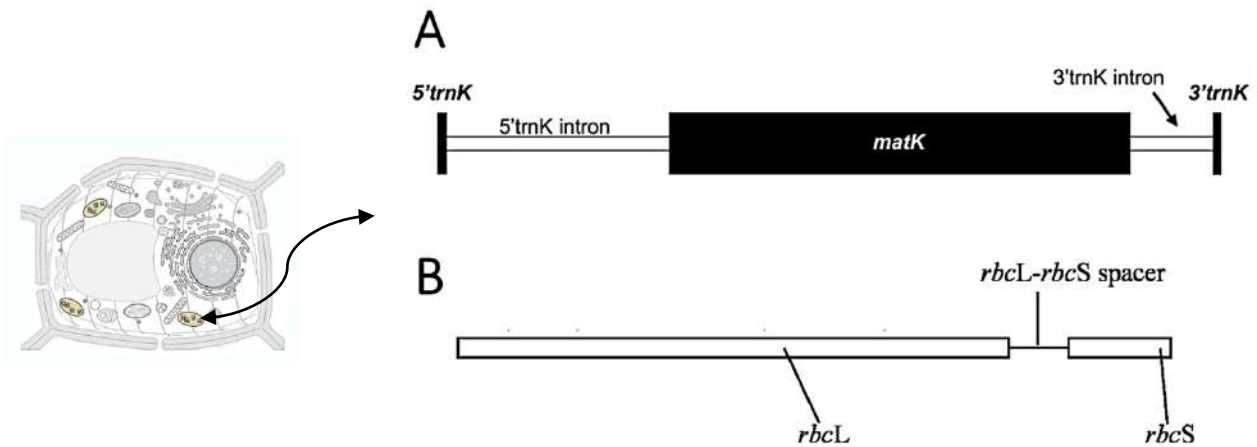


Figura 4. Imagen representativa de la ubicación de genes cloroplásticos dentro de la célula y utilizados como código de barra de ADN de plantas en este estudio. A) Ubicación del gen maturasa K (*matK*) dentro del gen *trnK*; B) estructura del Gen Rubisco (*rbcL*). (Editado de Granados Mendoza et al., 2013; Win et al., 2008).

Planteamiento del problema

El café es un cultivo de importancia económica para Panamá y el mundo, y el tipo de café más cultivado en Panamá, según las cifras de USDA, es Arábico con un 80% mientras que el 20% restante es Robusta (Perfect Daily Grind español en línea, 2020).

Se han realizado estudios sobre la microbiota del café y acerca de la diversidad de hongos endófitos en otros cultivos agrícolas y algunas especies de árboles medicinales (Mejía, 2008; Faddetta et al., 2021; Hassani et al., 2018; Saucedo et al., 2014). Sin embargo, no se han realizado estudios que comparen de manera directa la diversidad de hongos endófitos de café con otras especies de plantas que co-ocurren en cafetales o bosques cercanos. Cabe señalar que dentro de estas especies de plantas está la posibilidad de utilizar aquellas que no hayan sido

tratadas en estudios previos. Estudiarlas no sólo permitiría conocer la biodiversidad de hongos endófitos en esos grupos de plantas que ocurren cercanos al cultivo de café, sino de manera global. Al mismo tiempo, proporcionaría bases para futuros estudios sobre la ecología de hongos y posibles beneficios al ser humano y al ambiente.

Un conocimiento sobre la composición de comunidades de hongos endófitos en especies de plantas que co-ocurren con *Coffea arabica* puede utilizarse para definir plantas que sirvan como donantes de hongos benéficos para el cultivo de café, por ejemplo, como donantes de controladores biológicos. Este conocimiento facilitaría la implementación de enfoques de control biológico de plagas y patógenos de *C. arabica* basado en conservación.

Hipótesis de trabajo.

La abundancia relativa de taxones dominantes en comunidades de hongos varía entre especies vegetales.

Objetivos

Objetivo General

Estudiar y comparar la diversidad y composición taxonómica de comunidades de hongos endófitos foliares asociados a *Coffea arabica* y 15 especies de plantas que ocurren en cafetales y bosque cercano en Renacimiento (Chiriquí, Panamá) mediante uso de códigos de barra de ADN.

Objetivos Específicos

- Identificar la composición taxonómica de comunidades de hongos endófitos foliares asociados a dieciséis especies vegetales de cafetales y bosque dentro del Parque Internacional la Amistad (PILA) mediante metabarcoding empleando el espaciador transcrito interno 2 (ITS 2).
- Estimar la diversidad y abundancia relativa de taxones en comunidades de hongos endófitos foliares asociados a dieciséis especies vegetales.
- Implementar el uso de código de barras de ADN para identificación molecular de plantas. Específicamente secuencias de genes Rubisco (*rbcL*) y Maturasa K (*matK*).

CAPÍTULO II

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

Área de estudio

El estudio se realizó en la Provincia de Chiriquí República de Panamá, en el distrito de Renacimiento, en fincas donde se cultiva de *C. arabica* y bosque cercano a estas. En dos fincas de café, y un área cercana a estas fincas; los siguientes nombres corresponden a los tres sitios diferentes:

- Finca Hartmann ubicada en Santa Clara, Renacimiento. Se compone de 2 Fincas: Santa Clara Finca Hartmann y Ojo de Agua, a altitudes entre 1,300 y 2,000 msnm, con casi 100 hectáreas de reservas forestales que sirven de zona de amortiguamiento para el Parque Internacional la Amistad (PILA, PANAMA COFFEE CLUB, 2024);
- Finca Nuguo ubicada en Jurutungo, Renacimiento, rodeadas de bosque en las cercanías de PILA, a altitudes entre 1,700 y 2,000 msnm (Specialty Coffee Association Panama, 2020) y;
- El Parque Internacional La Amistad (PILA) localizado en la parte más occidental del país, colindante con Costa Rica. A nivel nacional se encuentra distribuida en su mayor parte en la provincia de Bocas del Toro, y un mínimo en la provincia de Chiriquí (Sistema Nacional de Información Ambiental (SINIA), 2020).

Se usó un total de dieciséis especies de plantas repartidas entre los tres sitios (Figura 5; Tabla 1).

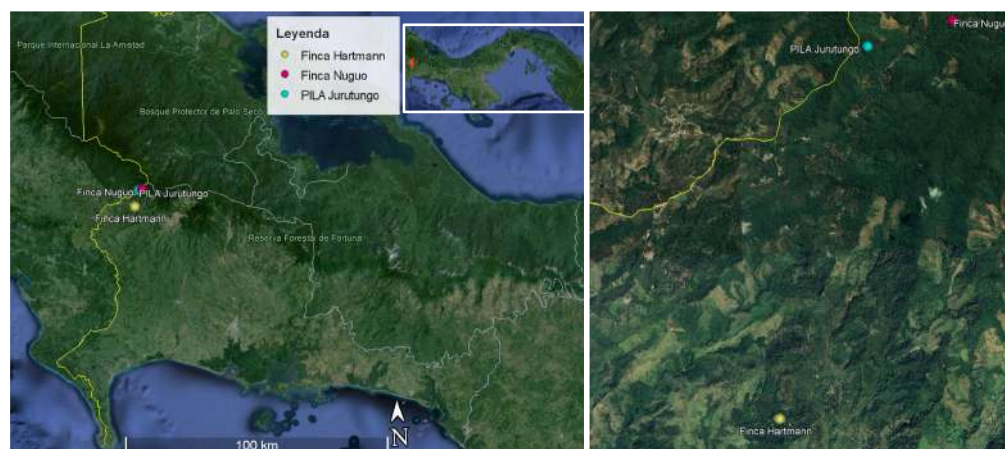


Figura 5. Área de estudio

Tabla 1. Especies de plantas que se utilizaron en el estudio.

N°	Familia	Nombre científico	Nombre común	Localidad/Sitio
1	Fabaceae	<i>Cojoba valerioi</i> Britton & Rose		Finca Hartmann
2	Lauraceae	<i>Ocotea whitei</i> Woodson	Sigua	Finca Hartmann
3	Sapotaceae	<i>Pouteria juruana</i> K. Krause		Finca Hartmann
4	Zamiaceae	<i>Zamia pseudomonticola</i> LD Gómez ex DW Stev. & Sábato		Finca Hartmann
5	Rubiaceae	<i>Coffea arabica</i> L.	Café	Finca Hartmann
6	Annonaceae	<i>Desmopsis maxonii</i> Saff.	Yayito	Finca Hartmann
7	Euphorbiaceae	<i>Alchornea latifolia</i> Sw.	Achiotillo	PILA (Jurutungo)
8	Magnoliaceae	<i>Magnolia poasana</i> (Pittier) Dandy		PILA (Jurutungo)
9	Polytrichaceae	Polytrichaceae sp.	Briófito	PILA (Jurutungo)
10	Jungermanniales sp.	Jungermanniales sp.	Briófito	PILA (Jurutungo)
11	Fabaceae	<i>Inga oerstediana</i> Benth.	Guabo, Guaba de mono	Finca Nuguo, (Jurutungo)
12	Ericacea	<i>Cavendishia atrovioleacea</i> Luteyn		Finca Nuguo, (Jurutungo)
13	Fagaceae	<i>Quercus salicifolia</i> Née	Roble de montaña, roblito, mamecillo, mamecillo, encino	Finca Nuguo, (Jurutungo)
14	Verbenaceae	<i>Citharexylum donnell- smithii</i> Greenm.	Palo de paloma, cola de pava	Finca Nuguo, (Jurutungo)
15	Podocarpaceae	<i>Podocarpus oleifolius</i> D.Don	Pinotea	Finca Nuguo, (Jurutungo)
16	Dicksoniaceae	<i>Dicksonia sellowiana</i> Hook.	Helecho de tronco	PILA

Colecta de muestras y procesamiento inicial de muestras. Ver Figura 6

Se colectaron hojas sanas y maduras de dieciséis especies de plantas que crecen alrededor y dentro de cafetales. Específicamente, de cada individuo, se seleccionaron cinco ramas diferentes por individuo de árbol y se colectó una hoja por cada rama. Las hojas colectadas fueron transportadas en una bolsa plástica sellada a la estación de campo y procesadas para preservación en un plazo de ocho horas. Todas las hojas de un mismo individuo en una sola bolsa. El procesamiento consistió en una limpieza superficial de las hojas; se hizo un lavado de las hojas con agua de grifo, luego con un perforador (previamente esterilizado), se tomaron veinte discos de hojas de aproximadamente 0,5 cm². Estos discos de hoja fueron desinfectados

de la siguiente manera: inmersión en hipoclorito de sodio 0.325%, 2 min en ETOH 70% y enjuagados en agua estéril por 1 min. Posteriormente los discos de hoja fueron colocados en tubos eppendorf (1,5-2ml) con Etanol al 95% y refrigeradas entre -4°C y -8°C. (Mejía, 2018). Se analizaron tres muestras por especie de planta, cada una de ellas proveniente de un individuo diferente, excluyendo a *Magnolia poasana*, se usaron dos muestras para esta especie, debido a que solo se encontraron dos individuos en los sitios de colecta.

Extracción de ADN total.

Se extrajo ADN total de hojas de las dieciséis especies de plantas, usando el DNeasy Plant Pro kit de Qiagen (Valencia, CA, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ADN extraído se cuantificó y se evaluó su pureza utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop™ Lite. Las muestras de ADN se almacenaron a -20°C para posteriores experimentos.

PCR, preparación de librería y secuenciación ADN

A cada muestra se le hicieron dos PCRs, una primera PCR para amplificar el locus de interés (ITS2) y una segunda PCR para incorporación de índices y adaptadores para secuenciación con la plataforma Illumina Miseq. En la primera PCR cada muestra fue amplificada en duplicado, es decir se hicieron dos réplicas técnicas para aumentar la chance de capturar mayor diversidad. La primera PCR se hizo en un volumen final de 25 µL con los siguientes componentes: 0.2 µL (2.5 U/µL) de KAPA3G Plant DNA Polymerase (KAPA BIOSYSTEMS, USA), 12.5 µL de KAPA Plant PCR Buffer 2X, 1.5 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.75 µL (10 µM) de cada cebador fITS7 (IHRMARK et al. 2012), ITS4 (WHITE et al. 1990), 3 µL de extracto de ADN (~25 ng/µL) y 6.3 µL de agua grado molecular. Las condiciones de la primera PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, 35 ciclos de 95 °C durante 20 s, 55 °C durante 15 s y 72 °C durante 25 s, y elongación final a 72 °C durante 1min. También se incluyó un control negativo sin ADN molde para descartar contaminación. Se tomó una alícuota de 2 µL de cada producto de PCR para verificar la amplificación en un gel de 1.5 % de agarosa.

Para la segunda PCR se combinaron los productos de la PCR de las dos réplicas técnicas y se tomó 2 μL para la segunda PCR. La segunda PCR tenía un volumen total de 25 μL , utilizando 14.75 μL de agua grado molecular, 0.25 μL (2.5 U/ μL) de KAPA3G Plant DNA Polymerase, 1 μL de cada índice (directo e inverso), 2.5 μL KAPA Plant PCR Buffer 2X, 1.5 μL de MgCl_2 (25 mM), 2 μL (10 mM) dNTPs (Qiagen, Valencia, CA, USA). Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización de a 95 °C durante 3 min, 30 ciclos de 95 °C durante 20 s, 55 °C durante 15 s y 72 °C durante 25 s, y elongación final a 72 °C durante 1min. Seguido se tomó 5 μL de cada muestra (pool de réplicas) de la segunda PCR, se combinaron en un tubo de 1,5 mL y se purificaron utilizando perlas paramagnéticas AMPURE XP (Beckman Coulter, Indianápolis, IN, EE. UU.). Antes y después de la purificación se midió la concentración final de la librería de ADN utilizando el fluorómetro Qubit 4 (Turner BioSystems, Foster City, CA, EE. UU.). Se analizó la calidad de la biblioteca de ADN con un analizador de tallas TapeStation systems (Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.) antes de secuenciarla en el sistema Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) La secuenciación se hizo en formato de finales pareados de 300 pb en el Laboratorio de Genómica del Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología-AIP (INDICASAT-AIP, Panamá, Panamá).

Análisis de datos

Para analizar los datos generados del ADNr ITS2 para comunidades de hongos endófitos foliares se usó el programa QUIIME2, Quantitative Insights Into Microbial Ecology, (Caporaso et al., 2010). Primero se hizo un demultiplexado de las muestras y visualización de la calidad de las lecturas. Luego de esto se decidió seguir los análisis solo con las lecturas 1 (R1) ya que las lecturas 2 no fueron de buena calidad. Se usó el algoritmo DADA2 (Callahan et al., 2016) para la eliminación de ruido y errores en la secuenciación, y obtención de variantes de secuenciación de amplicones (ASV). A los ASVs se les hizo una asignación taxonómica utilizando la base de datos UNITE versión 10.0 (Abarenkov et al., 2024). Todas las ASVs asignadas a secuencias mitocondriales de cloroplastos y otros eucariotas se eliminaron del conjunto de datos. Luego examinamos la abundancia relativa para los rangos taxonómicos de Filo, clase y género de hongos endófitos foliares entre las diferentes especies de plantas. Calculamos el índice de diversidad de Shannon y Pielou evenness seguido de Kruskal-Wallis no paramétrico para examinar las diferencias en estos índices o métricas de diversidad entre las diferentes especies

de plantas. Luego cuantificamos la diversidad beta entre sitios de fincas de café y grupo de plantas usando distancias de Bray-Curtis. Visualizamos la diversidad beta con Análisis de Coordenadas Principales (PCoA). Finalmente, todos los archivos de datos generados y analizados con QIIME 2 fueron cargados al software R versión 4.4.0 (2024-04-24) (McMurdie & Holmes, 2013) para generar las figuras finales con los softwares ggplot2, dplyr, RcolorBrewer, vegan y openxlsx.

Generación de códigos de barras molecular para plantas

Amplificación y secuenciación de ADN cloroplástico (matK y rbcL)

Se seleccionaron cinco especies de plantas utilizadas en el estudio de comunidad de hongos endófitos foliares, para generar códigos de barras para plantas. Específicamente por la razón de que estas especies no cuentan con información en bases de datos de secuencias de nucleótidos y a manera de ensayo para implementar una metodología de identificación molecular de plantas. Tomando alícuotas de las extracciones de ADN descritas en la sección anterior, se amplificó mediante PCR dos regiones cloroplásticas: el gen que codifica para maturasa (MatK) y el gen para la enzima Rubisco (rbcL), las cuales son ampliamente usadas como códigos de barra de ADN para plantas (CBOL Plant Working Group, 2009).

Los primers que se utilizaron fueron: rbcLa-F, rbcLa-R (para el gen rbcL) y para matK se utilizó matK-KIM3F y matK-KIM1R (CBOL Plant Working Group et al., 2009). La PCR se hizo en una solución de 25 μL que contenía 0.3 μL (2.5 U/ μL) de KAPA3G Plant DNA Polymerase (KAPA BIOSYSTEMS, Europe, Middle East, Africa, Latin America, Japan, Ais Pacific, Canada, USA), 2.25 μL KAPA Plant PCR Buffer 2X, 2.25 μL de MgCl_2 (25 mM), 5 μL Q solution 5X, 2.25 μL (10 mM) dNTPs (Qiagen, Valencia, CA, USA), 1.25 μL (10 μM) para cada par de cebador (rbcLa-F, rbcLa-R; matK-KIM3F y matK-KIM1R), 1 μL de extracto de ADN (5-25 ng/ μL) y 9.45 μL de agua molecular. Las condiciones para la PCR de rbcL fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, 35 ciclos de 94 °C durante 1min, 55 °C durante 1 min y 72 °C durante 1 min, y elongación final a 72 °C durante 7 min y una pausa de 4 °C.

Para matK la desnaturalización inicial a 94°C durante 1 min, 35 ciclos de 94 °C durante 30 s, 52 °C durante 20 s y 72 °C durante 50 s y elongación final a 72 °C durante 5min y una pausa de 4 °C. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se incluyó un control negativo sin ADN molde para verificar que no hubo contaminación. Los amplicones de PCR se enviaron a MacroGen Inc. (Seúl, Corea del Sur) para su purificación y secuenciación tipo Sanger.

Análisis de datos para secuencias de plantas

La edición de las secuencias, corte, revisión y ensamblado se realizaron con el programa Sequencher versión 5.4.6 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI). Para comparar las secuencias de plantas obtenidas, se utilizó el algoritmo blastn de GenBank, manteniendo un máximo de 100 hits por secuencia de consulta. Todas las secuencias se enviaron a la base de datos GenBank, los números de acceso para cada secuencia se muestran en la Tabla 2.

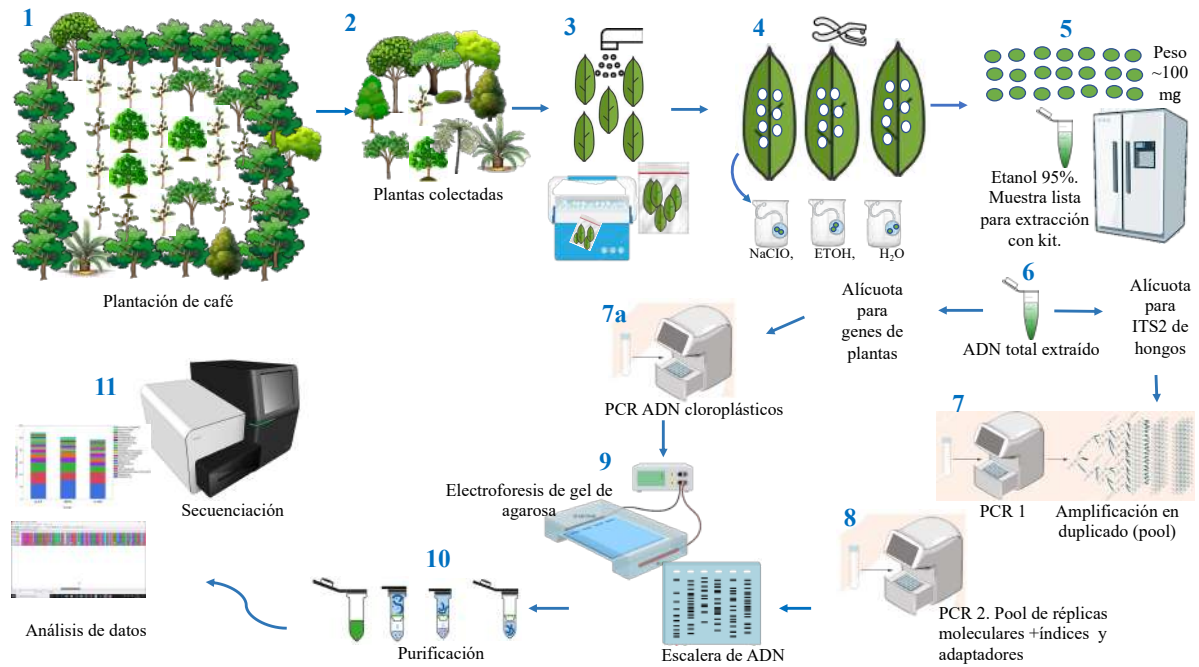


Figura 6. Metodología de colecta y procesamiento de muestras. Se extrajo ADN total de hojas 16 especies de plantas, se amplificó mediante PCR los loci ITS2 (para hongos), matK y rbcL (para plantas). La secuenciación masiva con Illumina (metabarcoding) y para barcoding de plantas por método de terminación de cadena tipo Sanger. Los análisis bioinformáticos se realizaron mediante los programas QIIME 2, R Studio y Sequencher.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Resultados

Se obtuvo un total de 56 muestras de hojas de plantas, ubicadas en tres sitios (Hartmann, Nuguo y PILA) dentro de cafetales y áreas circundantes o cercanas a los cafetales. Repartidas entre 16 especies de plantas, 5 Divisiones (Magnoliophyta, Pinophyta, Monilophyta, Bryophyta y Cycadophyta) y 15 Familias (Fabaceae, Lauraceae, Sapotaceae, Zamiaceae, Rubiaceae, Annonaceae, Euphorbiaceae, Magnoliaceae, Polytrichaceae, Jungermanniales sp., Ericaceae, Fagaceae, Verbenaceae, Podocarpaceae y Dicksoniaceae). Figura 7.

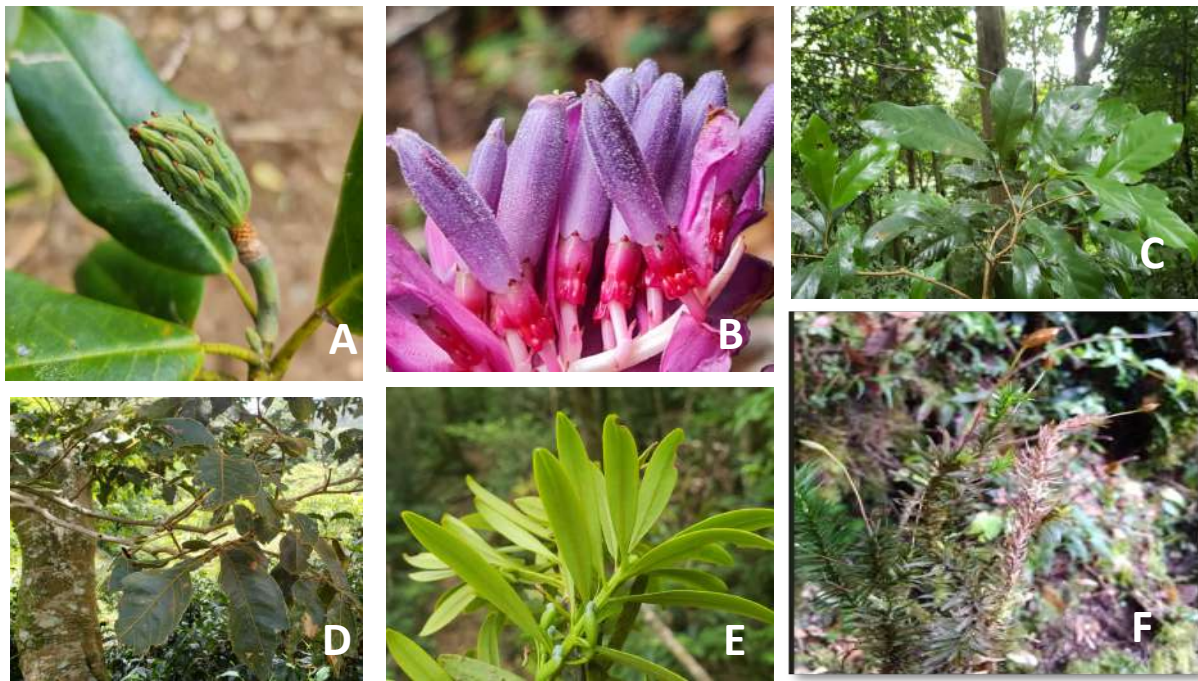


Figura 7. Fotografías representativas de especies de plantas muestreadas en este estudio.

A) *Magnolia poasana* (Pittier) Dandy, B) *Cavendishia atrovioleacea* Luteyn, C) *Pouteria juruana* K. Krause, D) *Inga oerstediana* Benth., E) y F) *Podocarpus latifolius* (Thunb.) R. Br. ex Mirb. Fotos tomadas por: José De Gracia, Luis C. Mejía y Karina Víquez R.

Luego de limpiar las secuencias de ruido, quimeras, ADNm y ADNp, el número de lecturas por muestra varió entre 124,093 y 1,690. Se obtuvo un total de 9,435 variantes de secuencias de amplicones (ASVs).

Comunidades de hongos endófitos foliares asociados a plantas que ocurren en un cafetal.

- **Análisis estructural de las comunidades fúngicas**

Se identificaron siete Filos, 28 Clases (Figura 8), 377 Familias y 639 Géneros. (Figura 9).

Para el rango taxonómico de Filo se identificaron los siguientes grupos: Ascomycota (81.45 %) y Basidiomycota (17.22 %) como los más abundantes; seguido de Mucoromycota (0.09%), Rozellomycota (0.07%), Mortierellomycota (0.01%) y Fungi_phy_Incertae_sedis (1.15%).

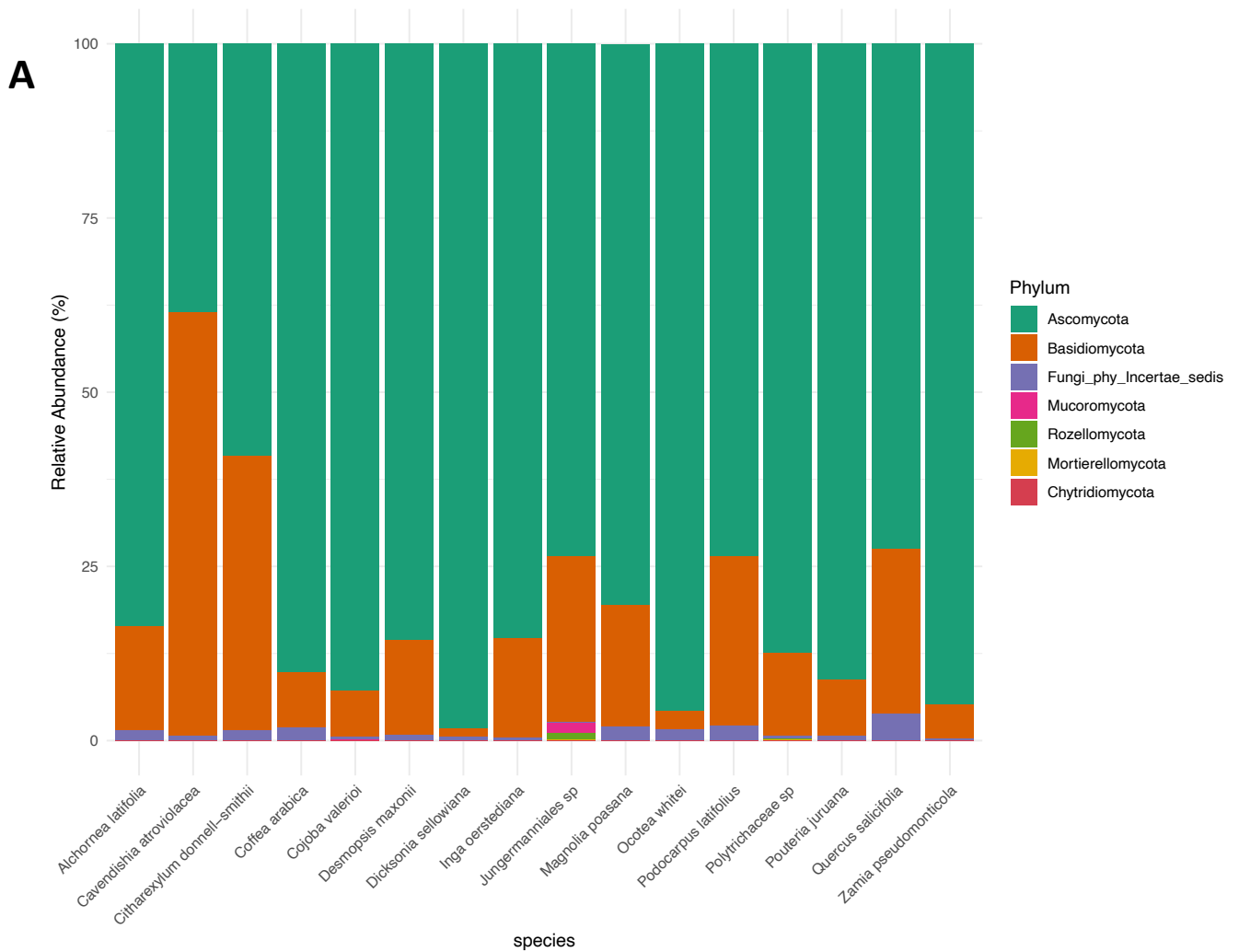
El rango taxonómico de Clase (Figura 8) estuvo representado por los siguientes grupos más abundantes: Dothideomycetes (29.23%), Unclassified (17.53%), Sordariomycetes (15.00%), Eurotiomycetes (13.31%), Agaricomycetes (10.31%), Leotiomycetes (4.68%), Microbotryomycetes (3.62%), Lecanoromycetes (2.70%), Tremellomycetes (2.07%), Other (0.51%), Malasseziomycetes (0.32%), Saccharomycetes (0.25%), Pucciniomycetes (0.16%), Orbiliomycetes (0.16%), y Cystobasidiomycetes (0.16%).

Para Género se clasificaron los 20 grupos más abundantes incluyendo “Other” como grupo de géneros identificados y no identificados con abundancia relativa menor a 1.06% del total de los grupos (Figura 9).

Los Géneros de endófitos foliares más abundantes son: Cladosporium (2.86 %) Ascomycota_gen_Incertae_sedis (2.37%), Polyphialoseptoria (2.11%), Pseudocercospora (2.01 %) y Capnobotryella (1.61%). Y los no clasificados más abundantes: Unclassified_p_Ascomycota (13.56,%), Unclassified_f_Agaricaceae (6.80%), Unclassified_o_Chaetothyriales (6.03%), Unclassified_c_Leotiomycetes

(3.1%), *Unclassified_c_Dothideomycetes* (2.99 %), siendo este grupo con mayor abundancia en nivel taxonómico de Clase.

Por último los géneros con abundancias que van desde 0.44 a 1.52 %: *Didymella*, *Unclassified_f_Teratosphaeriaceae*, *Pestalotiopsis*, *Colletotrichum*, *Unclassified_c_Sordariomycetes*, *Setophoma*, *Mycosphaerella*, *Calopadia* y *Stemphylium*, El grupo identificado con el término “*Unclassified_*” se refiere a grupos de hongos endófitos cuya clasificación taxonómica no fue determinada hasta género, sin embargo se colocó el grupo taxonómico hasta donde fue determinado.



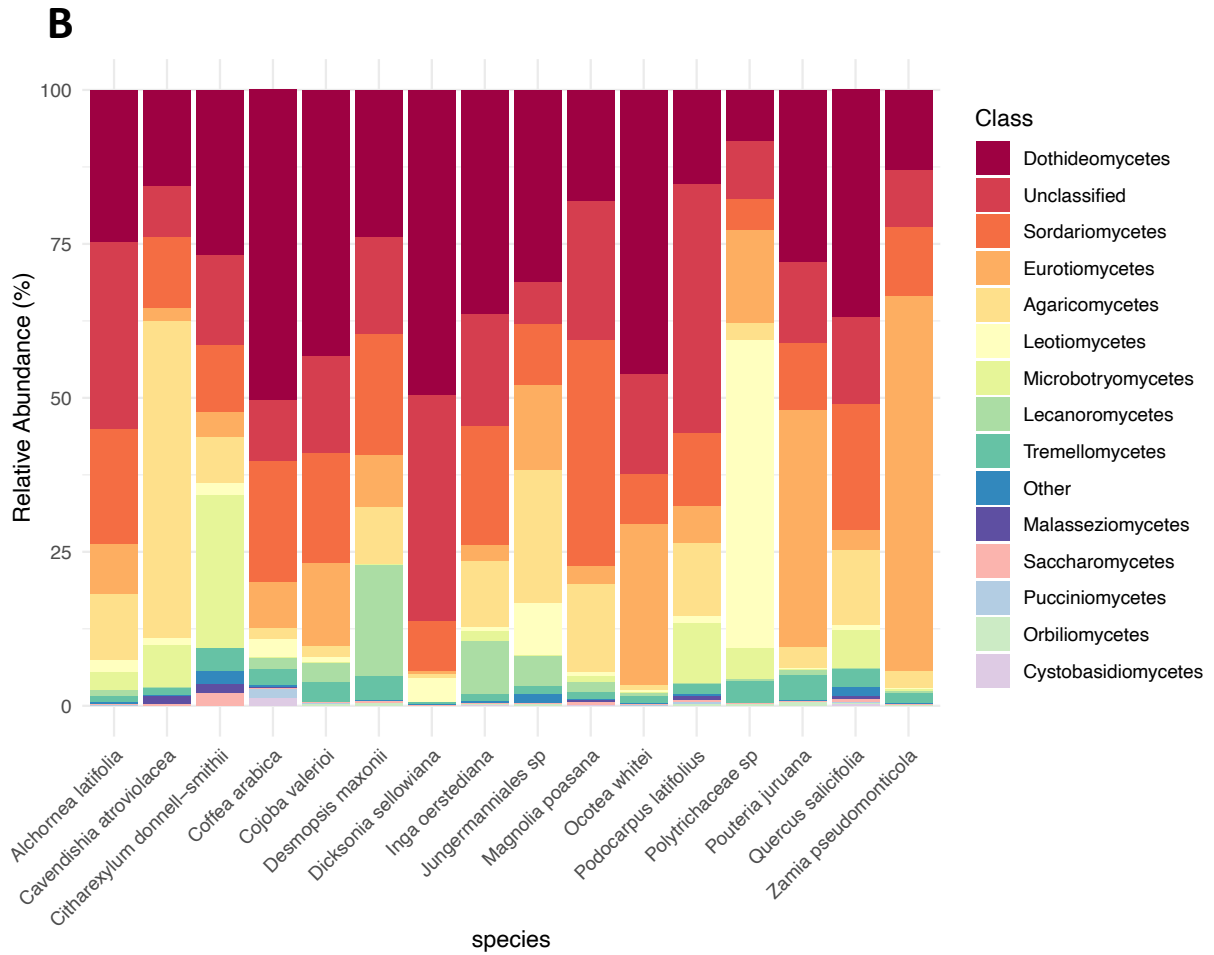


Figura 8. Abundancia Relativa de hongos endófitos foliares de *Coffea arabica* y 15 especies de plantas dentro y cerca de cafetales muestreados en Chiriquí. A) nivel de Filo y B) nivel de Clase.

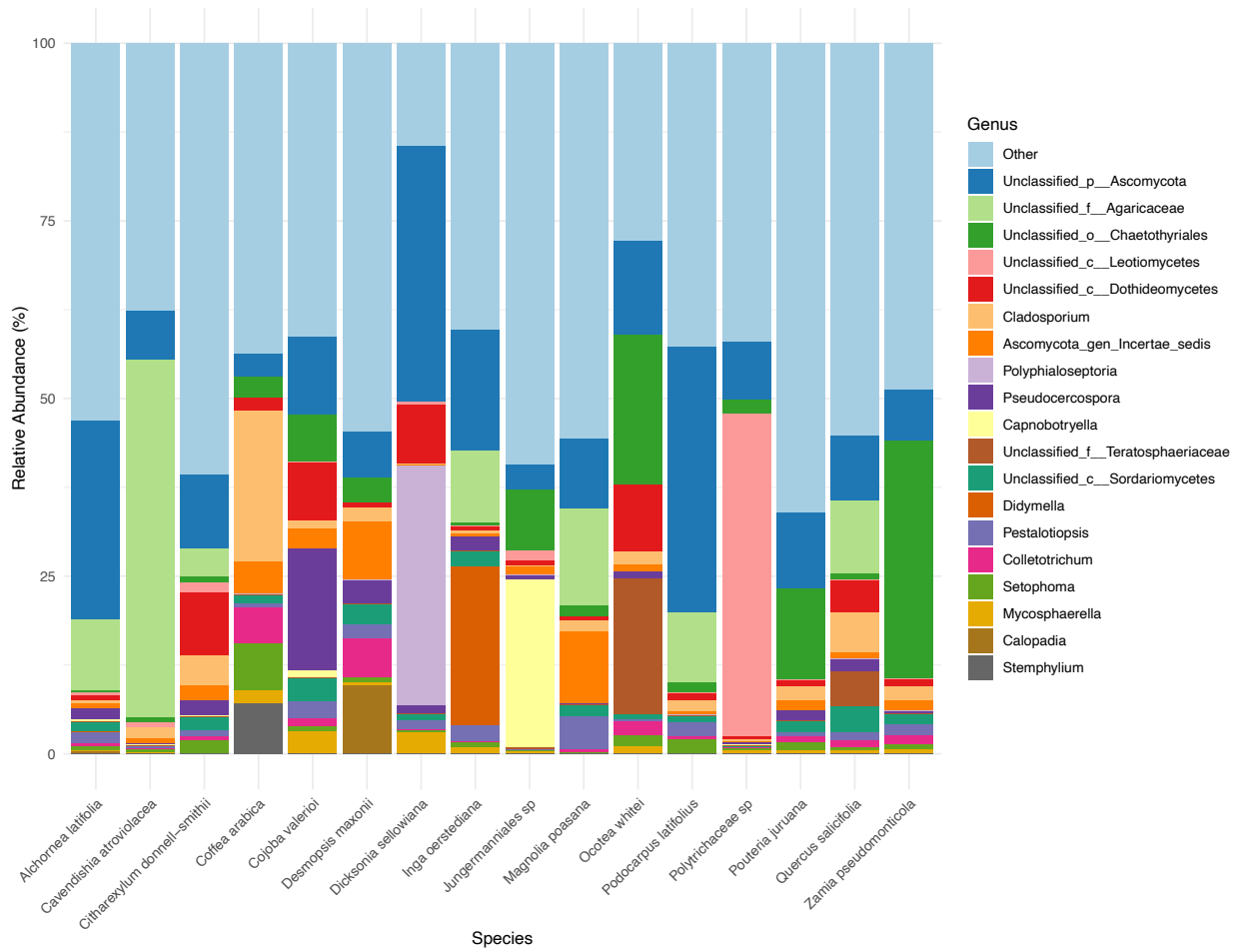


Figura 9. Abundancia Relativa de Géneros de hongos endófitos foliares de *Coffea arabica* y 15 especies de plantas dentro y cerca de cafetales muestreados en Chiriquí

- **Diversidad alfa de comunidades fúngicas asociados a plantas que ocurren en un cafetal**

Para buscar la diversidad de hongos endófitos foliares dentro de las muestras, es decir dentro de la especie de plantas, se realizó el análisis de diversidad alfa. Utilizando tres métricas de diversidad alfa proporcionadas por el programa QIIME 2: Índice de Shannon, ASVs observados y el Índice de Pielou.

El índice de Shannon indicó diferencia significativa entre las 16 especies de plantas (Kruskal-Wallis H, $p < 0.05$). Figura 10 A.

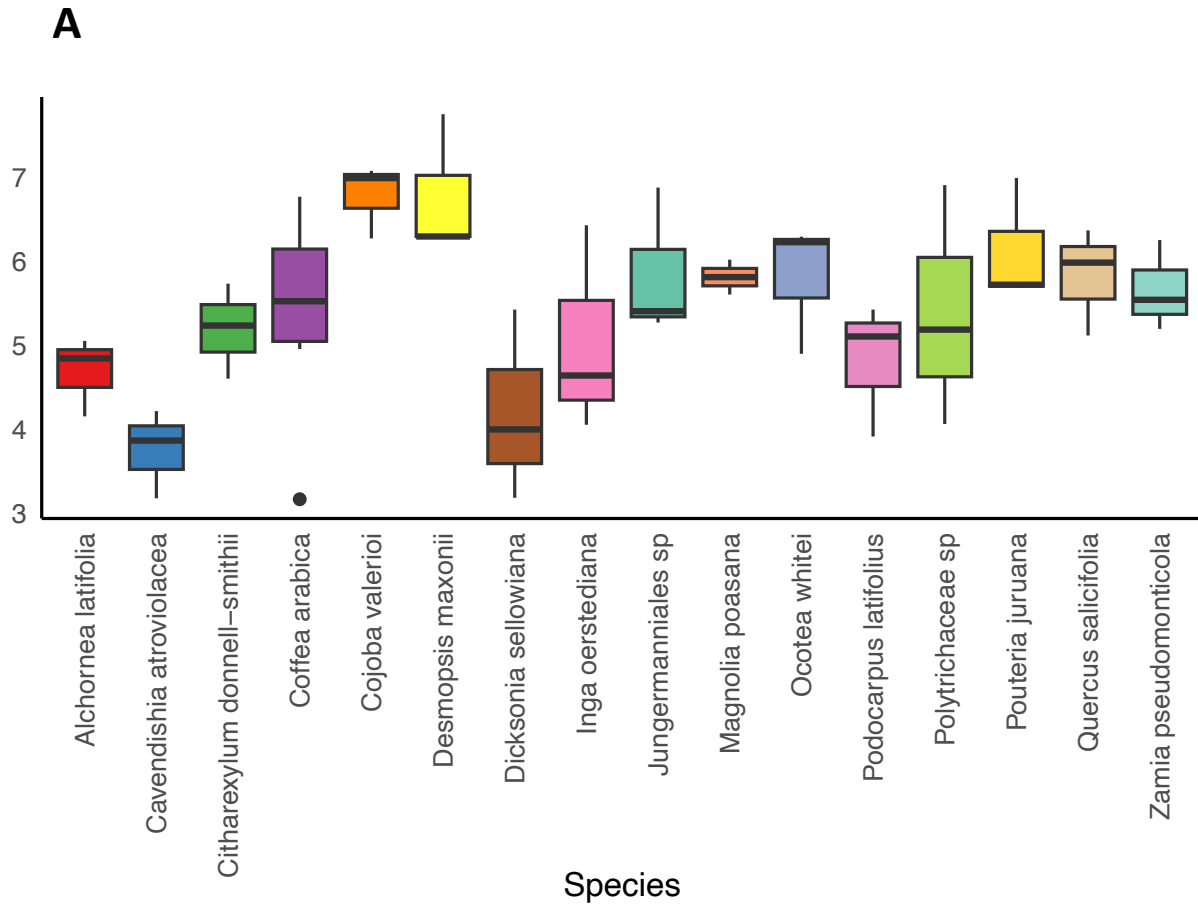
Comparando individualmente una especie con los 15 restantes se obtuvo diferencia significativa únicamente entre: *Cavendishia atrovioleacea* y los briófitos (Polytrichaceae sp. y Jungermanniales sp.; $p < 0.05$); y entre *Coffea arabica* y *Cojoba valerioi* ($p < 0.05$).

Para las características observadas se obtuvo diferencia significativa entre las 16 especies de plantas (Kruskal-Wallis H, $p < 0.05$). Figura 10 B.

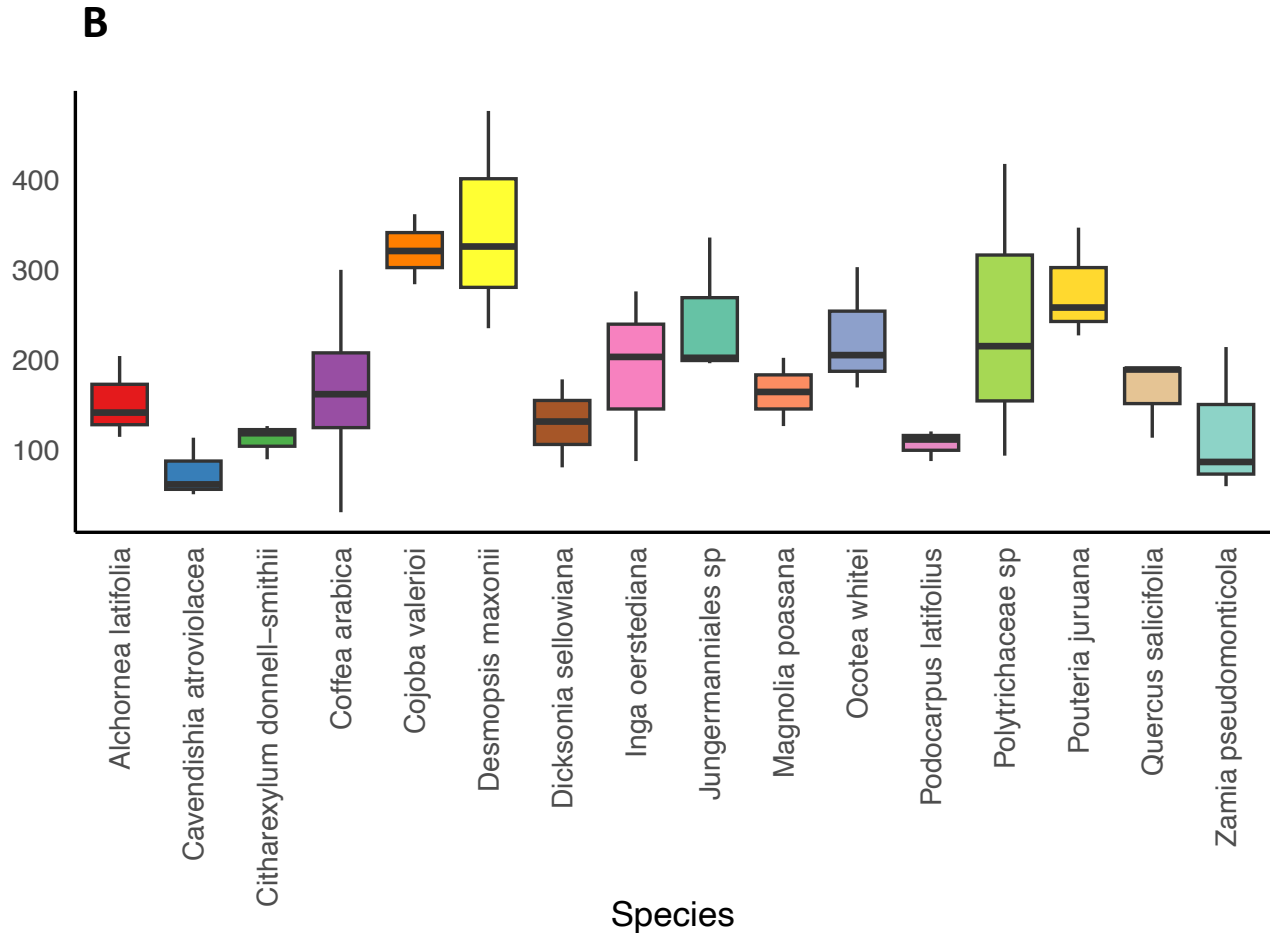
Individualmente cada especie comparada con los 15 restantes se encontró sólo diferencia entre: *Cavendishia atrovioleacea* y los briófitos (Polytrichaceae sp. y Jungermanniales sp.; $p < 0.05$); entre *Cavendishia atrovioleacea* y *Coffea arabica* ($p < 0.05$); entre *Coffea arabica* y *Cojoba valerioi*, *Pouteria juruana*, *Desmopsis maxonii* ($p < 0.05$).

El índice de Pielou mostró diferencia significativa entre las 16 especies de plantas (Kruskal-Wallis H, $p < 0.05$). Figura 10 C. Comparando individualmente cada especie con las 15 restantes tenemos diferencia en: *Alchornea latifolia* y *Coffea arabica* ($p < 0.05$); *Zamia pseudomonticola* y los briófitos (Polytrichaceae sp. y Jungermanniales sp.; $p < 0.05$); *Cavendishia atrovioleacea* y *Coffea arabica* ($p < 0.05$); *Coffea arabica* y *Dicksonia sellowiana*, *Zamia pseudomonticola* ($p < 0.05$).

Índice de Shannon



ASVs



Índice de Pielou

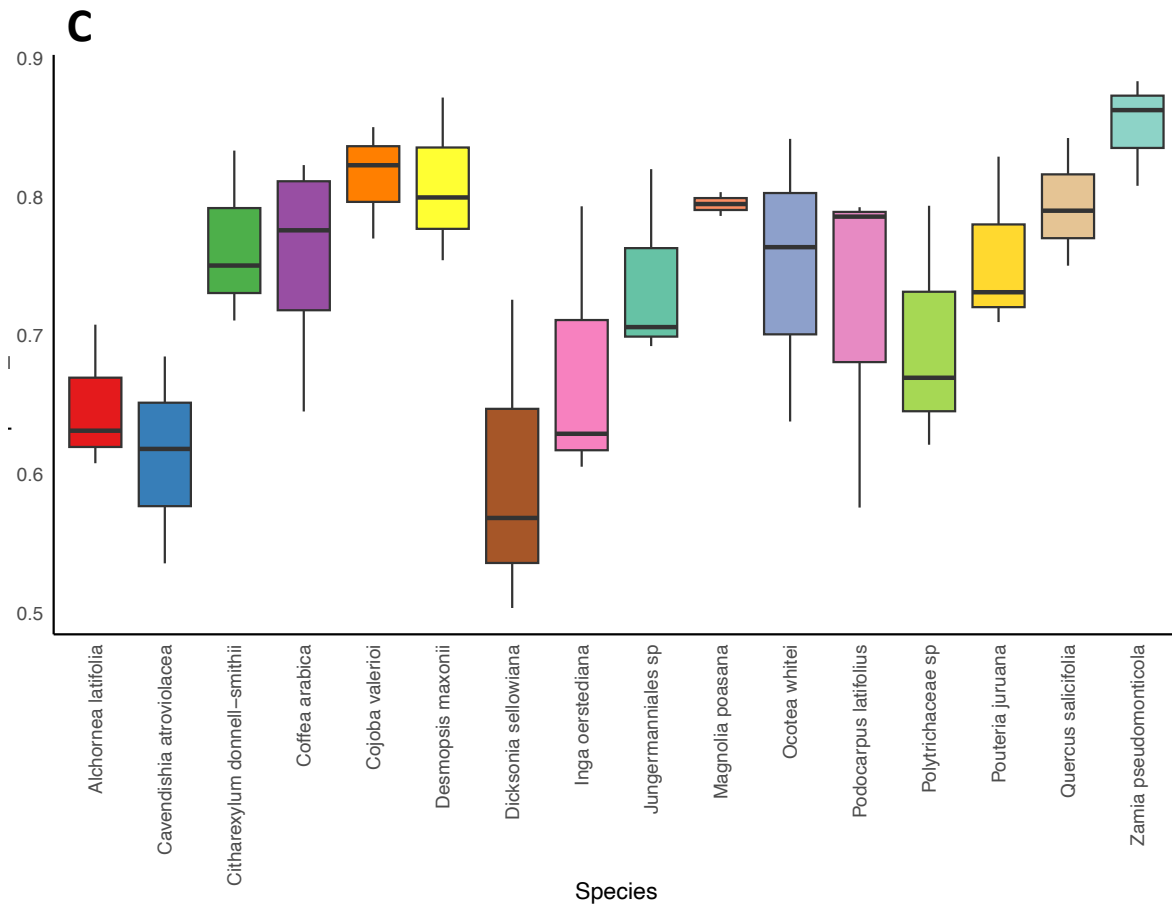


Figura 10. Diversidad alfa de comunidades fúngicas de *Coffea arabica* y 15 especies de plantas dentro y cerca de cafetales muestreados en Chiriquí A) Índice de Shannon para la diversidad de las comunidades, B) Número de variantes de amplicones observados (ASVs) como estimador de la riqueza de especies de las comunidades, y C) Índice de Pielou para uniformidad en la distribución de las comunidades por especies de plantas.

- **Diversidad beta de comunidades fúngicas asociados a plantas que ocurren en un cafetal.**

Se estudió la diversidad de hongos endófitos foliares entre muestras por sitio (localidad) y por grupos de plantas, mediante el análisis de diversidad beta. Representado a través del gráfico de Análisis de coordenadas principales (PCoA) para las 56 muestras de hojas. Utilizando la Distancia Bray-Curtis corroborado por el análisis estadístico multivariante permutacional de varianza (Permanova) en donde se obtuvo diferencias significativas entre sitios (Pseudo-F=2.72, $p=0.001$) y para los grupos de plantas (Pseudo-F=2.98, $p=0.001$). Se puede observar en la figura 11 que las distancias entre muestras de hojas (representadas por puntos de colores) tienden a aproximarse moderadamente y algunos casos sobreponerse, dependiendo del sitio y grupo de plantas.

En la figura 11A representadas por muestras de sitio, se observa que las muestras de la Finca Hartmann están agrupadas, las muestras de Finca Nuguo y PILA están más distantes y compartiendo los mismos ejes.

Las muestras de café (puntos color rojo) están más cerca de algunas muestras de plantas vasculares (puntos color azul) en comparación con las muestras de briófitos y helechos (puntos color lila), en donde se muestra mayor distancia y sin sobreponerse con muestras de los dos grupos anteriormente mencionados (Figura 11B).

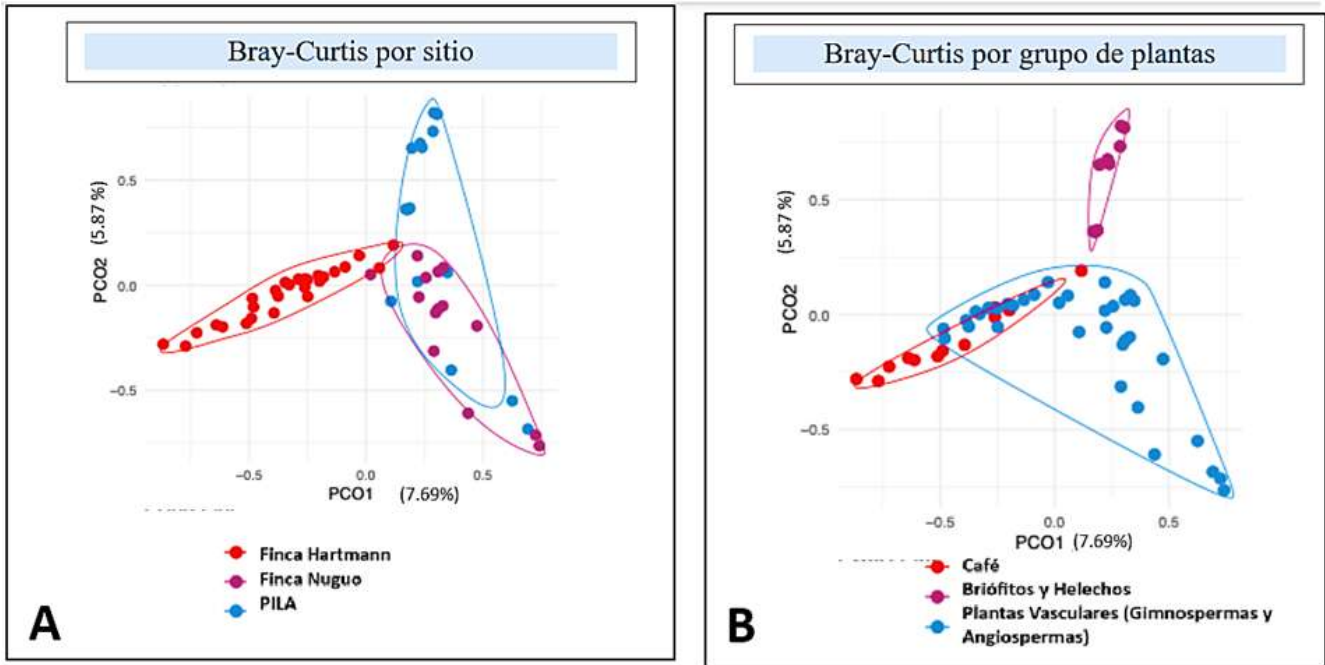


Figura 11. Análisis de coordenadas principales basada en Distancia de Bray-Curtis. Por sitio (Fincas y el PILA) (A) y por grupo de plantas (B)

Código de barra generados para cinco especies de plantas asociados a un cafetal.

En la caracterización molecular, se obtuvo secuencias código de barra de los genes matK y rbcL para *Cojoba valerioi* Britton & Rose, *Pouteria juruana* K. Krause, *Ocotea whitei* Woodson, *Desmopsis maxonii* Saff. y *Zamia pseudomonticola* L.D. Gómez ex D.W. Stev. & Sabato.

Los resultados de las secuencias para barcoding de los genes matK y rbcL de las especies de plantas fueron obtenidos utilizando secuenciación Sanger. El tamaño obtenido de las secuencias parciales para el gen matK después de realizar la edición (contig y/o ensamblado y corte) fue próximo a 600 pb. y para rbcL fue de 500 pb aproximadamente. Tabla 2.

Para comparar las secuencias obtenidas de este trabajo, se utilizó el algoritmo Blastn de GenBank.

Tabla 2. Código de barra generados en especies de plantas muestreadas dentro y fuera de cafetales.

Familia	Especies	Genes (pb)		Origen y Voucher
		matK	rbcL	
Fabaceae/Mimosoideae	<i>Cojoba valerioi</i> Britton & Rose	671	529	Panamá, LG688
Sapotaceae	<i>Pouteria juruana</i> K. Krause	671	530	Panamá, LG681
Lauraceae	<i>Ocotea whitei</i> Woodson	671	530	Panamá, LG693
Annonaceae	<i>Desmopsis maxonii</i> Saff.	671	530	Panamá, LG691
Zamiaceae	<i>Zamia pseudomonticola</i> L.D. Gómez ex D.W. Stev. & Sabato		530	Panamá, LG686
Rubiaceae	<i>Coffea arabica</i> L.	671	530	Panamá, GEF-7-12

Nota: pares de bases de secuencias parciales de genes matK y rbcL obtenidas en éste trabajo (pb).

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

Discusión

La información de las comunidades de hongos endófitos foliares en diferentes especies de plantas que co-ocurren en cafetales o asociaciones de estas comunidades fúngicas con plantas independientemente del cultivo, deben ser un foco de nuevas investigaciones ya que cuentan con pocos trabajos de investigación. (Huerta Palacio & Holguín Meléndez, 2019).

A pesar que este estudio solo abarca conocer la estructura y composición de las comunidades de hongos existentes en hojas de distintas especies de plantas y de ubicaciones cercanas, sabemos que aporta conocimiento sobre la diversidad y abundancia de los endófitos fúngicos foliares y los posibles donantes de hongos benéficos para el cultivo del café. La utilización del metabarcoding como herramienta puede encontrar taxones que a lo mejor no son cultivables.

Los resultados muestran que los Filos más abundantes fueron Ascomycota, Basidiomycota y Mucoromycota. Los géneros con abundancias relativas más altas fueron: Cladosporium, Polyphialoseptoria, Pseudocercospora y Capnobotryella. Por el contrario, Arnold y Lutzoni (2007) encontraron que Xylaria, Colletotrichum, Phomopsis, Fusarium, y Botriosphaeria fueron los géneros más frecuentes. Para los datos de Clases nuestros resultados concordaron dando como resultado las tres clases de hongos endófitos más abundantes según Arnold y Lutzoni (2007): Dothideomycetes, Sordariomycetes y Eurotiomycetes.

Se obtuvieron 600 géneros taxonómicos genéticamente identificados de un muestreo de 16 especies, en cinco Divisiones de plantas tratando que fuesen las más representativas (Angiospermas: Magnolides y Eudicotiledonea, Gimnospermas: Cícadas y Coníferas), Lycophyta y Briophyta), en 56 muestras (aproximadamente 1680 discos de hojas).

Tratando de comparar nuestros resultados con los obtenidos por Arnold y colaboradores (2000). Podemos indicar que la abundancia de comunidades de hongos endófitos foliares estará determinada por el número de especies de plantas con las que se trabaja, conociendo que cada una de las 16 especies de plantas posee características fenotípicas y genotípicas distintas.

Igualmente se debe mencionar que hubo más o menos 300 taxones no identificados por la base de datos. Posiblemente porque algunas de estas 16 especies de plantas aún no han sido estudiadas para este fin o porque hay taxones no identificados por falta de información.

Para la diversidad alfa detectamos diferencias significativas en las comunidades de hongos endófitos en hojas de 16 especies de plantas. El Índice de Shannon, indicó que hay una alta diversidad de comunidades de hongos endófitos en las hojas de las diferentes plantas. Tomando en cuenta los valores presentados en varios trabajos de investigación (Medrano et al., 2017; Pla, 2006) donde indican que el índice de Shannon, normalmente, se encuentra entre 1 a 5, e interpreta a valores menores de 2 como diversidad baja, de 2 a 3.5 media y superiores a 3.5 como diversidad alta.

ASVs observados mostró que hay alta riqueza en las comunidades de hongos endófitos en las hojas de las diferentes plantas. Índice de Pielou, mostró que no hay uniformidad en la distribución de las comunidades de hongos endófitos en las hojas de las diferentes plantas. Como lo indica (Campo & Duval, 2014) este índice tiene valores de 0 a 1. Cercanos a 1 corresponden a situaciones donde todas las especies son igualmente abundantes.

Estos datos muestran que las comunidades de hongos endófitos en muestras de hojas de 16 especies de plantas son distintas y heterogéneas en riqueza, diversidad y uniformidad en la distribución o abundancia de las comunidades de hongos.

En los datos obtenidos para la diversidad beta usando Distancia Bray-Curtis representado en gráfico PCoA y el estadístico Permanova, encontramos diferencias en la similitud de las comunidades fúngicas en las 56 muestras de hojas de las diferentes plantas.

Donde podemos observar (Figura 11 A) mayor concentración en las muestras de hojas de Finca Hartmann. Para Finca Nuguo y PILA las muestras se superponen y se agrupan o asocian más, que en comparación con las de Finca Hartmann. Esto puede corresponder a que geográficamente, la localidad de Nuguo y PILA, están más cercas (ver Figura 5).

Para la Figura 11 B se observa muestras de café sobreponiéndose con algunas muestras de plantas vasculares. Por el contrario, para las muestras de briófitos y helechos. Estas se asocian solas en un mismo eje.

Estas inferencias podrían indicar cuales comunidades de hongos endófitos foliares pudiesen ser posibles controladores biológicos viables para combatir otros microorganismos patógenos. Como, por ejemplo, la Roya del café o Roya anaranjada del Cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk. & Broome), que es uno de los principales problemas para este cultivo (Mejía, 2015).

En cuanto a los Código de barra generados para cinco especies de plantas, podemos mencionar que se generaron nueve secuencias para GenBank de los genes matK y rbcL para: *Cojoba valerioi*, *Pouteria juruana*, *Ocotea whitei*, *Desmopsis maxonii*, *Zamia pseudomonticola* y *Coffea arabica*.

Del total de las especies procesadas se generaron cuatro secuencias inéditas para el GenBank de *Desmopsis maxonii* y *Pouteria juruana* para matK y rbcL. La importancia de generar nuevas secuencias como código de barra radica según (Altamirano-Benavides & Yáñez, 2016) en aportar nuevo conocimiento que fortalezca los datos ya existentes en la diversidad de las especies y sus ecosistemas. Esta información acompañaría las colecciones de distintas especies con el fin de crear códigos de barras digitales e implementar bases de datos científicas.

CAPÍTULO V CONCLUSIONES

Conclusiones

- Se identificaron mediante secuenciación de segunda generación y análisis del espaciador transcrito interno dos (ITS2) un total de siete Filos, 28 Clases, 377 Familias y 639 Géneros de hongos endófitos foliares asociados a 16 especies vegetales cercanas a un cafetal.
- Los Filos de hongos endófitos foliares más abundantes en este estudio fueron Ascomycota con un 81.45 % y Basidiomycota con un 17.22 % del total de las muestras. En cuanto a Clases de hongos endófitos foliares los más abundantes estuvieron representadas por: Dothideomycetes con 29.23%, Sordariomycetes con 15%, y Eurotiomycetes con 13.31%. Por último, los géneros de hongos endófitos foliares identificados como los más abundantes fueron: Cladosporium con 2.86%, Ascomycota_gen_Incertae_sedis con 2.37%, Polyphialoseptoria con 2.11%, Pseudocercospora con 2.01 % y Capnobotryella con 1.61%.
- Las comunidades de hongos endófitos foliares de *Coffea arabica* y otras especies vegetales incluyendo briofitos, helechos, gimnospermas y angiospermas son altamente diversas (Índice de Shannon > 3.5) y con diferencias significativas en diversidad alfa, particularmente en abundancias relativas de sus taxones.
- Existen especies vegetales con comunidades de hongos endófitos foliares similares a las de *Coffea arabica* y que pueden ser consideradas como fuentes de inóculo compartido incluyendo taxones importantes para defensa del hospedero.
- La generación de códigos de barra de ADN para plantas es factible e importante para la identificación y conocimiento de la biodiversidad vegetal en el país, sin embargo, se requiere optimizar protocolos de extracción de ADN de alta calidad para varios grupos, se hace imprescindible la identificación combinada con caracteres morfológicos y moleculares, porque hay poca información sobre nuestras especies nativas en bases de datos.

- Se logró contribuir al incremento de información en base de datos moleculares para especies vegetales lo cual es de utilidad a la comunidad científica. Por ejemplo, *Cojoba valerioi*, *Pouteria juruana*, *Ocotea whitei*, *Desmopsis maxonii*, *Zamia pseudomonticola* y *Coffea arabica*, siendo *Desmopsis maxonii* y *Pouteria juruana* los primeros depósitos de secuencias en Genbank

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

- Queda por determinar con mayor precisión el rol de la química y filogenia de las plantas, además de la ubicación geográfica. Con el fin de comprobar hipótesis más robustas sobre la diversidad de comunidades de hongos endófitos foliares.
- Elaborar un protocolo de extracción de ADN eficaz en diversas especies de plantas con el propósito de seguir estudiando las comunidades de hongos endófitos y se logren resultados más limpios a la hora de trabajar con tejidos foliares.
- Elaborar un protocolo de análisis bioinformático estandarizado con el propósito de que exista una ruta de trabajo fácil de seguir para investigación de comunidades microbianas y secuencias de plantas, para que sea comparable entre estudios.
- Apoyar e incentivar a los estudiantes en el aprendizaje de nuevas herramientas moleculares ya que estas son imprescindibles a la hora de realizar investigaciones científicas con un gran impacto en el país.

REFERENCIAS

- Abarenkov, K., Zirk, A., Piirmann, T., Pöhönen, R., Ivanov, F., Nilsson, R. H., & Kõljalg, U. (2024). *UNITE QIIME release for eukaryotes* [Application/gzip]. UNITE Community. <https://doi.org/10.15156/BIO/2959338>
- Altamirano-Benavides, M., & Yáñez, P. (2016). EL CÓDIGO DE BARRAS DE ADN(barcoding): UNA HERRAMIENTA PARA LA INVESTIGACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA EN EL ECUADOR. *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*, 23(1), 5-14.
- Arnold, A. E., Mejía, L. C., Kyllö, D., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N., & Herre, E. A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 15649-15654.
- Arnold, A. E., & Lutzoni, F. (2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*, 88(3), 541-549.
- Barbara Schulz & Christine Boyle. (2006). What are Endophytes? En *Microbial Root Endophytes* (Vol. 9). Springer.
- Barthet, M. M., Pierpont, C. L., & Tavernier, E.-K. (2020). Unraveling the role of the enigmatic MatK maturase in chloroplast group IIA intron excision. *Plant Direct*, 4(3), e00208. <https://doi.org/10.1002/pld3.208>
- Bary, A. de. (1866). *Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten*. Engelmann.
- Bawin, Y., Ruttink, T., Staelens, A., Haegeman, A., Stoffelen, P., Mwanga Mwanga, J.-C. I., Roldán-Ruiz, I., Honnay, O., & Janssens, S. B. (2020). *Phylogenomic analysis clarifies the evolutionary origin of Coffea arabica L.* <https://doi.org/10.1101/2020.03.22.002337>
- Bonilla-Rosso, G., Souza, V., Eguiarte, L. E., Bonilla-Rosso, G., Souza, V., & Eguiarte, L. E. (2008). Metagenómica, Genómica y Ecología Molecular: La Nueva Ecología en el bicentenario de Darwin. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*,

11(1), 41-51.

- Botanic Gardens Conservation International (BGCI) (Botanic Gardens Conservation International (BGCI), & IUCN SSC Global Tree Specialist Group. (2018). IUCN Red List of Threatened Species: *Desmopsis maxonii*. *IUCN Red List of Threatened Species*. <https://www.iucnredlist.org/en>
- Botanic Gardens Conservation International (BGCI) (Botanic Gardens Conservation International (BGCI), Martínez-Gordillo, J., & González-Espinosa, M. (2018). IUCN Red List of Threatened Species: *Alchornea latifolia*. *IUCN Red List of Threatened Species*. <https://www.iucnredlist.org/en>
- Botanic Gardens Conservation International (BGCI), Cornejo-Tenorio, G., Ibarra-Manríquez, G., & Lorea Hernández, F. (2018). *The IUCN Red List of Threatened Species: Inga oerstediana*. IUCN Red List of Threatened Species. <https://www.iucnredlist.org/es>
- Botanic Gardens Conservation International (BGCI), IUCN SSC Global Tree Specialist Group, González-Espinosa, M, Sánchez-Velázquez, L. & Pineda-López, M. 2019. *Citharexylum donnell-smithii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T136788298A136788300. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-2.RLTS.T136788298A136788300.en>. Accessed on 11 October 2024. (s. f.). IUCN.
- Brodie, E., Edwards, S., & Clipson, N. (2003). Soil fungal community structure in a temperate upland grassland soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 45(2), 105-114. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00126-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00126-0)
- Bae, H., Sicher, R. C., Kim, M. S., Kim, S. H., Strem, M. D., Melnick, R. L., & Bailey, B. A. (2009). The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of experimental botany*, 60(11), 3279-3295.
- Calderon, E. (1998). IUCN Red List of Threatened Species: *Pouteria juruana*. *IUCN Red List of Threatened Species*. <https://www.iucnredlist.org/en>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Campo, A. M., & Duval, V. S. (2014). Diversidad y valor de importancia para la

conservación de la vegetación natural. Parque Nacional Lihué Calel (Argentina). *Anales de Geografía de la Universidad Complutense*, 34(2), 25-42. https://doi.org/10.5209/rev_AGUC.2014.v34.n2.47071

- CBOL Plant Working Group, Forrest, L. L., Hollingsworth, P. M., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., van der Bank, M., Chase, M. W., Cowan, R. S., Erickson, D. L., Fazekas, A. J., Graham, S. W., James, K. E., Kim, K.-J., Kress, W. J., Schneider, H., van AlphenStahl, J., Barrett, S. C. H., van den Berg, C., ... Little, D. P. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), 12794-12797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905845106>
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., ... & Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7(5), 335-336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- CBOL Plant Working Group. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 12794-12797.
- CHI, L. D. C. C. (2020). Diversidad de hongos endófitos asociados a una variedad comercial de Carica papaya L. en la Península de Yucatán. https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/1655/1/PCB_M_Tesis_2020_Lucia_Chi_Chi.pdf
- Chizmar Fernández, Carla, Correa A., Mireya D., Chang Vargas, Giselle, Lobo Cabezas, Silvia, Quesada Hernandez, Alonso, Ceren Lopez, Jose Gabriel, Lara, Leiman Ricardo, Menjivar Cruz, Jenny Elizabeth, Ruiz Valladares, Inga, House, Paul Raymond, Mejia Ordonez, Thelma, and Coronado Gonzalez, Indiana. 2009. Plantas comestibles de Centroamérica. First ed. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad.
- Christian, N., Herre, E. A., & Clay, K. (2019). Foliar endophytic fungi alter patterns of nitrogen uptake and distribution in *Theobroma cacao*. *The New phytologist*, 222(3), 1573–1583. <https://doi.org/10.1111/nph.15693>
- Christian, N., Sedio, B. E., Florez-Buitrago, X., Ramírez-Camejo, L. A., Rojas, E. I., Mejía, L. C., & Herre, E. A. (2020). Host affinity of endophytic fungi and the potential for reciprocal interactions involving host secondary chemistry. *American Journal of Botany*, 107(2), 219-228.

- Davidse, G. M., Sousa S., S. Knapp, & F. Chiang C. (2009, 2018). *Flora Mesoamericana* | *Cucurbitaceae a Polemoniaceae* | *Pouteria juruana* K. Krause. Tropicos. Missouri Botanical Garden. St. Louis. <http://legacy.tropicos.org/Name/28701407?projectid=3&langid=66>
- Davidse, G., Sousa Sánchez, M., Knapp, S., & Chiang Cabrera, F. (2009). *Tropicos* | *Flora Mesoamericana* | *Cavendishia atroviolacea* Luteyn. <http://legacy.tropicos.org/Name/12300699?projectid=3>
- DAVIS, A. P., GOVAERTS, R., BRIDSON, D. M., & STOFFELEN, P. (2006). An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152(4), 465-512. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2006.00584.x>
- Duong, B., Marraccini, P., Maeght, J.-L., Vaast, P., Lebrun, M., & Duponnois, R. (2020). Coffee Microbiota and Its Potential Use in Sustainable Crop Management. A Review. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.607935>
- De Bary, A. (1866). Morphologie und physiologie der pilze, flechten und myxomyceten. Engelmann. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/211464#page/6/mode/1up>
- De Wet Bösenberg (IUCN SSC Cycad Specialist Group / SANBI, Kirstenbosch, Cape Town, South Africa). (2020b, junio 26). IUCN Red List of Threatened Species: *Zamia pseudomonticola*. IUCN Red List Of Threatened Species. Recuperado 10 de octubre de 2024, de <https://www.iucnredlist.org/species/42176/243410303>
- En Segundos. (2023, noviembre 14). El tinte de jagua. *En Segundos Panama*. <https://ensegundos.com.pa/2023/11/14/el-tinte-de-jagua/>
- Fisher, M. M., & Triplett, E. W. (1999). Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Microbial Diversity and Its Application to Freshwater Bacterial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4630-4636.
- Fisher, P. J., Petrini, O., & Scott, H. M. L. (1992). The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). *New Phytologist*, 122(2), 299-305. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1992.tb04234.x>
- *Flora de Nicaragua* | *Ocotea whitei* Woodson. (2024). Tropicos. Missouri Botanical Garden Saint Louis, Missouri.

<http://legacy.tropicos.org/projectwebportal.aspx?pagename=Home&projectid=7>

- Forsman, A. M., Savage, A. E., Hoenig, B. D., & Gaither, M. R. (2022). DNA Metabarcoding Across Disciplines: Sequencing Our Way to Greater Understanding Across Scales of Biological Organization. *Integrative and Comparative Biology*, 62(2), 191-198. <https://doi.org/10.1093/icb/icac090>
- Faddetta, T., Abbate, L., Alibrandi, P. et al. The endophytic microbiota of Citrus limon is transmitted from seed to shoot highlighting differences of bacterial and fungal community structures. *Sci Rep* 11, 7078 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86399-5>
- Gamboa, M. A., & Bayman, P. (2001). Communities of Endophytic Fungi in Leaves of a Tropical Timber Tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). *Biotropica*, 33(2), 352-360. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2001.tb00187.x>
- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*, 2(2), 113-118.
- Gardner, M. 2013. *Podocarpus oleifolius*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: E.T46413452A2984968. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T46413452A2984968.en>. Accessed on 11 October 2024.s. (s. f.). Recuperado 10 de octubre de 2024, de <https://www.iucnredlist.org/species/46413452/2984968>
- White, T. J., T. D. Bruns, S. B. Lee, and J. W. Taylor. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*/Academic Press, Inc. https://www.researchgate.net/publication/223397588_White_T_J_T_D_Bruns_S_B_Lee_and_J_W_Taylor_Amplification_and_direct_sequencing_of_fungal_ribosomal_RNA_Genes_for_phylogenetics
- Govaerts, R. (2024). *World Checklist of Vascular Plants (WCVP) –Version 12.* | *Ocotea whitei* Woodson [Dataset]. Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. <https://doi.org/10.34885/JDH2-DR22>
- Granados Mendoza, C., Wanke, S., Salomo, K., Goetghebeur, P., & Samain, M.-S. (2013). Application of the phylogenetic informativeness method to chloroplast markers: A test case of closely related species in tribe Hydrangeae (Hydrangeaceae). *Molecular*

Phylogenetics and Evolution, 66(1), 233-242.
<https://doi.org/10.1016/j.ympcv.2012.09.029>

- Guevara, G., Garza-Ocañas, F., & Cazares, E. (2004). Estudio del ITS nuclear en algunas especies del género *Cantharellus* de México. *Ciencia UANL*, VII, 371-378.
- Gambo Gaitán, M. A. (2006). Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. *Acta Biológica Colombiana*, 11, 3-20.
- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*, 2(2), 113-118.
- Hammel, B. E., Grayum, M. H., Herrera, C., & Zamora, N. (2007). *Tropicos | Manual de Plantas de Costa Rica Magnolia poasana (Pittier) Dandy*. <http://legacy.tropicos.org/Name/19300143?projectid=66>
- Hammel, B. E., Grayum, M. H., Herrera, C., & Zamora, N. (2010). *Manual de Plantas de Costa Rica. Cojoba valerioi Britton & Rose*. The World Flora Online. <https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000171377>
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, 5(10), R245-R249. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(98\)90108-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90108-9)
- Hammond, PM. 1992. Species inventory. In *Global biodiversity: status of the Earth's living resources*. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/97636#page/5/mode/1up>
- Hassani, MA, Durán, P. & Hacquard, S. Interacciones microbianas dentro del holobionte vegetal. *Microbioma* 6, 58 (2018). <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0445-0>
- Harrison, J. G., & Griffin, E. A. (2020). The diversity and distribution of endophytes across biomes, plant phylogeny and host tissues: how far have we come and where do we go from here? *Environmental microbiology*, 22(6), 2107–2123. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14968>
- Hiruma, K., Gerlach, N., Sacristán, S., Nakano, R. T., Hacquard, S., Kracher, B., Neumann, U., Ramírez, D., Bucher, M., O'Connell, R. J., & Schulze-Lefert, P. (2016). Root Endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent. *Cell*, 165(2), 464–474.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.028>

- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
- Hernández-León, R., Velázquez-Sepúlveda, I., Orozco-Mosqueda, M. C., & Santoyo, G. (2010). Metagenómica de suelos: Grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Phyton (Buenos Aires)*, 79(2), 133-139.
- Huerta Palacio, G., & Holguín Meléndez, F. (2019). La microbiota del cafetal, modulador del daño producido por insectos y enfermedades. En *Caminar el cafetal Perspectivas socioambientales del café y su gente* (Primera edición). El Colegio de la Frontera Sur.
- Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano Glosario Metagenomics | NHGRI. (s. f.). Metagenomics. Recuperado 3 de agosto de 2024, de <https://www.genome.gov/>
- Jerome, D. (2018). IUCN Red List of Threatened Species: *Quercus salicifolia*. *IUCN Red List of Threatened Species*. <https://www.iucnredlist.org/en>
- Khela, S. (2012). IUCN Red List of Threatened Species: *Magnolia poasana*. *IUCN Red List of Threatened Species*. <https://www.iucnredlist.org/en>
- Lévillé, J. H. (1846). *Considérations mycologiques, suivies d'une nouvelle classification des champignons*. Imprimerie de I. Martinet.
- Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., & Forney, L. J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4516-4522.
- Lowell, J. L., & Klein, D. A. (2001). Comparative single-strand conformation polymorphism (SSCP) and microscopy-based analysis of nitrogen cultivation interactive effects on the fungal community of a semiarid steppe soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 36(2-3), 85-92. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00828.x>
- Ludwig H. Pfenning & Lucas Magalhães de Abreu. (2012). Hongos del suelo saprófitos y patógenos de plantas. En *Manual de biología de suelos tropicales. Muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo*. (Primera). Instituto Nacional de

Ecología.

- Larena, I., Salazar, O., González, V., Julián, M. C., & Rubio, V. (1999). Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *Journal of Biotechnology*, 75(2-3), 187-194. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00154-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00154-6)
- Lévillé, J. H. (1846). *Considérations mycologiques, suivies d'une nouvelle classification des champignons*. Imprimerie de I. Martinet. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/236099#page/26/mode/1up>
- Lodge, D. J., & Cantrell, S. (1995). Fungal communities in wet tropical forests: variation in time and space. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), 1391-1398. https://www.researchgate.net/profile/DeborahLodge/publication/265364032_Fungal_communities_in_wet_tropical_variation_in_time_and_space/links/54b52b220cf2318f0f9729d2/Fungal-communities-in-wet-tropical-variation-in-time-and-space.pdf
- *matK - Maturase—Oryza sativa (Rice) | UniProtKB | UniProt.* (s. f.). Recuperado 10 de agosto de 2024, de <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9MV45/entry>
- Medrano, M. de J. M., Hernández, F. J., Rivas, S. C., & Luna, J. A. N. (2017). Diversidad arbórea a diferentes niveles de altitud en la región de El Salto, Durango. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 8(40), 57-68.
- Mejía, L. C. (2015). *Manejo agroecológico de la roya del café. Memorias del seminario científico internacional. Organizació de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO)*.
- McMurdie PJ, Holmes S (2013) phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* 8(4): e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Mejía, L. C., Rojas, E. I., Maynard, Z., Van Bael, S., Arnold, A. E., Hebbbar, P., ... & Herre, E. A. (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*, 46(1), 4-14.
- Mejía, L.C. (2018). Plant Tissue Methods For Microbial Amplicon Sequencing. Protocol 1: Plant tissue processing for microbial massive amplicon sequencing (ITS and 16S based metagenomics).
- Muyzer, G., de Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial

populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695-700.

- Muyzer, G., & Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(1), 127-141. <https://doi.org/10.1023/A:1000669317571>
- National Research Council, Division on Earth and Life Studies, Board on Life Sciences, & Committee on Metagenomics: Challenges and Functional Applications. (2007). *The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of Our Microbial Planet*. National Academies Press.
- Niizawa, C. (2020). *Los códigos de barra moleculares como una herramienta para la identificación de plantas medicinales*.
- *Order Jungermanniales*. (s. f.). Recuperado 10 de octubre de 2024, de <https://www.taxateca.com/ordenjungermanniales.html>
- PANAMA COFFEE CLUB. (2024). *Finca Hartmann*. PANAMA COFFEE CLUB. <https://panamacoffeeclub.com/collections/finca-hartmann>
- Paul Bayman & J. Tupac Otero. (2006). Microbial Endophytes of Orchid Roots. En *Microbial Root Endophytes* (Vol. 9, pp. 153-173). Springer.
- Petrini, O. (1991). Fungal Endophytes of Tree Leaves. En J. H. Andrews & S. S. Hirano (Eds.), *Microbial Ecology of Leaves* (pp. 179-197). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3168-4_9
- Pla, L. (2006). Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia*, 31(8), 583-590.
- Perfect Daily Grind español <https://perfectdailygrind.com/es/2020/11/23/una-guia-del-cafe-especial-en-panama/>
- Petrini, O. (1991). Fungal endophytes of tree leaves. In *Microbial ecology of leaves* (pp. 179-197). Springer, New York, NY.
- Qiu, M., Xie, R. S., Shi, Y., Zhang, H., & Chen, H. M. (2010). Isolation and identification of two flavonoid-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* L. *Annals of Microbiology*, 60(1), 143-150. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0016-5>
- Ranjard, L., Poly, F., Lata, J.-C., Mougel, C., Thioulouse, J., & Nazaret, S. (2001).

Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints: Biological and Methodological Variability. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4479-4487. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4479-4487.2001>

- Rodríguez, A., Nelson Zamora (Museo Nacional de Costa Rica, H. N. de C. R., Monro, A., Chacón, O., Santamaría-Aguillar, D., Solano-Rojas, D., Zamora, N. A., González, F., & Correa, M. (2019). IUCN Red List of Threatened Species: *Cavendishia atrovioleacea*. *IUCN Red List of Threatened Species*. <https://www.iucnredlist.org/en>
- Rodríguez, R., White, J., Arnold, A., & Redman, R. (2009). Fungal endophytes: Diversity and functional roles. *The New phytologist*, 182, 314-330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
- Rodríguez-Tovar, A., Valdés, M., & Cásarez, B. (2004). Ecología molecular de los hongos ectomicorrízicos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 27. <https://doi.org/10.35196/rfm.2004.3.267>
- Saucedo-García A, Anaya AL, Espinosa-García FJ, González MC (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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098454>
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ... & White, M. M. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the national academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Suryanarayanan, T. S., Murali, T. S., Thirunavukkarasu, N., Rajulu, G., Venkatesan, G., & Sukumar, R. (2011). Endophytic fungal communities in woody perennials of three tropical forest types of the Western Ghats, southern India. *Biodiversity and Conservation*, 20(5), 913-928.
- Sánchez, L. (2016). *Identificación y caracterización de hongos de interés para su uso industrial y, en especial, en la industria alimentaria mediante el uso de métodos*

moleculares. <https://academica-e.unavarra.es/handle/2454/22336>

- SanMax, I. M. (2021, mayo 12). What is excelsa coffee? *Perfect Daily Grind*. <https://perfectdailygrind.com/2021/05/what-is-excelsa-coffee/>
- Santamaría, J., & Bayman, P. (2005). Fungal Epiphytes and Endophytes of Coffee Leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology*, 50(1), 1-8. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0002-1>
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Roberto, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium, Fungal Barcoding Consortium Author List, Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K.-D., Bai, F.-Y., Barreto, R. W., Begerow, D., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Selvaraj, D., Sarma, R. K., & Sathishkumar, R. (2008). Phylogenetic analysis of chloroplast matK gene from Zingiberaceae for plant DNA barcoding. *Bioinformation*, 3(1), 24-27.
- Sistema Nacional de Información Ambiental (SINIA). (2020). *Parque Nacional La Amistad* [Gobierno]. MINISTERIO DE AMBIENTE. SINIA. <https://www.sinia.gob.pa/index.php/agua-y-saneamiento/207-sinap/320-parque-nacional-la-amistad>
- Smith Merrill, G. L. (s. f.). *Polytrichaceae in Flora of North America* @ efloras.org. Flora of North America Vol 27. Recuperado 10 de octubre de 2024, de http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=10721
- Specialty Coffee Association Panama. (2020). *CAFE GALLARDO – Specialty Coffee Association of Panama*. <https://scap-panama.com/2017/04/14/gallardo/>
- Taş, N., de Jong, A. E., Li, Y., Trubl, G., Xue, Y., & Dove, N. C. (2021). Metagenomic tools in microbial ecology research. *Current Opinion in Biotechnology*, 67, 184-191. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.01.019>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

- *Tropicos* | *Flora de Nicaragua Quercus salicifolia Née.* (2024). <http://legacy.tropicos.org/NamePage.aspx?nameId=13100496&projectId=7>
- *Tropicos* | *Flora de Panamá Alchornea latifolia Sw.* (2024). <http://legacy.tropicos.org/Name/12802524?projectId=56>
- *Tropicos* | *Flora de Panama Inga oerstediana Benth. Ex Seem.* (s. f.). Recuperado 10 de octubre de 2024, de <http://legacy.tropicos.org/Name/13008862?projectId=56>
- *Tropicos* | *Flora de Nicaragua Alchornea latifolia Sw.* (s. f.). Recuperado 9 de octubre de 2024, de <http://legacy.tropicos.org/Name/12802524?projectId=7>
- *Tropicos* | *Flora de Panamá Desmopsis maxonii Saff.* (2024). <http://legacy.tropicos.org/Name/1600813?projectId=56>
- The World Flora Online (WFO) (2024): *Dicksonia sellowiana* Hook. Published on the Internet; <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0001112345>. Accessed on: 11 Oct 2024
- *Tropicos* | *Flora de Nicaragua Dicksonia sellowiana* Hook. (s. f.). Recuperado 10 de octubre de 2024, de <http://legacy.tropicos.org/Name/26606534?projectId=7>
- The World Flora Online (WFO) (2024): *Podocarpus oleifolius* D. Don. Published on the Internet; <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000485135>. Accessed on: 11 Oct 2024' Recuperado 10 de octubre de 2024, de <https://www.iucnredlist.org/species/46413452/2984968>
- UniProtKB. (2024). *rbcL - Ribulose biphosphate carboxylase large chain—Triticum aestivum (Wheat)* | Publications | UniProtKB | UniProt. [Uniprot.org. https://www.uniprot.org/uniprotkb/P11383/entry](https://www.uniprot.org/uniprotkb/P11383/entry)
- Van Bael, S. A., Valencia, M. C., Rojas, E. I., Gomez, N., Windsor, D. M., & 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.
- *WFO Plant List* | *World Flora Online.* (s. f.). Recuperado 24 de julio de 2024, de <https://wfoplantlist.org/taxon/wfo-4000008851-2024-06?page=1>
- Wilson, D. (1995). Endophyte: The Evolution of a Term, and Clarification of Its Use and Definition. *Oikos*, 73(2), 274. <https://doi.org/10.2307/3545919>
- Win, N.-N.-W., Hanyuda, T., Arai, S., Uchimura, M., Abbott, I., & Kawai, H. (2008). Three new records of *Padina* in Japan based on morphological and molecular markers.

Phycological Research, 56, 288-300. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2008.00510.x>

- Wintgens, J. N. (2004). The Coffee Plant. En *Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production* (pp. 1-24). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9783527619627.ch1>
- Yamaji, K., Watanabe, Y., Masuya, H., Shigeto, A., Yui, H., & Haruma, T. (2016). Root fungal endophytes enhance heavy-metal stress tolerance of *Clethra barbinervis* growing naturally at mining sites via growth enhancement, promotion of nutrient uptake and decrease of heavy-metal concentration. *PloS one*, 11(12), e0169089.
- Ye, S. H., Siddle, K. J., Park, D. J., & Sabeti, P. C. (2019). Benchmarking Metagenomics Tools for Taxonomic Classification. *Cell*, 178(4), 779-794. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.010>

ANEXOS

Datos utilizados para generar los análisis en los programas bioinformáticos.

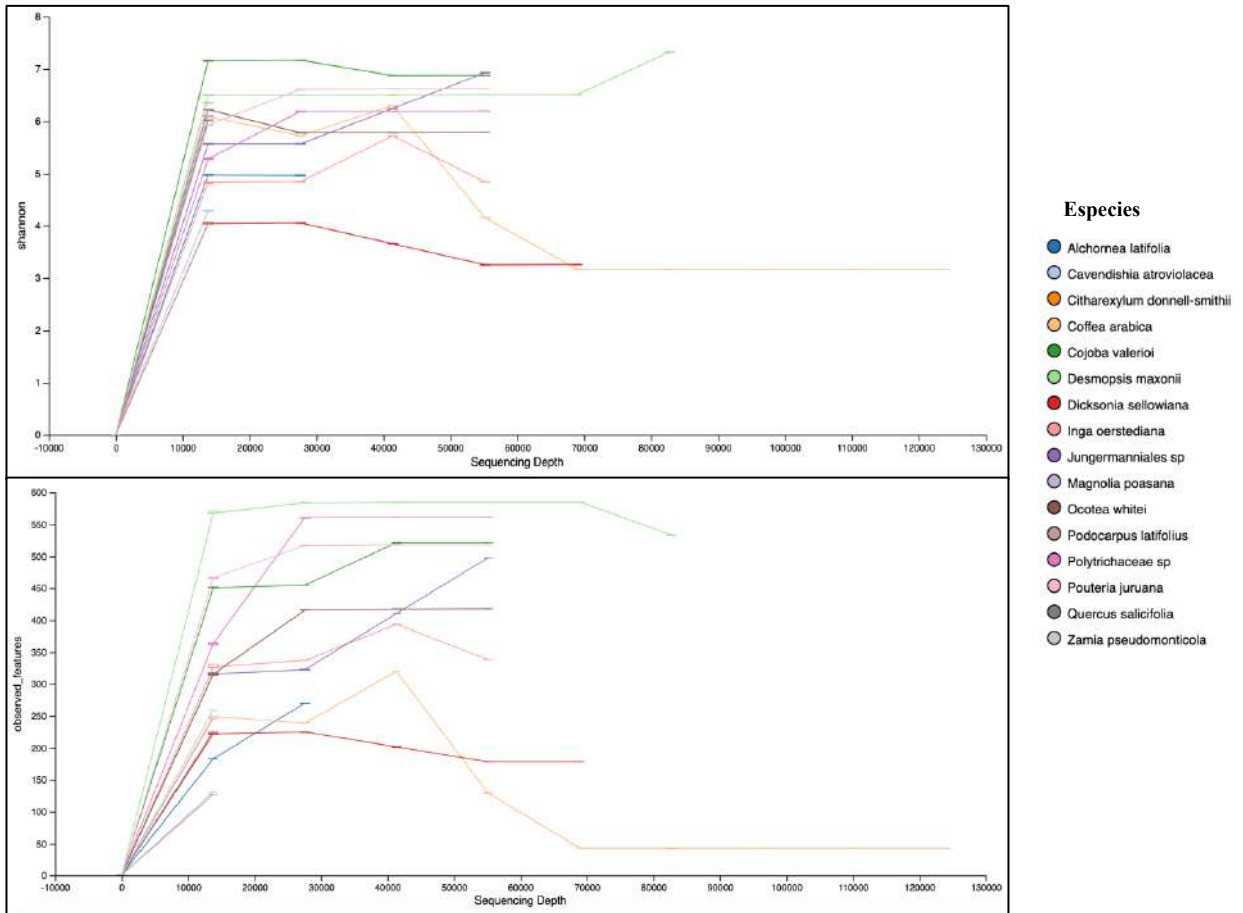
Código de la muestra	Grupo de plantas	División	Familia	Especies	Ubicación
LG638	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Magnoliaceae	Magnolia poasana	PILA
LG636	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Magnoliaceae	Magnolia poasana	PILA
LG639	Plantas vasculares	Pinophyta	Podocarpaceae	Podocarpus latifolius	PILA
LG663	Plantas vasculares	Pinophyta	Podocarpaceae	Podocarpus latifolius	Finca Nuguo
LG662	Plantas vasculares	Pinophyta	Podocarpaceae	Podocarpus latifolius	Finca Nuguo
LG635	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Euphorbiaceae	Alchornea latifolia	PILA
LG632	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Euphorbiaceae	Alchornea latifolia	PILA
LG633	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Euphorbiaceae	Alchornea latifolia	PILA
LG646	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Fabaceae	Inga oerstediana	Finca Nuguo
LG647	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Fabaceae	Inga oerstediana	Finca Nuguo
LG648	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Fabaceae	Inga oerstediana	Finca Nuguo

LG649	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Ericacea	Cavendishia atrovioleacea	Finca Nuguo
LG650	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Ericacea	Cavendishia atrovioleacea	Finca Nuguo
LG651	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Ericacea	Cavendishia atrovioleacea	Finca Nuguo
LG652	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Fagaceae	Quercus salicifolia	Finca Nuguo
LLG653	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Fagaceae	Quercus salicifolia	Finca Nuguo
LG654	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Fagaceae	Quercus salicifolia	Finca Nuguo
LG656	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Verbenaceae	Citharexylum donnell-smithii	Finca Nuguo
LG657	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Verbenaceae	Citharexylum donnell-smithii	Finca Nuguo
LG658	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Verbenaceae	Citharexylum donnell-smithii	Finca Nuguo
LG599	Helechos	Monilophyta	Dicksoniaceae	Dicksonia sellowiana	PILA
LG600	Helechos	Monilophyta	Dicksoniaceae	Dicksonia sellowiana	PILA
LG602	Helechos	Monilophyta	Dicksoniaceae	Dicksonia sellowiana	PILA
KV01	Briófitos	Briófitos	Polytrichaceae sp	Polytrichaceae sp	PILA
KV02	Briófitos	Bryophyta	Polytrichaceae sp	Polytrichaceae sp	PILA
KV03	Briófitos	Bryophyta	Polytrichaceae sp	Polytrichaceae sp	PILA
KV04	Briófitos	Bryophyta	Jungermanniales sp	Jungermanniales sp	PILA
KV05	Briófitos	Bryophyta	Jungermanniales sp	Jungermanniales sp	PILA

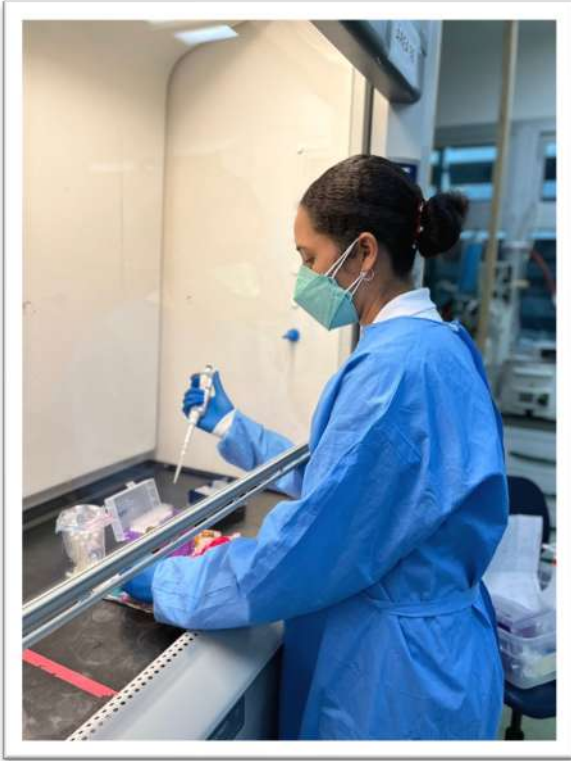
KV06	Briófitos	Bryophyta	Jungermanniales sp	Jungermanniales sp	PILA
GEF12	Café	Magnoliophyta	Rubiaceae	Coffea arabica	Finca Hartman
GEF13	Café	Magnoliophyta	Rubiaceae	Coffea arabica	Finca Hartman
GEF14	Café	Magnoliophyta	Rubiaceae	Coffea arabica	Finca Hartman
GEF15	Café	Magnoliophyta	Rubiaceae	Coffea arabica	Finca Hartman
GEF16	Café	Magnoliophyta	Rubiaceae	Coffea arabica	Finca Hartman
GEF17	Café	Magnoliophyta	Rubiaceae	Coffea arabica	Finca Hartman
GEF51	Café	Magnoliophyta	Rubiaceae	Coffea arabica	Finca Hartman
GEF52	Café	Magnoliophyta	Rubiaceae	Coffea arabica	Finca Hartman
GEF53	Café	Magnoliophyta	Rubiaceae	Coffea arabica	Finca Hartman
GEF54	Café	Magnoliophyta	Rubiaceae	Coffea arabica	Finca Hartman
GEF55	Café	Magnoliophyta	Rubiaceae	Coffea arabica	Finca Hartman
GEF56	Café	Magnoliophyta	Rubiaceae	Coffea arabica	Finca Hartman
LG687	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Fabaceae	Cojoba valerioi	Finca Hartman
LG688	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Fabaceae	Cojoba valerioi	Finca Hartman
LG689	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Fabaceae	Cojoba valerioi	Finca Hartman
LG680	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Lauraceae	Ocotea whitei	Finca Hartman

LG693	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Lauraceae	<i>Ocotea whitei</i>	Finca Hartman
LG694	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Lauraceae	<i>Ocotea whitei</i>	Finca Hartman
LG681	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Sapotaceae	<i>Pouteria juruana</i>	Finca Hartman
LG682	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Sapotaceae	<i>Pouteria juruana</i>	Finca Hartman
LG683	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Sapotaceae	<i>Pouteria juruana</i>	Finca Hartman
LG690	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Annonaceae	<i>Desmopsis maxonii</i>	Finca Hartman
LG691	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Annonaceae	<i>Desmopsis maxonii</i>	Finca Hartman
LG692	Plantas vasculares	Magnoliophyta	Annonaceae	<i>Desmopsis maxonii</i>	Finca Hartman
LG684	Plantas vasculares	Cycadophyta	Zamiaceae	<i>Zamia pseudomonticola</i>	Finca Hartman
LG685	Plantas vasculares	Cycadophyta	Zamiaceae	<i>Zamia pseudomonticola</i>	Finca Hartman
LG686	Plantas vasculares	Cycadophyta	Zamiaceae	<i>Zamia pseudomonticola</i>	Finca Hartman

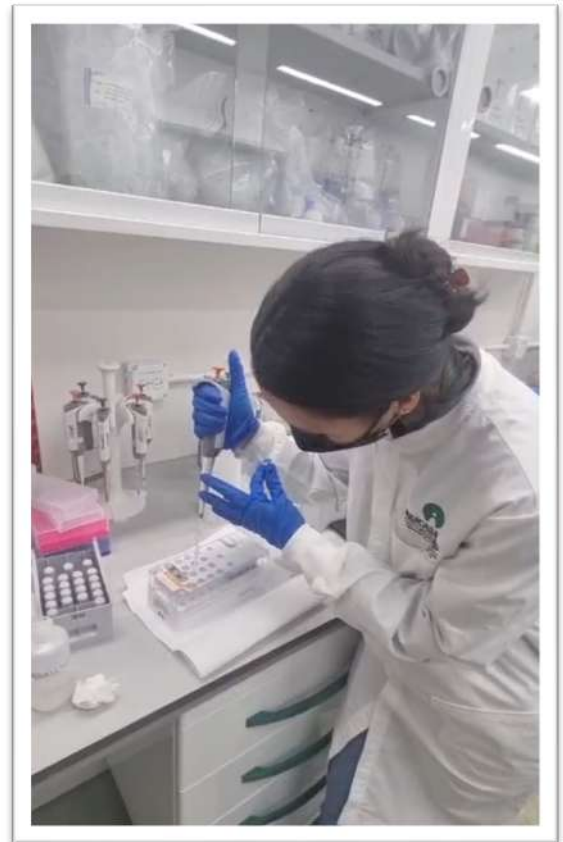
Curva de rarefacción



Rarefacción alfa utilizando la métrica de Shannon y Observed features (ASVs) para las 16 especies de plantas. A la derecha los códigos (colores) para cada especie. Esto nos ayudó a determinar que cada especie de planta pudo capturar la mayor cantidad de taxones de hongos endófitos foliares, hasta una profundidad suficiente.



Parte de la extracción de ADN



Colocando la librería en el cartucho de Illumina para la secuenciación masiva