

Universidad de Panamá

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

Escuela de Biología

Trabajo de Tesis

Comunidad de hongos endófitos asociados a hojas de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.), en bosques de manglar de las costas del caribe panameño (Provincia de Colón, República de Panamá).

Por:

Mauricio Mariona EC-21-12878

Shantal Ramírez 8-959-1637

Asesores

Prof. Nilka Torres

Prof. Nivia Ríos

Prof. Hilario Espinosa

Trabajo de graduación presentado a la Escuela de Biología como requisito para optar por el
Título de Licenciatura en Biología con orientación en Biología Ambiental

2024

TRIBUNAL EXAMINADOR

TÍTULO:

“Comunidad de hongos endófitos asociados a hojas de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.), en bosques de manglar de las costas del caribe panameño (Provincia de Colón, República de Panamá)”

POR:

MAURICIO MARIONA EC-21-12878 _____

SHANTAL RAMIREZ 8-959-1637 _____

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO A CONSIDERACIÓN DE LA
ESCUELA DE BIOLOGÍA COMO REQUISITO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA AMBIENTAL

PROF. NILKA TORRES _____

ASESORA PRINCIPAL

PROF. NIVIA RÍOS _____

COASESORA

PROF. HILARIO ESPINOSA _____

COASESOR

DEDICATORIA

Mauricio.

A mi madre, Inés Olivia Naves, y a mi padre, Nazario Mariona, quienes, con su amor incondicional, sacrificios y enseñanzas han sido mi mayor fuente de inspiración. Gracias por mostrarme el valor del trabajo duro y la perseverancia, y por siempre creer en mi potencial, gracias por estar siempre presentes dándome el apoyo que necesito.

A mi hermana, Alejandra, de quien siempre he querido ser un buen ejemplo para seguir. Espero que mis esfuerzos inspiren tus propios sueños y metas.

A todas las personas que creyeron en mí y me apoyaron incondicionalmente, quienes vieron en mí lo que a veces no podía ver en mí mismo. Su confianza y aliento me han impulsado a superar cada obstáculo y alcanzar mis metas. Estoy eternamente agradecido por su apoyo, esta tesis es tan suya como mía.

Shantal

A Dios, quien nos recuerda en **Santiago 1:17** que ***“todo lo que es bueno y perfecto es un regalo que desciende a nosotros de parte de Dios nuestro Padre, quien creó todas las luces de los cielos. Él nunca cambia, como lo hace una sombra en movimiento.”***

A mi amado esposo, Michael Gill, y a nuestros futuros hijos, dedico esta tesis con la esperanza de que este logro sea un legado de amor y determinación. Que sirva como un ejemplo de que el esfuerzo constante y el apoyo familiar son clave para alcanzar nuestros sueños.

A mi querida hermana menor, Marieanne Ramírez, dedico este trabajo con el deseo de que encuentres en él un ejemplo de que, con dedicación y persistencia, los sueños se pueden alcanzar. Sigue persiguiendo tus metas con la misma pasión y compromiso.

AGRADECIMIENTOS

|

Mauricio

En primer lugar, quiero agradecerme a mí mismo por nunca haberme defraudado y siempre haber luchado por mis metas, incluso en los momentos más desafiantes.

A Gina Harris, Miguel Padilla Harris, Gilberto Harris y demás familia por abrirme las puertas de su hogar y acogerme como un miembro más de su familia. Su generosidad y cariño han sido una fuente invaluable de fortaleza para mí.

Al profesor Hilario Espinosa, por darme la oportunidad de adentrarme en el mundo científico, aceptarme en su proyecto en el año 2020, y por continuar apoyándome desde entonces. Esta tesis no habría sido posible sin su guía y confianza.

A Yelissa Juárez, por estar siempre a mi lado y ofrecerme el aliento y los empujones que necesito cuando siento que no puedo más. Su cariño y apoyo incondicional han sido una fuente constante de fortaleza e inspiración, y su presencia en mi vida es algo que agradeceré eternamente.

A la profesora Nivia Ríos y al profesor Luis Cubilla, por permitirme usar su laboratorio para la realización de esta tesis y por su constante apoyo y orientación.

A la profesora Nilka Torres, por su disposición al aceptar guiarnos en este proyecto de tesis y por su orientación durante el proceso. Su apoyo fue valioso para la culminación de este trabajo.

A mis amigos, por todos los consejos, las colaboraciones científicas, las fiestas y los buenos momentos compartidos. Su amistad ha enriquecido mi vida de maneras innumerables.

A la Escuela de Biología, por mostrarme la belleza de la biología, su vastedad y complejidad, y por despertar en mí un interés insaciable por aprender y descubrir siempre más.

Gracias a la Universidad de Panamá, mi alma mater, por brindarme la oportunidad de acceder a una educación de calidad y formarme como profesional.

Finalmente, gracias a Panamá, por aceptarme y convertirse en mi segundo hogar. Su cultura y gente me han enriquecido enormemente.

Shantal

Primero y ante todo, agradezco a Dios: ***“Te daré gracias porque me has respondido y has sido mi salvación” Salmos 118:21.***

Con profunda estima, expreso mi sincero agradecimiento al Profesor Hilario Espinosa y a la Profesora Nivia Ríos, asesores de esta tesis. Su dedicación, paciencia y guía constante han sido pilares fundamentales en la dirección y enriquecimiento de esta investigación.

Extiendo mi gratitud a la Profesora Nilka Torres, cuyos comentarios constructivos y observaciones detalladas fueron esenciales para consolidar este trabajo y elevar su calidad.

Agradezco al Profesor Luis Cubilla y a la Profesora Nivia Ríos por brindarnos acceso a su infraestructura de laboratorio y por su apoyo continuo durante el desarrollo de esta tesis. Sus instalaciones y equipos han sido cruciales para el éxito de esta.

Mi agradecimiento más sincero va a mi compañero de tesis, Mauricio Mariona, por su colaboración invaluable a lo largo del proyecto. Su dedicación y esfuerzo han sido fundamentales para el desarrollo y culminación de nuestra investigación. Aprecio

profundamente su compañerismo y el trabajo en equipo que ha sido clave para alcanzar nuestros objetivos.

Quisiera expresar un agradecimiento especial a la Universidad de Panamá y a la Escuela de Biología por la formación académica que me han brindado. Su compromiso con la excelencia educativa ha sido determinante en mi crecimiento profesional y personal.

Finalmente, agradezco a mi familia por su amor, paciencia, comprensión y apoyo incondicional. Su respaldo ha sido esencial para enfrentar los desafíos y culminar con éxito esta tesis.

También quiero agradecer a mi lugar de trabajo por su comprensión y flexibilidad, que me permitió equilibrar mis responsabilidades profesionales con mis compromisos académicos, facilitando así la consecución de este importante logro.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
RESUMEN.....	17
ABSTRACT	18
INTRODUCCIÓN	19
HONGOS ENDÓFITOS.....	19
HONGOS ENDÓFITOS Y PLANTAS.....	21
BOSQUES DE MANGLAR	21
ESTUDIOS PREVIOS EN HONGOS ENDÓFITOS EN MANGLARES.....	23
ANTECEDENTES.....	23
OBJETIVO GENERAL.	28
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	29
METODOLOGÍA.....	29
Ubicación geográfica y descripción general del área de estudio.	29
Estrategia de muestreo	34
Procesamiento del tejido foliar para el aislamiento fúngico.....	36
Preparación de medios de cultivo.....	36
Limpieza y Desinfección del Tejido Foliar	37
Siembra, Aislamiento y cultivo de hongos endófitos	41
Identificación de hongos endófitos.	43
Técnica de Microcultivo.	43
Observación e Identificación Microscópica de Microcultivos.....	47
Análisis de diversidad de hongos endófitos.....	47
RESULTADOS	48
DISCUSIÓN.....	58
CONCLUSIONES	61
RECOMENDACIONES.....	62
REFERENCIAS	65
ANEXOS.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Figura 1. Ubicación del sitio de estudio en la República de Panamá.....	30
2. Figura 2. Puntos de muestreo.	31
3. Figura 3. Acceso al manglar desde tierra.	33
4. Figura 4. Línea de Rhizophora mangle en la costa.	33
5. Figura 5. Colecta de hojas de R. mangle en la línea costera.....	34
6. Figura 6. Colecta de hojas por Mauricio y Shantal.	35
7. Figura 7. Hojas colectadas guardadas en bolsas estériles individuales.....	35
8. Figura 8. Agar extracto de malta TM Media.....	36
9. Figura 9. Agar dextrosa de papa Oxoid.....	37
10. Figura 10. Hoja siendo lavada con agua potable.....	38
11. Figura 11. Hoja sobre tabla de picar desinfectada lista para cortar.	38
12. Figura 12. Hoja con cortes en base, ápice y área central.	39
13. Figura 13. Cortes de hojas puestos dentro de un filtro para su limpieza.....	40
14. Figura 14. Cortes de hoja siendo limpiados en hipoclorito de sodio al 0.5%.....	40
15. Figura 15. Cortes de hoja sembrados en platos Petri con MEA.....	41
16. Figura 16. Platos Petri con los cortes almacenados.	42
17. Figura 17. Hongos endófitos creciendo de los cortes de hoja.	42
18. Figura 18. Hongos aislados en platos petri con PDA.....	43
19. Figura 19. Cubreobjetos siendo colocado sobre un corte de medio de cultivo y corte de hongo endófito aislado.	44
20. Figura 20. Platos Petri con microcultivos siendo incubados para crecimiento.	44
21. Figura 21. Micelio creciendo sobre el medio de cultivo y debajo de los cubreobjetos....	45
22. Figura 22. Cubreobjetos con micelio siendo retirado.....	46
23. Figura 23. Cubreobjetos con micelio siendo colocado en un portaobjetos con una gota de azul de lactoglicerol.....	46
24. Figura 24. Fotografía microscópica de micelio estéril.....	47
25. Figura 25. Fotografía microscópica de Paecilomyces, aumento x100 lente de inmersión en tinción azul de lactoglicerol.	50
26. Figura 26. Fotografía microscópica de Penicillium, aumento x100 lente de inmersión en tinción azul de lactoglicerol.	51
27. Figura 27. Fotografía microscópica de Sporothrix, aumento x100 lente de inmersión en tinción azul de lactoglicerol.	51
28. Figura 28. Morfotipo 1 hongo 30.1	52
29. Figura 29. Morfotipo 53 hongo 75.2	53
30. Figura 30. Hongos aislados por hoja y árbol colecta 1.	54
31. Figura 31. Hongos aislados por hoja y árbol colecta 2.	55
32. Figura 32. Morfotipos de hongos aislados por hoja y árbol colecta 1.....	55
33. Figura 33. Morfotipos de hongos aislados por hoja y árbol colecta 2.....	56
34. Figura 34. Mapa de árbol (treemap) con los morfotipos aislados de la colecta 1.....	57
35. Figura 35. Mapa de árbol (treemap) con los morfotipos de la colecta 2.....	57
36. Figura 36. Mapa de la distribución de los bosques de manglar en la República de Panamá hecho por el Ministerio de Ambiente de Panamá y el Instituto de Investigaciones Tropicales Smithsonian.....	59
37. Figura 37. Mapa de tipos de vegetación en Panamá en Atlas Ambiental de la República de Panamá 2010. Autoridad Nacional del Ambiente ANAM, pág 51.	59

ÍNDICE DE ANEXOS

1. Anexo 1. Platos Petri con agar extracto de malta.	74
2. Anexo 2. Pesaje de medio de cultivo para preparación.	74
3. Anexo 3. Servido de medio en platos Petri.	74
4. Anexo 4. Limpieza de cristalería utilizada para la realización de medios.	74
5. Anexo 5. Colecta de hojas de R. mangle.	74
6. Anexo 6. Platos Petri con hongos endófitos aislados.	75
7. Anexo 7. Mismo hongo diferente característica fenotípica.	75
8. Anexo 8. Parte de la diversidad endófito aislada.	75
9. Anexo 9. Guía de identificación taxonómica: Illustrated Genera Of Imperfect Fungi.	75
10. Anexo 10. Guía de identificación taxonómica: The Genera Of Hyphomycetes.	76
11. Anexo 11. Guía de identificación taxonómica: Identifying Filamentous Fungi.	76
12. Anexo 12. Morfo 1, foto trasera.	77
13. Anexo 13. Morfo 1, foto delantera.	77
14. Anexo 14. Morfo 2, foto trasera.	77
15. Anexo 15. Morfo 2, foto delantera.	77
16. Anexo 16. Morfo 3, foto trasera.	77
17. Anexo 17. Morfo 3, foto delantera.	77
18. Anexo 18. Morfo 4, foto trasera.	78
19. Anexo 19. Morfo 4, foto delantera.	78
20. Anexo 20. Morfo 5, foto trasera.	78
21. Anexo 21. Morfo 5, foto delantera.	78
22. Anexo 22. Morfo 6, foto trasera.	78
23. Anexo 23. Morfo 6, foto delantera.	78
24. Anexo 24. Morfo 7, foto trasera.	79
25. Anexo 25. Morfo 7, foto delantera.	79
26. Anexo 26. Morfo 8, foto trasera.	79
27. Anexo 27. Morfo 8, foto delantera.	79
28. Anexo 28. Morfo 9, foto trasera.	79
29. Anexo 29. Morfo 9, foto delantera.	79
30. Anexo 30. Morfo 10, foto trasera.	80
31. Anexo 31. Morfo 10, foto delantera.	80
32. Anexo 32. Morfo 11, foto trasera.	80
33. Anexo 33. Morfo 11, foto delantera.	80
34. Anexo 34. Morfo 12, foto trasera.	80
35. Anexo 35. Morfo 12, foto delantera.	80
36. Anexo 36. Morfo 13, foto trasera.	81
37. Anexo 37. Morfo 13, foto delantera.	81
38. Anexo 38. Morfo 14, foto trasera.	81
39. Anexo 39. Morfo 14, foto delantera.	81
40. Anexo 40. Morfo 15, foto trasera.	81
41. Anexo 41. Morfo 15, foto delantera.	81
42. Anexo 42. Morfo 16, foto trasera.	82
43. Anexo 43. Morfo 16, foto delantera.	82
44. Anexo 44. Morfo 17, foto trasera.	82
45. Anexo 45. Morfo 17, foto delantera.	82

46. Anexo 46. Morfo 18, foto trasera.	82
47. Anexo 47. Morfo 18, foto delantera.	82
48. Anexo 48. Morfo 19, foto trasera.	83
49. Anexo 49. Morfo 19, foto delantera.	83
50. Anexo 50. Morfo 20, foto trasera.	83
51. Anexo 51. Morfo 20, foto delantera.	83
52. Anexo 52. Morfo 21, foto trasera.	83
53. Anexo 53. Morfo 21, foto delantera.	83
54. Anexo 54. Morfo 22, foto trasera.	84
55. Anexo 55. Morfo 22, foto delantera.	84
56. Anexo 56. Morfo 23, foto trasera.	84
57. Anexo 57. Morfo 23, foto delantera.	84
58. Anexo 58. Morfo 24, foto trasera.	84
59. Anexo 59. Morfo 24, foto delantera.	84
60. Anexo 60. Morfo 25, foto trasera.	85
61. Anexo 61. Morfo 25, foto delantera.	85
62. Anexo 62. Morfo 26, foto trasera.	85
63. Anexo 63. Morfo 26, foto delantera.	85
64. Anexo 64. Morfo 27, foto trasera.	85
65. Anexo 65. Morfo 27, foto delantera.	85
66. Anexo 66. Morfo 28, foto trasera.	86
67. Anexo 67. Morfo 28, foto delantera.	86
68. Anexo 68. Morfo 29, foto trasera.	86
69. Anexo 69. Morfo 29, foto delantera.	86
70. Anexo 70. Morfo 30, foto trasera.	86
71. Anexo 71. Morfo 30, foto delantera.	86
72. Anexo 72. Morfo 31, foto trasera.	87
73. Anexo 73. Morfo 31, foto delantera.	87
74. Anexo 74. Morfo 32, foto trasera.	87
75. Anexo 75. Morfo 32, foto delantera.	87
76. Anexo 76. Morfo 33, foto trasera.	87
77. Anexo 77. Morfo 33, foto delantera.	87
78. Anexo 78. Morfo 34, foto trasera.	88
79. Anexo 79. Morfo 34, foto delantera.	88
80. Anexo 80. Morfo 35, foto trasera.	88
81. Anexo 81. Morfo 35, foto delantera.	88
82. Anexo 82. Morfo 36, foto trasera.	88
83. Anexo 83. Morfo 36, foto delantera.	88
84. Anexo 84. Morfo 37, foto trasera.	89
85. Anexo 85. Morfo 37, foto delantera.	89
86. Anexo 86. Morfo 38, foto trasera.	89
87. Anexo 87. Morfo 38, foto delantera.	89
88. Anexo 88. Morfo 39, foto trasera.	89
89. Anexo 89. Morfo 39, foto delantera.	89
90. Anexo 90. Morfo 40, foto trasera.	90
91. Anexo 91. Morfo 40, foto delantera.	90
92. Anexo 92. Morfo 41, foto trasera.	90
93. Anexo 93. morfo 41, foto delantera.	90

94. Anexo 94. Morfo 42, foto trasera.	90
95. Anexo 95. Morfo 42, foto delantera.	90
96. Anexo 96. Morfo 43, foto trasera.	91
97. Anexo 97. Morfo 43, foto delantera.	91
98. Anexo 98. Morfo 45, foto trasera.	91
99. Anexo 99. Morfo 45, foto delantera.	91
100. Anexo 100. Morfo 46, foto trasera.	91
101. Anexo 101. Morfo 46, foto delantera.	91
102. Anexo 102. Morfo 47, foto trasera.	92
103. Anexo 103. Morfo 47, foto delantera.	92
104. Anexo 104. Morfo 48, foto trasera.	92
105. Anexo 105. Morfo 48, foto delantera.	92
106. Anexo 106. Morfo 49, foto trasera.	92
107. Anexo 107. Morfo 49, foto delantera.	92
108. Anexo 108. Morfo 50, foto trasera.	93
109. Anexo 109. Morfo 50, foto delantera.	93
110. Anexo 110. Morfo 53, foto trasera.	93
111. Anexo 111. Morfo 53, foto delantera.	93
112. Anexo 112. Morfo 54, foto trasera.	93
113. Anexo 113. Morfo 54, foto delantera.	93
114. Anexo 114. Morfo 55, foto trasera.	94
115. Anexo 115. Morfo 55, foto delantera.	94
116. Anexo 116. Morfo 56, foto trasera.	94
117. Anexo 117. Morfo 56, foto delantera.	94
118. Anexo 118. Morfo 57, foto trasera.	94
119. Anexo 119. Morfo 57, foto delantera.	94
120. Anexo 120. Morfo 58, foto trasera.	95
121. Anexo 121. Morfo 58, foto delantera.	95
122. Anexo 122. Morfo 59, foto trasera.	95
123. Anexo 123. Morfo 59, foto delantera.	95
124. Anexo 124. Morfo 60, foto trasera.	95
125. Anexo 125. Morfo 60, foto delantera.	95
126. Anexo 126. Morfo 61, foto trasera.	96
127. Anexo 127. Morfo 61, foto delantera.	96
128. Anexo 128. Morfo 62, foto trasera.	96
129. Anexo 129. Morfo 62, foto delantera.	96
130. Anexo 130. Morfo 63, foto trasera.	96
131. Anexo 131. Morfo 63, foto delantera.	96
132. Anexo 132. Morfo 64, foto trasera.	97
133. Anexo 133. Morfo 64, foto delantera.	97
134. Anexo 134. Morfo 65, foto trasera.	97
135. Anexo 135. Morfo 65, foto delantera.	97
136. Anexo 136. Morfo 66, foto trasera.	97
137. Anexo 137. Morfo 66, foto delantera.	97
138. Anexo 138. Morfo 67, foto trasera.	98
139. Anexo 139. Morfo 67, foto delantera.	98
140. Anexo 140. Morfo 68, foto trasera.	98
141. Anexo 141. Morfo 68, foto delantera.	98

142. Anexo 142. Morfo 69, foto trasera.	98
143. Anexo 143. Morfo 69, foto delantera.	98
144. Anexo 144. Morfo 70, foto trasera.	99
145. Anexo 145. Morfo 70, foto delantera.	99
146. Anexo 146. Morfo 71, foto trasera.	99
147. Anexo 147. Morfo 71, foto delantera.	99
148. Anexo 148. Morfo 72, foto trasera.	99
149. Anexo 149. Morfo 72, foto delantera.	99
150. Anexo 150. Morfo 73, foto trasera.	100
151. Anexo 151. Morfo 73, foto delantera.	100
152. Anexo 152. Morfo 74, foto trasera.	100
153. Anexo 153. Morfo 74, foto delantera.	100
154. Anexo 154. Morfo 75, foto trasera.	100
155. Anexo 155. Morfo 75, foto delantera.	100
156. Anexo 156. Morfo 76, foto trasera.	101
157. Anexo 157. Morfo 76, foto delantera.	101
158. Anexo 158. Morfo 77, foto trasera.	101
159. Anexo 159. Morfo 77, foto delantera.	101
160. Anexo 160. Morfo 78, foto trasera.	101
161. Anexo 161. Morfo 78, foto delantera.	101
162. Anexo 162. Morfo 79, foto trasera.	102
163. Anexo 163. Morfo 79, foto delantera.	102
164. Anexo 164. Morfo 80, foto trasera.	102
165. Anexo 165. Morfo 80, foto delantera.	102
166. Anexo 166. Morfo 81, foto trasera.	102
167. Anexo 167. Morfo 81, foto delantera.	102
168. Anexo 168. Morfo 82, foto trasera.	103
169. Anexo 169. Morfo 82, foto delantera.	103
170. Anexo 170. Morfo 83, foto trasera.	103
171. Anexo 171. Morfo 83, foto delantera.	103
172. Anexo 172. Morfo 84, foto trasera.	103
173. Anexo 173. Morfo 84, foto delantera.	103
174. Anexo 174. Morfo 85, foto trasera.	104
175. Anexo 175. Morfo 85, foto delantera.	104
176. Anexo 176. Morfo 86, foto trasera.	104
177. Anexo 177. Morfo 86, foto delantera.	104
178. Anexo 178. Morfo 87, foto trasera.	104
179. Anexo 179. Morfo 87, foto delantera.	104
180. Anexo 180. Morfo 88, foto trasera.	105
181. Anexo 181. Morfo 88, foto delantera.	105
182. Anexo 182. Morfo 89, foto trasera.	105
183. Anexo 183. Morfo 89, foto delantera.	105
184. Anexo 184. Morfo 90, foto trasera.	105
185. Anexo 185. Morfo 90, foto delantera.	105
186. Anexo 186. Morfo 91, foto trasera.	106
187. Anexo 187. Morfo 91, foto delantera.	106
188. Anexo 188. Morfo 92, foto trasera.	106
189. Anexo 189. Morfo 92, foto delantera.	106

190. Anexo 190. Morfo 93, foto trasera.	106
191. Anexo 191. Morfo 93, foto delantera.	106
192. Anexo 192. Morfo 94, foto trasera.	107
193. Anexo 193. Morfo 94, foto delantera.	107
194. Anexo 194. Morfo 95, foto trasera.	107
195. Anexo 195. Morfo 95, foto delantera.	107
196. Anexo 196. Morfo 96, foto trasera.	107
197. Anexo 197. Morfo 96, foto delantera.	107
198. Anexo 198. Morfo 97, foto trasera.	108
199. Anexo 199. Morfo 97, foto delantera.	108
200. Anexo 200. Morfo 98, foto trasera.	108
201. Anexo 201. Morfo 98, foto delantera.	108
202. Anexo 202. Morfo 99, foto trasera.	108
203. Anexo 203. Morfo 99, foto delantera.	108
204. Anexo 204. Morfo 100, foto trasera.	109
205. Anexo 205. Morfo 100, foto delantera.	109
206. Anexo 206. Morfo 101, foto trasera.	109
207. Anexo 207. Morfo 101, foto delantera.	109
208. Anexo 208. Morfo 102, foto trasera.	109
209. Anexo 209. Morfo 102, foto delantera.	109
210. Anexo 210. Morfo 103, foto trasera.	110
211. Anexo 211. Morfo 103, foto delantera.	110
212. Anexo 212. Morfo 104, foto trasera.	110
213. Anexo 213. Morfo 104, foto delantera.	110
214. Anexo 214. Morfo 105, foto trasera.	110
215. Anexo 215. Morfo 105, foto delantera.	110
216. Anexo 216. Morfo 106, foto trasera.	111
217. Anexo 217. Morfo 106, foto delantera.	111
218. Anexo 218. Morfo 107, foto trasera.	111
219. Anexo 219. Morfo 107, foto delantera.	111
220. Anexo 220. Morfo 108, foto trasera.	111
221. Anexo 221. Morfo 108, foto delantera.	111
222. Anexo 222. Morfo 109, foto trasera.	112
223. Anexo 223. Morfo 109, foto delantera.	112
224. Anexo 224. Morfo 110, foto trasera.	112
225. Anexo 225. Morfo 110, foto delantera.	112
226. Anexo 226. Morfo 111, foto trasera.	112
227. Anexo 227. Morfo 111, foto delantera.	112
228. Anexo 228. Morfo 112, foto trasera.	113
229. Anexo 229. Morfo 112, foto delantera.	113
230. Anexo 230. Morfo 113, foto trasera.	113
231. Anexo 231. Morfo 113, foto delantera.	113
232. Anexo 232. Morfo 114, foto trasera.	113
233. Anexo 233. Morfo 114, foto delantera.	113
234. Anexo 234. Morfo 115, foto trasera.	114
235. Anexo 235. Morfo 115, foto delantera.	114
236. Anexo 236. Morfo 116, foto trasera.	114
237. Anexo 237. Morfo 116, foto delantera.	114

238. Anexo 238. Morfo 117, foto trasera.	114
239. Anexo 239. Morfo 117, foto delantera.	114
240. Anexo 240. Morfo 118, foto trasera.	115
241. Anexo 241. Morfo 118, foto delantera.	115
242. Anexo 242. Morfo 119, foto trasera.	115
243. Anexo 243. Morfo 119, foto delantera.	115
244. Anexo 244. Morfo 120, foto trasera.	115
245. Anexo 245. Morfo 120, foto delantera.	115
246. Anexo 246. Morfo 121, foto trasera.	116
247. Anexo 247. Morfo 121, foto delantera.	116
248. Anexo 248. Morfo 122, foto trasera.	116
249. Anexo 249. Morfo 122, foto delantera.	116
250. Anexo 250. Morfo 123, foto trasera.	116
251. Anexo 251. Morfo 123, foto delantera.	116
252. Anexo 252. Morfo 124, foto trasera.	117
253. Anexo 253. Morfo 124, foto delantera.	117
254. Anexo 254. Morfo 125, foto trasera.	117
255. Anexo 255. Morfo 125, foto delantera.	117
256. Anexo 256. Morfo 126, foto trasera.	117
257. Anexo 257. Morfo 126, foto delantera.	117
258. Anexo 258. Morfo 127, foto trasera.	118
259. Anexo 259. Morfo 127, foto delantera.	118
260. Anexo 260. Morfo 128, foto trasera.	118
261. Anexo 261. Morfo 128, foto delantera.	118
262. Anexo 262. Morfo 129, foto trasera.	118
263. Anexo 263. Morfo 129, foto delantera.	118
264. Anexo 264. Morfo 130, foto trasera.	119
265. Anexo 265. Morfo 130, foto delantera.	119
266. Anexo 266. morfo 131, foto trasera.	119
267. Anexo 267. Morfo 131, foto delantera.	119
268. Anexo 268. Morfo 132, foto trasera.	119
269. Anexo 269. Morfo 132, foto delantera.	119
270. Anexo 270. Morfo 133, foto trasera.	120
271. Anexo 271. Morfo 133, foto delantera.	120
272. Anexo 272. Morfo 134, foto trasera.	120
273. Anexo 273. Morfo 134, foto delantera.	120

RESUMEN.

Los hongos son organismos eucariotas esenciales en la descomposición de materia orgánica y adaptables a diversos ecosistemas, desde terrestres hasta acuáticos. Su capacidad de simbiosis con plantas, como los hongos endófitos, aporta beneficios mutuos: los hongos obtienen nutrientes, y las plantas reciben protección y mayor resistencia a patógenos y herbívoros. Los hongos endófitos viven dentro de las plantas sin causarles daño y ayudan a mejorar su tolerancia al estrés.

En los manglares, ecosistemas costeros tropicales, se han identificado alrededor de 200 especies de hongos endófitos, aunque se estima que existen más especies no reportadas. El mangle rojo (*Rhizophora mangle*) es la especie predominante en los manglares de Panamá, que cuenta con una alta diversidad fúngica.

Este estudio analizó la diversidad de hongos endófitos en hojas de mangle rojo en el Caribe panameño, los muestreos se realizaron en dos periodos del año, siendo el primero durante la estación seca, previo a las lluvias y el segundo tras la finalización de la temporada de lluvias. Se observó una mayor cantidad de morfotipos en la segunda colecta, realizada después de la época de lluvias. Sin embargo, la esporulación fue limitada debido a la dificultad de replicar las condiciones óptimas para la esporulación.

En la primera colecta se obtuvo un índice de Shannon de 3.158857 y un índice de Simpson de 0.9346452. En la segunda colecta, los índices fueron 3.513764 y 0.9424978, respectivamente. Los resultados sugieren una mayor dominancia de ciertos morfotipos en cada época. Este estudio destaca la importancia de los hongos endófitos en la ecología de los manglares y sugiere la necesidad de aplicar herramientas moleculares para una identificación de los hongos aislados más precisa.

Palabras clave

Hongos, endófitos, manglar, morfotipos, diversidad, *Rhizophora mangle*.

ABSTRACT

Fungi are eukaryotic organisms essential in the decomposition of organic matter and adaptable to diverse ecosystems, from terrestrial to aquatic environments. Their ability to form symbiotic relationships with plants, such as endophytic fungi, offers mutual benefits: fungi obtain nutrients, while plants gain protection and increased resistance to pathogens and herbivores. Endophytic fungi live within plants without causing visible harm and help improve the plant's stress tolerance.

In mangroves, tropical coastal ecosystems, around 200 species of endophytic fungi have been identified, although it is estimated that there are many more unreported species. Red mangrove (*Rhizophora mangle*) is the predominant species in Panama's mangroves, which are known to harbor a high fungal diversity.

This study analyzed the diversity of endophytic fungi in red mangrove leaves in the Panamanian Caribbean. The sampling was conducted during two distinct periods of the year: the first during the dry season, before the onset of rainfall, and the second after the conclusion of the rainy season. A higher number of morphotypes was observed in the second collection, conducted after the rainy season. However, sporulation was limited due to the difficulty of replicating specific sporulation conditions in the laboratory.

The first collection yielded a Shannon index of 3.158857 and a Simpson index of 0.9346452. In the second collection, the indices were 3.513764 and 0.9424978, respectively. The results suggest greater dominance of certain morphotypes in each season. This study highlights the importance of endophytic fungi in mangrove ecology and suggests the need for molecular tools for more accurate identification.

Keywords

Fungi, endophytes, mangrove, morphotypes, diversity, *Rhizophora mangle*.

INTRODUCCIÓN

REINO FUNGI

Los hongos son organismos eucariotas, saprótrofos que están presentes en una amplia gama de ubicaciones geográficas a escala global y cumplen con roles importantes en los ecosistemas. Junto con las bacterias, los hongos son los mayores descomponedores de materia orgánica en los ecosistemas terrestres y acuáticos (Gadd, 2007), estos son capaces de crecer en hábitats desérticos o con altas concentraciones de sal (Vaupotic et al., 2008), pueden crecer también en sedimentos marinos (Raghukumar & Raghukumar, 1998) y algunos son capaces de sobrevivir a una intensa exposición a rayos UV (Sancho et al., 2007). Estos cuentan con dos tipos de reproducción, la asexual y la sexual.

Estos organismos pueden ser principalmente encontrados con dos tipos de crecimiento, levaduriforme o filamentoso, que puede cambiar según el medio al que estén expuestos (Sharifia et al., 2008). Los hongos que cuentan con cuerpos filamentosos tienen dos partes, siendo una la parte vegetativa que da el crecimiento y otra parte reproductiva que contiene a las estructuras sexuales (*Reino Fungi*, 2007), la parte vegetativa es haploide y está compuesta por hifas, las cuales forman el micelio (Fricker et al., 2007). El micelio es la estructura mediante la cual el hongo absorbe nutrientes y transporta agua, sin embargo, el micelio es susceptible a la desecación. Estas estructuras están adaptadas para absorber sustancias disueltas por ósmosis, esto es aprovechado por las plantas con las cuales forman una simbiosis (Adamatzky, 2022; Worrich et al., 2017).

HONGOS ENDÓFITOS

En el vasto y diverso Reino Fungi, se encuentran los hongos endófitos, organismos que viven dentro de las plantas sin causarles daño aparente. La palabra "endófito" proviene de la combinación de dos términos griegos: "endon," que significa "dentro," y "phyton," que significa "planta." Juntas, estas palabras describen la naturaleza íntima de estos hongos, que habitan

en los tejidos internos de las plantas, estableciendo una relación simbiótica que puede ser beneficiosa tanto para el hongo como para la planta hospedera. (Arnold, 2005), siendo así podemos definir a los hongos endófitos como microorganismos que están adaptados a vivir todo o gran parte de su ciclo de vida dentro de tejidos vegetales sin causarle un daño aparente (Rodriguez et al., 2009).

Estos organismos, utilizan la reproducción asexual debido a que este es un proceso rápido y eficiente que permite a los hongos endófitos colonizar rápidamente nuevos tejidos vegetales y propagarse dentro de la planta hospedera (Arnold & Lutzoni, 2007). Esto es aún más importante en ambientes dinámicos o cambiantes, donde los hongos necesitan establecerse y adaptarse rápidamente (Saikkonen, 2016) en condiciones ambientales adversas como estrés hídrico, salinidad o temperaturas extremas. Este tipo de reproducción permite a los hongos endófitos persistir y prosperar (Egan, et al. 2023). Otras ventajas de la reproducción asexual es la producción de esporas asexuales, como los conidios, esporangiosporas o las blastospóras que son estructuras livianas y resistentes que pueden ser dispersadas fácilmente por el viento, el agua o animales (Schardl & Clay, 2007), este tipo de dispersión permite a los hongos endófitos colonizar nuevas áreas geográficas y establecerse en nuevos hospederos (Carroll & Petrini, 1993). Además, estas células pueden replicarse y formar nuevas hifas o permanecer en forma de blastos y realizar otras funciones, como la absorción de nutrientes o la interacción con las células vegetales (Petrini & Scholtz, 2008; Redman, et al. 2000).

En el caso de los hongos endófitos, estos no poseen un cuerpo único y definido mientras se encuentran dentro de la planta, la morfología varía dependiendo de la especie del hongo, el tejido vegetal colonizado y la etapa de desarrollo del hongo. La forma más común de crecimiento dentro de las plantas son las hifas, estas pueden ser hialinas o pigmentadas, y su grosor varía según la especie (Arnold & Lutzoni, 2007; Saikkonen, et al. 2016).

HONGOS ENDÓFITOS Y PLANTAS

Según Ravirajan (Ravirajan et al., 2005) la relación que se constituye entre las plantas y los hongos es de gran importancia debido a los beneficios que ambos obtienen mutuamente, siendo para los hongos los principales beneficiados obteniendo alimentación y protección, mientras la planta obtiene beneficio de los metabolitos producidos por los hongos (Abellano & Kelemu, 2007; Sánchez et al. 2013). Estas relaciones también le dan a la planta protección frente a patógenos (Kumaresan & Suryanarayanan, 2002), debido a que los hongos producen enzimas que son liberadas en el tejido de la planta e inhiben el crecimiento de otros organismos que podrían ser nocivos, como bacterias y hongos patógenos (Ravirajan et al., 2005). Estos compuestos producidos por los hongos tales como triterpenos (Vil et al., 2019), alcaloides (Zhang et al., 2012), poliquetidos (Mapari et al., 2010), péptidos cíclicos (Qi et al., 2022), entre otros y la presencia de los hongos en el tejido vegetal ha demostrado ser una barrera de protección para la planta contra insectos defoliadores, como son las hormigas pertenecientes a los géneros *Atta*, *Acromyrmex* y *Myrmicinae* que son clasificados como los principales defoliadores tropicales, se ha reportado la herbivoría en la planta llega a disminuir a casi la mitad en individuos con altas densidades de hongos endófitos (Estrada et al., 2013).

Los hongos endófitos han demostrado que también pueden inducir el crecimiento, mejorar la condición física y aumentar la tolerancia de la planta frente al estrés biótico y abiótico (Gao et al., 2010; Lata et al., 2018; Liu et al., 2007; Rodriguez et al., 2009; Strobel et al., 2004; Tan & Zou, 2001; T.S. et al., 2018; Yamaji et al., 2016).

BOSQUES DE MANGLAR

Los comúnmente denominados manglares representan un ecosistema litoral caracterizado por la presencia de árboles y arbustos que prosperan en regiones tropicales y subtropicales, estos se encuentran en constante inundación debido a la acción de las mareas. Los manglares se encuentran restringidos a las áreas costeras con suelos de naturaleza arenosa o limo-arcillosa. La distribución de este ecosistema va a depender de factores tales como la

amplitud de las mareas, la salinidad del agua y del suelo y la topografía del terreno (Ruiz, 2023).

Los bosques de manglar son la base de ecosistemas que albergan una gran diversidad biológica (Prensa, 2019). Se encuentran entre los más productivos y biológicamente más importantes del mundo (Khoon, 1987), distribuyéndose en 112 países (Bezerra et al., 2013; Fisher & Petrini, 1987; Petrini et al., 2011; Qasim & Wafar, 1990; Wang et al., 2008). En Latinoamérica se encuentran bosques de manglar en las costas del Pacífico y del Atlántico. El país con mayor abundancia de manglares en la región es Brasil, seguido por México, Cuba, Colombia y Venezuela, respectivamente. Panamá, cuenta con aproximadamente 165,000 hectáreas compuestas por 12 de las 65 especies identificadas en el mundo, lo que convierte a Panamá en el país con mayor cobertura y diversidad de la región centroamericana. La distribución en Panamá es de aproximadamente 85% en las costas del pacífico y un 15% en las costas del Caribe según el Ministerio de Ambiente de Panamá (Prensa, 2021), la especie más común y de más amplia distribución geográfica es *Rhizophora mangle* L. comúnmente conocido como mangle rojo, este se encuentra en todas las áreas donde se desarrollan los bosques de manglar (Tosi, 1971).

Los bosques de manglar son parte primordial de los ecosistemas terrestres/marinos ya que son hospederos de una gran cantidad de organismos, entre estos encontramos a los hongos (Barrios et al., 2019). Se han logrado identificar aproximadamente 200 especies de hongos reportados como endófitos asociados a manglares (Liu et al., 2007), sin embargo, se estima que existen poco más de un millón de especies de hongos, motivo por el cual podría haber más especies que aún no han sido reportadas como endófitas y otras más desconocidas para la ciencia (Dreyfuss & Chapela, 1994).

ESTUDIOS PREVIOS EN HONGOS ENDÓFITOS EN MANGLARES

De los hongos que se han reportado hasta la fecha como endófitos dentro del tejido de plantas de manglar se sabe que la población está compuesta mayormente por hongos terrestres y en menor cantidad por hongos marinos (Ananda & Sridhar, 2002; Kumaresan & Suryanarayanan, 2001), esta composición puede deberse a el lavado de la superficie de la tierra que sucede en las temporadas de lluvia que disminuye los niveles de salinidad en el área del manglar y arrastran consigo a esporas que puedan colonizar el tejido del manglar (Sridhar & Kaveriappa, 1988), esto es importante ya que se ha reportado que altos niveles de salinidad disminuyen el crecimiento del micelio (Castillo & Demoulin, 1997). Con respecto a la diversidad presente en cada hoja, se sabe que estas cuentan con altas concentraciones de químicos antifúngicos en la etapa inmadura y estas disminuyen a medida que la hoja va madurando (Arnold et al., 2003), y también sus plantones cuentan con polifenoles de actividad oxidasa que la protegen de la antracnosis (Tattar et al., 1994), En nuestra investigación, es fundamental conocer la diversidad de hongos endófitos asociados a las hojas de mangle rojo y determinar si existen cambios en las comunidades endófitas en los dos periodos del año, previo a las lluvias y posterior a las lluvias. Esta información es crucial, ya que, para maximizar la recolección de hongos endófitos, utilizamos hojas que han perdido los compuestos inhibidores del crecimiento de microorganismos. El objetivo de esta investigación fue analizar las variaciones en la composición de los morfotipos que conforman las comunidades de hongos endófitos en hojas de mangle rojo (*Rhizophora mangle*) en dos estaciones climáticas contrastantes: la temporada lluviosa y la temporada seca.

ANTECEDENTES

Los hongos endófitos se encuentran ampliamente distribuidos en plantas de diversos ecosistemas terrestres, siendo especialmente notables en los bosques tropicales, donde la diversidad de especies vegetales supera considerablemente a otros tipos de bosques. Esta

abundancia de especies hospederas en los bosques tropicales influye directamente en la mayor diversidad de hongos endófitos en estos entornos (Sengupta & Chaudhuri, 2002; Simões et al., 2015). En los estudios llevados a cabo para analizar la comunidad de hongos endófitos presentes en plantas, se ha observado que la gran mayoría de los hongos identificados pertenecen a la división Ascomycota (Mittermeier, et al. 1999), esto debido a que aproximadamente el 80% de todas las especies conocidas pertenecen a esta división (Lu et al., 2023). Esta división fúngica desempeña un papel fundamental en la colonización endofítica de las plantas. Ascomycota es una de las divisiones más diversas y ampliamente distribuidas, conocida por su variedad de formas y funciones ecológicas. Su predominancia en la comunidad de hongos endófitos sugiere que estos organismos pueden desempeñar roles vitales en la salud y el funcionamiento de las plantas hospederas.

La comprensión de la diversidad y la composición de los hongos endófitos en las plantas es crucial no sólo para entender la dinámica de las comunidades de microorganismos asociadas a las plantas, sino también para explorar su potencial en aplicaciones agrícolas, forestales y medicinales (Selim, 2012).

Por lo tanto, reconocer la predominancia de la división Ascomycota entre los hongos endófitos, abre la puerta a investigaciones más detalladas sobre la diversidad genética, la ecología y el potencial biotecnológico de estos microorganismos, lo que puede conducir a avances significativos en varios campos científicos aplicados.

Los primeros estudios destinados a la identificación de comunidades de hongos endófitos se llevaron a cabo en plantas pertenecientes a géneros coníferos, incluyendo *Pinus*, *Taxus* y *Juniperus* (Bezerra et al., 2013; Fisher & Petrini, 1987; Petrini et al., 1992; Wang et al., 2008). Los primeros géneros de hongos endófitos reportados incluyeron *Lulworthia*, *Leptosphaeria*, *Phoma*, *Caryospora*, *Cirrenalia*, *Dactylospora*, *Halocyphina*, *Halosarpheia*, *Lignicola*, *Massarina*, *Phomopsis*, *Torpedospora*, *Trichocladium*, *Alternaria*, *Cladosporium*,

Colletotrichum, *Fusarium*, *Pestalotiopsis* y *Xylaria* (Kohlmeyer, 1984; Li et al., 2016; Petrini & Carroll, 1981; Sarma & Hyde, 2001.; Sieber et al., 1999).

El conocimiento de esto es esencial para comprender las complejas interacciones planta-hongo, tanto mutualistas como patogénicas, lo que a su vez contribuye a la conservación de la biodiversidad al ayudar a entender la diversidad fúngica en ecosistemas donde estas especies vegetales son predominantes.

En el año 2007, Elizabeth Arnold publicó un estudio titulado "Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers" (Comprendiendo la diversidad de hongos endófitos foliares: avances, desafíos y fronteras), en el cual realizó una síntesis de investigaciones previas enfocadas en los hongos endófitos que habitan en raíces, semillas, hojas y otros tejidos de las plantas. Los resultados de investigaciones realizadas en los años 2000, 2003 y 2004 incluyeron la evaluación de la frecuencia de infección por hongos endófitos en las hojas, lo que reveló que las comunidades identificadas parecían estar compuestas principalmente por hongos que habían colonizado los tejidos de las plantas en lugar de ser adquiridos de forma vertical (de planta adulta a semilla). Además de los cultivos, se llevaron a cabo análisis de PCR, que permitieron identificar géneros como *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Phoma*, *Aureobasidium*, *Chaetomium*, *Botryosphaeria*, *Colletotrichum*, *Mycosphaerella* y *Xylaria*, destacándose la predominancia de aquellos pertenecientes a la división Ascomycota (Arnold, 2007).

Este hallazgo tiene importantes implicaciones ecológicas ya que sugiere que los hongos endófitos tienen una alta capacidad para colonizar y establecerse en los tejidos de las plantas durante su ciclo de vida, en lugar de depender en gran medida de la transmisión vertical de planta adulta a semilla. Esta adaptación les permite formar asociaciones estrechas y persistentes con las plantas hospederas, lo que potencialmente les confiere ventajas competitivas y beneficios mutuos.

En su estudio "Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots?" (Diversidad y rango de hospederos de hongos endófitos foliares: ¿son los follajes tropicales puntos de biodiversidad?) Elizabeth Arnold y Francois Lutzoni se propusieron investigar la incidencia de infecciones por hongos endófitos en una amplia variedad de hospederos y entornos geográficos, desde regiones árticas hasta zonas tropicales. Los lugares de estudio abarcaron Nunavut y Quebec en Canadá, Carolina del Norte y Arizona en los Estados Unidos y la Isla de Barro Colorado en Panamá, en el transcurso de este, se examinaron meticulosamente un total de 28 especies hospederas, que incluyen musgos, hepáticas y plantas vasculares, como coníferas y angiospermas. Los resultados de esta investigación demostraron una disminución en la presencia de endófitos en las hojas a medida que se avanzaba desde las zonas tropicales hacia el Ártico. En muestras de hojas de 2 mm², se encontró que entre el 95.6% y el 99.5% estaban colonizadas por endófitos en las zonas tropicales, en contraste con las muestras del Ártico, donde la colonización alcanzaba solo el 1%.

En las zonas árticas, predominaban los hongos de la clase Sordariomycete, mientras que, en otros lugares de estudio, predominaban las clases Saccharomycotina, Pezizomycetes y Dothideomycetes. En la zona tropical, prevalecían las especies pertenecientes a los órdenes Phyllachorales, Xylariales, Diaporthales y Hypocreales, con una predominancia general de hongos de la división Ascomycota (Arnold & Lutzoni, 2007).

George Carroll exploró el fenómeno de las infecciones fúngicas en hojas y tallos en 1988 en un estudio bajo el título "Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont." Carroll analizó muestras de plantas de los géneros *Casuarina*, *Helianthemum* y *Lolium* recolectadas en diversas ubicaciones geográficas, incluyendo zonas de Canadá, como Nunavut y Quebec, así como Carolina del Norte, Arizona en los Estados Unidos, y la Isla de Barro Colorado en Panamá.

A partir de las muestras aisladas en estas diversas ubicaciones, se lograron identificar varios géneros de hongos, incluyendo *Cryptocline*, *Cryptosporiopsis*, *Leptostroma*, *Phomopsis* y *Phyllosticta*. Estos hallazgos proporcionaron una visión más amplia de la diversidad de hongos endófitos en hojas y tallos de plantas en diferentes regiones geográficas. Además, se subrayó la importancia de la división Ascomycota en este contexto, dada su amplia diversidad, lo que sugiere que los individuos pertenecientes a esta división serán comúnmente reportados en futuros estudios relacionados con hongos endófitos en plantas (Carroll, 1988).

El estudio titulado "Endophytic Fungi Isolated from Mangrove (*Rhizophora mucronata*) and Its Antibacterial Activity on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.", realizado en 2011 por Asep Prihanto y colaboradores se centró en investigar la actividad antibacteriana de extractos de hongos endófitos. Para este propósito, se aislaron hongos endófitos de las hojas de *Rhizophora mucronata*, identificando especies pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Ampelomyces*. Destaca que la mayoría de los individuos aislados pertenecían a la división Ascomycota (Prihanto et al., 2011).

Sukanyanee Chaerprasert y su equipo de colaboradores llevaron a cabo en el año 2010 un estudio titulado "Endophytic fungi from mangrove plant species of Thailand: their antimicrobial and anticancer potentials" (Hongos endófitos de especies de plantas de manglar en Tailandia: su potencial antimicrobiano y anticancerígeno). Este estudio tuvo como objetivo la búsqueda de compuestos derivados de hongos endófitos en manglares de Tailandia que pudieran ser utilizados en tratamientos contra el cáncer.

Para esta investigación, se analizaron individuos pertenecientes a las familias Rhizophoraceae, Sonneratiaceae, Combretaceae, Avicenniaceae, Meliaceae y Malvaceae. Se logró aislar un total de 71 hongos de los géneros *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Daldinia*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Phyllosticta* y *Xylaria*. Es relevante señalar que la mayoría de los hongos aislados pertenecen a la división Ascomycota (Chaerprasert et al., 2010).

En Brasil, se han llevado a cabo estudios centrados en el potencial de los metabolitos producidos por hongos endófitos presentes en las hojas de *Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* y *Rhizophora mangle*. Estos estudios condujeron al aislamiento de un total de 25 especies pertenecientes a 19 géneros diferentes (Costa et al., 2012).

En el año 2018, en Bahía Salinas, Cabo Rojo, Puerto Rico, se llevó a cabo un estudio con el objetivo de identificar nuevos compuestos antimicrobianos producidos por hongos endófitos aislados de las hojas y semillas del mangle negro, *Avicennia germinans*. Como resultado de este estudio, se logró aislar un total de 20 géneros de hongos endófitos. Cabe destacar que los hongos *Physalospora*, *Pochonia*, *Simplicillium*, *Teratosphaeria*, *Wrightoporia* y *Stereum* fueron identificados por primera vez como endófitos en manglares. Además, se observó que las especies *Aspergillus flavus* y *Aspergillus clavatus* mostraron potencial para la producción de compuestos con actividad antimicrobiana y antifúngica (Figueroa-Negrón, 2018), de este descubrimiento pueden surgir nuevos compuestos con actividad antimicrobiana que podrían usarse para tratar enfermedades.

Los ascomicetos manglícolas se pueden clasificar según su función ecológica en los ecosistemas de manglar, que incluye saprófitos, patógenos, endófitos, solubilizadores de fosfato y degradadores de celulosa. En Ecuador, durante el año 2019, se llevó a cabo un estudio titulado "Nuevos Registros de Ascomicetos Marinos Manglícolas para el Ecuador". Este estudio resultó en la descripción de 12 especies de ascomicetos marinos manglícolas que se encontraron en la Reserva Ecológica Manglares Churute. Este hallazgo representa una contribución significativa a la descripción de la microbiota de este importante sitio, ya que ocho de las especies identificadas fueron nuevos registros para el país suramericano (Álvarez et al., 2019).

OBJETIVO GENERAL.

-Establecer si existen cambios en las comunidades endófitas en diferentes épocas del año.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Agrupar por características morfológicas macroscópicas (morfotipos) a los hongos aislados de las hojas de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.) de cada colecta.
- Identificar la diversidad de hongos endófitos asociados a las hojas de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.).
- Analizar las variaciones de las comunidades de hongos endófitos en las estaciones del año estudiadas, mediante un análisis de diversidad.

METODOLOGÍA

Ubicación geográfica y descripción general del área de estudio.

El área de estudio conocido como Sherman se encuentra en la República de Panamá, Provincia de Colón, en el Corregimiento de Cristóbal con las coordenadas 9°21'13.62" N 79°56'44.17" W, con una elevación de 0 metros sobre el nivel del mar.

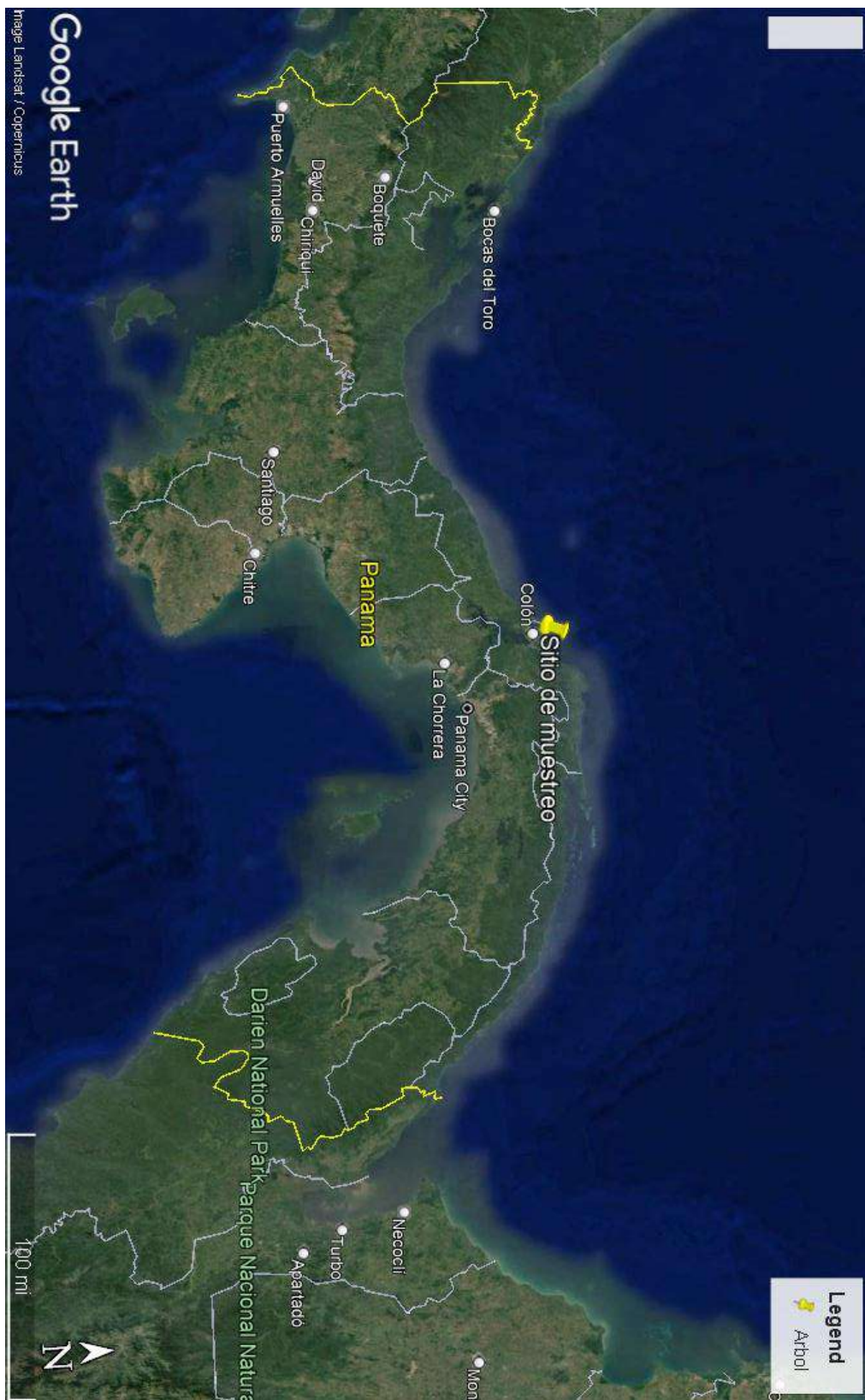


Figura 1. Ubicación del sitio de estudio en la República de Panamá.



Figura 2. Puntos de muestreo.

El ecosistema de manglar se ubica adyacente a la arteria vial principal, lo que facilita su accesibilidad a los investigadores y visitantes interesados en su análisis. Al explorar el área, se observó que el suelo estaba mayoritariamente compuesto por roca y arena, lo que posibilitó una fácil aproximación a los ejemplares de la especie de interés bajo estudio.

El manglar exhibió una zonación claramente definida, donde la franja contigua al océano está predominantemente poblada por la especie *R. mangle*, esta especie exhibe una compleja red de raíces aéreas y ramificaciones que se extienden en múltiples direcciones. Esta configuración arquitectónica brinda refugio, alimento y hábitat a diversas especies animales, al mismo tiempo que fortalece la resiliencia del ecosistema.

Lamentablemente, se constató la presencia de contaminación en el manglar, constituyendo una preocupación significativa. Los signos visibles de este problema incluyeron la acumulación de desechos y basura dispersos en el suelo, así como atrapados entre las raíces de los árboles.

En lo que concierne a la estructura poblacional, se observó que todas las especies presentes en el área de estudio exhibían una mayor proporción de individuos jóvenes en comparación con individuos adultos. Este patrón sugirió que el manglar se encuentra en una fase de recuperación y regeneración, caracterizada por la predominancia de individuos de menor tamaño en términos de diámetro y altura, propios de las etapas juveniles. Esta dinámica subraya la importancia de implementar estrategias de conservación que fomenten la restauración y el desarrollo integral a largo plazo del ecosistema.



Figura 3. Acceso al manglar desde tierra.



Figura 4. Línea de Rhizophora mangle en la costa.

Estrategia de muestreo

En el manglar ubicado en la costa del Caribe, específicamente en el antiguo Fuerte Sherman en la provincia de Colón, se estableció un transecto de 100 metros. Para llevar a cabo los muestreos, se procedió a la identificación de especímenes de *R. mangle* L. a intervalos de aproximadamente diez metros, seguido por la recolección de cinco hojas sin aparente daño de cada árbol.

Los muestreos se llevaron a cabo los días 7 de febrero de 2023 a las 14:30 horas y 11 de agosto de 2023 a las 14:00 horas, y tuvieron una duración aproximada de una hora.

Durante el proceso de colecta, se implementó el uso de guantes distintos para cada hoja, con el propósito de evitar una potencial contaminación cruzada. Las hojas recolectadas se almacenaron individualmente en bolsas para muestras biológicas previamente etiquetadas de forma numérica, iniciando con el número '1' hasta el '50' para el primer muestreo, y del '51' al '100' en el segundo muestreo.



Figura 5. Colecta de hojas de R. mangle en la línea costera.



Figura 6. Colecta de hojas por Mauricio y Shantal.



Figura 7. Hojas colectadas guardadas en bolsas estériles individuales.

Procesamiento del tejido foliar para el aislamiento fúngico.

Preparación de medios de cultivo

Se prepararon medios de cultivo para el aislamiento primario utilizando Agar Extracto de Malta (MEA) con peptona micológica de la marca TM MEDIA. Para los aislamientos secundarios, se empleó medio de Agar Dextrosa de Papa (PDA) de la marca OXOID.



Figura 8. Agar extracto de malta TM Media.



Figura 9. Agar dextrosa de papa Oxoid.

Limpieza y Desinfección del Tejido Foliar

Las hojas de interés fueron sometidas a un proceso de lavado utilizando agua potable y eventualmente lavadas con destilada estéril. Se implementó el uso de guantes diferentes entre cada manipulación de hoja para disminuir el riesgo de contaminación cruzada. La preparación de las hojas implicó su corte en cuadrantes de aproximadamente 3 x 3 mm de tamaño, utilizando tablas de picar previamente desinfectadas con una solución de cloro al 0.5% y etanol al 75% después de cada uso. Del mismo modo, las navajas empleadas para el corte fueron desinfectadas siguiendo un procedimiento similar.



Figura 10. Hoja siendo lavada con agua potable.



Figura 11. Hoja sobre tabla de picar desinfectada lista para cortar.

Cada hoja se sometió a ocho cortes, distribuidos de la siguiente manera: dos en el ápice de la hoja, dos en la base de la hoja y cuatro en la región central. Estos cortes se colocaron en filtros de acero inoxidable diseñados para facilitar la limpieza simultánea de todos los cortes. Dichos filtros fueron esterilizados mediante inmersión en etanol al 70% durante un minuto, seguido de un período de tres minutos en hipoclorito de sodio al 0.5%. Posteriormente, se sumergieron en etanol al 70% durante 30 segundos y, por último, se lavaron con agua estéril durante aproximadamente 30 segundos.



Figura 12. Hoja con cortes en base, ápice y área central.



Figura 13. Cortes de hojas puestos dentro de un filtro para su limpieza.



Figura 14. Cortes de hoja siendo limpiados en hipoclorito de sodio al 0.5%

Siembra, Aislamiento y cultivo de hongos endófitos

Una vez completada la fase de limpieza, los cortes se sembraron en placas Petri conteniendo MEA y se incubaron a temperatura ambiente, aproximadamente a 25°C, durante un período de 15 días, llevando a cabo observaciones diarias. Los hongos que emergieron de los cortes en el medio de cultivo se aislaron en placas de Agar Papa Dextrosa (PDA). Estos cultivos se sometieron a un monitoreo diario con el objetivo de detectar posibles contaminaciones, tanto bacterianas como de otros hongos. Una vez confirmada la ausencia de contaminantes, los hongos aislados se subcultivaron en medio PDA y se almacenaron a temperatura ambiente, con el fin de preservarlos para su posterior identificación taxonómica. Este procedimiento permitió asegurar la pureza y viabilidad de los cultivos endofíticos para su análisis detallado. En el caso de los platos Petri con los cortes de las hojas se revisaron diariamente para monitorear el crecimiento de hongos endófitos, estos se incubaron hasta que los hongos alcanzaron un desarrollo óptimo, es decir, cuando su crecimiento impidió la obtención de nuevos aislamientos o se logró aislar la mayor cantidad posible de individuos presentes.

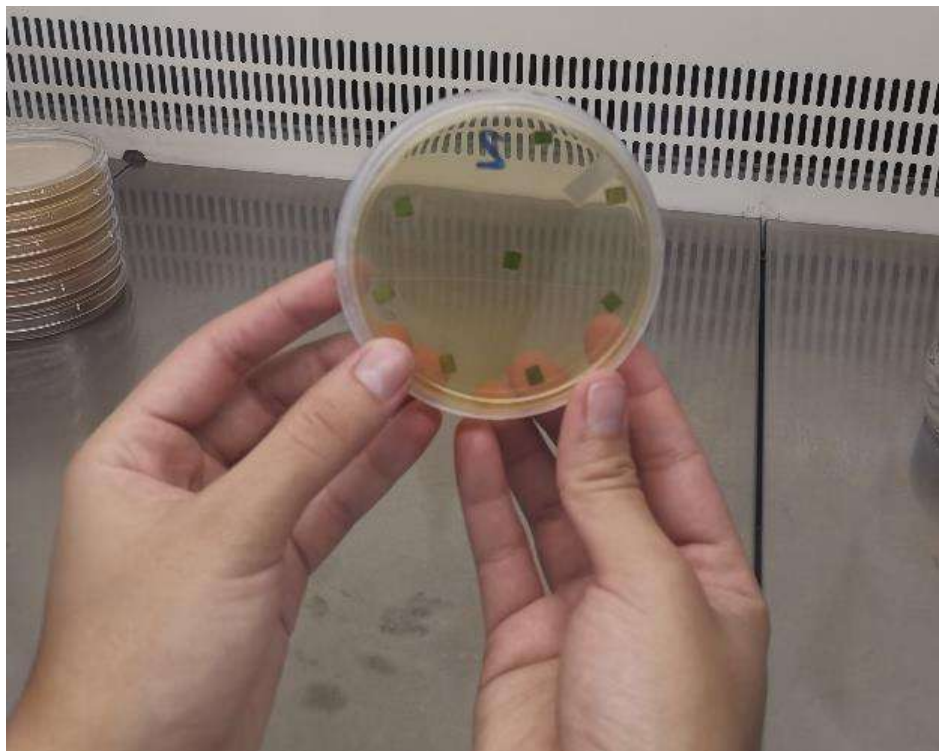


Figura 15. Cortes de hoja sembrados en platos Petri con MEA.



Figura 16. Platos Petri con los cortes almacenados.



Figura 17. Hongos endófitos creciendo de los cortes de hoja.

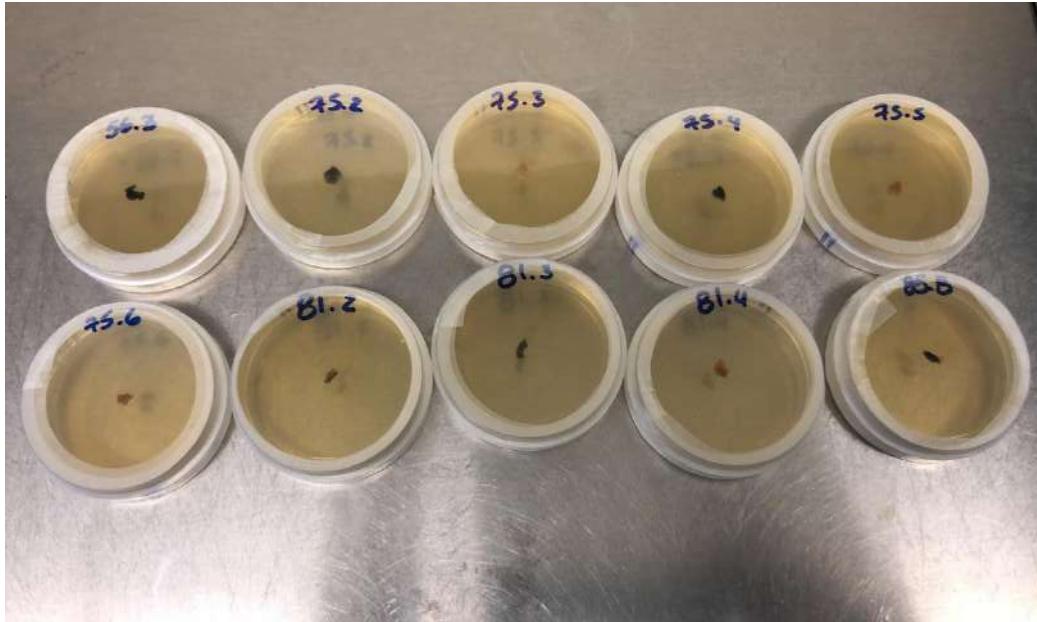


Figura 18. Hongos aislados en platos petri con PDA.

Identificación de hongos endófitos.

Técnica de Microcultivo.

En el proceso de identificación, se aplicó la técnica de microcultivo, que implica la disposición de dos portaobjetos en forma de equis sobre un plato Petri que contiene una cama de papel toalla humedecida previamente esterilizada. En los extremos de cada portaobjeto se situaron pequeños cortes de medio de cultivo, siendo distintos en cada extremo. Los medios de cultivo empleados en esta técnica comprendieron MEA, PDA, Agar V8, Agar Agua, Agar Avena y Agar Sabouraud.

Sobre estos medios de cultivo se inoculó una pequeña porción del micelio fúngico, cubriéndolo posteriormente con un cubreobjetos. Esta acción se realizó con el propósito de que, conforme el micelio se desarrolla, quedará adherido al cubreobjetos, lo cual facilita la observación de las estructuras sexuales.

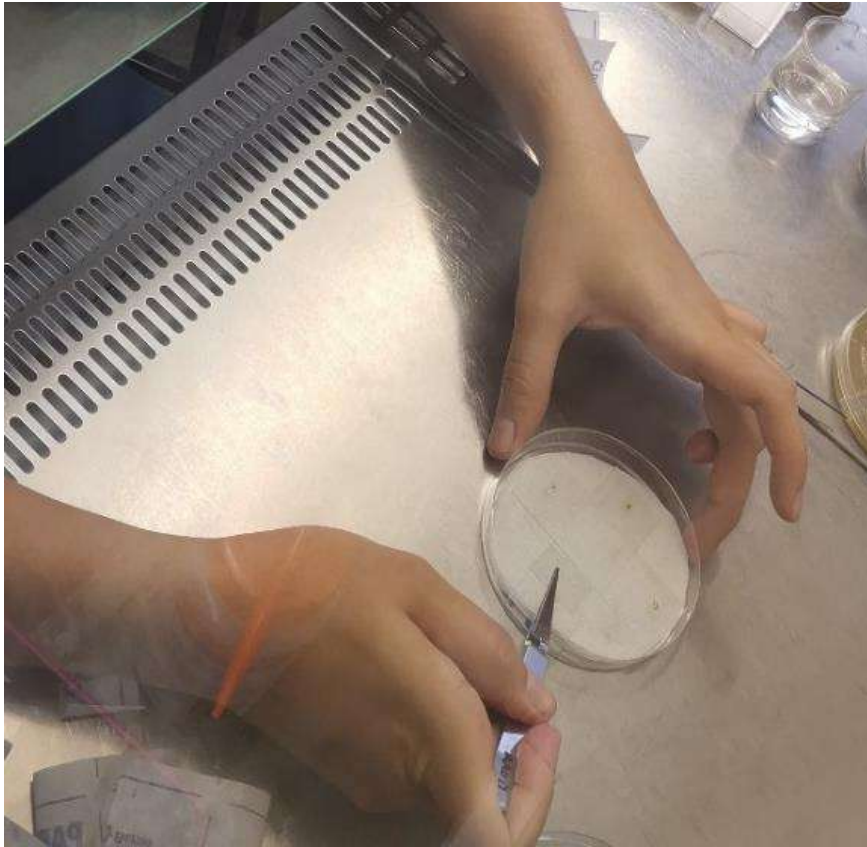


Figura 19. Cubreobjetos siendo colocado sobre un corte de medio de cultivo y corte de hongo endófito aislado.

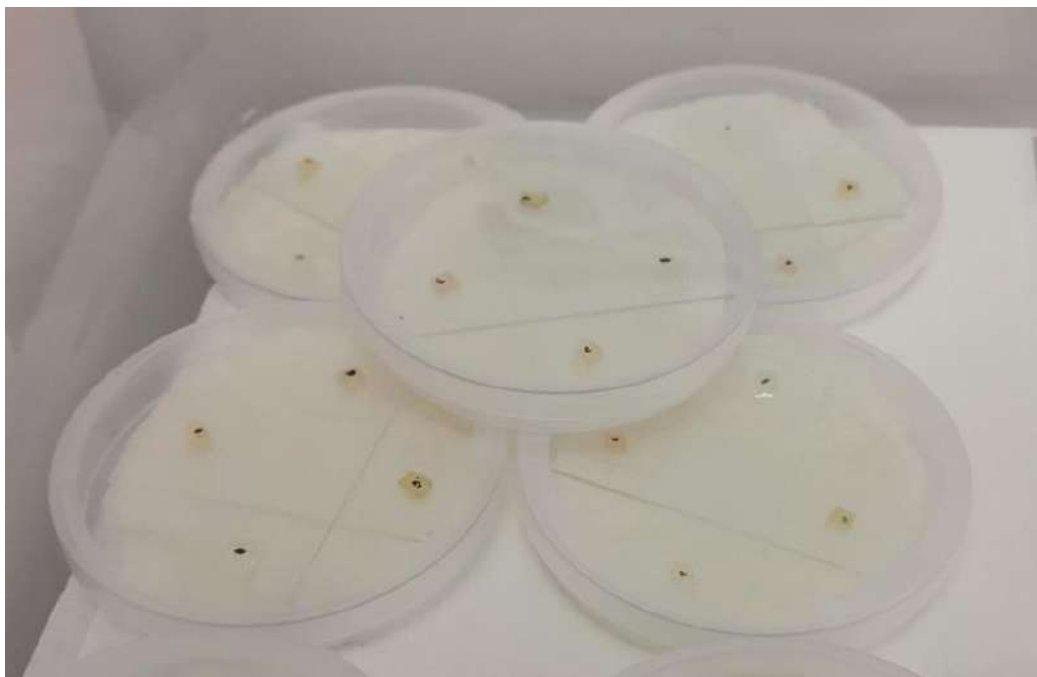


Figura 20. Platos Petri con microcultivos siendo incubados para crecimiento.

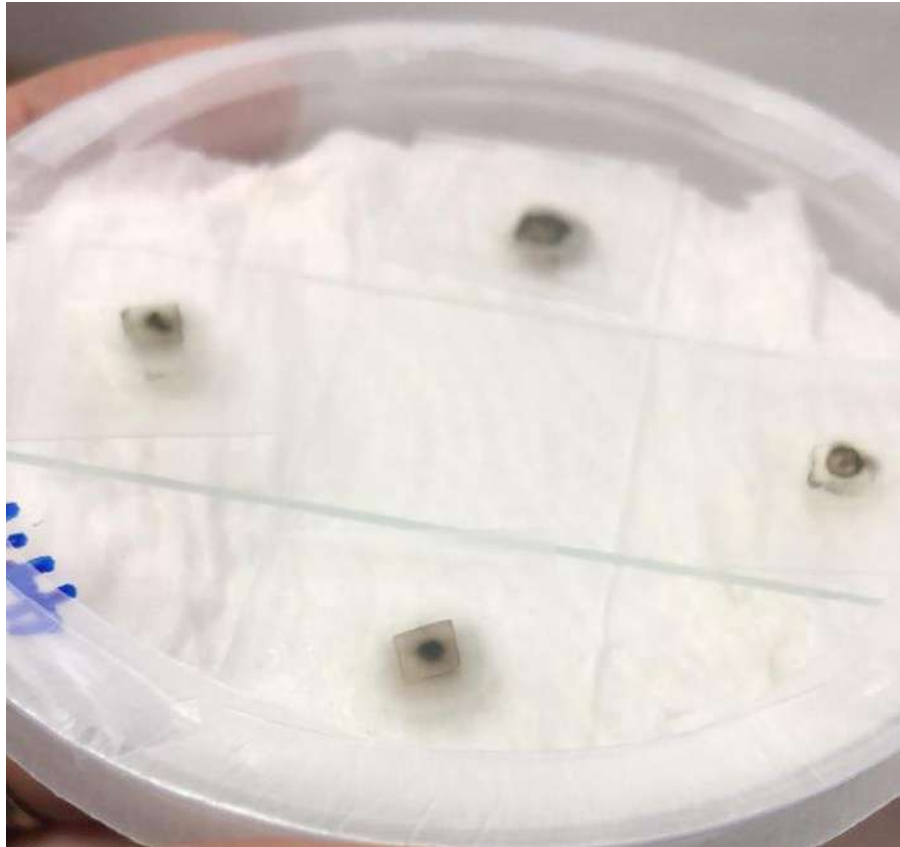


Figura 21. Micelio creciendo sobre el medio de cultivo y debajo de los cubreobjetos.

Una vez que el micelio alcanzó su crecimiento adecuado, se retiró el cubreobjetos y se transfirió a otro portaobjetos que ya había sido tratado con una gota de azul de lactoglicerol, utilizado para la tinción de las estructuras fúngicas presentes. A continuación, se procedió a la observación de las placas bajo un microscopio óptico equipado con objetivos de 4x, 10x, 40x y 100x, utilizando aceite de inmersión.



Figura 22. Cubreojetos con micelio siendo retirado.

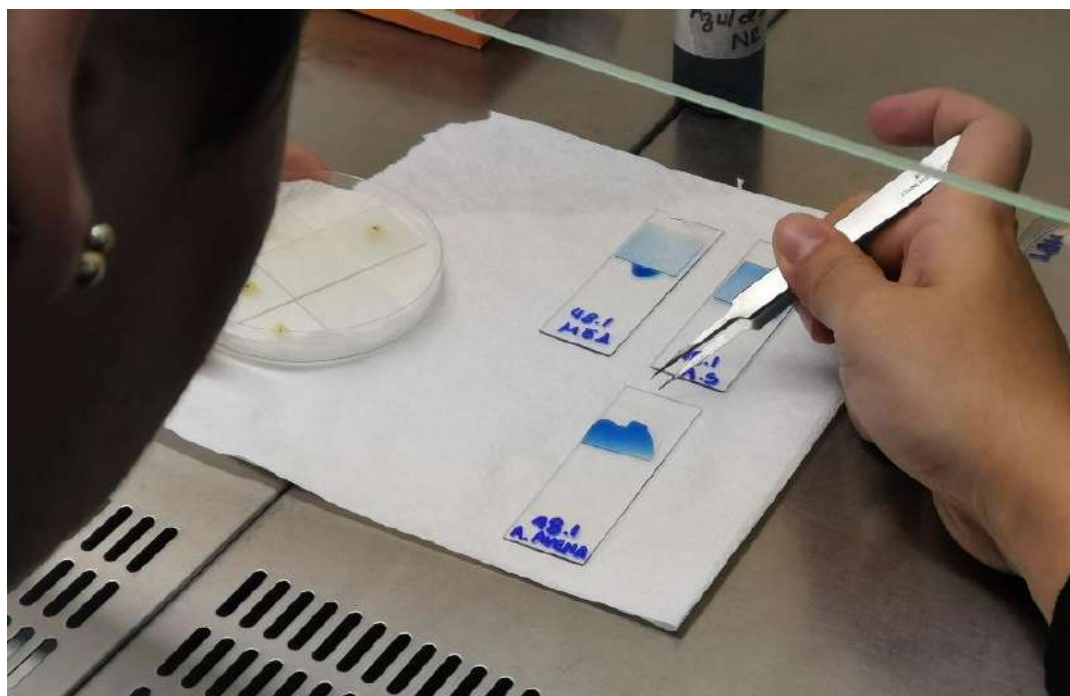


Figura 23. Cubreobjetos con micelio siendo colocado en un portaobjetos con una gota de azul de lactoglicerol.

Observación e Identificación Microscópica de Microcultivos

La identificación de las estructuras observadas se realizó con el apoyo de tres guías micológicas especializadas: St-Germain, G., & Summerbell, R. C. (1996), "Identifying filamentous fungi: A Clinical Laboratory Handbook"; Seifert, K., Morgan-Jones, G., Gams, W., & Kendrick, B. (2011), "The Genera of Hyphomycetes"; y Arnold, G. R. W. (1989), "Illustrated genera of imperfect fungi" (cuarta edición). Estas guías nos proporcionaron claves taxonómicas específicas para la identificación de las estructuras microscópicas.

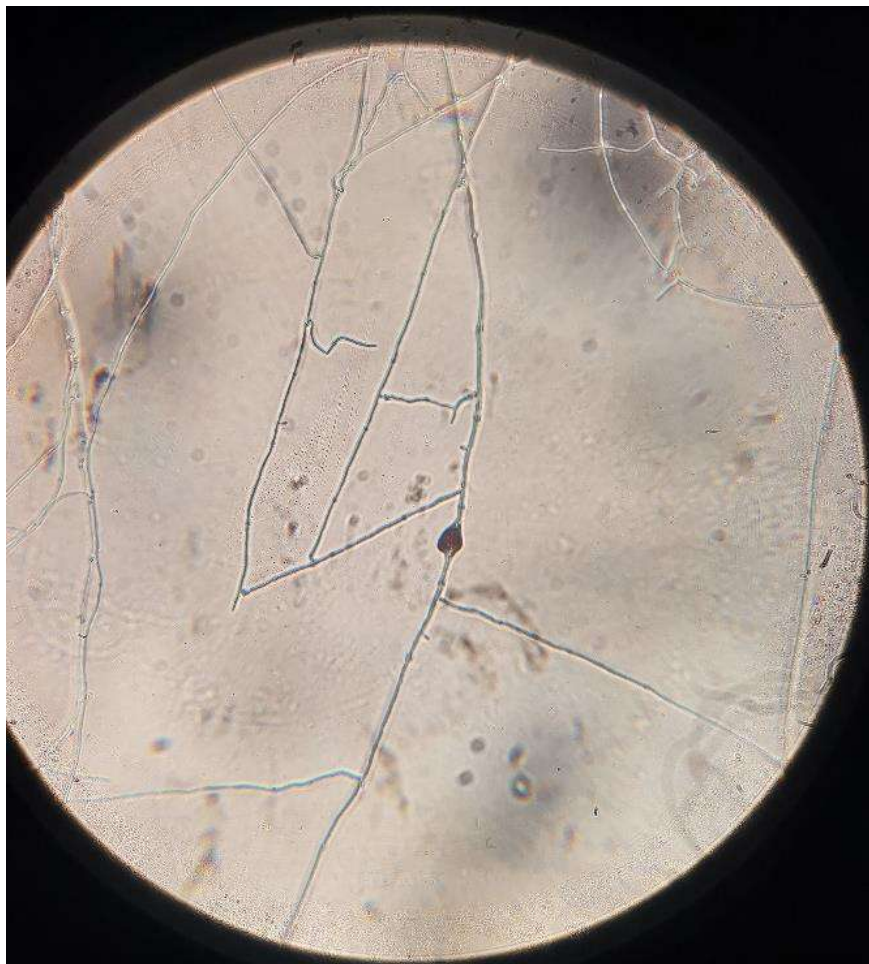


Figura 24. Fotografía microscópica de micelio estéril.

Análisis de diversidad de hongos endófitos.

Para el análisis de diversidad de hongos endófitos se ha empleado una combinación de software para el análisis y visualización de datos. En particular, se ha utilizado Microsoft Excel

versión 2407 para la manipulación inicial de los datos y la creación de tablas básicas, lo que permitió una comprensión preliminar y una organización eficiente de la información.

Por otro lado, se ha recurrido a "R version 4.3.3 (2024-02-29 ucrt)" para realizar análisis estadísticos más complejos y detallados.

Para calcular el índice Shannon y el índice de Simpson utilizamos el paquete "vegan".

En RStudio se utilizó para la elaboración de heatmaps y treemaps con el fin de representar los datos de manera que facilitaran su interpretación visual. Para la confección de heatmaps se empleó el paquete "gplots", mientras que para la generación de treemaps se utilizó el paquete "treemap". Estas herramientas permitieron una visualización más intuitiva y clara de los datos, lo cual es fundamental para el análisis y la interpretación precisa de los resultados obtenidos.

RESULTADOS

En este estudio se obtuvieron un total de 291 aislamientos de hongos endófitos a partir de hojas de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.). Estos aislamientos fueron agrupados en función de sus características macromorfológicas, como la forma y altura de la colonia, bordes de la colonia, presencia de micelio aéreo, color del micelio, tasa de crecimiento (rápido, moderado o lento), profundidad de crecimiento, entre otros caracteres evaluados visualmente. Se identificaron 52 morfotipos a partir de la primera colecta, correspondiente a la estación seca, y 91 morfotipos a partir de la segunda colecta, realizada durante la estación lluviosa.

Los morfotipos fueron numerados secuencialmente, comenzando desde el número 1 en la primera colecta, lo que resultó en la existencia de dos morfotipos para algunos hongos en cada colecta, uno correspondiente a la colecta 1 y otro a la colecta 2.

Durante la primera colecta, realizada durante la temporada lluviosa, se identificaron un total de 52 morfotipos. El morfotipo 1 exhibió una dominancia significativa en el grupo, con un total de 22 individuos, siendo este un 18.18% de los 121 hongos aislados, seguido por el morfotipo 2, que contaba con 7 individuos, siendo este un 5.79%.

En la segunda colecta, llevada a cabo durante la temporada seca, se registraron un total de 83 morfotipos. En esta instancia, el morfotipo 53 mostró una dominancia marcada, con un total de 27 individuos, siendo este un 15.88% de los 170 hongos aislados, mientras que el morfotipo 54 presentó 11 individuos, siendo este un 6.47%.

Es crucial destacar que, en ambas sesiones de colecta, el morfotipo dominante varió. En la primera colecta, el grupo dominante correspondió al morfotipo 30.1, mientras que, en la segunda colecta, el grupo dominante fue representado por el morfotipo 75.2.

Sin embargo, estas limitaciones pueden superarse mediante el uso de herramientas moleculares para la identificación precisa de las especies de hongos endófitos estudiadas.



Figura 25. Fotografía microscópica de Paecilomyces, aumento x100 lente de inmersión en tinción azul de lactoglicerol.



Figura 26. Fotografía microscópica de *Penicillium*, aumento x100 lente de inmersión en tinción azul de lactoglicerol.

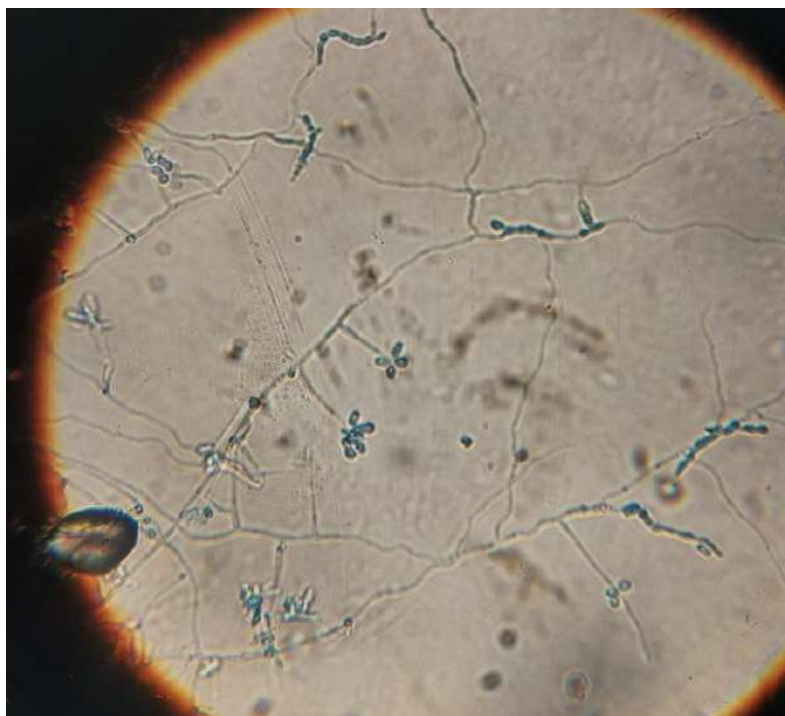


Figura 27. Fotografía microscópica de *Sporothrix*, aumento x100 lente de inmersión en tinción azul de lactoglicerol.

En el proceso de aislamiento descrito anteriormente, se obtuvo un total de 291 hongos endófitos a partir de las muestras recolectadas. Sin embargo, solo 8 de estos hongos demostraron la capacidad de esporulación en condiciones de laboratorio. Estos hongos pertenecen a los géneros: *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Sporothrix*.

A pesar de los esfuerzos dedicados a inducir la esporulación en los hongos endófitos, los resultados no fueron favorables. Aunque los hongos crecieron vigorosamente en los medios de cultivo, al examinar las placas bajo el microscopio, no se observó el desarrollo de estructuras reproductivas en el micelio de la mayoría de los aislamientos. Los medios de cultivo utilizados fueron seleccionados de acuerdo con la literatura consultada, pero otros factores ambientales críticos, como la exposición a radiación ultravioleta y la salinidad específica del entorno del manglar, no pudieron ser replicados adecuadamente en el laboratorio. Estos factores ambientales son esenciales para la esporulación y su ausencia podría haber influido en los resultados observados. La reproducción de los hongos es un proceso complejo, condicionado por un conjunto de variables ambientales que no se lograron simular en el laboratorio, lo que podría explicar el fracaso en la inducción de esporulación.

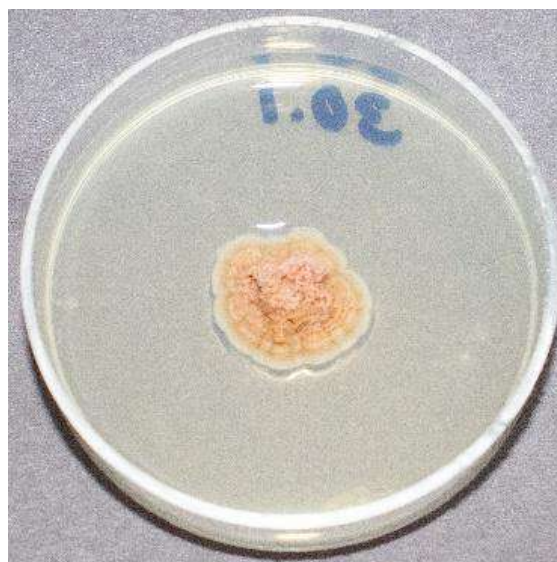


Figura 28. Morfotipo 1 hongo 30.1

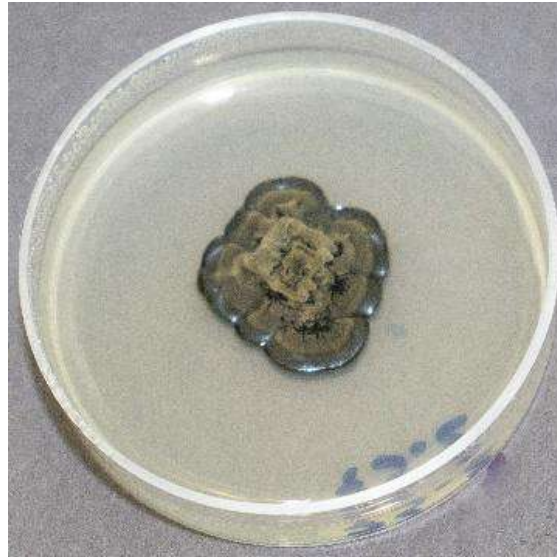


Figura 29. Morfotipo 53 hongo 75.2

Con base en los datos recopilados, podemos determinar que:

Para la primera colecta, los cálculos revelan que el índice de Shannon es de 3.158857 y el índice de Simpson es de 0.9346452. Estos resultados indican la presencia de una notable diversidad en el grupo de la colecta número 1. No obstante, también sugieren la existencia de dominancia por parte de un morfotipo específico.

En cuanto a la segunda colecta, los cálculos muestran un índice de Shannon de 3.513764 y un índice de Simpson de 0.9424978. Estos valores sugieren una elevada diversidad dentro de este grupo, al igual que en la colecta anterior. Asimismo, se observa una dominancia por un morfotipo particular en esta segunda colecta.

Estos resultados nos brindan una visión inicial sobre la diversidad y la dominancia de los morfotipos en ambas colectas. Sin embargo, es importante realizar un análisis más detallado.

En la segunda colecta, se observó un incremento significativo en la cantidad de hongos endófitos aislados en comparación con la primera. Para analizar y presentar los datos de manera más efectiva, se empleó el software estadístico RStudio para generar mapas de calor (heatmaps). Estos mapas permiten visualizar patrones de distribución y abundancia de los

hongos endófitos de manera clara y comprensible, facilitando así la interpretación de los resultados y la identificación de tendencias relevantes en la diversidad de las comunidades fúngicas.

En la Figura 30, se presenta un heatmap que ilustra la distribución de hongos aislados por hoja durante la primera colecta. Este gráfico revela una mayor concentración de hongos aislados en el primer grupo de hojas, destacando así patrones de distribución que podrían ser relevantes para el análisis comparativo.

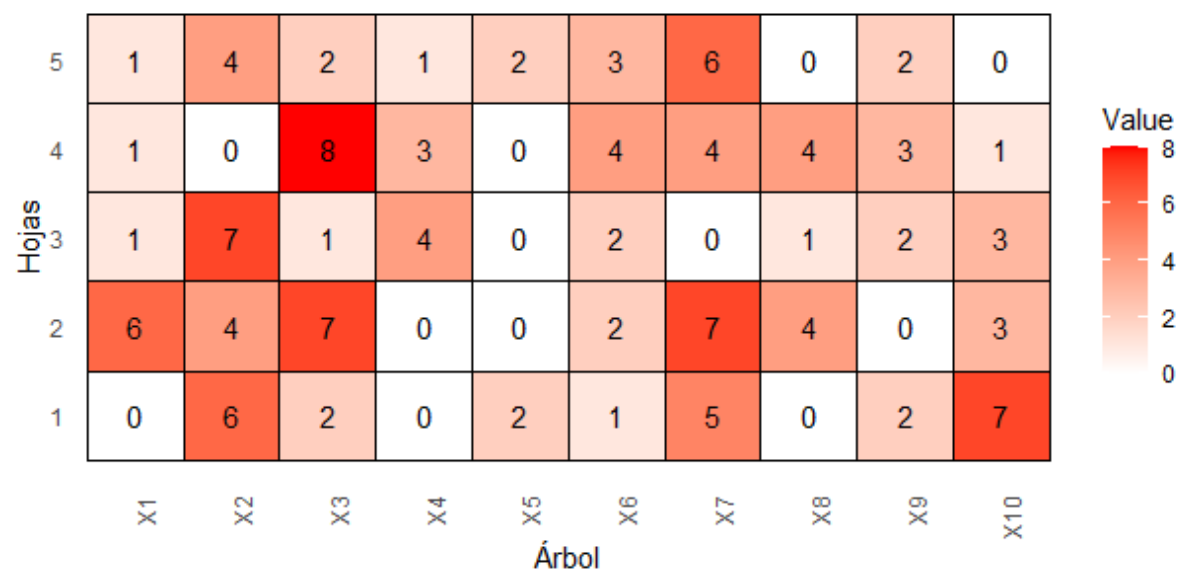


Figura 30. Hongos aislados por hoja y árbol colecta 1.

Similar a la Figura 30, en la Figura 31 se muestra la cantidad de hongos aislados por hoja durante la segunda colecta. En este caso, se observa una mayor concentración de hongos en el último grupo de hojas recolectadas.

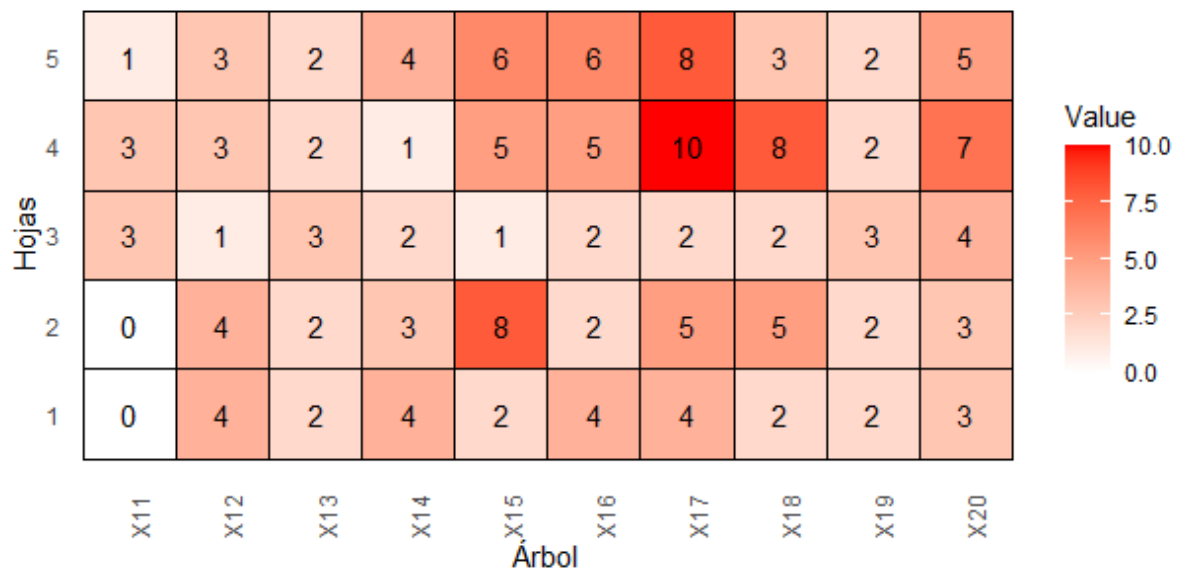


Figura 31. Hongos aislados por hoja y árbol colecta 2.

En la figura 32 se presentan los morfotipos de hongos aislados por hoja, siguiendo una distribución similar a la observada en el heatmap de la figura 30. Este patrón refuerza la consistencia en la diversidad y abundancia de morfotipos a lo largo del primer grupo de hojas recolectadas.



Figura 32. Morfotipos de hongos aislados por hoja y árbol colecta 1.

En la figura 33 se muestran los morfotipos de hongos aislados por hoja, manteniendo el mismo patrón de distribución observado en la figura 31, lo que muestra una mayor diversidad y abundancia de morfotipos en el último grupo de hojas recolectadas.

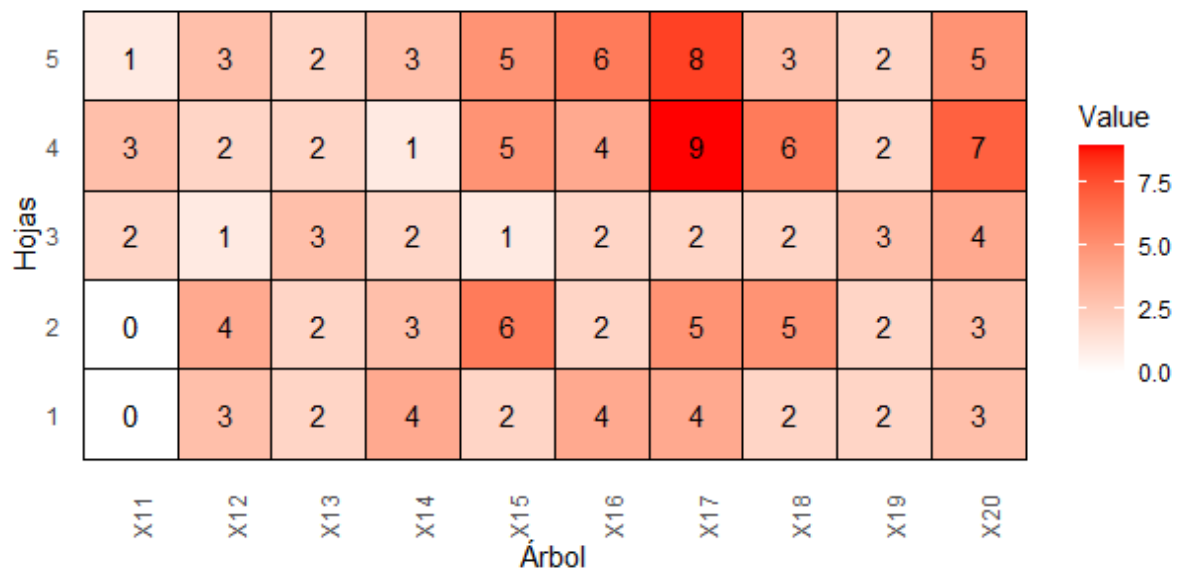


Figura 33. Morfotipos de hongos aislados por hoja y árbol colecta 2.

En la figura 34 se presenta un treemap que ilustra los morfotipos y su abundancia relativa. Los morfotipos representados en color verde indican una mayor cantidad de individuos, mientras que los morfotipos en color rojo muestran una menor cantidad de individuos, permitiendo una visualización clara de la distribución y predominancia de los diferentes morfotipos.

Morfotipos colecta 1

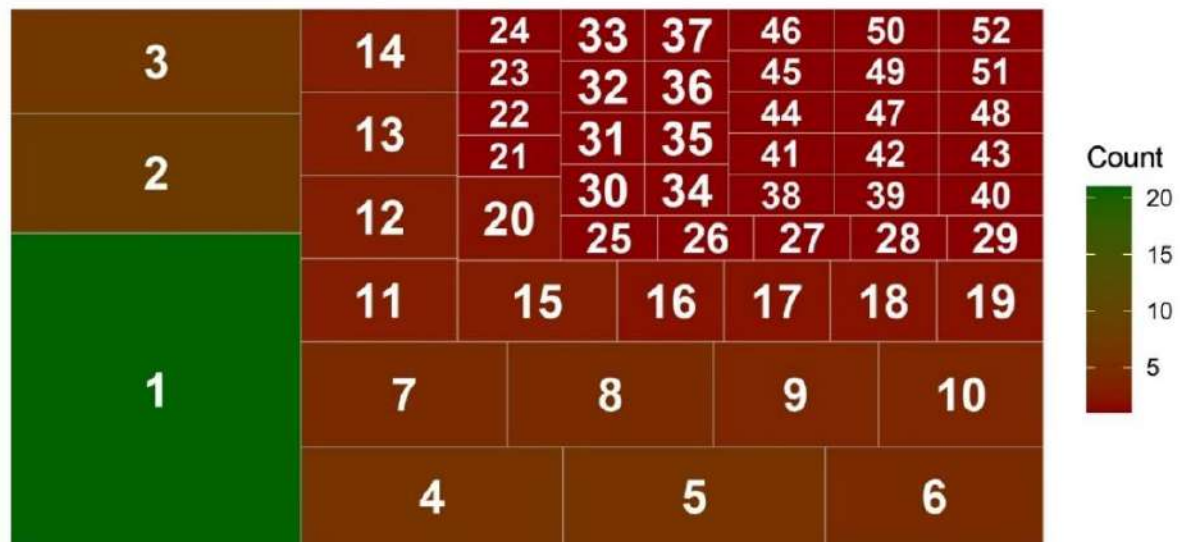


Figura 34. Mapa de árbol (treemap) con los morfotipos aislados de la colecta 1.

En la figura 35 se presenta un treemap que ilustra los morfotipos de la segunda colecta. Se observa un aumento en la cantidad de morfotipos aislados, aunque se mantiene el mismo patrón que en el treemap anterior, donde un solo morfotipo predomina en el grupo.

Morfos colecta 2

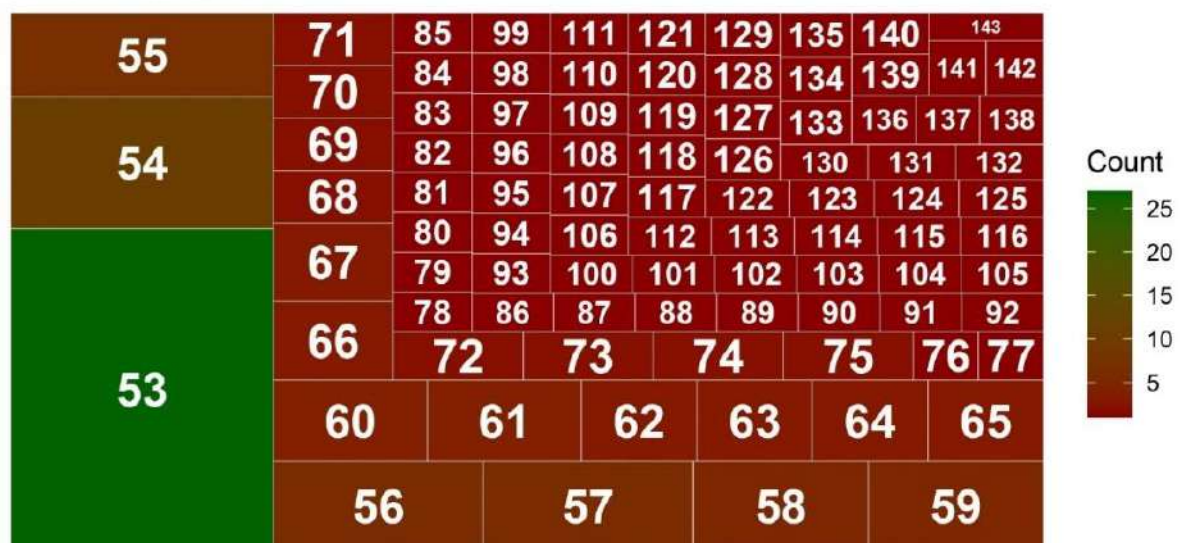


Figura 35. Mapa de árbol (treemap) con los morfotipos de la colecta 2.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en términos de diversidad muestran ciertas similitudes con los hallazgos documentados en la literatura. Sin embargo, es esencial destacar que nuestra metodología de identificación se basó en la evaluación morfológica, en contraste con los métodos moleculares utilizados en algunos estudios consultados. A pesar de la adopción de los protocolos de cultivo descritos en la literatura, no se logró inducir la esporulación con éxito en nuestra investigación, por ese motivo la clasificación de los grupos por morfotipos se realizó mediante observación de caracteres macromorfológicos visibles, tales como altura de la colonia, bordes de la colonia, presencia de micelio aéreo, color del micelio, entre otras características descritas.

Se observó que el número total de morfotipos obtenidos es inferior al reportado en la tesis de Rojas E. (2000), titulada "Diversidad, abundancia y especificidad de microhongos asociados con hojas en tres especies de mangle (*Rhizophora mangle*, *Laguncularia racemosa* y *Avicennia germinans*)", quien utilizó técnicas de aislamiento similares. Sin embargo, mientras que en dicho estudio se trabajó con tres especies de mangle, nuestra investigación se centró exclusivamente en *Rhizophora mangle*. Además, aunque el número de hojas muestreadas por individuo fue mayor en nuestro estudio (5 hojas por individuo en comparación con 3 en el estudio de Rojas), el total de morfotipos resultó menor. Nuestra investigación incluyó 100 hojas recolectadas del Caribe panameño, mientras que el estudio de Rojas analizó 30 hojas provenientes de la costa del Pacífico de Panamá, en donde obtuvo 394 hongos aislados y 183 morfotipos en *R. mangle*. Es importante subrayar que nuestro estudio se realizó únicamente en las costas del Caribe panameño.

Según las investigaciones realizadas por el cartógrafo y profesor de la Universidad de Panamá Jean Guevara en el año 2020, se ha registrado una extensión considerablemente mayor de bosques de manglar en las costas del Pacífico en comparación con las del Caribe. Anteriormente, ya se había reportado que existía una mayor diversidad en bosques de

manglar del Pacífico comparado con los presentes en el Caribe (Jiménez, 1992). Esta diferencia en la extensión y diversidad entre ambas costas podría sugerir la posibilidad de una mayor adaptación y colonización por parte de los microorganismos que en ellos habitan.

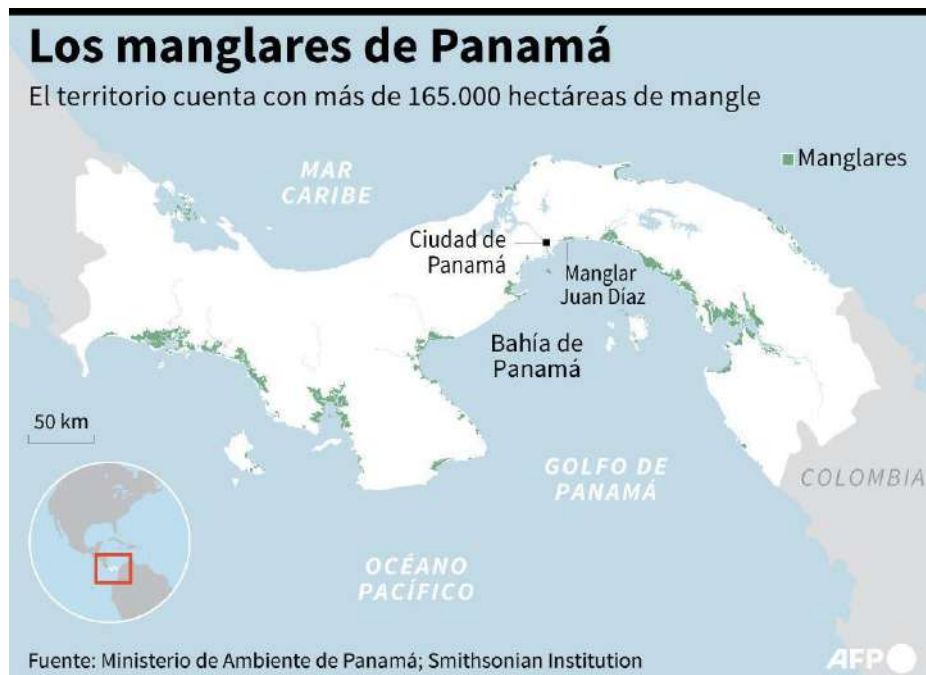


Figura 36. Mapa de la distribución de los bosques de manglar en la República de Panamá hecho por el Ministerio de Ambiente de Panamá y el Instituto de Investigaciones Tropicales Smithsonian.

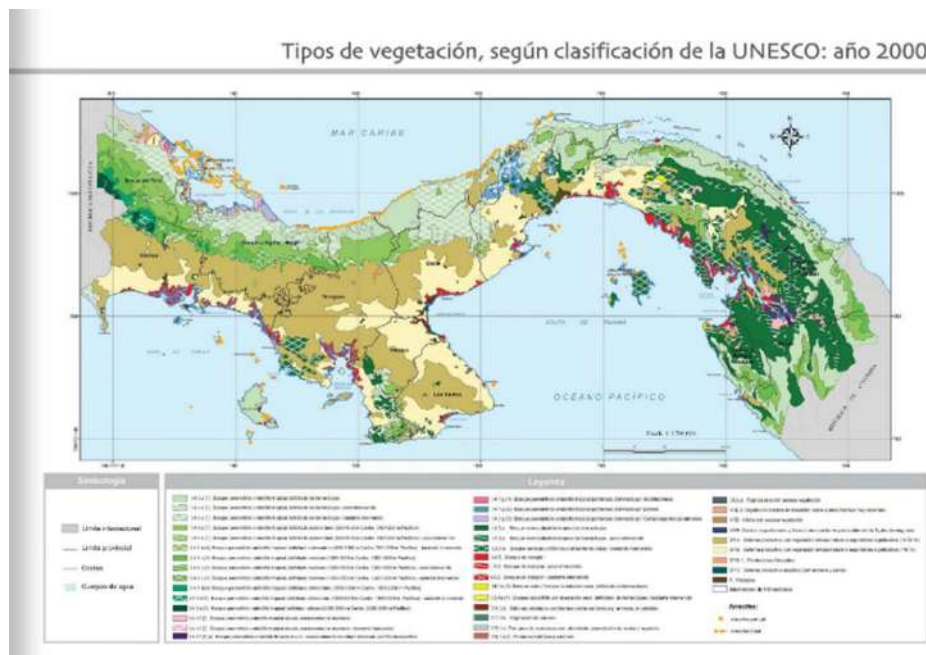


Figura 37. Mapa de tipos de vegetación en Panamá en Atlas Ambiental de la República de Panamá 2010.

Autoridad Nacional del Ambiente ANAM, pág 51.

En un estudio llevado a cabo por Bolaños y colaboradores (Bolaños et al., 2015), se investigó la diversidad filogenética de hongos asociados a esponjas marinas en las regiones del Caribe y del Pacífico en Panamá. Los resultados revelaron un índice alfa de Fisher de 32.07 para el Caribe y de 39.22 para el Pacífico, indicando una mayor riqueza de especies fúngicas cultivables en la región del Pacífico.

Además, se analizaron los patrones ecológicos de la macrofauna en las playas de Costa Rica, comparando las regiones del Pacífico y del Caribe. Los resultados indicaron que las playas del Pacífico presentaban un promedio de 15 ± 9 taxones por playa, mientras que en el Caribe se encontraron 4 ± 1 taxones por playa, lo que indica una mayor diversidad de fauna en las playas del Pacífico (Sibaja-Cordero et al., 2019). Es importante destacar que, aunque estos organismos no pueden ser comparados directamente debido a sus diferencias intrínsecas, comprender las variaciones en la diversidad entre ambas costas es de vital importancia.

Finalmente, en la investigación llevada a cabo por Solano y colaboradores (Solano et al., 2009), se estudió la diversidad de actinomicetos en las costas del Pacífico norte y del Caribe de Costa Rica. Los resultados indicaron la presencia de 10 y 8 géneros de actinomicetos en los sitios estudiados del Pacífico, y de 7 y 9 géneros en los del Caribe, respectivamente.

Sin embargo, los resultados de nuestro estudio muestran una diversidad significativa de morfotipos de hongos endófitos en el manglar, como se evidencia por el número de morfotipos identificados en cada colecta. Este hallazgo sugiere que los manglares son hábitats ricos en diversidad fúngica, lo que respalda la hipótesis de que los hongos endófitos cuentan con una gran diversidad en estos ecosistemas.

La presencia de una diversidad fúngica saludable en el manglar puede tener importantes implicaciones para la salud y la resiliencia del ecosistema en su conjunto. Se sabe que los hongos endófitos desempeñan roles importantes en la protección de las plantas hospedadoras contra patógenos, la mejora de la tolerancia al estrés y la promoción del crecimiento de las

plantas (Yan et al., 2019). Por lo tanto, la diversidad de hongos endófitos en el manglar puede contribuir a su capacidad para resistir disturbios ambientales y mantener su función ecológica.

Durante el primer muestreo, realizado al comienzo de la temporada de lluvias, se observó una menor diversidad y cantidad de hongos aislados de las hojas de *R. mangle* en comparación con la segunda colecta, realizado después de la temporada de lluvias. Este aumento en la segunda colecta puede atribuirse a lo que hemos mencionado anteriormente, la disminución de la salinidad en las áreas de manglar debido a las lluvias, lo que facilita la supervivencia de esporas y micelios para colonizar el tejido de los árboles, incluyendo sus hojas. Además, las lluvias transportan esporas que pueden caer directamente en los bosques de manglar, lo que promueve la colonización por diferentes especies de hongos.

CONCLUSIONES

1. Diversidad estacional de hongos endófitos: Los resultados de esta investigación revelan que la diversidad de hongos endófitos en hojas de mangle rojo es significativamente mayor después de la época lluviosa. La segunda colecta, realizada tras el período de lluvias, mostró una mayor variedad de morfotipos en comparación con la primera colecta, que se llevó a cabo al inicio de la temporada lluviosa. Esto sugiere que las condiciones ambientales post-lluvia, como la humedad residual y el incremento de materia orgánica, pueden favorecer la proliferación y diversificación de estos hongos.

2. Influencia de factores ambientales: Las diferencias en la diversidad entre las dos colectas indican que los factores ambientales, particularmente los cambios estacionales, desempeñan un papel crucial en la composición y dinámica de las comunidades de hongos endófitos. La variación en las condiciones climáticas, como la temperatura y la humedad, probablemente afecta la colonización y el desarrollo de estos hongos en el tejido foliar de *Rhizophora mangle*.

3. Identificación basada en morfotipos: La identificación de los hongos endófitos se basó en características morfológicas observables, lo cual proporcionó una visión inicial de la diversidad presente. Aunque este enfoque es útil para obtener una evaluación preliminar, destaca la necesidad de integrar métodos moleculares en futuras investigaciones para lograr una identificación detallada y precisa de las especies presentes. Esto permitirá una mejor comprensión de la biodiversidad y las interacciones ecológicas en estos ecosistemas.

4. Importancia de los hongos endófitos: Los hongos endófitos desempeñan roles vitales en los ecosistemas de manglares, contribuyendo a la salud de las plantas hospederas y al equilibrio ecológico. La diversidad observada en este estudio resalta su potencial importancia en la adaptación de los manglares a las fluctuaciones ambientales y en la provisión de servicios ecosistémicos, como la protección contra patógenos y el reciclaje de nutrientes.

5. Contribuciones al conocimiento local y regional: Esta investigación contribuye al conocimiento de la biodiversidad fúngica en las costas del Caribe panameño, proporcionando datos que son esenciales para la conservación y manejo de estos ecosistemas críticos. Los hallazgos de este estudio pueden servir como base para futuras investigaciones sobre la función ecológica de los hongos endófitos y su potencial aplicación biotecnológica en la región.

RECOMENDACIONES

Dado que la diversidad y la dominancia de los morfotipos en las colectas pueden ser influenciadas por una serie de variables ambientales y biológicas, sería prudente explorar técnicas adicionales de análisis de datos. Por ejemplo, el uso de software estadístico como Python con bibliotecas especializadas como SciPy, pandas, ampliar las variables en R o

incluso herramientas de análisis de datos específicas para ecología podrían ofrecer una visión más profunda y precisa de los patrones observados en las colectas de hongos.

Sería valioso complementar los análisis cuantitativos con investigaciones cualitativas que exploren aspectos tales como la distribución geográfica de los morfotipos, sus interacciones ecológicas y su relación con factores ambientales específicos. Estos enfoques integrados podrían proporcionar una comprensión más completa de la dinámica de los morfotipos de hongos en los ecosistemas estudiados.

Además, considerando la relevancia ecológica y potencial aplicabilidad de los resultados, sería beneficioso llevar a cabo análisis de correlación con variables ambientales, como la temperatura, la humedad, la disponibilidad de nutrientes y otros factores específicos del hábitat. Esto permitiría identificar posibles relaciones causales entre estas variables y la diversidad de morfotipos, lo que contribuiría a una comprensión más profunda de los mecanismos que regulan la composición y la distribución de los hongos en el ecosistema estudiado.

A pesar de los resultados prometedores, el estudio presenta algunos desafíos que ofrecen valiosas oportunidades para futuras investigaciones. La limitada esporulación de los hongos endófitos en el laboratorio sugiere que muchas cepas pueden requerir condiciones específicas, no replicables en un entorno controlado, para completar su ciclo de vida. Este hallazgo subraya la necesidad de optimizar las condiciones de cultivo para fomentar la esporulación, lo cual es crucial para la identificación taxonómica y el estudio de la biodiversidad de estos organismos.

Como recomendación, futuras investigaciones deberían considerar la realización de estudios de campo más exhaustivos, complementados con la aplicación de técnicas moleculares para analizar la diversidad fúngica en el manglar. Además, sería beneficioso explorar la relación entre la diversidad de hongos endófitos y factores ambientales clave, como la salinidad, la

humedad y la temperatura, para mejorar la comprensión de los mecanismos que influyen en la distribución y abundancia de estos organismos en su hábitat natural.

REFERENCIAS

- Abello, J. F., & Kelemu, S. (2007). Hongos endófitos: Ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 7(2), 55-57. <https://doi.org/10.21930>
- Adamatzky, A. (2022). Language of fungi derived from their electrical spiking activity. *Royal Society Open Science*, 9(4), 211926. <https://doi.org/10.1098/rsos.211926>
- Álvarez, X., Tamayo, R., Almeida, D., Robles, S., & Moscoso, A. (n.d.). NUEVOS REGISTROS DE ASCOMICETOS MARINOS MANGLÍCOLAS PARA EL ECUADOR.
- Ananda, K., & Sridhar, K. R. (2002). Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the west coast of India. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(10), 871–878. <https://doi.org/10.1139/w02-080>
- Arnold, A. E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: Progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, 21(2–3), 51–66. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.003>
- Arnold, A. E., Mejía, L. C., Kylo, 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.2533483100>
- Bezerra, J. D. P., Santos, M. G. S., Barbosa, R. N., Svedese, V. M., Lima, D. M. M., Fernandes, M. J. S., Gomes, B. S., Paiva, L. M., Almeida-Cortez, J. S., & Souza-Motta, C. M. (2013). Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: A first study. *Symbiosis*, 60(2), 53–63. <https://doi.org/10.1007/s13199-013-0243-1>
- Bolaños, J., De León, L. F., Ochoa, E., Darías, J., Raja, H. A., Shearer, C. A., Miller, A. N., Vanderheyden, P., Porras-Alfaro, A., & Caballero-George, C. (2015). Phylogenetic Diversity of Sponge-Associated Fungi from the Caribbean and the Pacific of Panama

- and Their In Vitro Effect on Angiotensin and Endothelin Receptors. *Marine Biotechnology*, 17(5), 533–564. <https://doi.org/10.1007/s10126-015-9634-z>
- Carroll, G. (1988). Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont. *Ecology*, 69(1), 2–9. <https://doi.org/10.2307/1943154>
- Castillo, G., & Demoulin, V. (1997). NaCl salinity and temperature effects on growth of three wood-rotting basidiomycetes from a Papua New Guinea coastal forest. *Mycological Research*, 101(3), 341–344. <https://doi.org/10.1017/S0953756296002717>
- Chaeprasert, S., Piapukiew, J., Whalley, A. J. S., & Sihanonth, P. (2010). Endophytic fungi from mangrove plant species of Thailand: Their antimicrobial and anticancer potentials. *Botanica Marina*, 53(6). <https://doi.org/10.1515/bot.2010.074>
- Costa, I. P. M. W., Maia, L. C., & Cavalcanti, M. A. (2012). Diversity of leaf endophytic fungi in mangrove plants of Northeast Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3), 1165–1173. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000300044>
- Dreyfuss, M. M., & Chapela, I. H. (1994). Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, 26, 49–80. <https://doi.org/10.1016/b978-0-7506-9003-4.50009-5>
- Estrada, C., Wcislo, W. T., & Van Bael, S. A. (2013). Symbiotic fungi alter plant chemistry that discourages leaf-cutting ants. *The New Phytologist*, 198(1), 241–251. <https://doi.org/10.1111/nph.12140>
- Figueroa-Negrón, V. (2018). *Endophytic fungi associated with the black mangrove Avicennia germinans in Cabo Rojo, Puerto Rico: Their antimicrobial potential*. <https://hdl.handle.net/20.500.11801/1867>
- Fisher, P. J., & Petrini, O. (1987). Location of fungal endophytes in tissues of Suaeda fruticosa: A preliminary study. *Transactions of the British Mycological Society*, 89(2), 246–249. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(87\)80161-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(87)80161-4)
- Fricker, M., Boddy, L., & Bebbber, D. (2007). Network Organisation of Mycelial Fungi. In R. J. Howard & N. A. R. Gow (Eds.), *Biology of the Fungal Cell* (Vol. 8, pp. 309–330). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-70618-2_13

- Gadd, G. M. (2007). Geomycology: Biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research*, 111(1), 3–49. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.12.001>
- Gao, F., Dai, C., & Liu, X. (n.d.). *Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens*.
- Gao, F.-K., Dai, C.-C., & Liu, X.-Z. (2010). Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, 4, 1346–1351.
- Jiménez, J. A. (1992). Mangrove Forests of the Pacific Coast of Central America. In *Coastal Plant Communities of Latin America* (pp. 259–267). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092567-7.50022-2>
- Khoon, G. W. (1987). P. B. Tomlinson 1986. The botany of mangroves. Cambridge University Press, Cambridge. 413 pages. ISBN 0-521-25567-8. Price: £47.50 or US\$69.50 (hardback). *Journal of Tropical Ecology*, 3(2), 188–189.
<https://doi.org/10.1017/S0266467400002017>
- Kohlmeyer, J. (1984). Tropical Marine Fungi*. *Marine Ecology*, 5(4), 329–378.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.1984.tb00130.x>
- Kumaresan, V., & Suryanarayanan, T. S. (2001). Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. *Mycological Research*, 105(11), 1388–1391.
<https://doi.org/10.1017/S0953756201004841>
- Lata, R., Chowdhury, S., Gond, S. K., & White, J. F. (2018). Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. *Letters in Applied Microbiology*, 66(4), 268–276. <https://doi.org/10.1111/lam.12855>
- Li, J.-L., Sun, X., Chen, L., & Guo, L.-D. (2016). Community structure of endophytic fungi of four mangrove species in Southern China. *Mycology*, 7(4), 180–190.
<https://doi.org/10.1080/21501203.2016.1258439>
- Liu, A.-R., Wu, X.-P., & Xu, T. (2007). [Research advances in endophytic fungi of mangrove]. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao = The Journal of Applied Ecology*, 18(4), 912–918.

- Lu, Y.-Z., Liu, J.-K., Chen, J., Zeng, X.-Y., & Kang, J.-C. (2023). Editorial: Insights on fungal diversity of ascomycetes and basidiomycetes: taxonomy and interaction with their host. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1245204.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1245204>
- Mapari, S. A. S., Thrane, U., & Meyer, A. S. (2010). Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? *Trends in Biotechnology*, *28*(6), 300–307.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.03.004>
- O, P. (1992). Fungal endophytes of bracken (*Pteridium aquilinum*), with some reflections on their use in biological control. *Sydowia*, *44*, 282–293.
- Petrini, O., & Carroll, G. (1981). Endophytic fungi in foliage of some Cupressaceae in Oregon. *Canadian Journal of Botany*, *59*(5), 629–636. <https://doi.org/10.1139/b81-089>
- Prensa. (2019, August 16). *MIAMBIENTE RESALTA LA IMPORTANCIA AMBIENTAL QUE TIENE LOS MANGLARES* - *MiAmbiente*. <https://miambiente.gob.pa/miambiente-resalta-la-importancia-ambiental-que-tiene-los-manglares/>
- Prensa. (2021, August 15). *Panamá: El país con más especies de manglar del continente americano* - *MiAmbiente*. <https://miambiente.gob.pa/panama-el-pais-con-mas-especies-de-manglar-del-continente-americano/>
- Prihanto, A. A., Firdaus, M., & Nurdiani, R. (n.d.). *Endophytic Fungi Isolated from Mangrove (Rhizophora mucronata) and Its Antibacterial Activity on Staphylococcus aureus and Escherichia coli*.
- Qi, J., Han, H., Sui, D., Tan, S., Liu, C., Wang, P., Xie, C., Xia, X., Gao, J., & Liu, C. (2022). Efficient production of a cyclic dipeptide (cyclo-TA) using heterologous expression system of filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Microbial Cell Factories*, *21*(1), 146.
<https://doi.org/10.1186/s12934-022-01872-8>
- Raghukumar, C., & Raghukumar, S. (1998). Barotolerance of fungi isolated from deep-sea sediments of the Indian Ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, *15*, 153–163.
<https://doi.org/10.3354/ame015153>

- Ravirajan, S., Maria, G. L., & Sridhar, K. (2005). Antimicrobial and Enzyme Activity of Mangrove Endophytic Fungi of Southwest Coast of India. *International Journal of Agricultural Technology*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Antimicrobial-and-Enzyme-Activity-of-Mangrove-Fungi-Ravirajan-Maria/c163ab081038466d95bd877a1e3cacca94d5a846>
- Reino Fungi. (n.d.). Retrieved August 10, 2024, from <http://www.biologia.edu.ar/fungi/>
- Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: Diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2), 314–330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
- Ruiz, M. (2023). Listado florístico y comunidades vegetales de la microcuenca Estero del Yugo, Mazatlán, Sinaloa, México. *Acta Botanica Mexicana*, 130, Article 130. <https://doi.org/10.21829/abm130.2023.2136>
- Sancho, L. G., De La Torre, R., Horneck, G., Ascaso, C., De Los Rios, A., Pintado, A., Wierzchos, J., & Schuster, M. (2007). Lichens Survive in Space: Results from the 2005 LICHENS Experiment. *Astrobiology*, 7(3), 443–454. <https://doi.org/10.1089/ast.2006.0046>
- Sarma, V. V., & Hyde, K. D. (n.d.). *A review on frequently occurring fungi in mangroves*.
- Selim, K. (2012). Biology of Endophytic Fungi. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 2(1), 31–82. <https://doi.org/10.5943/cream/2/1/3>
- Sengupta, A., & Chaudhuri, S. (2002). Arbuscular mycorrhizal relations of mangrove plant community at the Ganges river estuary in India. *Mycorrhiza*, 12(4), 169–174. <https://doi.org/10.1007/s00572-002-0164-y>
- Sharifia, M., Karimi, K., & Taherzadeh, M. J. (2008). Production of ethanol by filamentous and yeast-like forms of *Mucor indicus* from fructose, glucose, sucrose, and molasses. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(11), 1253–1259. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0422-x>
- Sibaja-Cordero, J. A., Camacho-García, Y. E., Azofeifa-Solano, J. C., & Alvado-Arranz, B. (2019). Ecological patterns of macrofauna in sandy beaches of Costa Rica: A Pacific-

Caribbean comparison. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 223, 94–104.

<https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.04.032>

Sieber, T. N., Rys, J., & Holdenrieder, O. (1999). Mycobiota in symptomless needles of *Pinus mugo* ssp. *Uncinata*. *Mycological Research*, 103(3), 306–310.

<https://doi.org/10.1017/S0953756298007229>

Simões, M. F., Antunes, A., Ottoni, C. A., Amini, M. S., Alam, I., Alzubaidy, H., Mokhtar, N.-A., Archer, J. A. C., & Bajic, V. B. (2015). Soil and Rhizosphere Associated Fungi in Gray Mangroves (*Avicennia Marina*) from the Red Sea—A Metagenomic Approach. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 13(5), 310–320.

<https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.07.002>

Solano, G., Rojas-Jiménez, K., Jaspars, M., & Tamayo-Castillo, G. (2009). Study of the diversity of culturable actinomycetes in the North Pacific and Caribbean coasts of Costa Rica. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96(1), 71–78.

<https://doi.org/10.1007/s10482-009-9337-4>

Sridhar, K. R., & Kaveriappa, K. M. (1988). Occurrence and survival of aquatic hyphomycetes in brackish and sea water. *Archiv Für Hydrobiologie*, 113(1), 153–160.

<https://doi.org/10.1127/archiv-hydrobiol/113/1989/153>

Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., & Harper, J. (2004). Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Journal of Natural Products*, 67(2), 257–268.

<https://doi.org/10.1021/np030397v>

Tan, R. X., & Zou, W. X. (2001). Endophytes: A rich source of functional metabolites (1987 to 2000). *Natural Product Reports*, 18(4), 448–459. <https://doi.org/10.1039/b100918o>

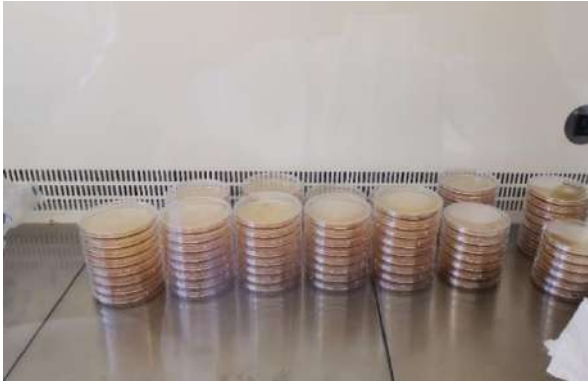
Tattar, T. A., Klekowski, E. J., & Stern, A. I. (1994). DIEBACK AND MORTALITY IN RED MANGROVE, RHIZOPHORA MANGLE L., IN SOUTHWEST PUERTO RICO. *Arboricultural Journal*, 18(4), 419–429.

<https://doi.org/10.1080/03071375.1994.9747046>

- T.S., Suryanarayanan., M.B., G. R., & S, Vidal. (2018). Biological Control Through Fungal Endophytes: Gaps In Knowledge Hindering Success. *Current Biotechnology*, 7(3), 185–198. <https://doi.org/10.2174/2211550105666160504130322>
- Vaupotic, T., Veranic, P., Jenoe, P., & Plemenitas, A. (2008). Mitochondrial mediation of environmental osmolytes discrimination during osmoadaptation in the extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*. *Fungal Genetics and Biology*, 45(6), 994–1007. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.01.006>
- Vil, V. A., Terent'ev, A. O., Savidov, N., Gloriovova, T. A., Poroikov, V. V., Pounina, T. A., & Dembitsky, V. M. (2019). Hydroperoxy steroids and triterpenoids derived from plant and fungi: Origin, structures and biological activities. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 190, 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.03.020>
- Wang, Y.-T., Lo, H.-S., & Wang, P.-H. (2008). Endophytic fungi from *Taxus mairei* in Taiwan: First report of *Colletotrichum gloeosporioides* as an endophyte of *Taxus mairei*. *Botanical Studies*, 49.
- Worrich, A., Stryhanyuk, H., Musat, N., König, S., Banitz, T., Centler, F., Frank, K., Thullner, M., Harms, H., Richnow, H.-H., Miltner, A., Kästner, M., & Wick, L. Y. (2017). Mycelium-mediated transfer of water and nutrients stimulates bacterial activity in dry and oligotrophic environments. *Nature Communications*, 8(1), 15472. <https://doi.org/10.1038/ncomms15472>
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169089>
- Yan, L., Zhu, J., Zhao, X., Shi, J., Jiang, C., & Shao, D. (2019). Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09713-2>

Zhang, Y., Han, T., Ming, Q., Wu, L., Rahman, K., & Qin, L. (2012). Alkaloids Produced by Endophytic Fungi: A Review. *Natural Product Communications*, 7(7), 1934578X1200700742. <https://doi.org/10.1177/1934578X1200700742>

ANEXOS



Anexo 1. Platos Petri con agar extracto de malta.



Anexo 2. Pesaje de medio de cultivo para preparación.



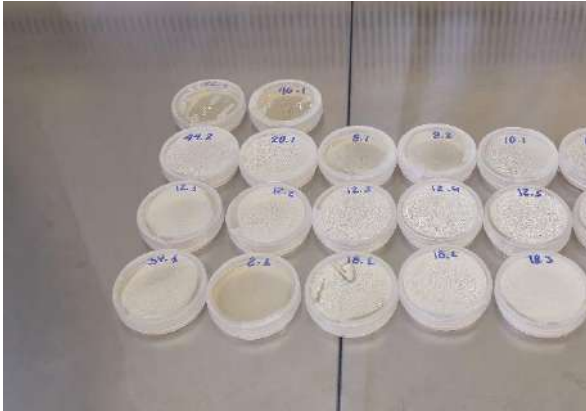
Anexo 3. Servido de medio en platos Petri.



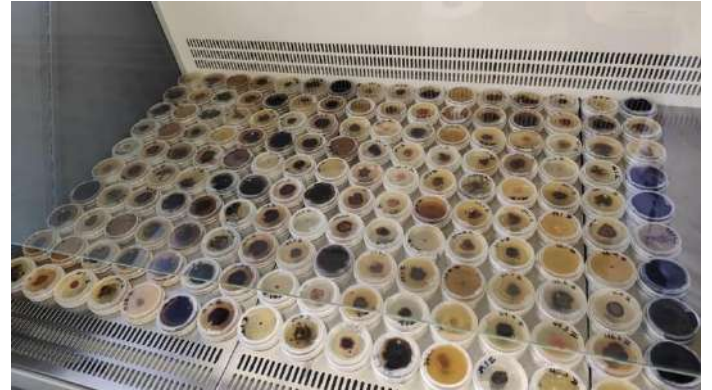
Anexo 4. Limpieza de cristalería utilizada para la realización de medios.



Anexo 5. Colecta de hojas de R. mangle.



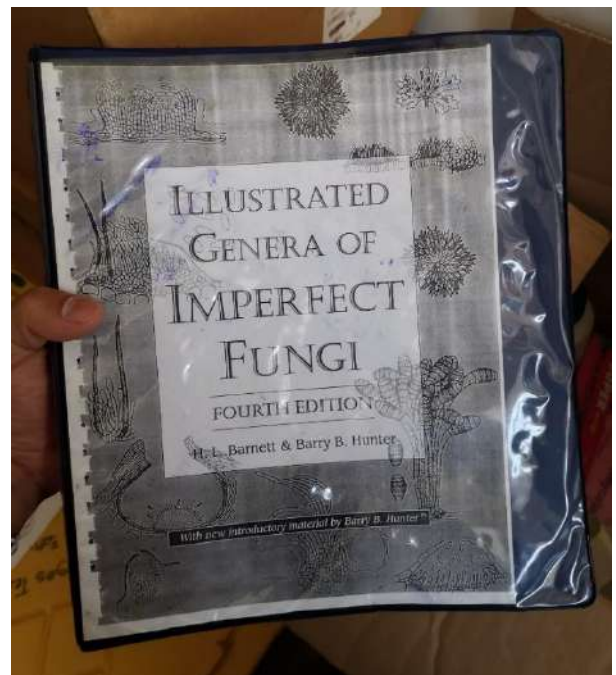
Anexo 6. Platos Petri con hongos endófitos aislados.



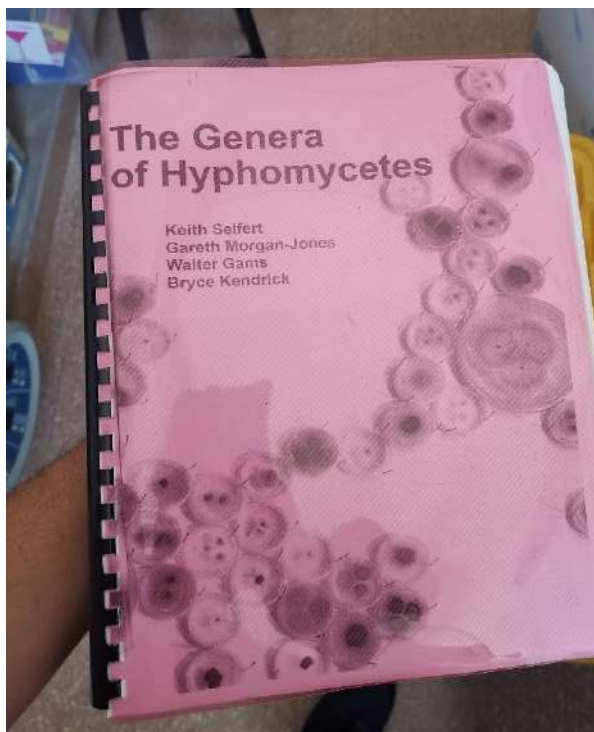
Anexo 8. Parte de la diversidad endófito aislada.



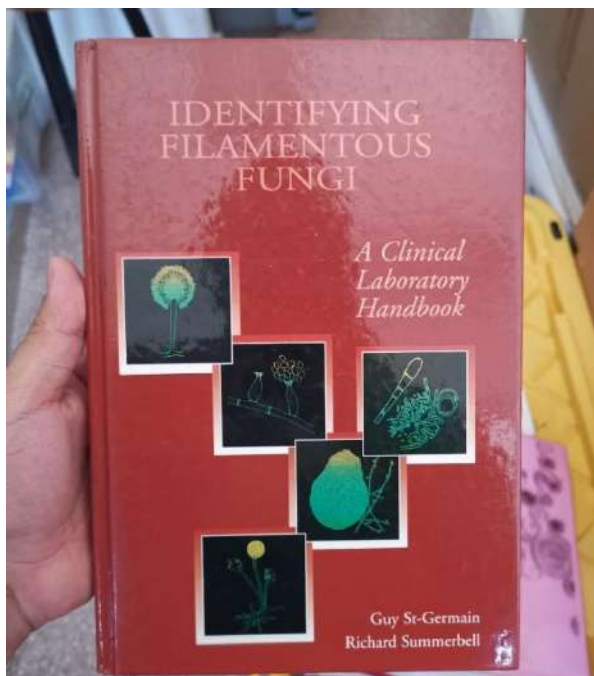
Anexo 7. Mismo hongo diferente característica fenotípica.



Anexo 9. Guía de identificación taxonómica:
Illustrated Genera Of Imperfect Fungi.



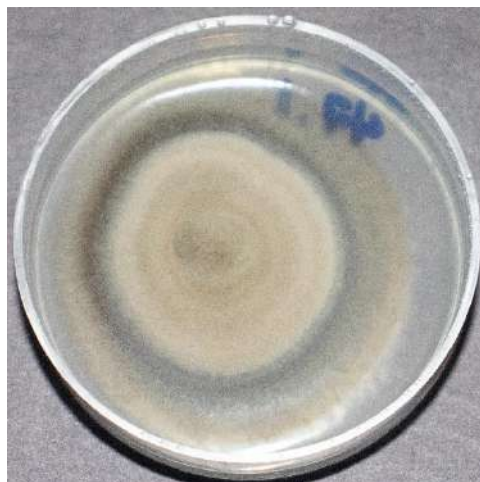
Anexo 10. Guía de identificación taxonómica: *The Genera Of Hyphomycetes*.



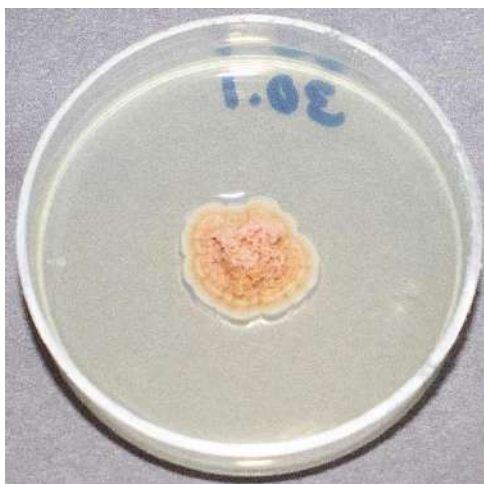
Anexo 11. Guía de identificación taxonómica: *Identifying Filamentous Fungi*.



Anexo 12. Morfo 1, foto trasera.



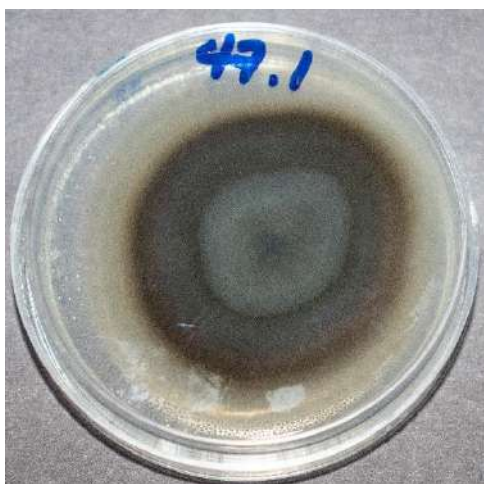
Anexo 15. Morfo 2, foto delantera.



Anexo 13. Morfo 1, foto delantera.



Anexo 16. Morfo 3, foto trasera.



Anexo 14. Morfo 2, foto trasera.



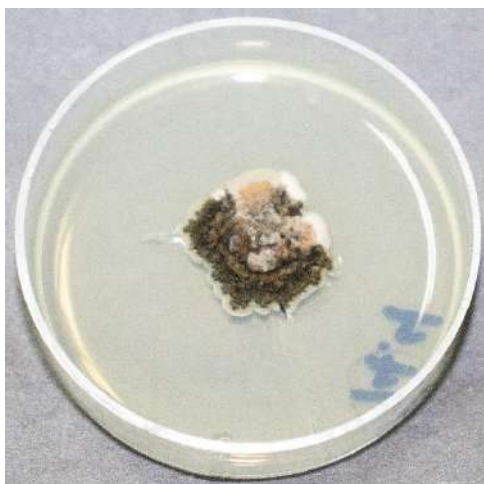
Anexo 17. Morfo 3, foto delantera.



Anexo 18. Morfo 4, foto trasera.



Anexo 21. Morfo 5, foto delantera.



Anexo 19. Morfo 4, foto delantera.



Anexo 22. Morfo 6, foto trasera.



Anexo 20. Morfo 5, foto trasera.



Anexo 23. Morfo 6, foto delantera.



Anexo 24. Morfo 7, foto trasera.



Anexo 27. Morfo 8, foto delantera.



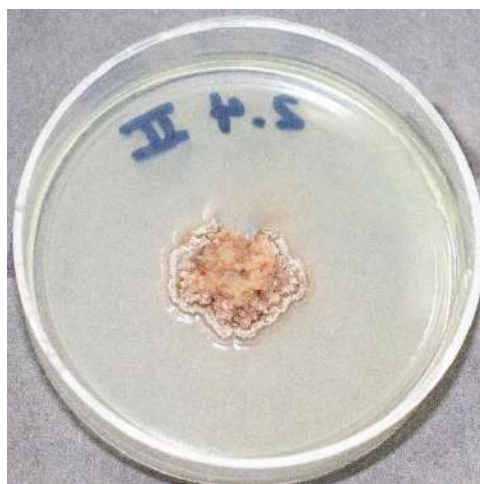
Anexo 25. Morfo 7, foto delantera.



Anexo 28. Morfo 9, foto trasera.



Anexo 26, Morfo 8, foto trasera.



Anexo 29. Morfo 9, foto delantera.



Anexo 30. Morfo 10, foto trasera.



Anexo 33. Morfo 11, foto delantera.



Anexo 31. Morfo 10, foto delantera.



Anexo 34. Morfo 12, foto trasera.



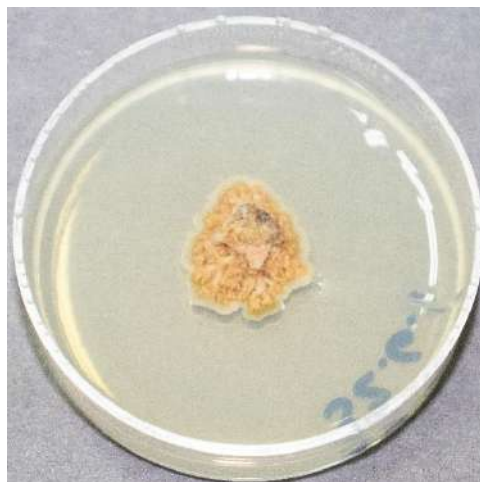
Anexo 32. Morfo 11, foto trasera.



Anexo 35. Morfo 12, foto delantera.



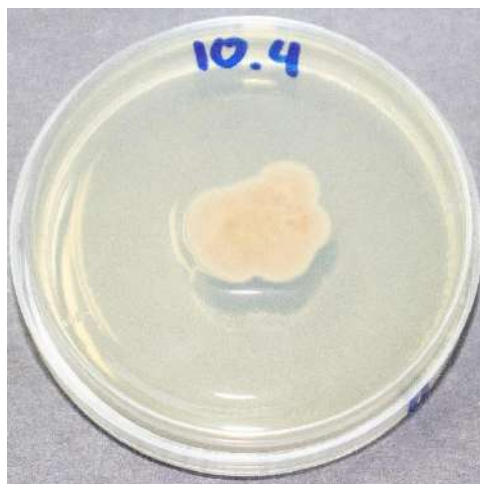
Anexo 36. Morfo 13, foto trasera.



Anexo 39. Morfo 14, foto delantera.



Anexo 37. Morfo 13, foto delantera.



Anexo 40. Morfo 15, foto trasera.



Anexo 38. Morfo 14, foto trasera.



Anexo 41. Morfo 15, foto delantera.



Anexo 42. Morfo 16, foto trasera.



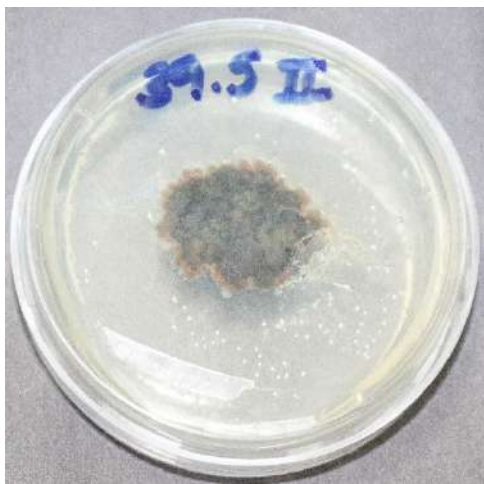
Anexo 45. Morfo 17, foto delantera.



Anexo43. Morfo 16, foto delantera.



Anexo 46. Morfo 18, foto trasera.



Anexo 44. Morfo 17, foto trasera.



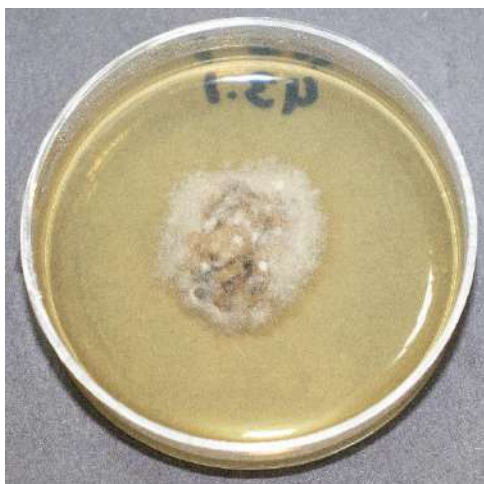
Anexo 47. Morfo 18, foto delantera.



Anexo 48. Morfo 19, foto trasera.



Anexo 51. Morfo 20, foto delantera.



Anexo 49. Morfo 19, foto delantera.



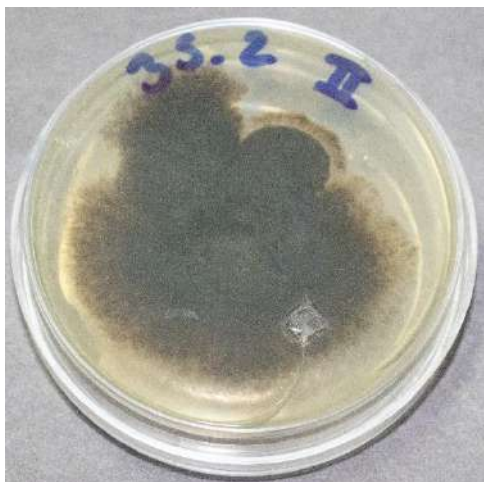
Anexo 52. Morfo 21, foto trasera.



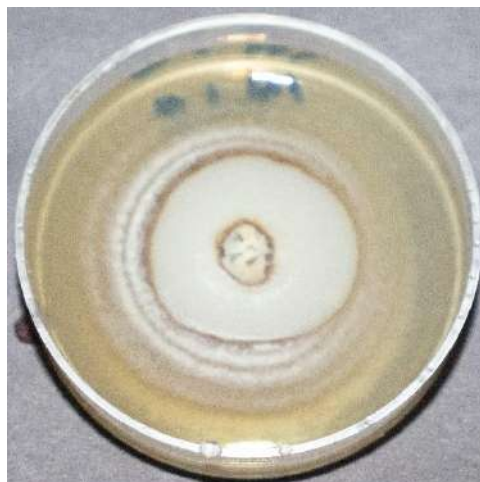
Anexo 50. Morfo 20, foto trasera.



Anexo 53. Morfo 21, foto delantera.



Anexo 54. Morfo 22, foto trasera.



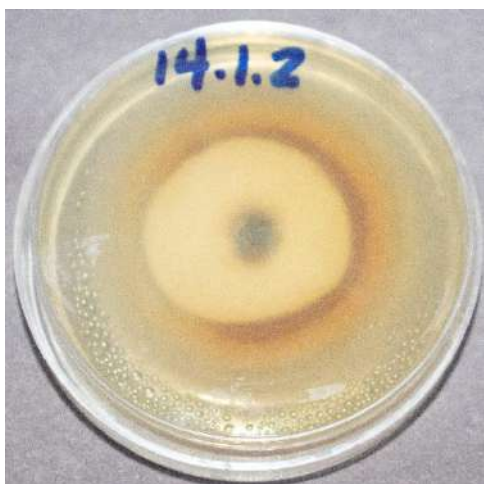
Anexo 57. Morfo 23, foto delantera.



Anexo 55. Morfo 22, foto delantera.



Anexo 58. Morfo 24, foto trasera.



Anexo 56. Morfo 23, foto trasera.



Anexo 59. Morfo 24, foto delantera.



Anexo 60. Morfo 25, foto trasera.



Anexo 63. Morfo 26, foto delantera.



Anexo 61. Morfo 25, foto delantera.



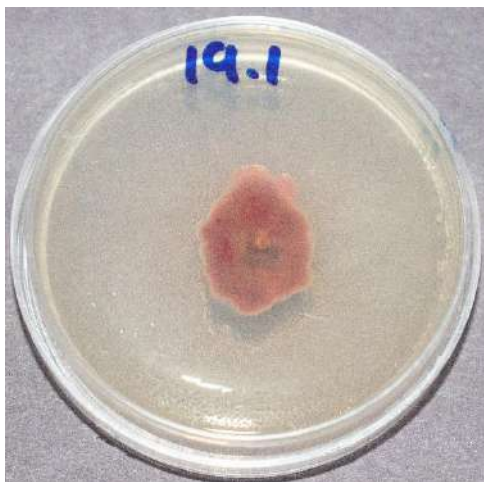
Anexo 64. Morfo 27, foto trasera.



Anexo 62. Morfo 26, foto trasera.



Anexo 65. Morfo 27, foto delantera.



Anexo 66. Morfo 28, foto trasera.



Anexo 69. Morfo 29, foto delantera.



Anexo 67. Morfo 28, foto delantera.



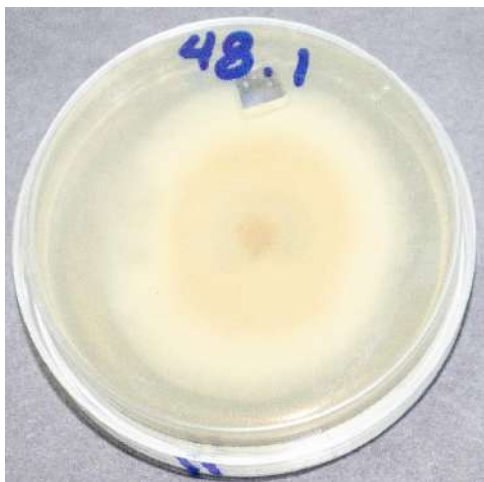
Anexo 70. Morfo 30, foto trasera.



Anexo 68. Morfo 29, foto trasera.



Anexo 71. Morfo 30, foto delantera.



Anexo 72. Morfo 31, foto trasera.



Anexo 75. Morfo 32, foto delantera.



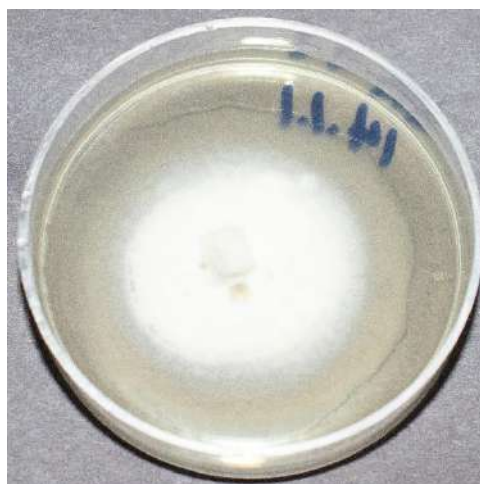
Anexo 73. Morfo 31, foto delantera.



Anexo 76. Morfo 33, foto trasera.



Anexo 74. Morfo 32, foto trasera.



Anexo 77. Morfo 33, foto delantera.



Anexo 78. Morfo 34, foto trasera.



Anexo 81. Morfo 35, foto delantera.



Anexo 79. Morfo 34, foto delantera.



Anexo 82. Morfo 36, foto trasera.



Anexo 80. Morfo 35, foto trasera.



Anexo 83. Morfo 36, foto delantera.



Anexo 84. Morfo 37, foto trasera.



Anexo 87. Morfo 38, foto delantera.



Anexo 85. Morfo 37, foto delantera.



Anexo 88. Morfo 39, foto trasera.



Anexo 86. Morfo 38, foto trasera.



Anexo 89. Morfo 39, foto delantera.



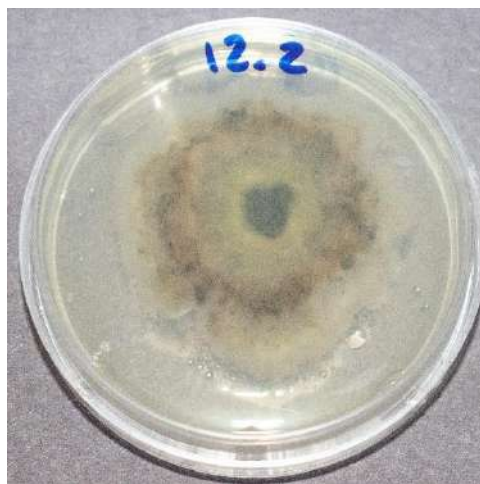
Anexo 90. Morfo 40, foto trasera.



Anexo 93. morfo 41, foto delantera.



Anexo 91. Morfo 40, foto delantera.



Anexo 94. Morfo 42, foto trasera.



Anexo 92. Morfo 41, foto trasera.



Anexo 95. Morfo 42, foto delantera.



Anexo 96. Morfo 43, foto trasera.



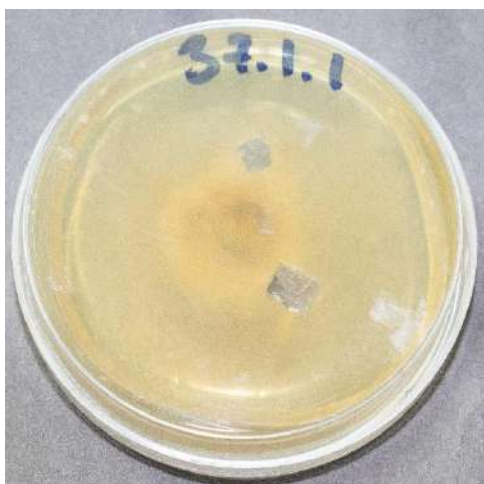
Anexo 99. Morfo 45, foto delantera.



Anexo 97. Morfo 43, foto delantera.



Anexo 100. Morfo 46, foto trasera.



Anexo 98. Morfo 45, foto trasera.



Anexo 101. Morfo 46, foto delantera.



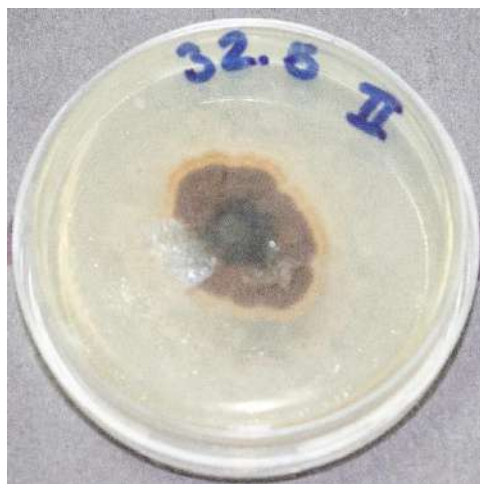
Anexo 102. Morfo 47, foto trasera.



Anexo 105. Morfo 48, foto delantera.



Anexo 103. Morfo 47, foto delantera.



Anexo 106. Morfo 49, foto trasera.



Anexo 104. Morfo 48, foto trasera.



Anexo 107. Morfo 49, foto delantera.



Anexo 108. Morfo 50, foto trasera.



Anexo 111. Morfo 53, foto delantera.



Anexo 109. Morfo 50, foto delantera.



Anexo 112. Morfo 54, foto trasera.



Anexo 110. Morfo 53, foto trasera.



Anexo 113. Morfo 54, foto delantera.



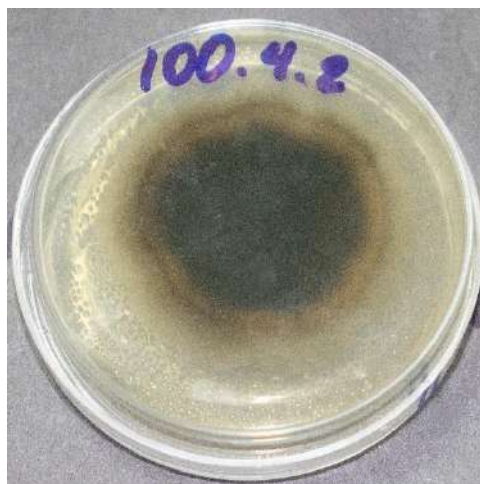
Anexo 114. Morfo 55, foto trasera.



Anexo 117. Morfo 56, foto delantera.



Anexo 115. Morfo 55, foto delantera.



Anexo 118. Morfo 57, foto trasera.



Anexo 116. Morfo 56, foto trasera.



Anexo 119. Morfo 57, foto delantera.



Anexo 120. Morfo 58, foto trasera.



Anexo 123. Morfo 59, foto delantera.



Anexo 121. Morfo 58, foto delantera.



Anexo 124. Morfo 60, foto trasera.



Anexo 122. Morfo 59, foto trasera.



Anexo 125. Morfo 60, foto delantera.



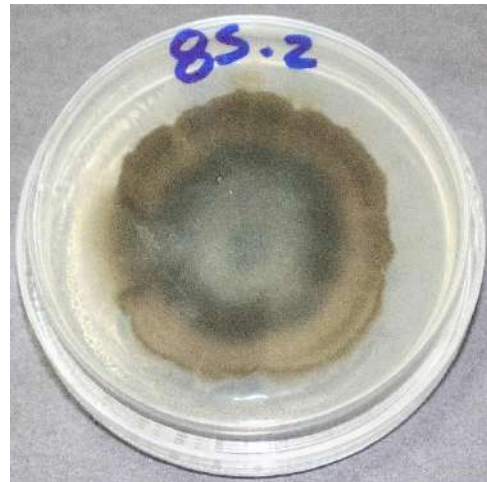
Anexo 126. Morfo 61, foto trasera.



Anexo 129. Morfo 62, foto delantera.



Anexo 127. Morfo 61, foto delantera.



Anexo 130. Morfo 63, foto trasera.



Anexo 128. Morfo 62, foto trasera.



Anexo 131. Morfo 63, foto delantera.



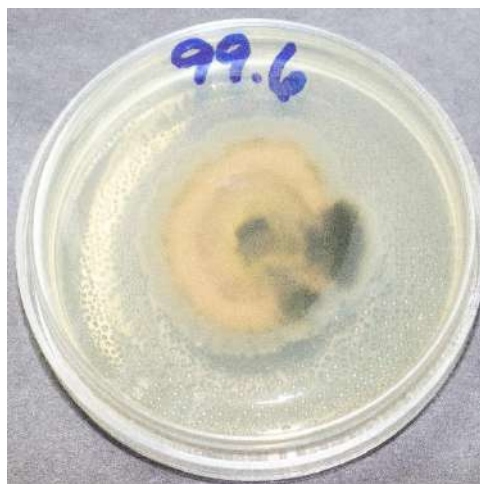
Anexo 132. Morfo 64, foto trasera.



Anexo 135. Morfo 65, foto delantera.



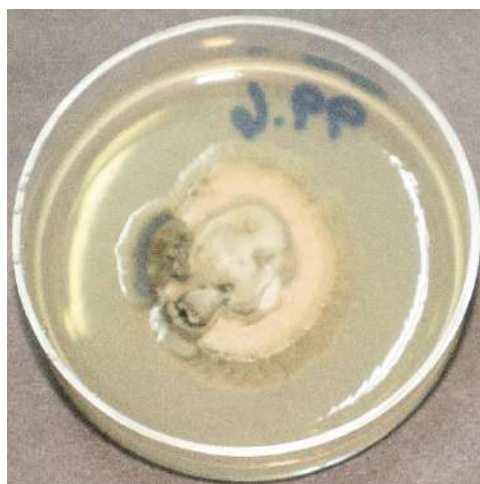
Anexo 133. Morfo 64, foto delantera.



Anexo 136. Morfo 66, foto trasera.



Anexo 134. Morfo 65, foto trasera.



Anexo 137. Morfo 66, foto delantera.



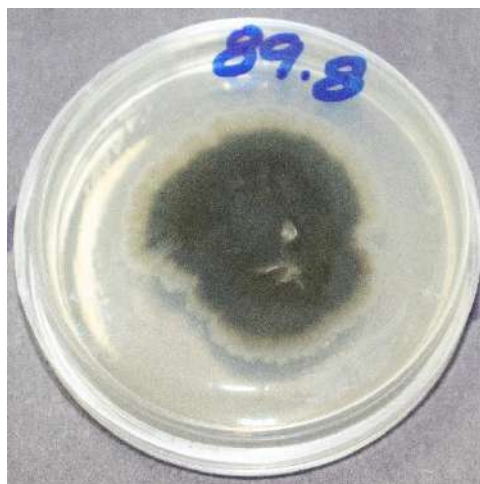
Anexo 138. Morfo 67, foto trasera.



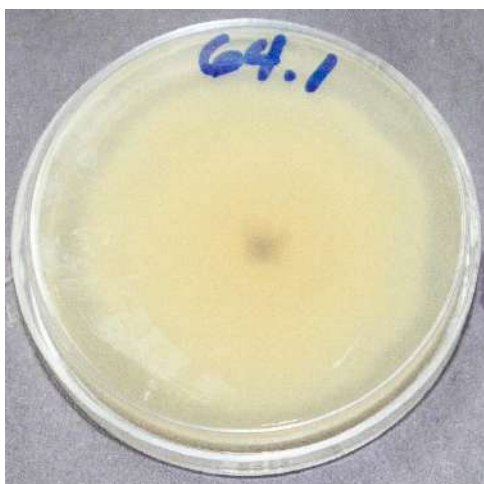
Anexo 141. Morfo 68, foto delantera.



Anexo 139. Morfo 67, foto delantera.



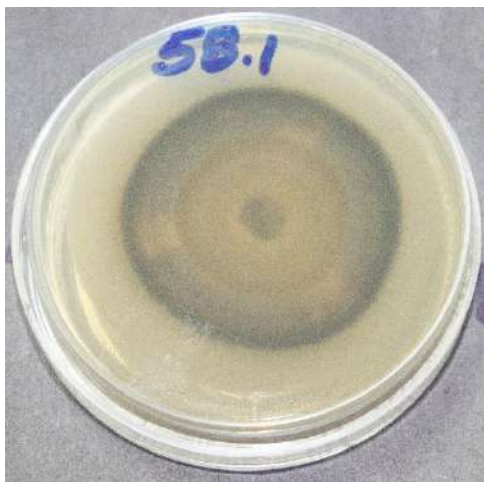
Anexo 142. Morfo 69, foto trasera.



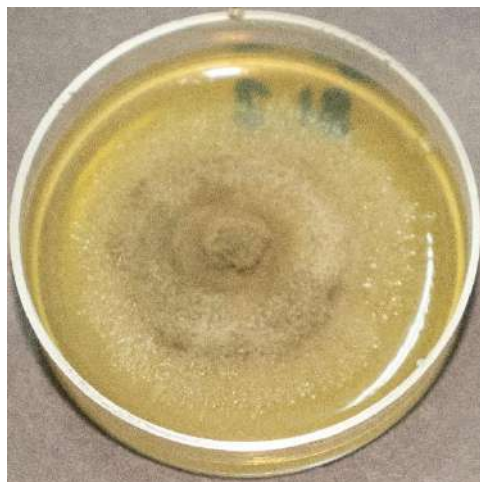
Anexo 140. Morfo 68, foto trasera.



Anexo 143. Morfo 69, foto delantera.



Anexo 144. Morfo 70, foto trasera.



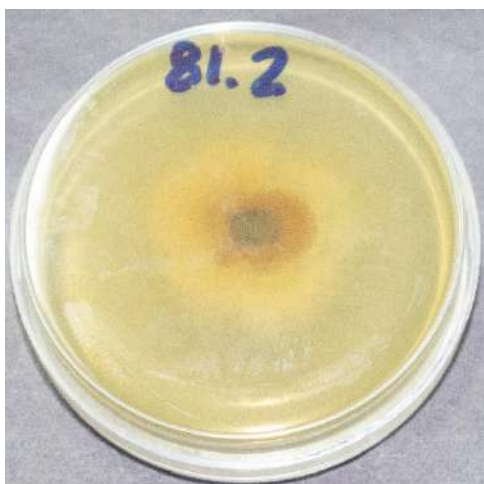
Anexo 147. Morfo 71, foto delantera.



Anexo 145. Morfo 70, foto delantera.



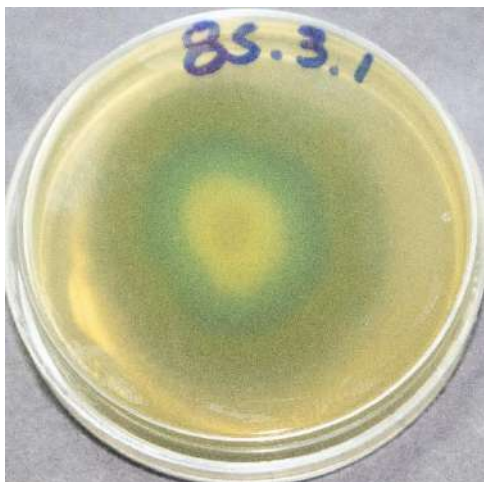
Anexo 148. Morfo 72, foto trasera.



Anexo 146. Morfo 71, foto trasera.



Anexo 149. Morfo 72, foto delantera.



Anexo 150. Morfo 73, foto trasera.



Anexo 153. Morfo 74, foto delantera.



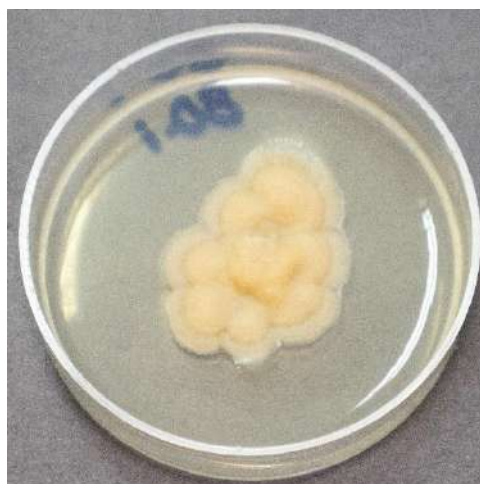
Anexo 151. Morfo 73, foto delantera.



Anexo 154. Morfo 75, foto trasera.



Anexo 152. Morfo 74, foto trasera.



Anexo 155. Morfo 75, foto delantera.



Anexo 156. Morfo 76, foto trasera.



Anexo 159. Morfo 77, foto delantera.



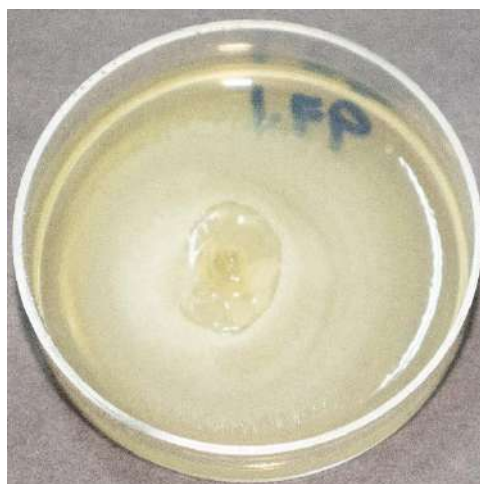
Anexo 157. Morfo 76, foto delantera.



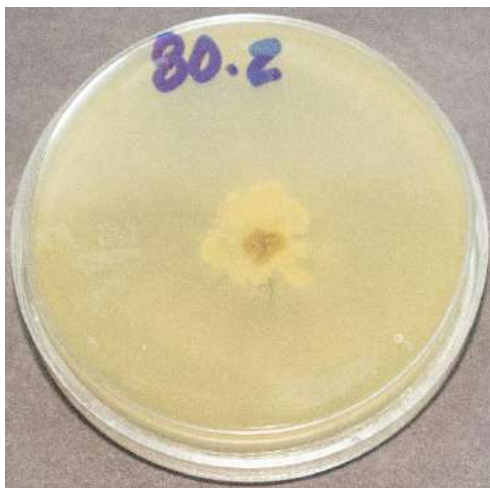
Anexo 160. Morfo 78, foto trasera.



Anexo 158. Morfo 77, foto trasera.



Anexo 161. Morfo 78, foto delantera.



Anexo 162. Morfo 79, foto trasera.



Anexo 165. Morfo 80, foto delantera.



Anexo 163. Morfo 79, foto delantera.



Anexo 166. Morfo 81, foto trasera.



Anexo 164. Morfo 80, foto trasera.



Anexo 167. Morfo 81, foto delantera.



Anexo 168. Morfo 82, foto trasera.



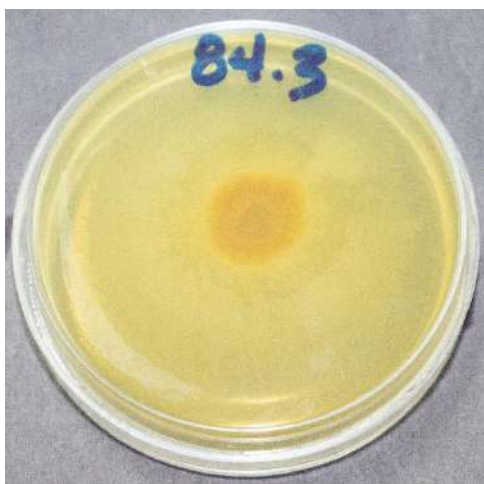
Anexo 171. Morfo 83, foto delantera.



Anexo 169. Morfo 82, foto delantera.



Anexo 172. Morfo 84, foto trasera.



Anexo 170. Morfo 83, foto trasera.



Anexo 173. Morfo 84, foto delantera.



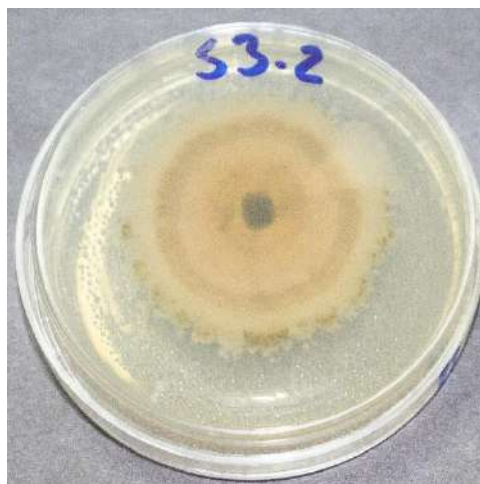
Anexo 174. Morfo 85, foto trasera.



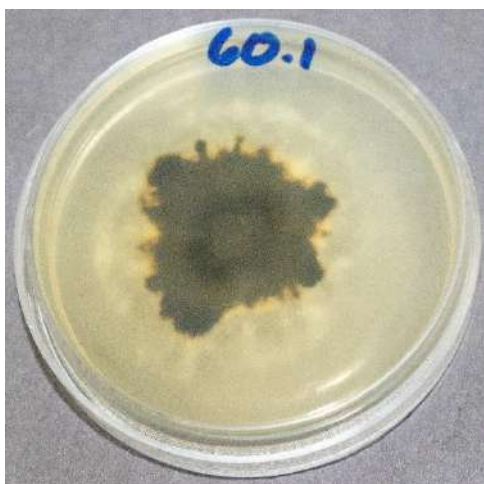
Anexo 177. Morfo 86, foto delantera.



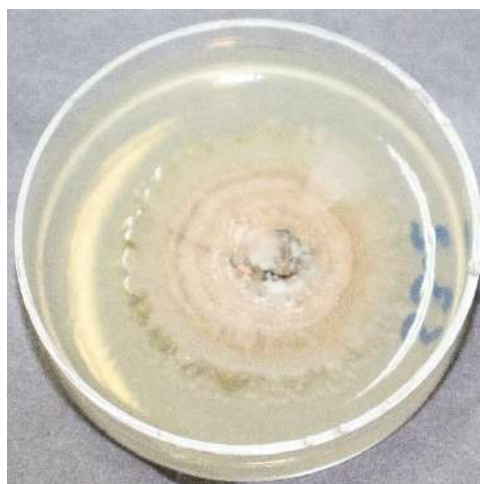
Anexo 175. Morfo 85, foto delantera.



Anexo 178. Morfo 87, foto trasera.



Anexo 176. Morfo 86, foto trasera.



Anexo 179. Morfo 87, foto delantera.



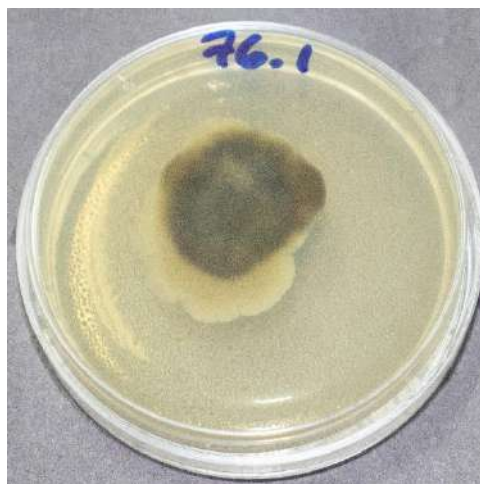
Anexo 180. Morfo 88, foto trasera.



Anexo 183. Morfo 89, foto delantera.



Anexo 181. Morfo 88, foto delantera.



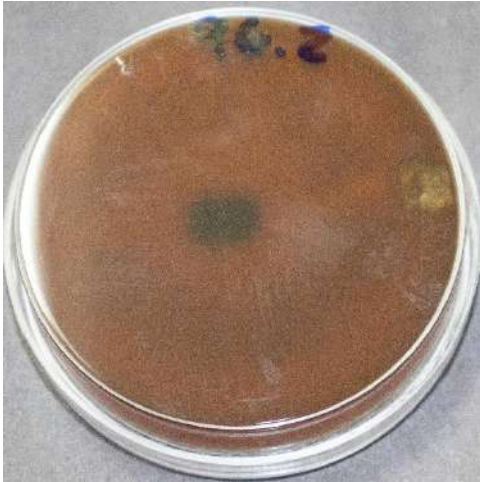
Anexo 184. Morfo 90, foto trasera.



Anexo 182. Morfo 89, foto trasera.



Anexo 185. Morfo 90, foto delantera.



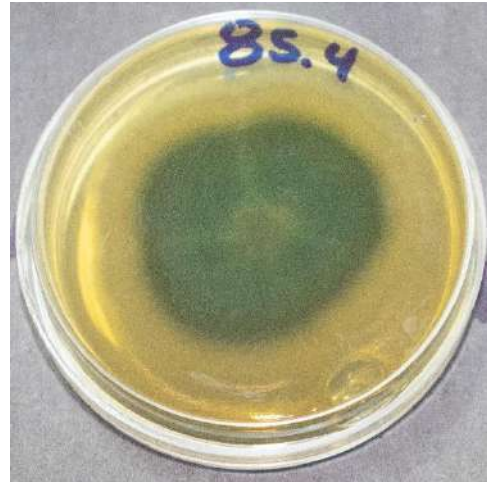
Anexo 186. Morfo 91, foto trasera.



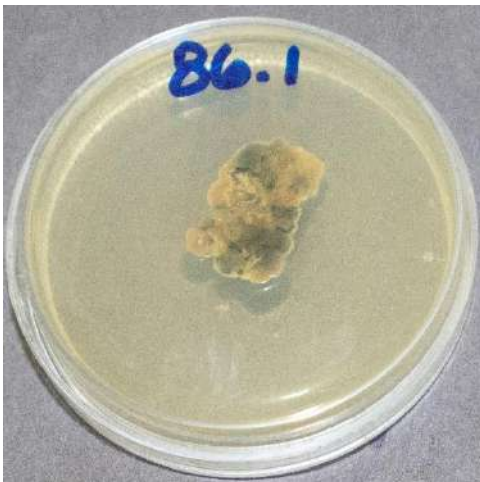
Anexo 189. Morfo 92, foto delantera.



Anexo 187. Morfo 91, foto delantera.



Anexo 190. Morfo 93, foto trasera.



Anexo 188. Morfo 92, foto trasera.



Anexo 191. Morfo 93, foto delantera.



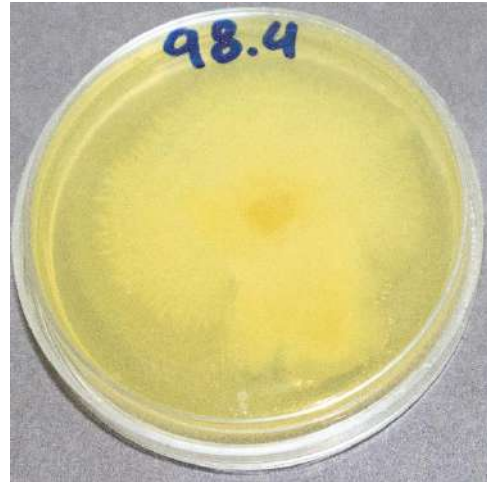
Anexo 192. Morfo 94, foto trasera.



Anexo 195. Morfo 95, foto delantera.



Anexo 193. Morfo 94, foto delantera.



Anexo 196. Morfo 96, foto trasera.



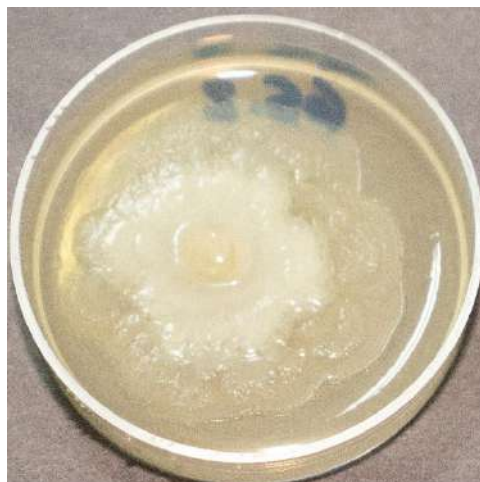
Anexo 194. Morfo 95, foto trasera.



Anexo 197. Morfo 96, foto delantera.



Anexo 198. Morfo 97, foto trasera.



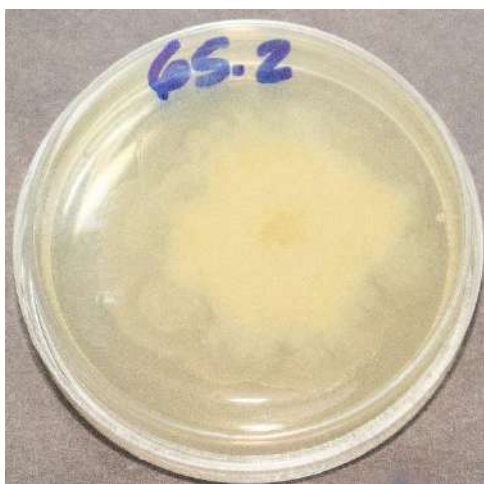
Anexo 201. Morfo 98, foto delantera.



Anexo 199. Morfo 97, foto delantera.



Anexo 202. Morfo 99, foto trasera.



Anexo 200. Morfo 98, foto trasera.



Anexo 203. Morfo 99, foto delantera.



Anexo 204. Morfo 100, foto trasera.



Anexo 207. Morfo 101, foto delantera.



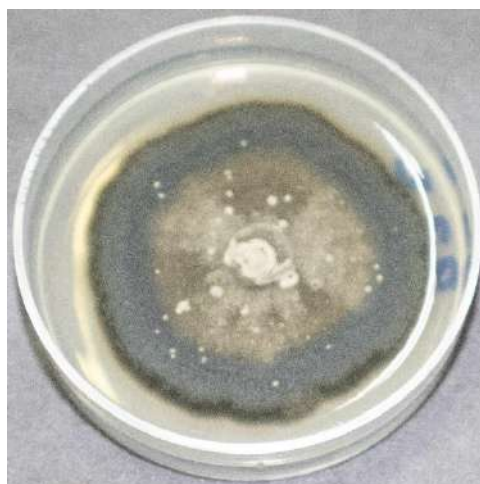
Anexo 205. Morfo 100, foto delantera.



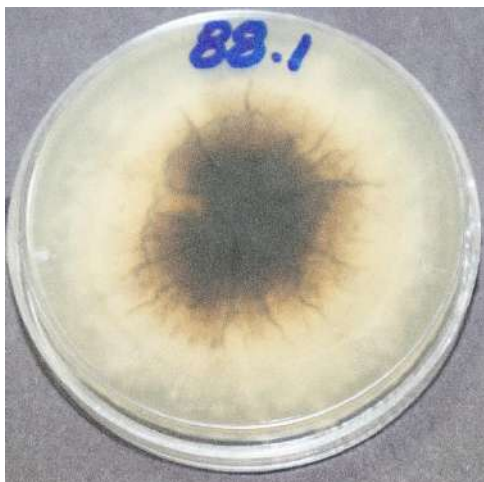
Anexo 208. Morfo 102, foto trasera.



Anexo 206. Morfo 101, foto trasera.



Anexo 209. Morfo 102, foto delantera.



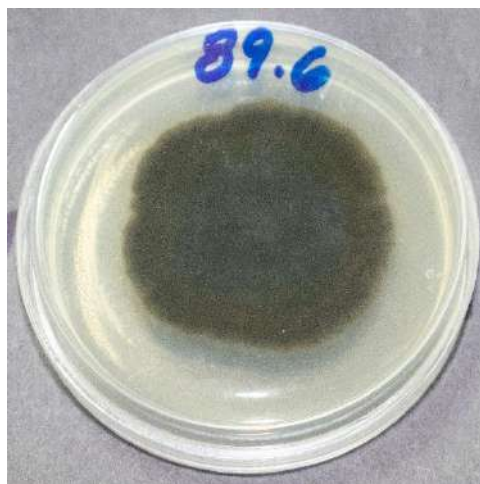
Anexo 210. Morfo 103, foto trasera.



Anexo 213. Morfo 104, foto delantera.



Anexo 211. Morfo 103, foto delantera.



Anexo 214. Morfo 105, foto trasera.



Anexo 212. Morfo 104, foto trasera.



Anexo 215. Morfo 105, foto delantera.



Anexo 216. Morfo 106, foto trasera.



Anexo 219. Morfo 107, foto delantera.



Anexo 217. Morfo 106, foto delantera.



Anexo 220. Morfo 108, foto trasera.



Anexo 218. Morfo 107, foto trasera.



Anexo 221. Morfo 108, foto delantera.



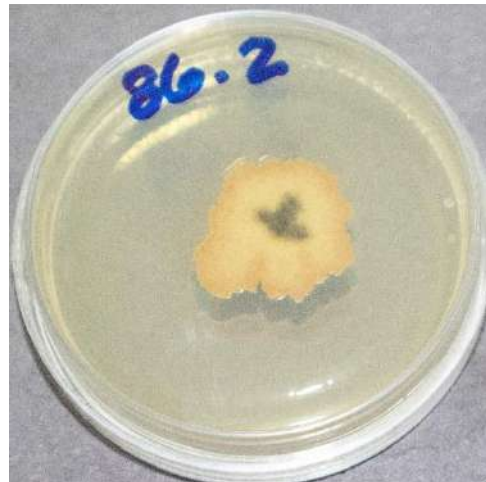
Anexo 222. Morfo 109, foto trasera.



Anexo 225. Morfo 110, foto delantera.



Anexo 223. Morfo 109, foto delantera.



Anexo 226. Morfo 111, foto trasera.



Anexo 224. Morfo 110, foto trasera.



Anexo 227. Morfo 111, foto delantera.



Anexo 228. Morfo 112, foto trasera.



Anexo 231. Morfo 113, foto delantera.



Anexo 229. Morfo 112, foto delantera.



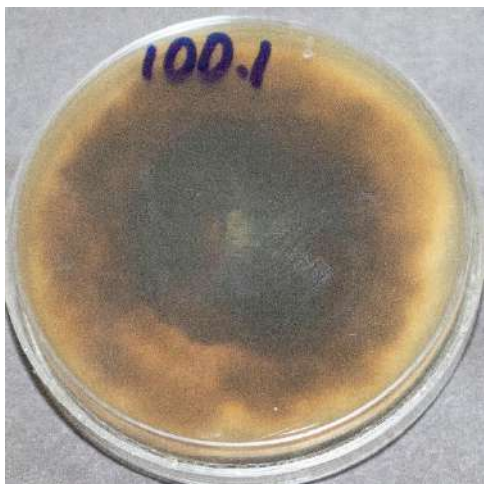
Anexo 232. Morfo 114, foto trasera.



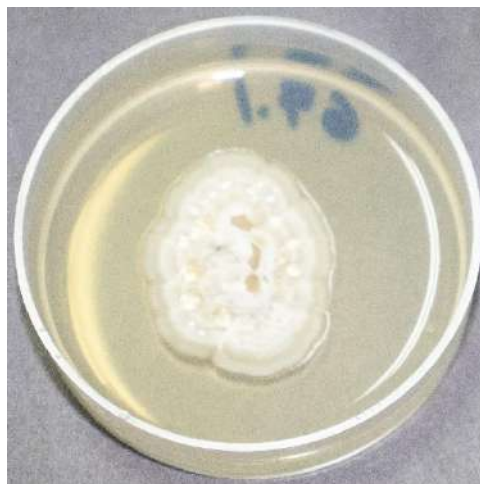
Anexo 230. Morfo 113, foto trasera.



Anexo 233. Morfo 114, foto delantera.



Anexo 234. Morfo 115, foto trasera.



Anexo 237. Morfo 116, foto delantera.



Anexo 235. Morfo 115, foto delantera.



Anexo 238. Morfo 117, foto trasera.



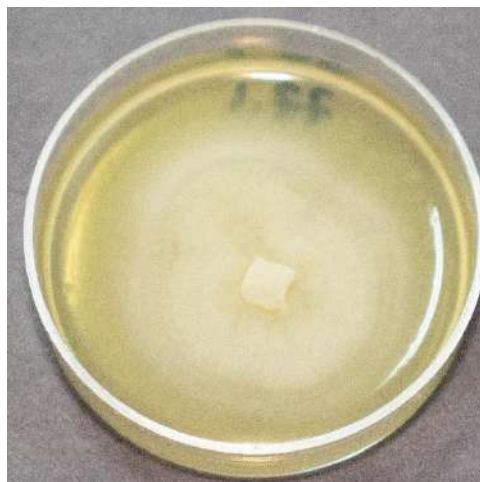
Anexo 236. Morfo 116, foto trasera.



Anexo 239. Morfo 117, foto delantera.



Anexo 240. Morfo 118, foto trasera.



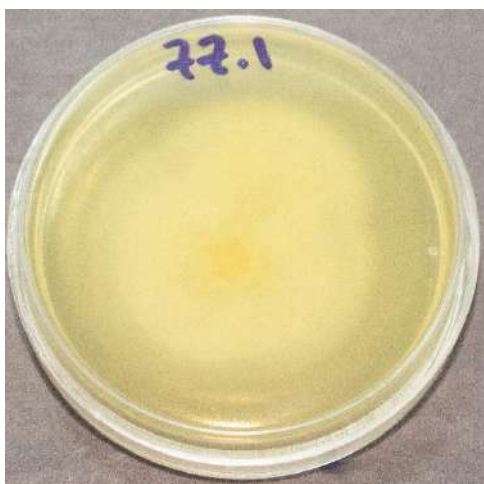
Anexo 243. Morfo 119, foto delantera.



Anexo 241. Morfo 118, foto delantera.



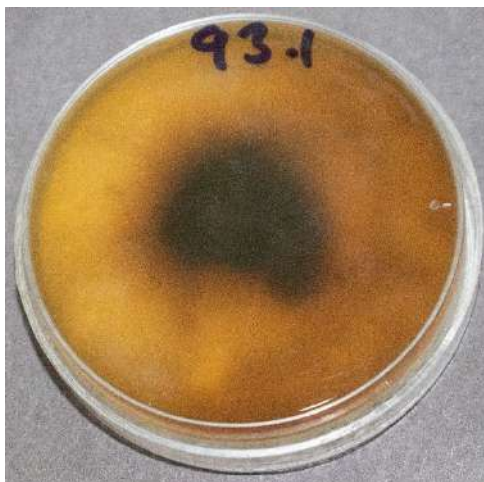
Anexo 244. Morfo 120, foto trasera.



Anexo 242. Morfo 119, foto trasera.



Anexo 245. Morfo 120, foto delantera.



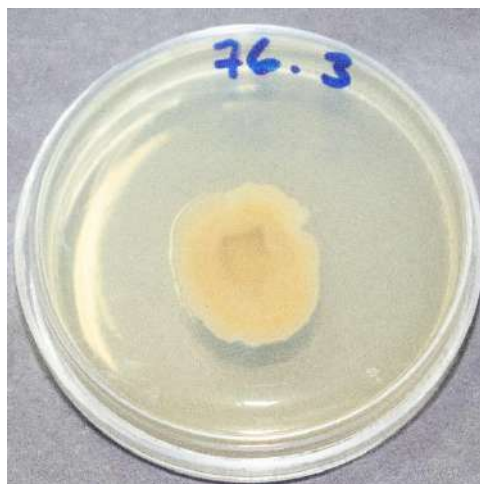
Anexo 246. Morfo 121, foto trasera.



Anexo 249. Morfo 122, foto delantera.



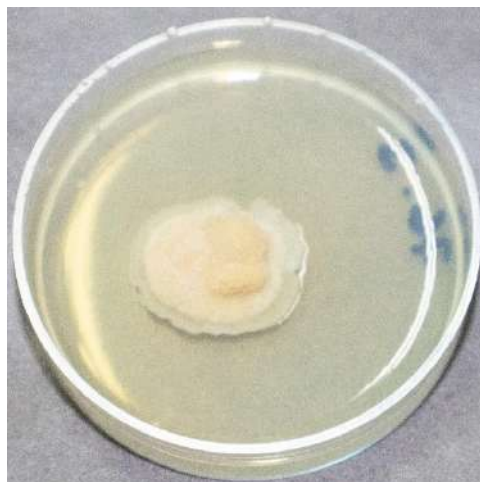
Anexo 247. Morfo 121, foto delantera.



Anexo 250. Morfo 123, foto trasera.



Anexo 248. Morfo 122, foto trasera.



Anexo 251. Morfo 123, foto delantera.



Anexo 252. Morfo 124, foto trasera.



Anexo 255. Morfo 125, foto delantera.



Anexo 253. Morfo 124, foto delantera.



Anexo 256. Morfo 126, foto trasera.



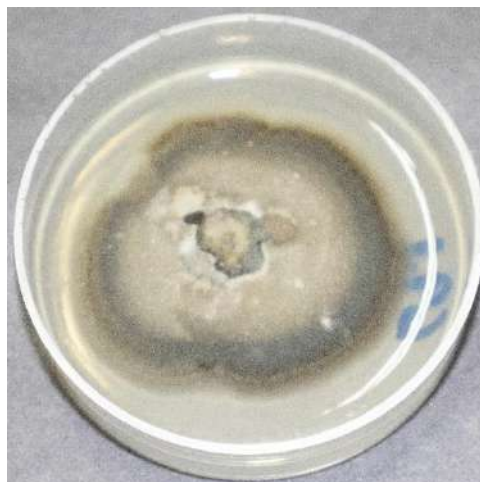
Anexo 254. Morfo 125, foto trasera.



Anexo 257. Morfo 126, foto delantera.



Anexo 258. Morfo 127, foto trasera.



Anexo 261. Morfo 128, foto delantera.



Anexo 259. Morfo 127, foto delantera.



Anexo 262. Morfo 129, foto trasera.



Anexo 260. Morfo 128, foto trasera.



Anexo 263. Morfo 129, foto delantera.



Anexo 264. Morfo 130, foto trasera.



Anexo 267. Morfo 131, foto delantera.



Anexo 265. Morfo 130, foto delantera.



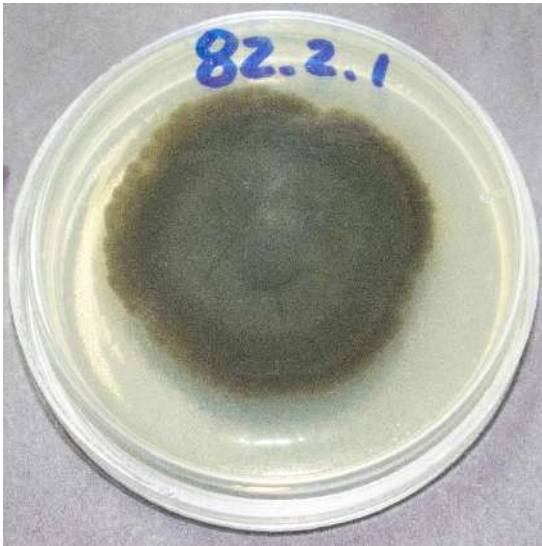
Anexo 268. Morfo 132, foto trasera.



Anexo 266. morfo 131, foto trasera.



Anexo 269. Morfo 132, foto delantera.



Anexo 270. Morfo 133, foto trasera.



Anexo 272. Morfo 134, foto trasera.



Anexo 271. Morfo 133, foto delantera.



Anexo 273. Morfo 134, foto delantera.

