

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA




Determinación de la composición de la comunidad de hongos endófitos asociados a mangle rojo (Rhizophora mangle L.) y mangle blanco (Laguncularia racemosa (L.) C.F. Gaertn.) en la Reserva Natural De Usos Múltiples Monterrico.

Angela Begonia Barrios Palacios

Bióloga

Guatemala, mayo de 2019

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a blue background, depicting a golden figure holding a staff and a cross. The shield is flanked by two golden figures holding up a banner. The shield is set against a background of green mountains and a blue sky. The seal is surrounded by a circular border containing the Latin motto: "LETTERAS ORBE CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER".

Determinación de la composición de la comunidad de hongos endófitos asociados a mangle rojo (Rhizophora mangle L.) y mangle blanco (Laguncularia racemosa (L.) C.F. Gaertn.) en la Reserva Natural De Usos Múltiples Monterrico.

INFORME DE TESIS

Presentado por

Angela Begonia Barrios Palacios

Para optar al título de

Bióloga

Guatemala, mayo de 2019

JUNTA DIRECTIVA

M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto	Decano
Licda. Miriam Roxana Marroquín Leiva	Secretaria
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal I
Dr. Roberto Enrique Flores Arzú	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Byron Enrique Pérez Díaz	Vocal IV
Br. Pamela Carolina Ortega Jiménez	Vocal V

DEDICATORIA

A mi Padre Celestial por su amor infinito y por despertar en mí una profunda fascinación por la ciencia.

A mi Madre, Silvia Palacios, por su gran amor, paciencia, apoyo incondicional y por estar SIEMPRE.

A mi Padre, Carlos Barrios, por introducirme en el mundo científico, por su guía, por su amor y por ser el MEJOR compañero de colecta.

A mis Hermanos Mishel, José Carlos y Diego, por ser mi apoyo, mi consuelo, mi fuente de ánimo, por amarme y por nuestras discusiones científicas.

A mi abuelita, Mamita, por estar pendiente de mí.

A mi abuelo, Juan José, por apoyarme y brindarme su amor.

A mi esposo, Christopher Rosales, por ser mi compañero de vida, mejor amigo, por hacerme mejor persona y por motivarme para alcanzar mis sueños.

A Maura Quezada y Carlos Avendaño, por compartir sus conocimientos, experiencias y formarme como profesional.

A mis amigos, Jessica López, Roxanda López, Rosa Sunum, María Eugenia Papa, Bianka Hernández, María José Pérez, Rosario Rodas, Andrea Marroquín, Oscar Rojas y Ernesto Rivera, por creer en mí y apoyarme en distintos momentos de mi formación académica.

Al pueblo de Guatemala por apoyar mi educación.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y especialmente los profesores de la Escuela de Biología por mi formación profesional.

Al proyecto “Restauración Ecológica Participativa del Ecosistema de Manglar en La Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico”, especialmente a Jessica López por el apoyo en los muestreos.

Al Departamento de Microbiología de la Escuela de Química Biológica, especialmente a los Licenciados Osberth Morales y Ricardo Figueroa por brindarme apoyo con la fase de laboratorio.

A mis Asesoras Maura Quezada y Celeste Méndez por apoyarme en terrenos inexplorados, motivarme a plantear investigaciones innovadoras y guiarme en el desarrollo de mi tesis.

Al Ing. Agr. Mario Veliz, del Herbario BIGU, por apoyarme con la identificación de especies de mangle.

Al Ing. Agr. Jorge Mario Vargas por realizar la revisión de mi documento de tesis.

A los guardarecursos de la Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico por apoyarme en las colectas y compartir su conocimiento.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	4
3.1. Estudios de hongos en ecosistemas de manglar	4
3.2. Biología de los hongos	4
3.3. Hongos endófitos.	5
3.5. Importancia de los hongos endófitos para el ecosistema de manglar	6
3.6. Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico	7
3.7. Ecosistema de manglar	7
3.8. Estudios en Guatemala.	8
4. JUSTIFICACIÓN	9
5. OBJETIVOS	10
6. HIPÓTESIS	11
7. MATERIALES Y MÉTODOS	12
7.1. Universo	12
7.1.1. Muestra	12
7.1.2. Variables	12
7.2. Recursos	13
7.2.1. Humanos	13
7.2.1.2. Investigador	13
7.2.2. Institucionales	13
7.3. Materiales	13
7.3.1. Equipo de colecta	13
7.3.2. Materiales de laboratorio	14
7.3.4. Equipo	14
7.3.5. Reactivos	15
7.3.6. Medios de cultivo	15
7.4. Métodos	15
7.4.1. Fase de Campo	15

7.4.2.	Fase de Laboratorio	18
7.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	20
7.5.2.	Cálculo de la frecuencia de colonización	20
8.	RESULTADOS	22
8.1.	Riqueza y Abundancia de endófitos	22
8.2.	Frecuencia de Colonización (FC%)	24
8.3.	Endófito dominante	25
8.4.	Composición de la comunidad de endófitos	26
9.	DISCUSIÓN	27
9.1.	Riqueza y Abundancia de endófitos	27
9.2.	Frecuencia de colonización (FC%)	30
9.3.	Endófito dominante	30
9.4.	Composición de la comunidad de endófitos.	30
10.	CONCLUSIONES	32
11.	RECOMENDACIONES	33
12.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
13.	ANEXOS	48

1. RESUMEN

Los ecosistemas de manglar sufren grandes presiones en nuestro país, siendo la Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico un remanente de este ecosistema, el cuál resguarda alta diversidad biológica, reflejada en los bienes y servicios que brinda este ecosistema a la población. Sin embargo, en lo que se refiere a los procesos de degradación de nutrientes y su incorporación a los ciclos del carbono y del nitrógeno, es poco lo que se conoce, y es donde los hongos poseen un papel clave para que se lleven a cabo dichos procesos. Así mismo, los hongos endófitos se encuentran asociados a la resistencia de manglares a la salinidad y otros estreses propios de este ecosistema. Por lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar la diversidad de hongos endófitos asociados a mangle rojo (*Rhizophora mangle*) y mangle blanco (*Laguncularia racemosa*), presentes en la Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico. De 144 fragmentos de material vegetal seleccionado, se aislaron un total de 84 colonias fúngicas, identificándose 10 especies, de las cuales solamente tres se comparten entre hospederos, siendo estas *Fusarium equiseti*, *Paecilomyces* sp. y *Ramichloridium* sp. El endófito con mayor frecuencia de colonización fue *Scopulariopsis* sp. para *R. mangle* y *Pestalotiopsis* sp. para *L. racemosa*, los cuales a su vez constituyeron los endófitos dominantes para el ensamble de especies de ambos hospederos. No fue posible determinar la composición de especies de la comunidad de endófitos de la Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico como tal, sin embargo, se evidenció una tendencia en la que existe especificidad endófito-hospedero.

2. INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas de manglar están conformados por diversas especies de árboles y arbustos tropicales que poseen adaptaciones fisiológicas que les permiten crecer en la zona intermareal (Duke, 1992, p.63; Kathiresan & Bingham, 2001, p.82). Estos ecosistemas son altamente productivos, contando con una alta diversidad de microorganismos responsables de la degradación de materia orgánica, que posteriormente se integra a la cadena trófica (Clough, 1992, p.225; Jennerjahn & Ittekkot, 2002, p.23). Esta degradación es realizada inicialmente por bacterias y hongos (Das, Lyla & Khan, 2006, p. 1325; Holguin, Vazquez & Bashan, 2001, p.265).

Se ha registrado una alta diversidad de hongos asociada a los manglares, cumpliendo diversos roles ecológicos entre los que se pueden mencionar la degradación de materia orgánica, asociaciones micorrícicas, asociaciones con parásitos causantes de enfermedades y asociaciones con endófitos (Gilbert, Gregory, Mejía Chang & Rojas, 2002, p.278; Sengupta & Chaudhuri, 2002, p.169; Simoes, et. al., 2005, p.311; Wanderley, Maia & Cavalcanti, 2012, p. 1165). Éstos últimos son un grupo diverso de hongos que viven de forma asintomática en los tejidos de las plantas (hojas, tallos, flores, frutos, etc.) (Clay & Schardl, 2002, p. S1001; Faeth, 2002, p.25). Confieren a su hospedero tolerancia a estrés biótico ocasionado por herbivoría (producción de alcaloides) y a estrés abiótico ocasionado por desecación, temperaturas extremas, salinidad, toxicidad por metales pesados y concentraciones elevadas de CO₂ (Rodríguez, White, Arnold, & Redman, 2009, p. 314; Singh, Gill & Tuteja, 2011, p.175; Zhang, Nagabhyru & Schardl, 2009, p. 1072).

Desafortunadamente, los endófitos han sido poco estudiados en los ecosistemas del país y se desconocen las especies presentes en Guatemala, lo que dificulta otros estudios y aplicaciones de su potencial. Por lo tanto, la presente investigación tiene por objeto caracterizar los hongos endófitos presentes en dos especies de mangle, *Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaertn. y *Rhizophora mangle*

L. en la Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico. Esto con la finalidad de establecer una línea base para el estudio de este grupo en Guatemala, tener una mejor aproximación de su potencial y generar pautas para la conservación, manejo y restauración del ecosistema de manglar.

3. ANTECEDENTES

3.1. Estudios de hongos en ecosistemas de manglar

Los ecosistemas de manglar proporcionan hábitat para una alta diversidad de especies, incluyendo los hongos. En los primeros estudios se reportaron tres géneros frecuentes de hongos marinos: *Lulworthia*, *Leptosphaeria* y *Phoma*. A partir de esto se han realizado numerosas investigaciones en países como Japón, Malasia, Singapur, Indonesia y México (Sarma & Hyde, 2001, p.5). Los hongos endófitos también han sido estudiados en ecosistemas de manglar con dos enfoques, el primero es conocer su biodiversidad y el segundo relacionado con su bioprospección para la obtención de metabolitos útiles en la industria farmacéutica, médica y agrícola (Calcul et al., 2013, p.5036; Wanderley et al., 2012, p.1165). Aunque se conoce la presencia de hongos en el ecosistema de manglar de la Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico, esta información aún no ha sido documentada.

3.2. Biología de los hongos

Los hongos son organismos eucariotas, heterotróficos, con nutrición por absorción. Presentan paredes celulares de quitina y otros glucanos que forman filamentos ramificados denominados hifas. Se reproducen sexual y asexualmente por meiosis y mitosis, respectivamente. Han colonizado diversos hábitats y juegan importantes roles ecológicos. (Moore, Robson, Trinci, 2011, p. 4; Webster, & Weber, 2007. p.1-2).

Por sus funciones ecológicas los hongos se clasifican en parásitos, saprofitos, micorrízicos o endófitos. Siendo uno de los roles más importantes la degradación de materia orgánica, debido sus rutas metabólicas únicas. Pueden formar asociaciones mutualistas con algas, líquenes, y con plantas, entre las que se encuentran las micorrizas y los endófitos (Arnold et. al, 2001, p.1502; Moore et al., 2011, p. 4). Estos últimos confieren tolerancia al estrés a las comunidades vegetales, son fuente de metabolitos secundarios ecológica y económicamente valiosos (Rodríguez et al., 2009, p. 314).

Actualmente, no se han reportado las especies de hongos endófitos presentes en Guatemala y se desconoce su número, aunque por su biología se considera un grupo hiperdiverso (Arnold, Maynard, Gilbert, Coley & Kursar, 2000, p. 267).

3.3. Hongos endófitos.

Los endófitos son hongos que viven asintómicamente entre los tejidos de las plantas. Otros pueden ser patógenos o saprofitos y participar en la descomposición de materia orgánica (Brown, Hyde & Guest, 1998, p. 27; Ghimire, & Hyde, 2004, p. 281). Fueron descubiertos en **1970** en tejidos de gramíneas (Bacon, Porter, Robbins & Luttrell, 1977, p. 577).

Los hongos endófitos más estudiados son ascomicetos, pertenecientes a la familia *Clavicipitaceae*. Estos colonizan los tejidos de especies de gramíneas templadas. Se transmiten verticalmente de una generación a otra por las semillas (Saikkonen, Faeth, Helander & Sullivan, 1998, p.319). Forman asociaciones mutualistas con plantas que les confieren resistencia a patógenos, desecación, herbivoría, tolerancia a metales pesados, estimulan el crecimiento de las raíces y pelos radiculares por secreción de fenoles mejorando la aptitud de las comunidades vegetales y su resistencia al cambio climático (Rodríguez et al., 2009, p. 314). Participan en el reciclaje de nutrientes en ecosistemas naturales, debido a que poseen los paquetes enzimáticos para la degradación de hojas y madera pudiendo actuar como saprofitos (Kumaresan & Suryanarayanan, 2002, p.83; Sun, Guo & Hyde 2011, p. 85).

Sintetizan diversos compuestos dentro de los que destacan los alcaloides (Dahlman, Eichenseer & Siegel, 1991, p.228). Presentan actividad antifúngica (indol y diacetamida), anticancerígena (taxol), útiles en biotecnología (Soliman, Trobacher, Tsao, Greenwood, & Raizada, 2013, p. 1; Wanderley, et al., 2012, p.1166).

Aunque se desconoce el número exacto de especies de endófitos, constituye un grupo diverso, particularmente los endófitos foliares que se han

encontrado en linajes de plantas desde musgos hasta angiospermas (Davis, Franklin, Shaw & Vilgalys, 2003, p. 1663).

3.4. Hongos endófitos en el ecosistema de manglar

Los hongos endófitos se encuentran ampliamente distribuidos en diversos ecosistemas. Se reporta alta diversidad de endófitos para ecosistemas de manglar de China, India, Hong-Kong, Tailandia y Brasil (Ananda & Sridhar, 2002, p.871; Li, Sun, Chen, Guo, 2016, p.180; Pang, Vrijmoed, Khiang Goh, Plaingam & Jones, 2008, p. 17; Wanderley et al., 2012, p. 1165). Algunos de los géneros reportados como frecuentes para ecosistemas de manglar son: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis* y *Xylaria* (Chaeprasert, Piapukiew, Whalley, & Sihanonth, 2010, p. 555; Gu, Bai, Zeng, Chang, Mei, 2012, p. 1;). Sin embargo, se considera que gran parte de la diversidad aún no ha sido explorada.

Así mismo, se ha evidenciado que la estructura de las comunidades de endófitos en mangle se ve influenciada por el hospedero, el tejido colonizado y factores ambientales (Li et al, 2016, p.180). Otro aspecto interesante, es que la mayoría de los hongos endófitos que se encuentran asociados a las raíces de diversas especies de mangle son hongos terrestres, lo que sugiere una adaptación a las condiciones de estrés abiótico y búsqueda de protección dentro de los tejidos del mangle, favoreciendo su competencia con saprofitos de las raíces (Ananda & Sridhar, 2002, p.871).

3.5. Importancia de los hongos endófitos para el ecosistema de manglar

Se ha sugerido que el potencial de los manglares puede estar asociado a hongos endófitos (Sosa-Rodríguez, Sánchez-Nieves y Melgarejo, 2009, p.40). En diversos estudios se ha evidenciado que los endófitos de manglar producen sustancias antimicrobianas, antibióticas, anticancerígenas e insecticidas que les sirven como mecanismo de defensa contra patógenos y estreses relacionados con la salinidad del sustrato (Dutta, Puzari, Gogoi, & Dutta, 2014, p.623; Gilbert,

Mejía Chang & Rojas, 2002, p.285). Otra característica importante de los mangles es la absorción de metales pesados, en experimentos controlados en el laboratorio se ha comprobado que algunos endófitos protegen a las plántulas del estrés ocasionado por metales pesados (Gong, Liu, Liao, Song, & Zhang, 2017, p. 530). Aunque las rutas metabólicas exactas y los mecanismos de simbiosis específicos son desconocidos en la actualidad, se presumen que el papel de los endófitos es de gran importancia en los ecosistemas de manglar, teniendo gran plasticidad de roles funcionales que les permitirían ser una herramienta de conservación y biorremediación (Ling, Lim, Mujahid, Proksch, & Müller, 2016, p.1063)

3.6. Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico

La Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico se localiza al sureste de la República de Guatemala entre los municipios de Taxisco, Chiquimulilla y Guazacapán del departamento de Santa Rosa, siendo sus coordenadas 90°26'21" y 90°30'14" longitud Oeste y paralelos 13°58'28" y 14°0'38" latitud Norte. Es administrada por el Centro de Estudios Conservacionistas (CECON) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Es un humedal que constituye hábitat para una alta diversidad de especies de flora y fauna (Sigüenza y Ruíz-Ordoñez, 1999).

3.7. Ecosistema de manglar

Los manglares están conformados por 40-50 especies que han desarrollado adaptaciones morfológicas y fisiológicas que les permiten habitar en ambientes hostiles, en Guatemala se cuenta únicamente con 4 especies de mangle (INAB-CONAP, 2015, p.1; Tomlinson, 1986, p.3). En Guatemala los departamentos con mangle son: San Marcos, Retalhuleu, Escuintla, Santa Rosa, Jutiapa, e Izabal, teniendo una cobertura de 25,089 ha que corresponde a un 0.23% de la cobertura forestal del país (INAB-CONAP, 2015, p.2; Ministerio de Ambiente y Recursos Naturales (MARN), 2013, p.3).

La dinámica de los ecosistemas de manglar comprende la producción, la composición, el transporte, las rutas y transformaciones del carbono orgánico. El carbono orgánico que entra en cadenas tróficas de manglares es esencial para la supervivencia de los organismos asociados. (Kristensena, Bouillonb, Dittmard & Marchande, 2008, p. 201).

Las principales fuentes de carbono autóctonas son la hojarasca de manglar y microalgas bentónicas. La dinámica del ecosistema es amenazada por la subestimación del valor de este ecosistema y los impactos de las actividades humanas que contribuyen a su pérdida generalizada y la degradación (Gilbert & Janssen, 1998, p. 323). Los manglares también son sensibles al cambio climático, lo que puede conducir a una pérdida global máxima de 10 a 15% de los bosques de manglar (Alongi, 2008, p.1).

3.8. Estudios en Guatemala.

No se cuenta con información de las especies de endófitos presentes en Guatemala. Se reportan únicamente en una investigación con enfoque de control biológico de plagas, en la que se utiliza una cepa de *Trichoderma atroviride* P. Karsten para el control del nemátodo *Radopholus similis* (Chaves, 2007, p. 54).

4. JUSTIFICACIÓN

Los hongos constituyen un grupo extremadamente diverso y poco estudiado de organismos, con alrededor de 1.5 millones de especies en la Tierra. (Blackwell, 2011, p.431; Hawksworth, 2001, p.142; Miller, 1995, p.50). La mayoría de linajes de plantas (briofitas, pteridofitas, gimnospermas y angiospermas) de están colonizadas por endófitos, hongos asintomáticos que se producen entre las células, y representan una amplia gama de grupos taxonómicos (Arnold & Lutzoni, 2007, p. 541; Saikkonen et al., 1998, p.319) Estos se caracterizan por proporcionar a su hospedero resistencia a estrés biótico y abiótico, aumentando la aptitud de las comunidades vegetales (Rodriguez et al., 2009, p. 314).

En los ecosistemas de manglar los endófitos tienen potencial para la resistencia al estrés que ocasiona el cambio climático al activar mecanismos de defensa en el hospedero (Ravindran, Naveenan, Varatharajan, Rajasabapathy & Meena, 2012, p.269). De esta forma favorecen la estabilidad de la cadena trófica de los ecosistemas marinos adyacentes, afectando directamente a especies de peces y camarones cuya pesca constituye una actividad económica importante para el país. Sin embargo, para Guatemala existe escasa información relacionada con endófitos (Chaves, 2007, p. 54). Por lo que ha limitado su investigación de forma sistemática en diversos ecosistemas, lo que dificulta otros estudios y aplicaciones de su potencial. De no conocerse la diversidad y la dinámica de los hongos endófitos en los ecosistemas de manglar, su conservación se verá limitada o será poco eficaz a largo plazo.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Determinar la diversidad de especies de la comunidad de hongos endófitos presentes en dos especies de Mangle (*Rhizophora mangle* L. y *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn.C.F.) de la Reserva Natural de usos Múltiples Monterrico.

5.2. Específicos

- Identificar las especies de hongos endófitos asociados a *Rhizophora mangle* L. y *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn.C.F. de la Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico.
- Comparar la composición de especies de hongos endófitos en función del hospedero en el Ecosistema de Manglar de la Reserva Natural de Usos múltiples Monterrico.

6. HIPÓTESIS

La composición de especies de la comunidad de hongos endófitos en la Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico, está determinada por el hospedero (*Rhizophora mangle* L. y/o *Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaertn), dado que poseen una alta especificidad en la selección de los mismos (Petrini, 1996).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Universo: El universo comprende todas las especies de hongos endófitos pertenecientes al ecosistema de manglar de la Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico.

7.1.1. Muestra:

La muestra se obtuvo de acuerdo con el protocolo de Wanderley, et al. (2012) y Gamboa, Laureano & Bayman (2002). Consistió en tres hojas en buen estado escogidas al azar de cuatro árboles de *Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaertn. (mangle blanco) y cuatro árboles de *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo), seleccionados según su estructura: madurez, saludables, con un DAP > de 10 cm (medido a 1.3 m de distancia del sustrato). Muestras botánicas de los hospederos se ingresaron al Herbario BIGU, para el establecimiento de su identidad taxonómica (Anexo 1). De cada muestra (hoja) se obtuvieron 6 submuestras de aprox. 0,5 mm² (del ápice-A-, medio-M- y base-B-). Las muestras fueron colectadas en sitios de muestreo separados por la distancia mínima de un 1 km (Wanderley et al., 2012). En cada sitio de muestreo se seleccionaron al azar los árboles de las especies de interés para tomar la muestra.

7.1.2. Variables

-Temporalidad: Época lluviosa

-Variable independiente: Mangle

-Variable dependiente: Composición de hongos endófitos en las hojas.

7.2. Recursos

7.2.1. Humanos

7.2.1.1. Asesores

Dra. Maura Quezada
Licda. Celeste Méndez

7.2.1.2. Investigador

Br. Angela Barrios

7.2.2. Institucionales

Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

Centro de Estudios Conservacionistas (CECON), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

Personal administrativo y guardarecursos de la Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico.

Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

7.3. Materiales

7.3.1. Equipo de colecta

- Libreta de campo
- Números de colecta
- Bolsas plásticas
- Tijeras para podar
- Cinta métrica

7.3.2. Materiales de laboratorio

- Láminas portaobjetos
- Láminas cubreobjetos
- Cajas de Petri de vidrio
- Cajas de Petri de plástico
- Erlenmeyer de 500 ml
- Tubos de ensayo
- Agujas de disección
- Hoja de bisturí No. 11
- Papel limpiantes
- Papel mayordomo
- Papel paraflim
- Bolsas plásticas con cierre hermético
- Guantes de latex desechables
- Asas en punta y en L
- Claves taxonómicas

7.3.3. Materiales de oficina

- Marcador permanente punto fino
- Lapiceros
- Bitácora
- Papel bond tamaño carta
- Masking tape
- Regla de 30 cm
- Claves taxonómicas

7.3.4. Equipo

- Microscopio óptico marca Zeiss calibrado en micrómetros (μm)
- Estereoscopio marca Motic con aumento desde 4x hasta 40x
- Cámara digital

- Medidor de temperatura marca Digital Hygro-Thermometer
- Horno con temperaturas hasta 80°C

7.3.5. Reactivos

- Azul de lactofenol
- Aceite de inmersión
- Agua desmineralizada
- Alcohol polivinílico

7.3.6. Medios de cultivo

- Agar papa dextrosa (PDA)
- Agar Extracto de Malta (MEA)
- Agar Sabouraud
- Agar Czapeck-Dox

7.4. Métodos

7.4.1. Fase de Campo

Establecimiento de los sitios de colecta

Se realizaron premuestras a través del el Canal de Chiquimulilla, que se encuentra dentro de la Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico para la selección de los sitios de colecta con una distancia mínima de 1 km entre los mismos para evitar la autocorrelación de la muestra (Wanderley, et al., 2012).

Posteriormente se seleccionaron cuatro individuos de *R. mangle* (R1, R2, R3, R4) y cuatro individuos de *L. racemosa* (L1, L3, L4, L5). Estos individuos serán considerados como unidades experimentales y los sitios donde se encuentran ubicados se codificaron como PR1, PR2, PR3, PR4, PL1, PL3, PL4 y PL5 respectivamente (Figura 1).

Tabla 1. Georreferenciación de los siete puntos de colecta dentro de La Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico, seleccionados para la colecta de hongos endófitos.

CÓDIGO	LATITUD	LONGITUD	ALTITU D	DISTANCIA (KM)
PR1	13.89369	-90.44144	0	1
PR2	13.89563	-90.44233	0	1.01
PR3	13.89636	-90.44519	3	1.02
PR4	13.89617	-90.44786	4	1.25
PL1	13.89449	-90.44150	18	0
PL3	13.89363	-90.44119	8	1.03
PL4	13.89897	-90.45138	-1	1.12
PL5	13.900527	-90.46075	-1	1.30



Figura 1. Mapa de puntos de Colecta en la Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico.

Método de Colecta

De cada árbol para ambas especies se colectaron tres hojas pertenecientes al mismo estrato arbóreo. Las muestras fueron elegidas al azar, se verificó que no tuvieran evidencia de presencia de patógenos, posteriormente se depositaron en bolsas herméticas, separando las que pertenecían a cada individuo. Seguidamente fueron almacenadas en una hielera y transportadas al laboratorio el mismo día de la colecta para evitar pérdida de hongos por la degradación de la hoja. Al llegar al laboratorio se sometieron a un proceso de esterilización superficial.

7.4.2. Fase de Laboratorio

Aislamiento y cultivo de hongos

Las muestras fueron sembradas el mismo día de la colecta, de acuerdo con el protocolo propuesto por Petrini (1986), en el laboratorio del Departamento de microbiología, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Las hojas fueron lavadas con agua corriente, esterilizando la superficie con etanol al 70% (5 s), posteriormente se sumergieron en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 4% (90 s), y se enjuagaron con agua destilada estéril (10s). De cada hoja se obtuvo un conjunto de 6 submuestras (2 del ápice-A-, 2 del medio-M- y 2 de la base-B-) de aproximadamente 0.5 mm² (Gamboa et al., 2002).

Cada conjunto de submuestras fue inoculado en un medio de agar papa dextrosa (PDA), suplementado con cloranfenicol en una caja de petri. Todas las cajas de petri se mantuvieron a temperatura ambiente ($25^{\circ} \pm 1$) y las colonias de hongos que crecieron a partir de los fragmentos de hojas fueron examinadas durante cuatro semanas (Figura 2). Para inducir la esporulación algunos hongos fueron transferidos a otros medios de crecimiento tales como agar extracto de malta, Czapek y Sabouraud (Wanderley et al., 2012).

Cultivo en lámina

Se utilizó la metodología propuesta por Riddell (1950) colocando en una caja de Petri previamente estéril un soporte de vidrio y sobre ella un portaojeto. Sobre este se colocó un fragmento de 1 mm de diámetro de PDA estéril. Con el montaje preparado se sembró el hongo con un asa estéril y se colocó el cubreobjetos sobre el agar. Posteriormente se agregaron 10 ml de agua destilada estéril al sistema, se selló con papel parafilm y se dejó en observación durante 15 días. Pasado en tiempo de incubación, se retiró el fragmento de agar, se añadió azul de lactofenol o alcohol polivinílico y se observó al microscopio. El cultivo en lámina de hongos es uno de los métodos más eficientes para observar las estructuras fructíferas de los mismos. Las láminas de los hongos identificados, etiquetadas y se depositaron en el Herbario BIGU (Anexo 1).

Identificación de Hongos

La identificación se hizo utilizando una modificación de las claves taxonómicas según Domsch, Gams & Anderson. (1980), Aggarwal & Hasija (1980), Petrini (1986), Addy, Piercey & Currah, (2005), Seifert, Morgan-Jones, Gams, & Kendrick (2011) y literatura reciente relacionada con las especies identificadas. Las claves taxonómicas estándar incluyen la textura, la forma y color de las colonias (caracterización macroscópica) y las dimensiones y morfología de las hifas y conidios (caracterización microscópica) (Soto-Barajas, Vázquez De Aldana y Zabalgoeazcoa, 2014, p. 194).

Mantenimiento

Los cultivos puros fueron transferidos a tubos con agar papa dextrosa inclinado, a temperatura ambiente, adicionados con aceite mineral (Lloyd,1994) para su posterior ingreso en la colección del Herbario USCG.

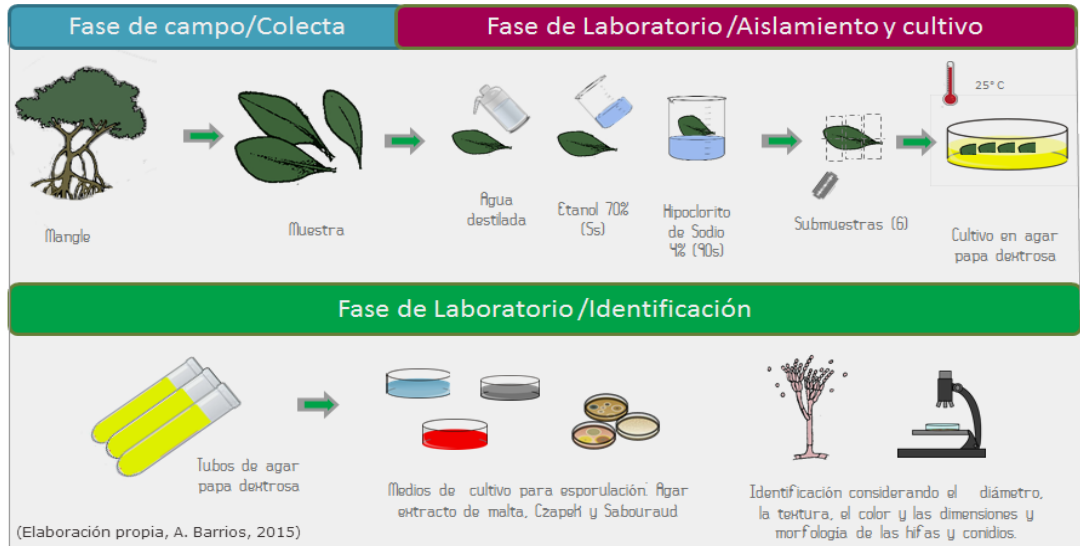


Figura 2. Procesamiento de material vegetal y fúngico.

7.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

7.5.1. Análisis de riqueza y composición de la información

Para el análisis de la composición de especies de hongos endófitos se utilizaron tablas descriptivas y diagramas de barras.

7.5.2. Cálculo de la frecuencia de colonización

Para determinar las abundancias relativas de las especies de la comunidad de endófitos por hospedero, se realizó el cálculo de la frecuencia de colonización (%) de una especie de hongo endófito, que es igual al número de segmentos colonizados por un solo endófito dividido por el número total de segmentos observados, multiplicado por cien.

$$F = \frac{N_{col}}{N_{total}} \times 100.$$

(Suryanarayanan, Venkatesan & Murali, 2003)

7.5.3. Endófito Dominante

Para determinar la heterogeneidad del ensamble de especies de la comunidad de endófitos se realizó el cálculo del endófito dominante, que es igual a la frecuencia de colonización de una especie (F) dividida por la frecuencia de colonización total de los endófitos observados (SF), multiplicados por cien.

$$D = \frac{F}{SF} \times 100.$$

(Bagchi & Banerjee, 2014)

8. RESULTADOS

8.1. Riqueza y Abundancia de endófitos

De un total de 144 fragmentos de hoja analizados de las dos especies de mangle de interés, se aislaron 84 colonias de endófitos (Figura 3), correspondiendo 60 colonias (71%) a micelio estéril no identificado (ED) y 24 (29%) pertenecientes a diferentes especies. De las colonias identificadas (EI), 15 fueron aisladas de *Rhizophora mangle* (mangle rojo, R) y nueve de *Laguncularia racemosa* (mangle blanco, L).

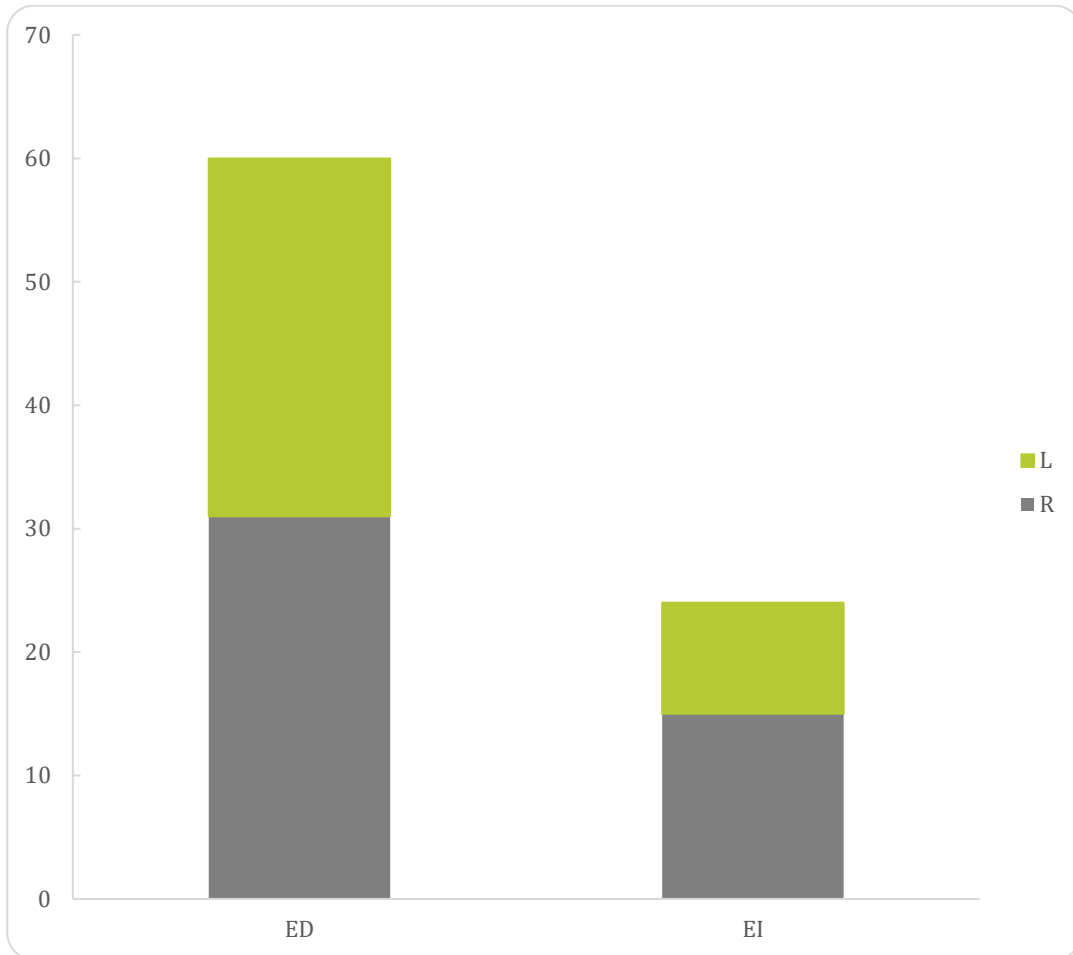


Figura 3. Abundancia de colonias aisladas. Colonias totales aisladas de fragmentos de hoja. ED= Especies Desconocidas; EI= Especies Identificadas; R= *R. mangle*; L= *L. racemosa*.

Las 24 colonias identificadas se clasificaron en 10 especies de endófitos (Tabla 2). De estas *Fusarium equiseti*, *Paecilomyces* sp. y *Ramichloridium* sp. son especies compartidas por ambos hospederos, el resto presenta especificidad (Figura 4, Anexo 2).

Tabla 2. Hongos endófitos aislados en *Rhizophora mangle* y *Laguncularia racemosa* en La Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico

Especie	Familia
<i>Aspergillus flavus</i>	Aspergillaceae
<i>Cladosporium halotolerans</i>	Cladosporiaceae
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	Cladosporiaceae
<i>Curvularia</i> sp.	Pleosporaceae
<i>Fusarium equiseti</i>	Nectriaceae
<i>Pestalotipsis</i> sp	Pestalotipsidaceae
<i>Scopulariopsis</i> sp.	Microascaceae
<i>Chloridium virescens</i>	Chaetosphaeriaceae
<i>Ramichloridium</i> sp.	Mycosphaerellales
<i>Paecilomyces</i> sp	Aspergillaceae

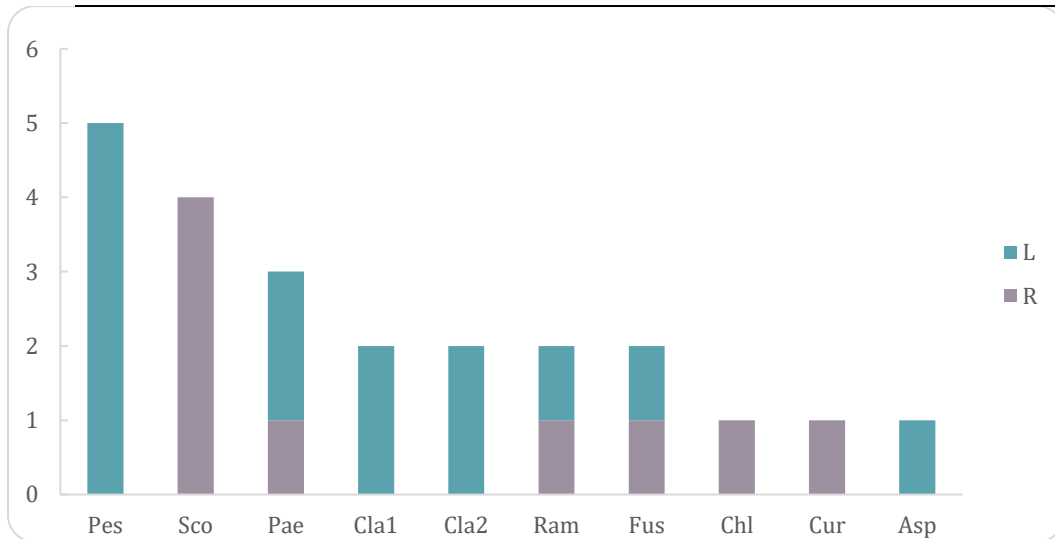


Figura 4. Riqueza de especies de endófitos. Especies totales aisladas para ambos hospederos. Pes= *Pestalotiopsis* sp. ; Sco= *Scopulariopsis* sp.; Pae= *Paecilomyces* sp.; Cla1= *Cladosporium halotolerans*; Cla2= *Cladosporium sphaerospermum*; Ram= *Ramichloridium* sp.; Fus= *Fusarium equiseti*; Chl= *Chloridium* sp.; Cur= *Curvularia* sp.; Asp= *Aspergillus flavus*, R= *R. mangle*, L= *L. racemosa*.

8.2. Frecuencia de Colonización (FC%)

El endófito más frecuente para *Rhizophora mangle* fue *Scopulariopsis* sp., (5.56 %) y los menos frecuentes *Chloridium virescens* (1.39%) y *Curvularia* sp. (1.39%). Para *Laguncularia racemosa*, *Pestalotipsis* sp. (6.94%) presentó mayor frecuencia de colonización, seguido de las especies del género *Cladosporium* (5.56% en conjunto), la menor frecuencia corresponde a *Aspergillus flavus* (1.39%) (Figura 5).

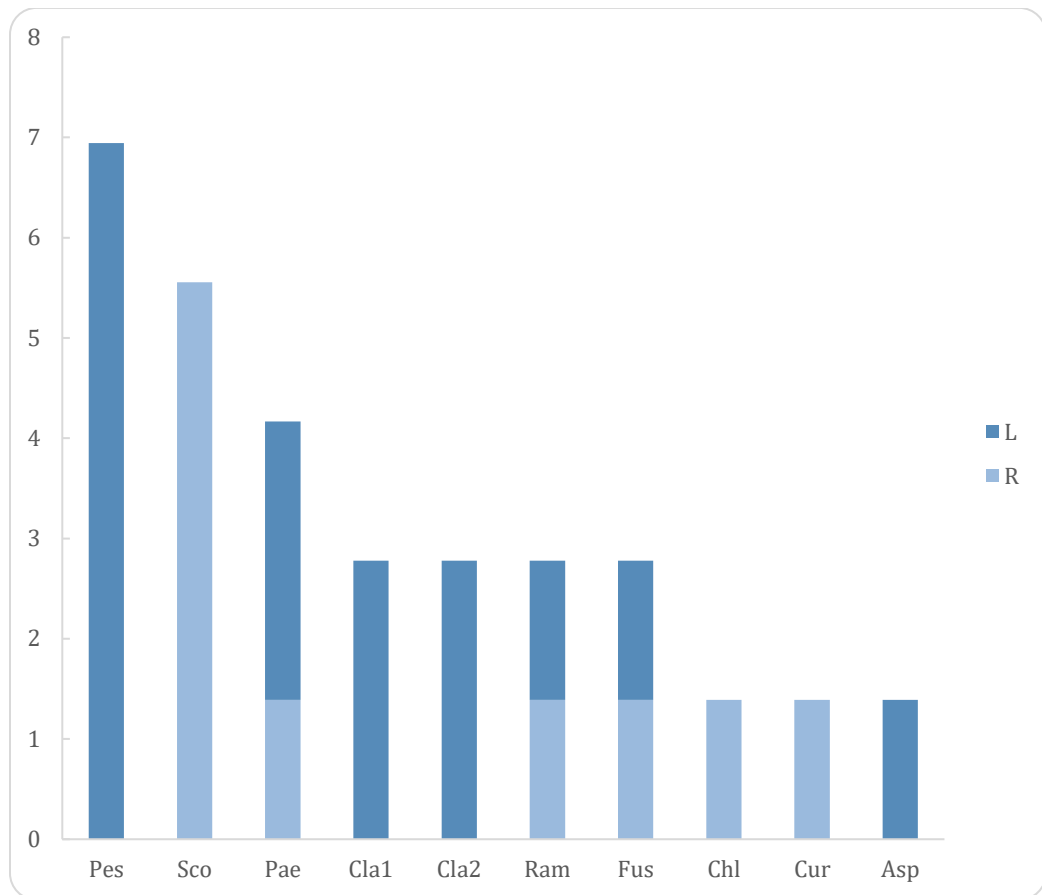


Figura 5. Frecuencia de colonización de endófitos. Endófitos frecuentes aisladas para ambos hospederos. Pes= *Pestalotiopsis* sp.; Sco= *Scopulariopsis* sp.; Pae= *Paecilomyces* sp.; Cla1= *Cladosporium halotolerans*; Cla2= *Cladosporium sphaerospermum*; Ram= *Ramichloridium* sp.; Fus= *Fusarium equiseti*; Chl= *Chloridium* sp.; Cur= *Curvularia* sp.; Asp= *Aspergillus flavus*, R= *R. mangle*, L= *L. racemosa*.

8.3. Endófito dominante

El endófito dominante para el ensamble de *Rhizophora mangle* fue *Scopulariopsis* sp. (44.44%) y para *Laguncularia racemosa* fue *Pestalotiopsis* sp. (35.71%), seguido por las especies del género *Cladosporium* (21.43% en conjunto) (Figura 6).

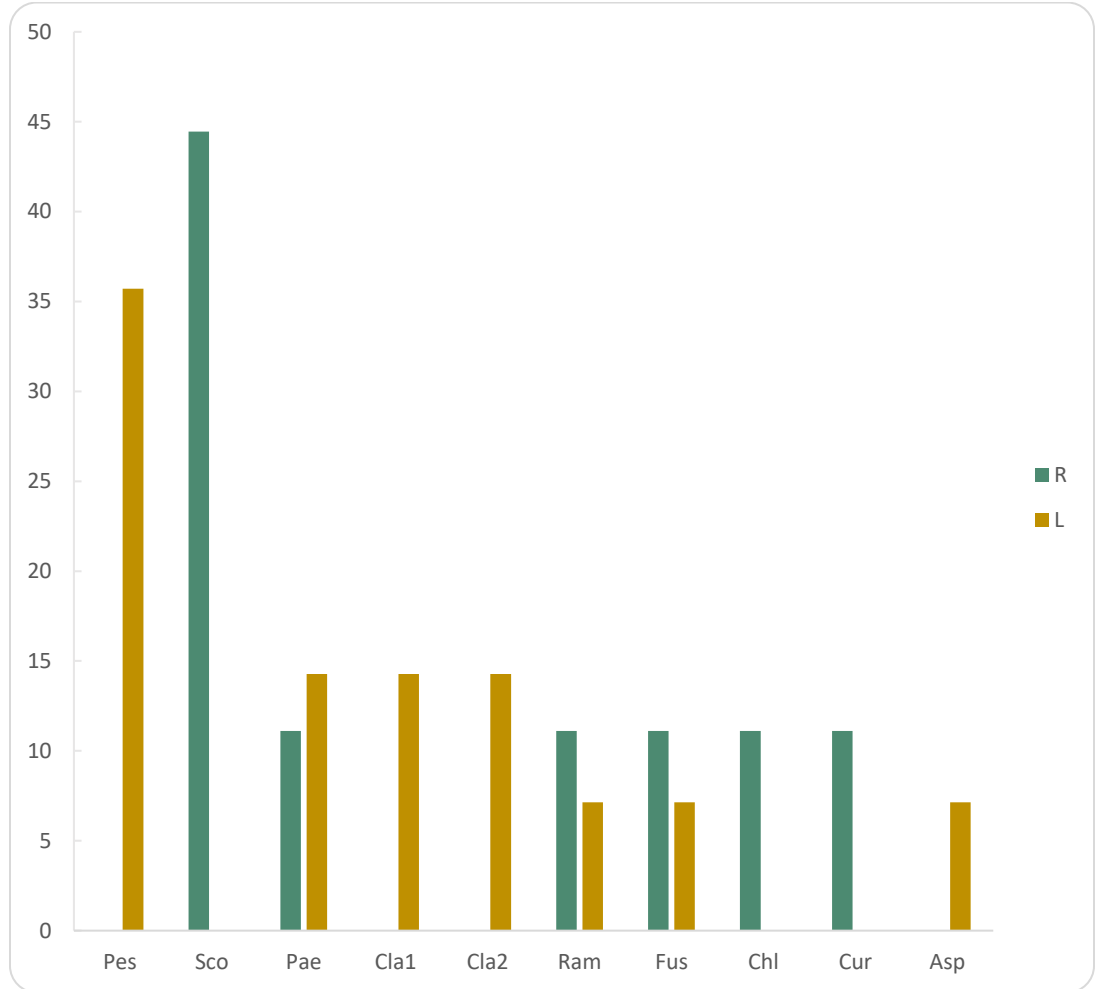


Figura 6. Dominancia de endófitos. Endófitos Dominantes asilados para ambos hospederos. Pes= *Pestalotiopsis* sp. ; Sco= *Scopulariopsis* sp.; Pae= *Paecilomyces* sp.; Cla1= *Cladosporium halotolerans*; Cla2= *Cladosporium sphaerospermum*; Ram= *Ramichloridium* sp.; Fus= *Fusarium equiseti*; Chl= *Chloridium* sp.; Cur= *Curvularia* sp.; Asp= *Aspergillus flavus*, R= *R. mangle*, L= *L. racemosa*.

8.4. Composición de la comunidad de endófitos

De todos los individuos de *R. mangle* se aislaron colonias de endófitos (46 colonias) siendo R1 el que presentó mayor número de colonias. De los individuos de *L. racemosa* (36 Colonias), L1 no tuvo presencia de endófitos (Figura 7).

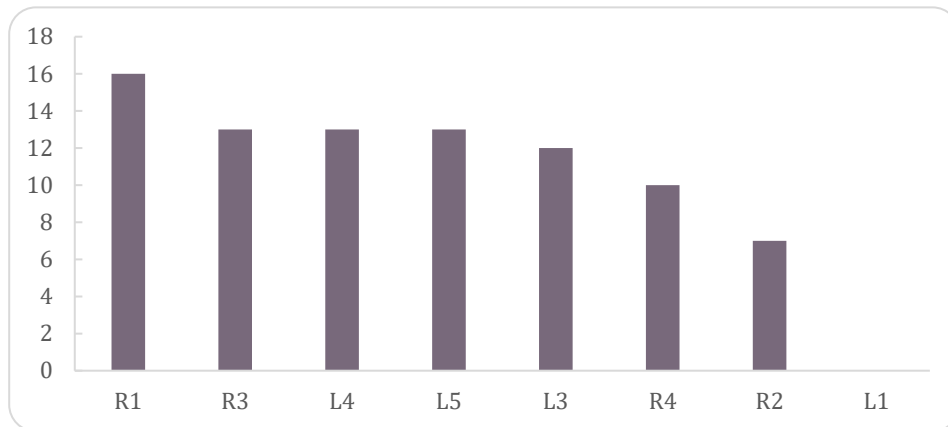


Figura 7. Número de colonias aisladas por individuo. Colonias totales aisladas por hospederos. R= *R. mangle*; L= *L. racemosa*.

9. DISCUSIÓN

9.1. Riqueza y Abundancia de endófitos

Diversas interacciones hongo-planta tienen lugar en el ecosistema de manglar, siendo fundamentales en los procesos de reciclaje de nutrientes, resistencia a estrés bióticos o abiótico, entre otras (Chen, Zhao, Li, Jian, y Ren, 2016, p. 3; Sosa-Rodríguez, Sánchez-Nieves y Melgarejo, 2009, p.39). Los hongos endófitos desempeñan un papel esencial en la tolerancia de los manglares a la salinidad, patógenos y producción de metabolitos biológicamente activos (Bamisile, Dash, Akutse, Keppan & Wang, 2018, p.1; Kannan, Kumar, Ramya, Madhu Nika, Meenatchi, Sowmya, Bhuvaneswari, 2014, p. 4084; Kis-Papo, Oren, Wasser y Nevo, 2001, p. 756; Rajamanikyam, Vadlapudi, Amanchy & Upadhyayula, 2017, p. 1). Este ecosistema constituye un entorno ideal para el aislamiento de endófitos debido a que integra áreas de alta diversidad, tiene antecedentes etnobotánicos para la obtención de compuestos medicinales y se desarrolla en un ambiente con condiciones únicas (Sánchez-Fernández, Sánchez-Ortiz, Sandoval-Espinosa, Ulloa-Benítez, Armendáriz-Guillén, García-Méndez, & Macías-Rubalcava, 2013, p.141)

En este estudio se aislaron 84 colonias de endófitos, de las cuales únicamente el 29% se identificaron. Estudios anteriores coinciden en que es frecuente aislar micelios estériles al trabajar con endófitos, en particular cuando se trata de endófitos tropicales, por diversas razones (Arnold et al., 2000, p 270.; Chutulo y Chalannavar, 2018, p. 3; Hamzah et al, 2018, p.10; Hawksworth & Rossman, 1997, p.890; Tayung, Sarkar y Baruah, 2012, p.653). El porcentaje de micelio estéril aislado varía de un estudio a otro, pudiendo representar hasta arriba del 54% de la diversidad explorada (Fisher, Petrini, Petrini & Sutton, 1994, p. 341), como en este estudio. Los micelios estériles no pueden ser identificados taxonómicamente al utilizar técnicas tradicionales, dado que éstas se basan en las características morfológicas de las esporas y estructuras reproductivas (Sun

& Guo, 2012, p.67; Vincent, Weiblen & May, 2016, p. 838; Vinnere, 2004, p.36). La falta de esporulación puede estar influenciada por las sustancias químicas producidas por el hospedero, es decir la química de la hoja, lo que incide en su especificidad y dificulta replicar las mismas condiciones en un medio de cultivo, (Sieber, 2007, p.83; Wear, Sutton, Morley & Gange,2012, p. 1085). También influyen los métodos de cultivo, esterilización y condiciones de incubación, tal es el caso del uso del papel Parafilm que evita la desecación del medio de cultivo, pero en algunos casos puede inhibir la esporulación (Mueller, Bills & Foster,2004, p. 495). Por las causas anteriores, este grupo constituye gran parte de la diversidad inexplorada en lo que se refiere a hongos, con un 71% de especies sin identificar en este estudio, que se presume son especies raras con requerimientos estrictos (Figura 3). Dada la recurrencia del aislamiento de micelio estéril y otras limitaciones taxonómicas, se estima que existen 1.5 millones de endófitos de bosques tropicales sin identificar (Dreyfuss & Chapela, 1994), por lo que resulta útil la combinación de técnicas tradicionales dependientes del cultivo combinadas con técnicas moleculares (secuenciación de alto rendimiento) que permiten la identificación de micelio estéril. En algunos casos suelen clasificarse dichos micelios a nivel de morfoespecie o morfotipo, sin embargo, esto no es recomendable dado que no reflejan la filogenia al no constituir unidades taxonómicas reales y debido a la gran plasticidad fenotípica (especies crípticas) de este grupo tiende a la subestimación al aplicar este método (Sun & Guo, 2012, p.68).

Un mosaico de especies e individuos de endófitos pueden ser observados a una escala fina en plantas tropicales (Lodge, Fisher & Sutton, 1996, p.733). Este puede estar influenciado por varios factores que inciden en el número de especies aisladas, un aspecto relevante es el tamaño del tejido utilizado, en este caso fragmentos de 0.5mm², de acuerdo con Gamboa, et al. (2012) es el tamaño eficiente para obtener la mayor diversidad posible de endófitos dado que reduce la competencia entre hongos y aumenta el borde en comparación con fragmentos más grandes. Así mismo el tamaño de la muestra (3 hojas) es el adecuado dado que alrededor de la mitad de la diversidad de endófitos foliares está presente en

un fragmento de 2mm² de una sola hoja (Bayman, Lebrón, Tremblay & Lodge, 1997, p. 147; Gamboa et al, 2002, p.43). De las especies identificadas, las más abundantes corresponden a *Pestalotiosis* sp. y *Scopulariopsis* sp. (Tabla 2, Figura 4), esto coincide con lo reportado por Liu, Chen, Jin, Zhao, Jeewon & Xu (2012), donde documentan a *Pestalotiopsis* como abundante en el ensamble de la comunidad de endófitos. Sin embargo, sugieren que es común que colonice todas las especies de mangle, pero en este estudio se encuentra restringido a *L. racemosa*. En tanto que *Scopulariopsis* sp. ha sido documentado como endófito por Wanderley, et. al (2012), no obstante, tradicionalmente se le reporta como saprófito (Sandoval-Denis, Gené, Sutton, Cano-Lira, de Hoog, Decock, Wiederhold, 2015, p.1). Por lo que requieren más estudios para documentar el rol de esta especie en la comunidad de mangle.

La mayor riqueza corresponde al género *Cladosporium* con dos especies identificadas (Figura 4). Esto indica que los requerimientos de *Cladosporium* para esporular en un medio de cultivo no son restrictivos, por lo que constituyen un género de distribución cosmopolita, dominante en otros ecosistemas de manglar (Liu, Zhang, Lin, Hu, & Wang, p., 2015, p. 633; Liu, Zhang, Hu, & Wang, 2013, p. 54). Tanto *Cladosporium halotolerans* como *Cladosporium sphaerospermum*, tienen la característica de tolerar hábitats hipersalinos (Zalar, de Hoog, Schroers, Crous, Groenewald & Gunde-Cimerman, 2007). Basándonos en lo anterior, se dilucida que se encuentren restringidas a *L. racemosa*, cuyas glándulas de excreción de sal localizadas en las hojas ocasionan que la concentración de sales sea alta en la lámina foliar (Francisco, 2009, p.237). Cabe mencionar que estas especies implican riesgo patogénico provocando necrosis de las hojas (Liu, Li, Lin & Zhang, 2016, p. 4). Debido a que los hongos endófitos pueden asumir distintos roles ecológicos, como mutualistas cuando es favorable para la interacción huésped-hospedero, o cómo patógenos cuando el hospedero se encuentra dañado o sometido a situaciones de estrés disociando la relación simbiótica (Redman, Dunigan, Rodríguez, 2001, p.715; Schulz, Römmert, Dammann, Aust & Strack, 1999, p. 1282; Siebert, 2007, p.83).

9.2. Frecuencia de colonización (FC%)

La frecuencia de colonización (FC%) nos indica qué tan frecuente es un endófito en el ecosistema estudiado, de acuerdo con Hyde (1989) los hongos presentes en porcentaje > 10% son “comunes” y los hongos presentes con un porcentaje < 10% son “frecuentes”. Según este criterio los hongos identificados en este estudio (Figura 5) se clasificarían como frecuentes, dado que corresponden a especies con requerimientos generalistas. *Scopulariopsis* sp. es frecuente para *R. mangle* y *Pestalotiopsis* sp. para *L. racemosa*. Las variaciones en la frecuencia de colonización están relacionadas con la especificidad de los endófitos a su hospedero (Apigo & Oono, 2018, p.15) Las especies compartidas *Fusarium equiseti* y *Paecylomyces* sp. presentan la misma frecuencia para ambos hospederos. Las condiciones ambientales también inciden en la frecuencia de colonización (Sun & Guo, 2012, p.119), por lo que las frecuencias varían según el lugar en el que encuentre ubicado el hospedero.

9.3. Endófito dominante

El endófito dominante para *R. mangle* es *Scopulariopsis* sp., y para *L. racemosa* es *Pestalotiopsis* sp. (Figura 6). Los endófitos dominantes describen variaciones en los ensambles de las comunidades (Paris, 2016, p.24). Aunque, en este caso los porcentajes de dominancia demuestran la heterogeneidad de la comunidad, sus valores son similares.

9.4. Composición de la comunidad de endófitos.

Se define una comunidad ecológica como un grupo de organismos de distintas especies que conviven en un lugar y tiempo determinado que potencialmente interactúan (Gee & Giller, 1987, p. 519; Grime, 2001, p. 204). Dicha comunidad posee atributos que la caracterizan tales como: riqueza, la abundancia, la composición y la diversidad (Begon, Harper & Townsend, 1986, p. 700). En este estudio no fue posible caracterizar la composición de las especies, es decir, la lista de especies taxonómicas que componen la comunidad (Valverde,

Meave, Carabias, Cano-Santana, 2005, p.76) dada la cantidad de especies sin identificar. Por lo que no puede predecirse a ciencia cierta, el ensamble de la comunidad de endófitos ni aseverar que está conformada únicamente por las especies identificadas.

No obstante, es posible evidenciar algunas tendencias en cuanto a la incidencia de factores ambientales y la especificidad endófito-hospedero. Se aislaron colonias de endófitos de todos los hospederos, excepto de L1 (Figura 7). Este individuo se encuentra ubicado en el sitio “Las Flores”, que consta de aproximadamente 25 hectáreas degradadas por causa de incendios y que son inundables durante la época lluviosa (López, 2016). Esto demuestra que factores ambientales como el pH, la salinidad y la temperatura de este sitio con respecto a otros más conservados tiene incidencia en la comunidad de endófitos y que existe un punto de inflexión en cuanto a la tolerancia a estrés abiótico proporcionada por los mismos (Mandyam & Jumpponen, 2015). También sugiere un potencial papel de los endófitos como bioindicadores del estado de conservación del ecosistema de manglar y su resiliencia a estreses abióticos, como la acumulación de azufre y metales pesados. Se han documentado respuestas a la polución en endófitos asociados diversas especies de *Pinus* (Kowalski & Zych, 2002, p.251; Helander, 1995, p.223). Sin embargo, para ecosistemas de manglar continúa siendo un tema incipiente (Gong, Liu, Liao, Song, & Zhang, 2017, p. 530). Así mismo, aunque no se obtuvo la composición como tal, los resultados de abundancia, riqueza, frecuencia de colonización y endófito dominante indican una fuerte influencia del hospedero y en menor grado de las variables ambientales de los sitios donde estos se ubican. Cabe resaltar, que la identificación de especies raras aportaría un panorama más completo de las interacciones endófito-hospedero y de factores que inciden en la misma.

10.CONCLUSIONES

- La Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico presentó alta diversidad de endófitos, 84 colonias aisladas y 10 especies identificadas. La mayor riqueza identificada la presentó el género *Cladosporium*, mientras las especies más abundantes fueron *Scopulariopsis* sp. y *Pestalotiopsis* sp.
- Para *Rhizophora mangle* L., el endófito frecuente y dominante fue *Scopulariopsis* sp. mientras que para *Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaertn. fue *Pestalotiopsis* sp.
- La comunidad estudiada mostró diferencias en su composición en función del hospedero, siendo especies compartidas *Fusarium equiseti*, *Paecilomyces* sp. y *Ramichloridium* sp.
- En el caso de L1, no evidenció presencia de endófitos, lo que puede indicar que los factores ambientales, tales como la degradación inciden en la presencia de endófitos.
- No se identificó la composición de la comunidad de endófitos asociados a mangle de la Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico como tal, debido al sesgo en la identificación de especies que se ve reflejado en los atributos de esta (riqueza, composición, abundancia, diversidad, etc.).

11.RECOMENDACIONES

- Dado que las especies desconocidas constituyen un 71% de este trabajo, se recomienda continuar con la identificación taxonómica utilizando técnicas moleculares u otras técnicas, tales como preparación de agar a base de hojas de mangle que permitan inducir la esporulación. Así mismo, incluir en futuras investigaciones técnicas moleculares, en especial la secuenciación de alto rendimiento que se reporta como efectiva para la identificación de endófitos.
- Realizar análisis utilizando variables ambientales como temperatura, inundabilidad, salinidad, estado de degradación, entre otras, que permitan explicar la ausencia o presencia de endófitos en los distintos sitios de la Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico.
- Incluir en análisis futuros otros tejidos vegetales, tales como corteza y raíz para tener un panorama más amplio de la especificidad por estrato.
- Debido a la importancia de este grupo, se recomienda realizar estudios exploratorios de bioprospección con las especies identificadas. Así mismo, evaluar su potencial como bioindicadores del estado de conservación del ecosistema de manglar.

12.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Addy, H.D., Piercey, M.M. & Currah, R.S. (2005). Microfungal endophytes in roots. *Canadian Journal of Botany*, 2005, 83(1).

Aggarwal, G.P. & Hasija, S.K. (1980) Microorganisms in the laboratory. En: *Laboratory guide of mycology, Microbiology and plant pathology* (pp.58). India: Ravi printers Jabalpur.

Alongi, D. (2008). Mangrove forests: Resilience, protection from tsunamis, and responses to global climate change. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 76 (1), 1–13.

Ananda K. & Sridhar K.R. (2002) Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the west coast of India. *Can J. Microbiol.*, 48, 871–878.

Apigo, A. & Oono, R. (2018). Dimensions of Host Specificity in Foliar Fungal Endophytes. En: Pirttiläand, A. M. & Frank, A.C. (eds.), *Endophytes of Forest Trees*, Forestry Sciences. Suiza: Springer International Publishing.

Arnold, A.E., Maynard, Z. & Gilbert, G.S. (2001). Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycological Research*, 105(12), 1502-1507.

Arnold, A.E. & Lutzoni, F. (2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*, 88 (3), 541-549.

- Arnold, A.E., Maynard, Z., Gilbert, G., Coley, P.D. & Kursar, T. (2000). Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters*, 3 (4), 267 – 274.
- Bacon, C.W., Porter, J.K, Robbins, J.D. & Luttrell, E.S. (1977). *Epichloe typhina* from toxic tall fescue grasses. *Applied and Environmental Microbiology*, 34(5), 576–581.
- Bagchi B. and Banerjee D. (2014). Endophytic fungal diversity from four woody lianas plants of Chilkigarh, west medinipur, W.B. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 3(4),1375-1383.
- Bamisile, B. S., Dash, C. K., Akutse, K. S., Keppanan, R., & Wang, L. (2018). Fungal Endophytes: Beyond Herbivore Management. *Frontiers in Microbiology*, 9(544),1-11.
- Bayman P., Lebrón L.L., Tremblay R.L. & Lodge D.J. (1997): Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). *New Phytol.* 135,143–149.
- Begon, M., Harper J. L. & Townsend, C. R. (1986). *Ecology: individuals, populations and communities*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98(3), 426-438.
- Brown, K.B., Hyde, K.D. & Guest, D.I. (1998). Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia. *Fungal Diversity*, (1),27–51.

- Calcul, L., Waterman, C., Ma, W. S., Lebar, M. D., Harter, C., Mutka, T., Morton, L., Maignan, P., Olphen, A., Kyle, K. Vrijmoed, L., Pang, K., Pearce, C. & Baker, B. J. (2013). Screening Mangrove Endophytic Fungi for Antimalarial Natural Products. *Marine Drugs*, 11(12), 5036–5050.
- 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), 555–564.
- Chaves, N. (2007). *Utilización de bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del nematodo barrenador Radopholus similis (Cobb) Thorn* (Tesis de Maestría). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica.
- Chen, Q., Zhao, Q., Li, J., Jian, S., & Ren, H. (2016). Mangrove succession enriches the sediment microbial community in South China. *Scientific Reports*, 6 (27468), 1-9.
- Chutulo, E. C. & Chalannavar, R.K. (2018). Endophytic Mycoflora and Their Bioactive Compounds from *Azadirachta Indica*: A Comprehensive Review. *Journal of Fungi*, 4(42),1-12.
- Clay, K. & Schardl, C.L. (2002). Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist*, 160(S4), S99–S127.
- Clough, B.F. (1992). Primary productivity and the growth of mangrove forests. En: Robertson, A.I. & Alongi, D.M., (eds.). *Tropical Mangrove Ecosystems. Coastal and Estuarine Studies* (pp. 225-250). United States of America: American Geophysical Union.

- Dahlman, D.L., Eichenseer, H. & Siegel, M.R. (1991). Chemical perspectives on endophyte-grass interactions and their implications to insect herbivory. En: Jones, C., Krischik, V., & Barbosa, P. (Eds). *Microorganisms, Plants and Herbivores* (pp. 227–252). New York: John Wiley & Sons.
- Das, S., Lyla, P.S. & Khan, S.A. (2006). Marine microbial diversity and ecology: present status and future perspectives. *Current Science*, 90 (10), 1325-1335.
- Davis, Christine & Franklin, Joseph & Shaw, Arthur & Vilgalys, Rytas. (2003). Endophytic Xylaria (Xylariaceae) among liverworts and angiosperms: Phylogenetics, distribution, and symbiosis. *American journal of botany*, 90(11), 1661-7.
- Domsch K.H., Gamas, W. & Anderson, T.H. (1980). *Compendium of Soil Fungi*. New York: Academic press.
- Dreyfuss, M.M. & Chapela, I.H. (1994). Potential of fungi in discovery of novel low molecular weight pharmaceuticals. In: *The discovery of Natural Products with Therapeutic Potential* (ed. V.P. Gullo). Butterworth-Heinemann, London, UK.
- Duke, N. C. (1992). Mangrove floristics and biogeography. En: Robertson, A.I. & Alongi, D.M., (eds.). *Tropical Mangrove Ecosystems. Coastal and Estuarine Studies* (pp. 63-100). Washington, D.C.: American Geophysical Union.
- Dutta, D., Puzari, K. C., Gogoi, R., & Dutta, P. (2014). Endophytes: exploitation as a tool in plant protection. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(5), 621–629.
- Faeth, S. H. (2002). Are endophytic fungi defensive plant mutualists? *Oikos*, 98 (1), 25–36.

- Fisher, P.J., Petrini, O., Petrini, L.E. and Sutton, B.C. (1994). Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. from England, Majorca and Switzerland. *New Phytologist* 127, 133-137
- Francisco, A.M. (2009). Descripción Morfoanatómica de los tipos de glándulas foliares en el mangle blanco *Laguncularia racemosa* L. Gaertn (f.). *Acta Microscopica*, 18(3), 237-252.
- Gamboa, M, Laureano, S. & Bayman, P. (2002). Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter?. *Mycopathologia*. 156, 41-5.
- Gee, J.H.R. & Giller, P.S. (1987) The analysis of community organization: the influence of equilibrium, scale and terminology. In: Gee J.H.R. and Giller P.S. (eds) *Organization of Communities: Past and Present*. Blackwell, Oxford.
- Ghimire, S.R. & Hyde, K.D. (2004). Fungal endophytes. En: Varma, A., Abbott, L., Werner, D., Hampp, R. (eds) *Plant Surface Microbiology* (pp. 281–288). Heidelberg: Springer-Verlag.
- Gilbert, A. & Janssen, R. (1998). Use of environmental functions to communicate the values of a mangrove ecosystem under different management regimes. *Ecological Economics*, 25(3), 323–346.
- Gilbert, G. S., Mejía Chang, M. & Rojas, E. (2002). Fungal diversity and plant disease in mangrove forests: Salt excretion as a possible defense mechanism. *Oecologia*, 132(2), 278-285.

- Gong, B., Liu, G., Liao, R., Song, J., & Zhang, H. (2017). Endophytic fungus *Purpureocillium* sp. A5 protect mangrove plant *Kandelia candel* under copper stress. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(3), 530–536.
- Grime J. P. (2001). *Plant strategies, vegetation processes, and ecosystem properties*. Chichester, UK: John Wiley and Son.
- Gu, H.G., Bai, H.J., Zeng, Y.B., Chang, D.D. & Mei, W.L. (2012). Isolation & primary identification of endophytic fungi from mangrove plant *Ceriops tagal*. *J Microbiol (In China)*, 32,1–6.
- Hawksworth, D.L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimator revisited. *Mycological Research*, 105(12),1422–1432.
- Hawksworth, D. L. & Rossman, A. Y. (1997) Where are all the undescribed fungi ? *Phytopathology*, 87, 888–891.
- Hamzah, T. N. T., Lee, S. Y., Hidayat, A., Terhem, R., Faridah-Hanum, I., & Mohamed, R. (2018). Diversity and Characterization of Endophytic Fungi Isolated From the Tropical Mangrove Species, *Rhizophora mucronata*, and Identification of Potential Antagonists Against the Soil-Borne Fungus, *Fusarium solani*. *Frontiers in Microbiology*, 9(1707), 1-17.
- Helander, M. (1995). Responses of Pineneedle endophytes to air pollution. *New Phytol.*, 131, 223-229-
- Holguin G., Vazquez P. & Bashan Y. (2001). The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: An overview. *Biology and Fertility of Soils*, 33 (4), 265-278.
- Hyde, KD. (1989). Ecology of tropical marine fungi. *Hydrobiologia* 178(3), 199-208.

- Jaccard, P. (1901). Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. *Bulletin del la Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, 37(142), 547-579.
- Jennerjahn, T.C. & Ittekkot, V. (2002). Relevance of mangroves for the production and deposition of organic matter along tropical continental margins. *Die Naturwissenschaften*, 89(1), 23-30.
- Kannan, K.P., Madhankumar, D., Ramya, P., R., Madhu Nika, S. Meenatchi, G. , Sowmya, A.N. & Bhuvaneswari, S. (2014). Diversity of Endophytic Fungi from Salt Tolerant Plants. *International Journal of ChemTech Research*, 6 (9), 4084-88.
- Kathiresan, K. & B.L. Bingham. (2001). Biology of mangroves and mangrove ecosystems. *Advances in Marine Biology*, 40, 81-251.
- Kis-Papo, T., Oren, A., Wasser, SP., Nevo, E., (2001). Spatiotemporal Diversity of Filamentous Fungi in the Hyper Saline Dead Sea. *Mycology Research*, 105 (6), 749-756.
- Kristensena, E. Bouillonb,S., Dittmard, T., & Marchande, C. (2008).Organic carbon dynamics in mangrove ecosystems: A review *Aquatic Botany*, 89(2), 201–219.
- Kowalski, T. & Zych, P. (2002). Endophytic Fungi in needles of *Pinus nigra* growing under different site conditions. *Polish Botanical Journal*, 47(2), 251-257.
- Kumaresan, V. & Suryanarayanan, T.S. (2002). Endophyte assemblages in young, mature and senescent leaves of *Rhizophora apiculata*: evidence for the role of endophytes in mangrove litter degradation. *Fungal Diversity*, 9, 81-91.

- 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.
- Ling., O.M., Lim, P.T., Mujahid, A., Proksch, P., Müller, M. (2016). Initial screening of mangrove endophytic fungi for antimicrobial compounds and heavy metal biosorption potential. *Sains Malaysiana*, 45, 1063–1071.
- Liu, A.R., Chen, S.C., Jin, W.J., Zhao, P.Y., Jeewon, R., Xu, T. (2012). Host specificity of endophytic *Pestalotiopsis* populations in mangrove plant species of South China. *Afr J Microbiol Res.*, 6, 6262–6269.
- Liu, Y. L., Zhang, Y. B., Hu, H. Q., & Wang, J. H. (2013). Preliminary investigation on distribution of cultivable filamentous fungi from Zhanjiang Bay. *Mycosystema*, 32(4), 633–6425.
- Liu, Y. L., Zhang, Y. B., Lin, Q. L., Hu, H. Q., & Wang, J. H. (2015). Fungal community in Zhanjiang Bay of South China and its relationship with environmental factors. *Mycosystema*, 34(1), 53–64.
- Liu, Y., Li, Y., Lin, Q., & Zhang, Y. (2016). Assessment of the pathogenicity of marine *Cladosporium* spp. towards mangroves. *Forest Pathology*, 47(2), 1-5.
- Lodge, D., Fisher, P. & Sutton, B. (1996). Endophytic Fungi of *Manilkara bidentata* Leaves in Puerto Rico. *Mycologia*. 88. 733-738.
- López, J. (2016). Restauración Ecológica Participativa del ecosistema de manglar en la Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico. (INF-2016-35). Guatemala: Universidad del San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación y Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

- Mandyam, K. G., & Jumpponen, A. (2015). Mutualism-parasitism paradigm synthesized from results of root-endophyte models. *Frontiers in microbiology*, 5(776),1-13.
- Miller, S. (1995). Functional diversity in fungi. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), 50-57.
- Ministerio de Ambiente y Recursos Naturales (MARN). (2013). *Informe técnico: Estudio de la cobertura de mangle en la República de Guatemala*. Guatemala: MARN.
- Moore, D., Robson, G.D. & Trinci, A.P. (2011). *21st century Guidebook to fungi*. Reino Unido: Cambridge University.
- Mueller, G.M., Bills, G.F. & Foster, M.S. (2004). *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Academic Press Pp. 241-268.
- Osorio, J. A., Wingfield, M. J., & Roux, J. (2016). A review of factors associated with decline and death of mangroves, with particular reference to fungal pathogens. *South African Journal of Botany*, 103, 295–301.
- Pang, K.-L., Vrijmoed, L. L. P., Khiang Goh, T., Plaingam, N., & Jones, E. B. G. (2008). Fungal endophytes associated with *Kandelia candel* (Rhizophoraceae) in Mai Po Nature Reserve, Hong Kong. *Botanica Marina*, 51(3),171-178.
- Paris, M. (2016). *Diversidad y distribución de hongos endófitos en endemismos canarios*. (Tesis de grado). Universidad de La Laguna, España.

- Petrini O.(1986). Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. En: Fokkema,N.J. & Van Den Heuvel, J.(pp.175-187). *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Petrini O., 1996 Ecological and physiological aspects of host specificity in endophytic fungi. En: Redlin, S.C, Carris, L.M, (Eds.). *Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants* (pp. 87–100). St Paul, Minnesota: APS Press.
- Rajamanikyam, M., Vadlapudi, V., Amanchy, R. & Upadhyayula, S. M. (2017). Endophytic Fungi as Novel Resources of natural Therapeutics. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60,(e17160542), 1-26.
- Ravindran, C., Naveenan, T., Varatharajan, G.R., Rajasabapathy, R., Meena, R.M. (2012). Antioxidants in mangrove plants and endophytic fungal associations. *Botanica Marina*, 55(3), 269-279.
- Redman R. S., Dunigan D. D., Rodriguez R. J. (2001). Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *New Phytol.* 151, 705–716.
- Riddell, R. W. (1950). Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. *Mycologia*, 42, 265-270.
- Rodriguez, R. J., White, J. F., Arnold, A. E. & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182 (2), 314–330.
- Sánchez-Fernández, R., Sánchez-Ortiz, B., Sandoval-Espinosa, Y., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M. y Macías-Rubalcava, M. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios

bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 16(2), 132-146.

Saikkonen, K., Faeth, S., Helander, M. & Sullivan, T.J. (1998). Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29(1), 319 – 343.

Sandoval-Denis, M., Gené, J., Sutton, D. A., Cano-Lira, J. F., de Hoog, G. S., Decock, C. A., Wiederhold, N. P., ... Guarro, J. (2015). Redefining *Microascus*, *Scopulariopsis* and allied genera. *Persoonia*, 36, 1-36.

Sarma, V. & Hyde, Kevin. (2001). A review on frequently occurring fungi in mangroves. *Fungal diversity*, 8(2), 1-34.

Schulz, B., Römmer, A.-K., Dammann, U., Aust, H.-Jür., & Strack, D. (1999). The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycological Research*, 103(10), 1275–1283.

Seifert, K., Morgan-Jones, G., Gams, W., & Kendrick, B. (2011) *The genera of Hyphomycetes*. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.

Sengupta, A. & Chaudhuri, S. (2002) Arbuscular mycorrhizal relations of mangrove plant community at the Ganges river estuary in India. *Mycorrhiza*, 12(4), 169–174.

Sieber T. N. (2007). Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fung. Biol. Rev.* 21(2-3), 75–89.

Sigüenza R. y Ruíz-Ordoñez J. (1999). *Plan Maestro de la Reserva Natural de Usos Múltiples Monterrico*. Guatemala: Centro de Estudios Conservacionistas,

Consejo Nacional de Áreas Protegidas, Proyecto “Aprovechamiento sostenible de los recursos asociados a los manglares del Pacífico de Guatemala” (INAB-UICN-UE). 454pp.

Simoes, M.F.; Antunes, A.; Ottoni, C.A.; Amini, M.S.; Alam, I.; Alzubaidy, H.; Mokhtar, N.; 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), 310-320.

Singh, L.P., Gill, S.S. & Tuteja, N. (2011). Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior*, 6(2), 175-191.

Soliman, S., Trobacher, C., Tsao, R., Greenwood, J. & Raizada, M. (2013). A fungal endophyte induces transcription of genes encoding a redundant fungicide pathway in its host plant. *BMC Plant Biology*, (13)93, 1-10.

Sosa-Rodríguez, T., Sánchez-Nieves, J. y Melgarejo, L. M. (2009). Papel Funcional de los Hongos en los Ecosistemas de Manglar. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 38(1),39-57.

Soto-Barajas, M.C., Vázquez De Aldana, B.R. y Zabalgoageazcoa, I. (2014). Diversidad taxonómica de hongos endófitos *Epichloë* en *Lolium perenne* de distintos hábitats. En: Busqué Marcos, J., Salcedo Díaz, G., Serrano Martínez, E., Mora Martínez, M.J. y Rodríguez-Arango, B.F. (Eds). *Pastos y PAC 2014-2020*. (pp. 193-200). Potes, Cantabria: SEEP.

Sun, X. & Guo, L. D. (2012) Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques, *Mycology: An International Journal on Fungal Biology*, 3(1), 65-76.

- Sun, X., Guo, L. & Hyde, K.D. (2011). Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. *Fungal Diversity*, 47(1), 85–95.
- Suryanarayanan, T.S., Venkatesan G. & Murali T.S. (2003) Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: Diversity and distribution patterns. *Current Science*, 85(4), 489-492.
- Tayung, K., Sarkar, M., & Baruah, P. (2012). Endophytic fungi occurring in *Ipomoea carnea* tissues and their antimicrobial potentials. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(5), 653–660.
- Tomlinson, P. B. (1986). *The botany of mangroves*. Reino Unido: Cambridge University Press, Cambridge.
- Valverde, T., Cano-Santana, Z., Meave, J., & Carabias, J. (2005). *Ecología y medio ambiente*. México: Pearson Educación.
- Vincent, J. B., Weiblen, G. D., & May, G. (2016). Host associations and beta diversity of fungal endophyte communities in New Guinea rainforest trees. *Molecular Ecology*, 25(3), 825–841.
- Vinnere, O. (2004). Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases: Acta Universitatis Upsaliensis. *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology*. 72 pp.
- Wanderley, I., Maia L. & Cavalcanti M. (2012). Diversity of leaf endophytic fungi in mangrove plants of northeast Brazil. *Journal of Microbiology*, 43(3), 1165-73.

- Wearn J.A., Sutton B.C., Morley N.J. & Gange A.C. (2012) Species and Organ Specificity of Fungal Endophytes in Herbaceous Grassland Plants. *J. Ecol*, 100(5), 1085–1092.
- Webster, J. & Webwe, R. (2007). *Introduction to fungi*. (3a ed). Estados Unidos: Cambridge University Press.
- Zalar, P.; Hoog, G.S. de; Schroers, H.-J.; Crous, P.W.; Groenewald, J.Z.; Gunde-Cimerman, N. (2007). Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. *Studies in Mycology*, 58, 157-183.
- Zhang, D.X., Nagabhyru, P & Schardl, C.L. (2009) Regulation of a chemical defense against herbivory produced by symbiotic fungi in grass plants. *Plant Physiology*, 150(2), 1072-1082.

13. ANEXOS

Anexo 1: Constancia de depósito en Herbario.



28 de agosto del 2018

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este medio se hace constar que la señorita **ANGELA BEGONIA BARRIOS PALACIOS**, con CUI no. 2058011530101, con carné 201021318, solicitó la determinación botánica y depositó en este herbario, especímenes de "Mangles" que fueron registrado así:

***Rhizophora mangle* L: (RHIZOPHORACEAE) Registro BIGU 75431, 75432, 75433, 75434 y 75435**

***Laguncularia racemosa* (L.) C. F. Gaertn (COMBRETACEAE), Registro BIGU 75422, 75423, 75424 y 75427**

A solicitud de la interesada, se les extiende la presente constancia en el mismo lugar y fecha arriba indicados.

Atentamente,

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

Ing. Agr. Mario Esteban Véliz Pérez
Coordinador-curador
Académico de Número



ANEXO 2

**Especies de endófitos encontradas
en la Reserva Natural de Usos
Múltiples Monterrico**

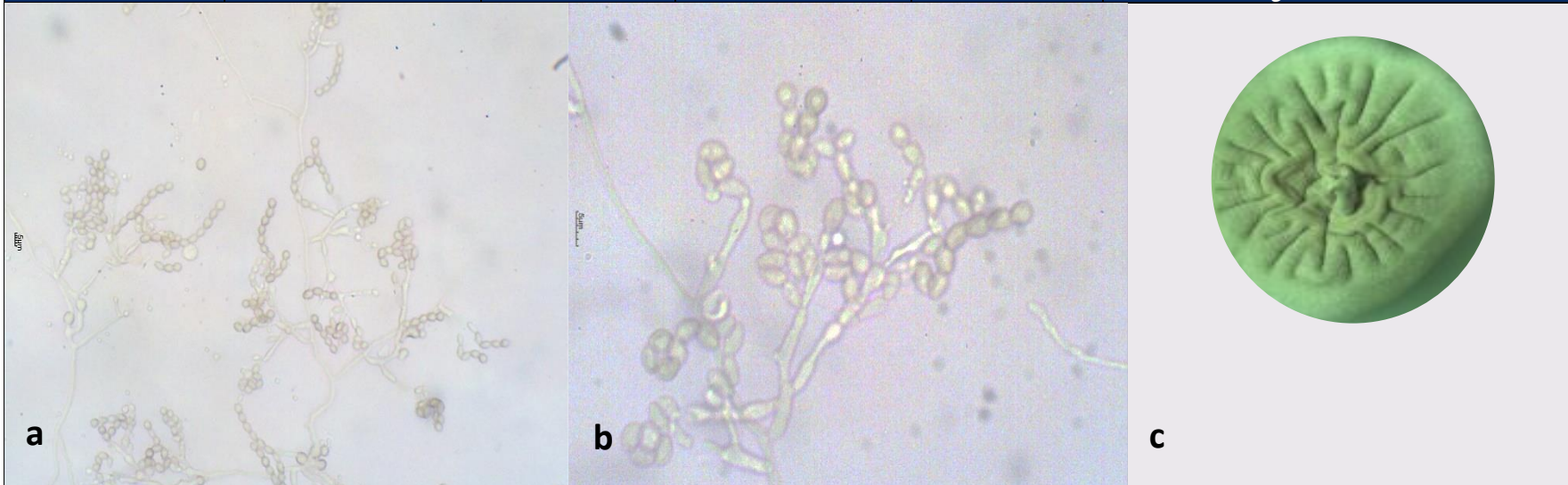
IDENTIFICACIÓN DEL HONGO

CÓDIGO
LRAN 3/2 M1
LRAN 4/2 M2

HOSPEDERO
Laguncularia racemosa

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

División	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
<i>Ascomycota</i>	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Capnodiales</i>	<i>Cladosporiaceae</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium halotolerans</i> Zalar, de Hoog & Gunde-Cim.



***Cladosporium halotolerans* Zalar, de Hoog & Gunde-Cim (Cladosporiaceae).** Características macroscópicas y microscópicas. A. Ramificación de los conidióforos (40x). B. Conidióforo con conidios esféricos (100x). C. Cultivo en agar PDA.

Descripción microscópica: Hifas finas, septadas, ramificadas de color hialino a marrón, conidióforos de 25-30 μm , ramoconidios secundarios de 10-12 μm con cadenas ramificadas de conidios unicelulares, redondos de 3.1-3.5 μm de largo por 2.5-3.0 μm de ancho.

Descripción macroscópica: Colonias aterciopeladas, con pliegues radiales, de color blanco en un inicio que tienden a oscurecerse en tonos verde oliva.

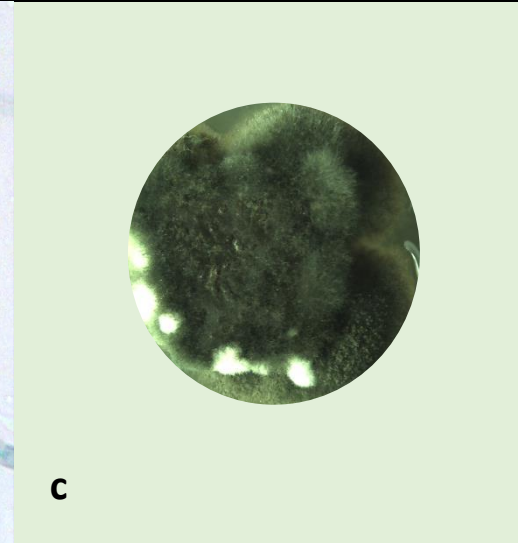
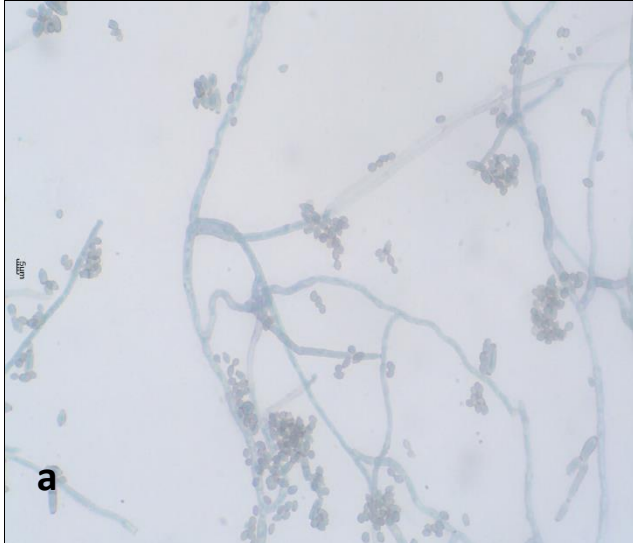
IDENTIFICACIÓN DEL HONGO

CÓDIGO
LRAN4/2 B1
LRAN 4/2 M1

HOSPEDERO
Laguncularia racemosa

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

<u>División</u>	<u>Clase</u>	<u>Orden</u>	<u>Familia</u>	<u>Género</u>	<u>Especie</u>
<i>Ascomycota</i>	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Capnodiales</i>	<i>Cladosporiaceae</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.



***Cladosporium sphaerospermum* Penz (Cladosporiaceae).** Características macroscópicas y microscópicas. A. Ramificación de los conidióforos (40x). B. Conidióforo con conidios elípticos (100x). C. Cultivo en agar PDA.

Descripción microscópica: Hifas finas, septadas, ramificadas de color hialino a marrón, conidióforos de 30-35 μm con cadenas ramificadas de conidios unicelulares, elipsoides de 2.5-2.9 μm de largo por 1.7-2.2 μm de ancho.

Descripción macroscópica: Colonias aterciopeladas, con pliegues radiales, de color negro. Tiende a formar múltiples colonias.

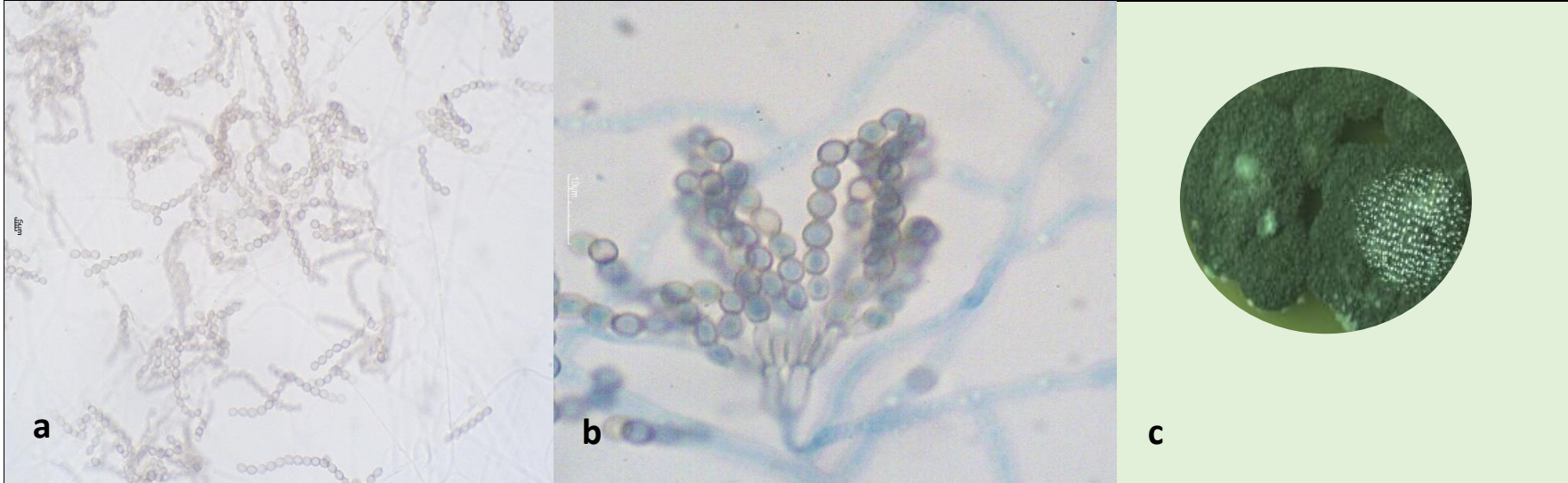
IDENTIFICACIÓN DEL HONGO

CÓDIGO
 RMAN1/3 M2, RMAN3/2 B2
 RMAN3/2 M1, RMAN4/1 M2

HOSPEDERO
Rhizophora mangle

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

División	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
<i>Ascomycota</i>	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Microascales</i>	<i>Microascaceae</i>	<i>Scopulariopsis</i>	<i>Scopulariopsis sp.</i>



Scopulariopsis sp. (Microascaceae). Características macroscópicas y microscópicas. A. Ramificación de los conidióforos (40x). B. Conidióforo con conidios elípticos(100x). C. Cultivo en agar PDA.

Descripción microscópica: Hifas gruesas, septadas, de color hialino, conidióforos de 35-38 μm con cadenas de 25.4-26.8 μm de largo, conidios unicelulares, esféricos de 3.1-4 μm de largo por 2.7-3.5 μm de ancho.

Descripción macroscópica: Colonias de coloración oscura, tendencia a formar múltiples colonias pequeñas.

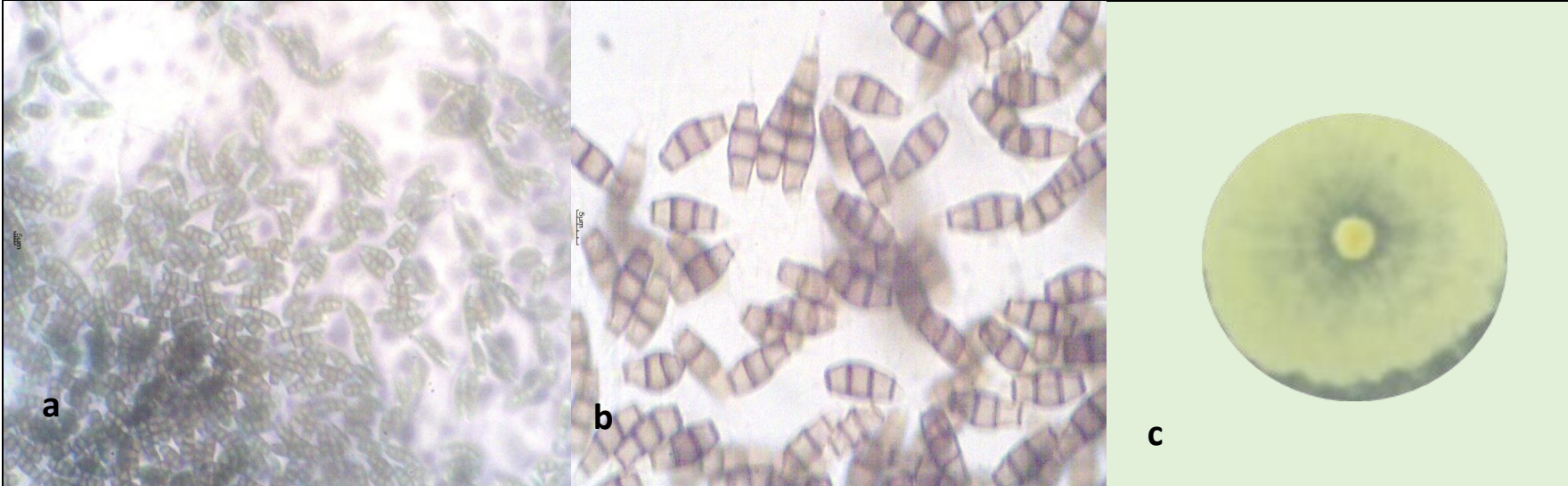
IDENTIFICACIÓN DEL HONGO

CÓDIGO
LRAN 4/2 M1

HOSPEDERO
Rhizophora mangle

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

<u>División</u>	<u>Clase</u>	<u>Orden</u>	<u>Familia</u>	<u>Género</u>	<u>Especie</u>
<i>Ascomycota</i>	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Amphisphaeriales</i>	<i>Pestalotiopsidaceae</i>	<i>Pestalotiopsis</i>	<i>Pestalotiopsis sp.</i>



Pestalotiopsis sp. (Pestalotiopsidaceae). Características macroscópicas y microscópicas. A. Ramificación de los conidióforos (40x). B. Conidióforo con conidios septados (100x). C. Cultivo en agar PDA.

Descripción microscópica: Hifas muy finas, cenocíticas, de color hialino, macroconidios, triseptados, alargados de 15-2-17 μm de largo por 4.5-5.15 μm de ancho con tres apéndices.

Descripción macroscópica: Colonias aterciopeladas, con pliegues radiales, de color blanco a crema.

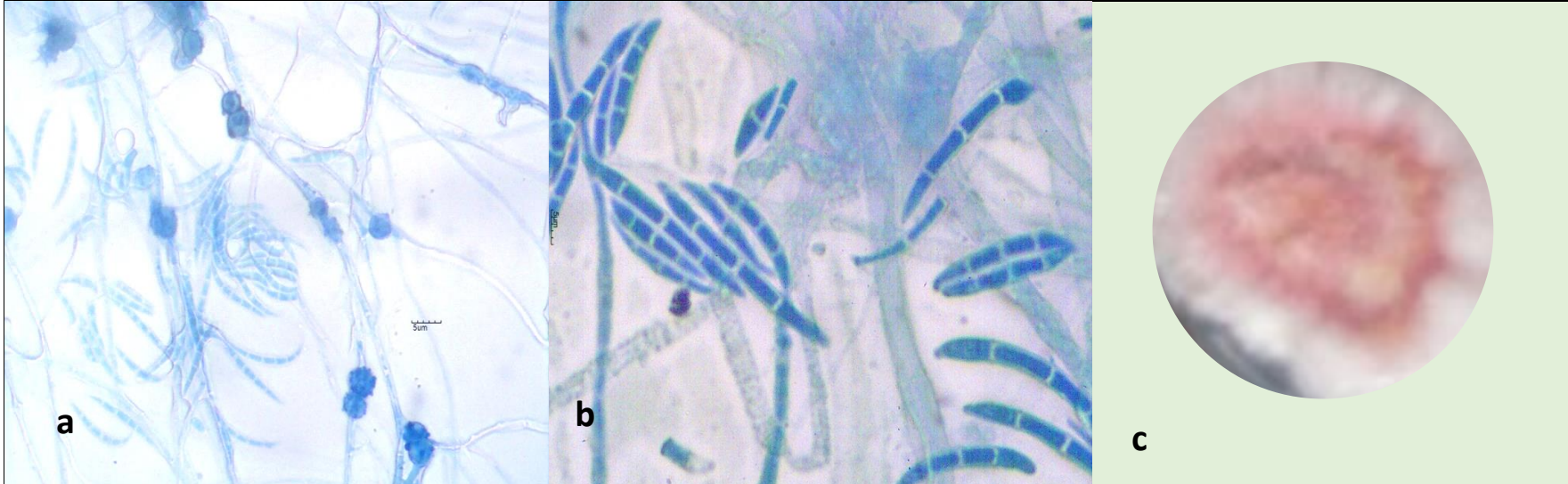
IDENTIFICACIÓN DEL HONGO

CÓDIGO
LRAN3/3 A1
RMAN4/1 B1

HOSPEDERO
Rhizophora mangle

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

<u>División</u>	<u>Clase</u>	<u>Orden</u>	<u>Familia</u>	<u>Género</u>	<u>Especie</u>
<i>Ascomycota</i>	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Hypocreales</i>	<i>Nectriaceae</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium equiseti</i>



***Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. (Nectriaceae).** Características macroscópicas y microscópicas. A. Ramificación de los conidióforos (40x). B. Conidióforo con conidios elípticos (100x). C. Cultivo en agar PDA.

Descripción microscópica: Hifas finas, septadas, ramificadas de color hialino, conidióforos de 80-100 μm con macroconidios septados fusiformes de 22- 30 μm de largo por 2.5-3 μm de ancho, clamidosporas de 7.4-8.4 μm de largo por 7.7.-10 μm de ancho.

Descripción macroscópica: Colonias aterciopeladas, con pliegues radiales, de color blanco en un inicio que tienden a cambiar a color rosado durante la esporulación.

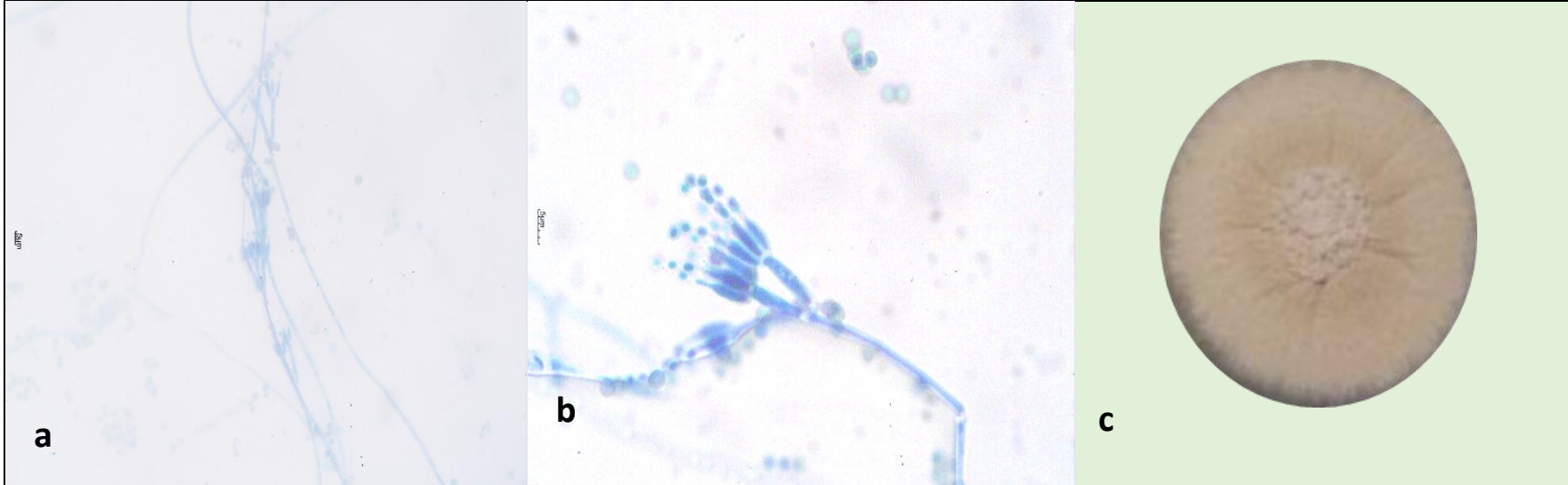
IDENTIFICACIÓN DEL HONGO

CÓDIGO
RMAN2/1 B1+ PELUDO
LRAN5 M2-1

HOSPEDERO
Rhizophora mangle

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

División	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
<i>Ascomycota</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Paecilomyces</i>	<i>Paecilomyces sp.</i>



Paecilomyces sp. (Aspergillaceae). Características macroscópicas y microscópicas. A. Ramificación de los conidióforos (40x). B. Conidióforo con conidios elípticos (100x). C. Cultivo en agar PDA.

Descripción microscópica: Hifas muy finas, ramificadas de color hialino, conidióforos de 29-35 μm con conidios unicelulares, esféricos de 1.1-1.5 μm de largo por 1.1.-1.5 μm de ancho.

Descripción macroscópica: Colonias aterciopeladas, de color marrón con bordes aserrados.

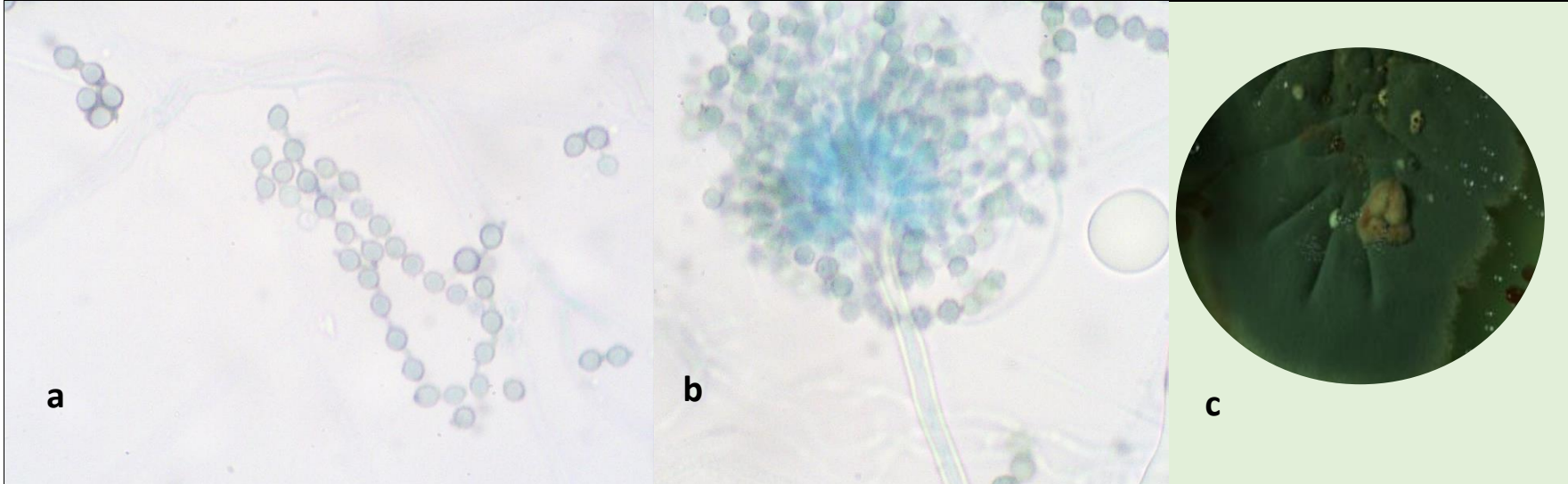
IDENTIFICACIÓN DEL HONGO

CÓDIGO
LRAN5 A1

HOSPEDERO
Rhizophora mangle

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

División	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
<i>Ascomycota</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>



***Aspergillus flavus* Link (Aspergillaceae).** Características macroscópicas y microscópicas. A. Cadenas de esporas(100x). B. Conidióforo con conidios elípticos (100x). C. Cultivo en agar PDA.

Descripción microscópica: Hifas finas hialinas, conidióforos de 35-38.5 μm de largo, cabezuelas radiadas uni y biseriadas, vesícula esférica de 18-21.2 μm de diámetro con conidios equinulados de 2.6-3 μm de largo por 2.3-2.7 μm de ancho.

Descripción macroscópica: Colonias aterciopelada de color oscuros con bordes color blanco a gris.

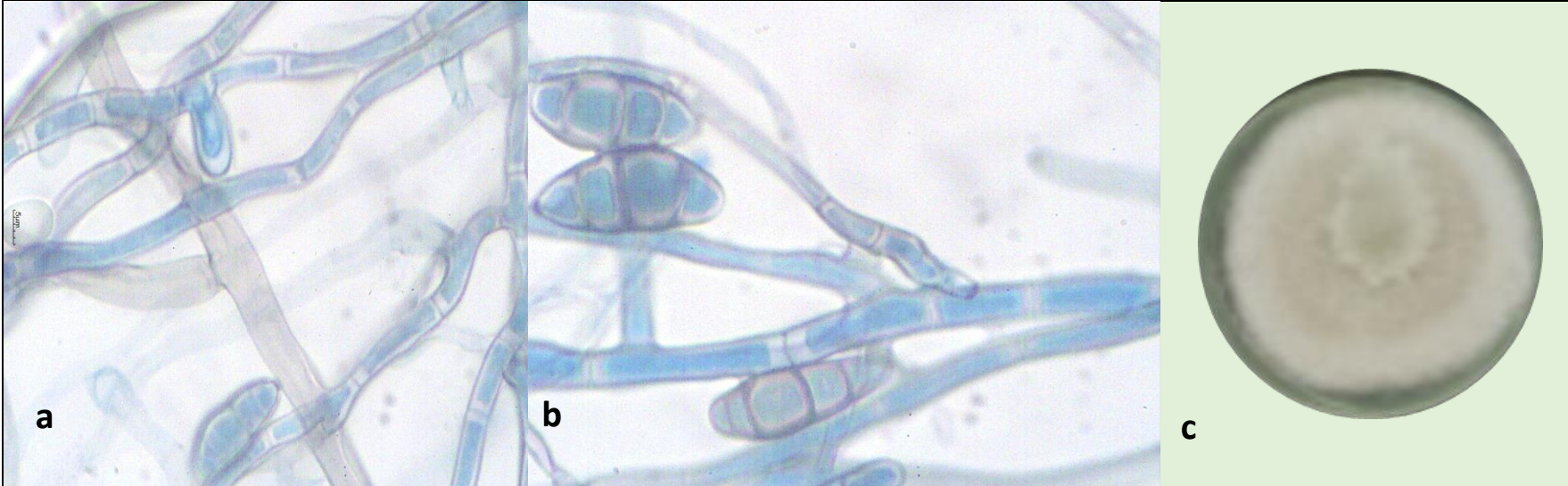
IDENTIFICACIÓN DEL HONGO

CÓDIGO
RMAN3/3 A1

HOSPEDERO
Rhizophora mangle

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

<u>División</u>	<u>Clase</u>	<u>Orden</u>	<u>Familia</u>	<u>Género</u>	<u>Especie</u>
<i>Ascomycota</i>	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Pleosporales</i>	<i>Pleosporaceae</i>	<i>Curvularia</i>	<i>Curvularia sp.</i>



***Curvularia sp.* (Pleosporaceae).** Características macroscópicas y microscópicas. A. Ramificación de los conidióforos (40x). B. Conidióforo con conidios elípticos (100x). C. Cultivo en agar PDA.

Descripción microscópica: Hifas gruesas, septadas, ramificadas, marrones. conidióforos de 45-50 μm con conidios multicelulares con 4 septos, de 22-25.5 μm de largo por 0.9 -11 μm de ancho.

Descripción macroscópica: Colonias aterciopeladas, con pliegues radiales, de color blanco en un inicio que tienden a oscurecerse en tonos marrón claro.

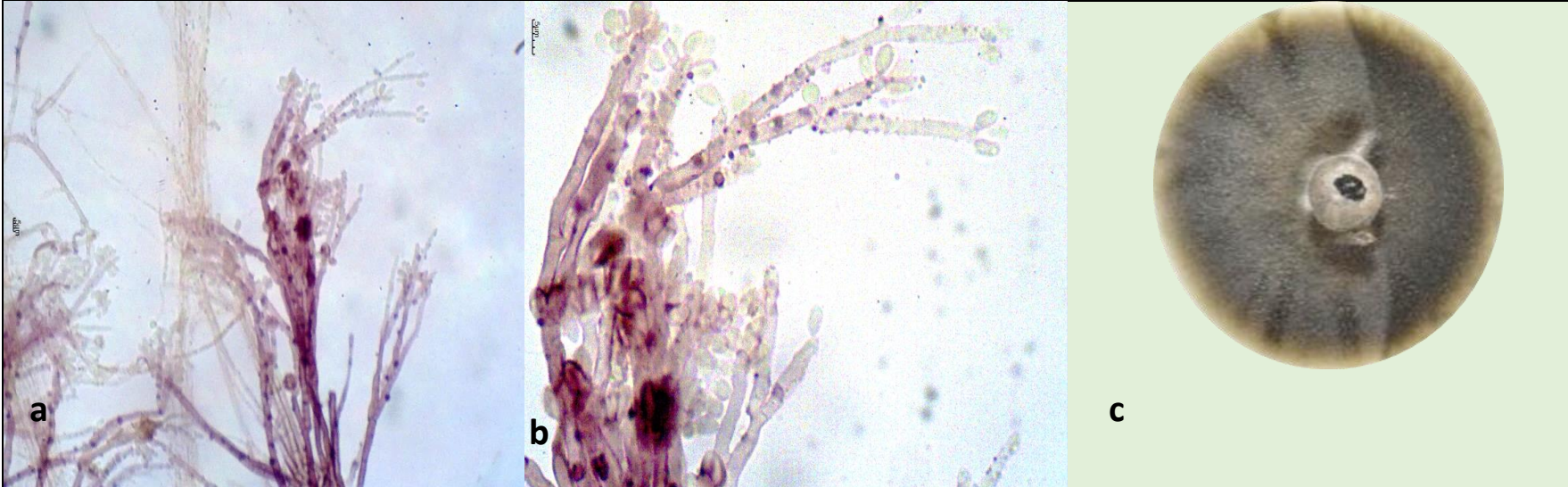
IDENTIFICACIÓN DEL HONGO

CÓDIGO
RMAN1/2 B2

HOSPEDERO
Rhizophora mangle

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

División	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
<i>Ascomycota</i>	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Chaetosphaeriales</i>	<i>Chaetosphaeriaceae</i>	<i>Chloridium</i>	<i>Chloridium virescens</i>



***Chloridium virescens* (Pers.) W. Gams & Hol.-Jech (Chaetosphaeriaceae).** Características macroscópicas y microscópicas. A. Ramificación de los conidióforos (40x). B. Conidióforo con conidios elípticos (100x). C. Cultivo en agar PDA.

Descripción microscópica: Hifas gruesas septadas, ramificadas marrón-rojizo, conidióforos solitarios de 45-56 μm con conidios unicelulares, elipsoides de 3.3-4.2 μm de largo por 2.2-2.7 μm de ancho.

Descripción macroscópica: Colonias pulverulentas de color marrón en un inicio que tienden a oscurecerse.

IDENTIFICACIÓN DEL HONGO

CÓDIGO
LRAN5 A2
RMAN1/2 B1

HOSPEDERO
Rhizophora mangle

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

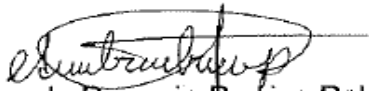
<u>División</u>	<u>Clase</u>	<u>Orden</u>	<u>Familia</u>	<u>Género</u>	<u>Especie</u>
<i>Ascomycota</i>	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Mycosphaerellales</i>	<i>Mycosphaerellaceae</i>	<i>Ramichloridium</i>	<i>Ramichloridium sp.</i>



Ramichloridium sp. (Mycosphaerellaceae). Características macroscópicas y microscópicas. A. Ramificación de los conidióforos (40x). B. Conidióforo con conidios elípticos (100x). C. Cultivo en agar PDA.

Descripción microscópica: Hifas gruesas, septadas, ramificadas de color marrón con incrustaciones, conidióforos de 10-12 μm con cadenas ramificadas de conidios unicelulares, elipsoides de 4.3 -5 μm de largo por 2.2- 2.6 μm de ancho.

Descripción macroscópica: Colonias aterciopeladas, con pliegues, de color blanco en un inicio que tienden a oscurecerse en el centro. .



Br. Angela Begonia Barrios Palacios
Tesista



Dra. Maura L. Quezada
Asesora



Licda. Celeste Méndez Ortiz
Asesora



Ing. Agr. Jorge Mario Vargas Ponce
Revisor



Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares
Director de Escuela



M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto
Decano