

Valoración de hongos endófitos asociados a la vegetación de senderos en la Reserva Forestal El Montoso, Tres Puntas, Herrera, Panamá

Assessment of endophytic fungi associate with the vegetation of senderos in the El Montoso Forest Reserve, Tres Punta's, Herrera, Panama

Alexis De La Cruz

Universidad de Panamá, Facultad de ciencias naturales y exactas, Panamá

alexis.delacruz@up.ac.pa

<https://orcid.org/0009-0008-4258-6747>

Recepción
01/10/24

Aprobación
27/11/24

DOI <https://doi.org/10.48204/j.scientia.v35n1.a6660>

Resumen

Los hongos endófitos son microorganismos que habitan en plantas, siendo un grupo diverso y polifilético, cuya relación ecológica con plantas es mutualista y en otros casos es negativa para la planta. Este estudio expone datos cuantitativos de la evaluación de hongos endófitos en vegetación en los Senderos Río La Villa, Reserva Forestal El Montuoso. La Reserva Forestal El Montuoso está localizada en el distrito de Las Minas, provincia de Herrera, República de Panamá. Por tal motivo se evaluó la ocurrencia de hongos endófitos miceliales en vegetación y su relación en anuros, mediante muestreo de hojas e hisopado de anuros a lo largo de los senderos, y consecuente aislamiento de cepas para identificación taxonómica. Para ello, se muestreó en los Senderos Río La Villa. Se identificaron 10 géneros: *Alternaria sp.*, *Lecytophora sp.*, *Aureobasidium sp.*, *Scedosporium sp.*, *Exophiala sp.*, *Rhinochadiella sp.*, *Curvularia sp.*, *Phialophora sp.* La prueba Binomial para establecer diferencia en la frecuencia de ocurrencia de hongos endófitos miceliales arrojó un valor de $Z = -2.6458$, $p < 0.05$. De 2 muestras de anuros diferentes, solo 1 presentó esporas de *Helminthosporium sp.* y *Lecytophora sp.*. Se concluye que el género *Lecytophora* fue predominante en los resultados tomados y que los anuros poseen capacidad de transportar esporas de hongos endófitos.

Palabras clave: hongos endófitos, vegetación, reserva.

Abstract

Endophytic fungi are microorganisms that inhabit plants, being a diverse and polyphyletic group, whose ecological relationship with plants is mutualistic and in other cases is negative for the plant. This study presents quantitative data from the evaluation of endophytic fungi in vegetation in the Senderos Río La Villa, El Montuoso Forest Reserve. The El Montuoso Forest Reserve is located in the district of Las Minas, province of Herrera, Republic of Panama. For this reason, the occurrence of mycelial endophytic fungi in vegetation and their relationship in anurans was evaluated by means of leaf sampling and anuran swabs along the trails, and consequent isolation of strains for taxonomic identification. For this, it was sampled in the Senderos Río La Villa. 10 genera were identified: *Alternaria sp.*, *Lecytophora sp.*, *Aureobasidium sp.*, *Scedosporium sp.*, *Exophiala sp.*, *Rhinochadiella*

sp., *Curvularia sp.*, *Phialophora sp.* The Binomial test to establish a difference in the frequency of occurrence of mycelial endophytic fungi yielded a value of $Z = -2.6458$, $p < 0.05$. Of 2 different anuran samples, only 1 presented *Helminthosporium sp.* and *Lecythophora sp.* spores. It is concluded that the genus *Lecythophora* was predominant in the results taken and that the anurans have the capacity to transport spores of endophytic fungi.

Keywords: endophytic fungi, vegetation, reserve.

Introducción

La palabra 'endófito' etimológicamente significa 'dentro de la planta' (endon: dentro, phyton: planta). Generalmente conocemos a los hongos endófitos como microorganismos que pasan la mayor parte o todo su ciclo de vida habitando los tejidos de la planta, sin causar daño evidente la mayoría de las veces, refiriéndose a este convenio de costo-beneficio, asintomático y temporal, que se forma dentro de los tejidos vivos de la planta. Estos hongos se han encontrado en todas las plantas incluso las que se encuentran en lugares de difícil cohabitar. (Sánchez, 2013).

Los hongos endófitos son un grupo muy diverso y polifilético que habitan en diversas partes de las plantas. La mayoría pertenecen al phylum Ascomycota, aunque también se han encontrado en los Basidiomycota, Zygomycota y Oomycota. Históricamente los hongos endófitos se han clasificado en Clavicipitáceos y no Clavicipitáceos, basados en su filogenia e historia de vida. (Rodríguez et al., 2009). En esta clasificación se conservan los grupos Clavicipitáceos y No Clavicipitáceos, y este último se divide en: Clavicipitáceos que son los endófitos que colonizan los pastos, mientras que los No Clavicipitáceos colonizan las plantas no vasculares, helechos, coníferas y angiospermas. A pesar de su abundancia y gran diversidad, particularmente en regiones tropicales, donde se ha planteado que cada hoja representa un mosaico de diversas especies de hongos endófitos. Dreyfuss et al. (1994) estimaron que debe haber una gran diversidad de hongos endófitos por descubrir.

Los hongos endófitos representan un papel ecológico importante entre él y la planta que había ya que es capaz de tomar nutrientes de su planta y de esta forma

protegerla generando un papel mutualista entre ambos formando mecanismos que mejoren su tolerancia al estrés producir metabolismos secundarios, A su vez ayuda a planta a protegerse de herbívoros o microorganismos fitopatógenos.

Es necesario mencionar que un hongo endófito es capaz de producir metabolismos secundarios con inhibidores que protejan a la planta de patógenos en particular u otros hongos endófitos. Algunos hongos endófitos inducen los efectos alelopáticos de su hospedera a través de la producción de metabolitos secundarios o aleloquímicos, es decir, influyen sobre el crecimiento y desarrollo de otras especies que crecen a su alrededor y que usualmente son competidores por el espacio y nutrientes. Se ha identificado que los hongos endófitos pueden contribuir con la protección de su hospedadora contra factores bióticos abióticos por medio de mecanismos cómo directos indirectos y ecológicos. Un ejemplo de estos mecanismos directos son los capaces de producir compuestos orgánicos volátiles (Sánchez,2013).

Los mecanismos indirectos que según la investigación realizada por mecanismo de protección a las hospederas es evidenciado en la investigación realizada por Waller et al. (2005), donde demostraron la resistencia de la cebada al ataque de microorganismos patógenos debido a la colonización en raíces por endófitos Piriformospora indica. Estos mecanismos pueden actuar de manera simultánea dependiendo del estrés que tenga la planta en ese momento.

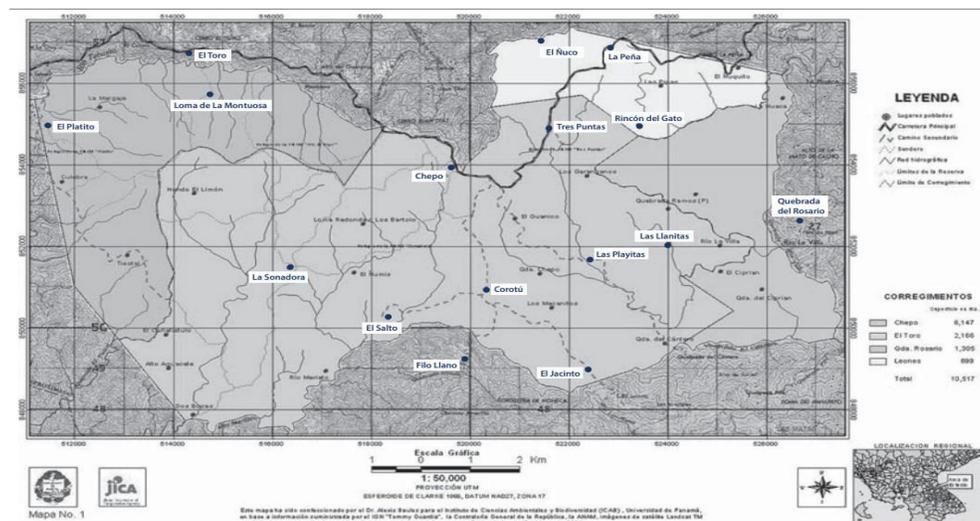
El objetivo de este estudio es valorar los hongos endófitos asociado a la vegetación y algunos animales de los senderos del Río la Villa, en Tres Puntas, Reserva Forestal El Montuoso, provincia de Herrera, República de Panamá. Determinando la ocurrencia de hongos endófitos miceliales en las plantas y su clasificación taxonómica, y cómo ciertos animales sirven como intermediarios.

Materiales y método

El muestreo se realizó en la Reserva Forestal El Montuoso (RFM), localizada en el distrito de Las Minas, provincia de Herrera, República de Panamá, en coordenadas geográficas entre los 7°, 45'17" a 7°,40' 11" latitud Norte y los 80°, 45', 05" a 80°, 54',00", longitud Oeste (Google, s.f.). La RFM comprende de una extensión de 12043 hectáreas con una topografía sinuosa con cerros y montañas altas disectadas por la hidrografía de la región, con una relativa elevación de entre los 600 msnm a casi 1000 msnm (Figura 1).

Figura 1.

Delimitación geográfica de la Reserva Forestal El Montuoso, provincia de Herrera, Panamá.



Nota: mapa de la RFM confeccionado por el Dr. Alexis Baules para el ICAB, modificado por Pedreschi et al. (2013)

El clima es tropical húmedo con una temperatura media de 24.5 °C, registrando una variación de temperatura media anual de entre los 21-25 °C y precipitación media anual de 282.2 mm; la vegetación consiste en bosque húmedo tropical y bosque muy húmedo tropical premontano, constituidos por bosque

maduro en un 27% y bosque secundario en un 20.4% (ANAM, 2003).

Este estudio está basado en un diseño de muestreo al azar transversal en la que se evaluaron y colectaron hojas con síntoma de hongos endófitos asociados al circuito circular de senderos Río La Villa del Centro ANAM Reserva Forestal El Montuoso, una ruta de 2.9 km de longitud (Figura 2) compuesta por 4 senderos intercalados entre sí de los cuales se seleccionó el Sendero de Los Tucanes, Sendero de Los Monos y Sendero Río La Villa.

Figura 2

A) Ubicación de la zona de muestreo, RFM. **B)** Ruta del circuito circular Senderos Río La Villa, en el Centro ANAM Reserva Forestal El Montuoso.



Nota: La ruta del circuito circular realizada por Alltrails (s. f.).

Cultivo y aislamiento

Se cortaron trozos de hoja con tijeras previamente esterilizadas de un tamaño aproximado de 0.5cm x 0.5cm que fueron pasadas con ayuda de pinzas anteriormente flambeadas, en Clorox al 2% y alcohol al 70% durante 1 min en cada

solución para su desinfección, y agua destilada estéril durante 3 min para su lavado (Acosta, 2021). Los trozos de hoja previamente tratados se sembraron en platos petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) con un pH de 3.5; para inhibir el crecimiento bacteriano se añadió 14 ml/L de solución de ácido tartárico al 10% (Pepper et al., 2011). Las muestras de anuros se cultivaron en platos petri con medio de cultivo de las mismas especificaciones mediante la técnica de estriado (Brock et al., 2004). Se incubaron los cultivos durante cuatro días en incubadora a 30°C.

Se realizó un aislamiento de los hongos cultivados para mayor pureza y fiabilidad en los resultados de identificación. De los cultivos de hongo en hoja y anuros se inocularon sólo los hongos que presentaron micelio en platos petri con el mismo medio del cultivo original, mediante técnica de punción central (Rozo, 2009); se incubaron los inóculos durante 7 días en incubadora a 30°C.

El tratamiento, cultivo y aislamiento de las muestras se realizó en el Centro ANAM Reserva Forestal El Montuoso y el Laboratorio de Calidad de Agua MINSA-CAPSI La Villa.

Identificación

La identificación fue macroscópica y microscópica de la parte vegetativa y esporulada, obtenida a través de pases y aislamientos sucesivos basadas en imágenes y taxonomía de crecimiento en medio de cultivo específico. Para cada hongo aislado se tomaba una muestra de este que se esparcía en un portaobjetos con asa bacteriológica, con una gota de agua destilada estéril, que consecuentemente se teñía con Lugol; las muestras se observaron a nivel microscópico, con objetivo de 10x en Microscopio. Se observaron a nivel macroscópico los hongos aislados en su plato petri a través del Estereoscopio. Los hongos aislados se identificaron a nivel de género según su morfología, en base a

las ilustraciones y factores de identificación y caracterización de Anaissie et al. (2003); la clasificación según Sánchez, R. et al. (2013).

Análisis estadístico

Se realizó la prueba Binomial con parámetro de probabilidad de 0.5 (IBM, sfSánchez, 2013) para determinar la frecuencia de hongos endófitos miceliales en la vegetación de la RFM, utilizando en el software libre BioEstat 5.3. Para la estadística descriptiva se utilizó el software Microsoft Excel versión 2210.

Resultados

Se tomaron un total de 28 muestras, 26 de las cuales pertenecían a muestras de vegetación y dos de anuros. De las 28 muestras totales tomadas sólo siete de ellas presentaron hongo micelial, que se aislaron individualmente y por separado; 21 muestras presentaron hongos levaduriformes (Figura 3 y 4) (Paul, 1998; Ohtani et al., 2004).

Figura 3

Número de muestras que presentaron hongos levaduriformes y miceliales.

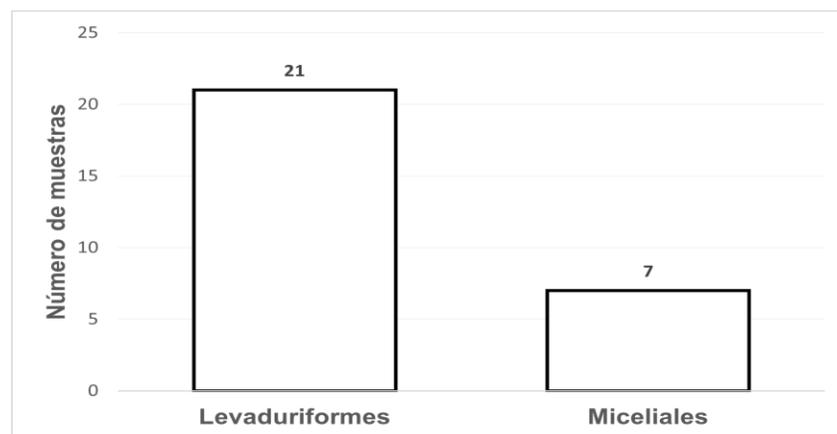
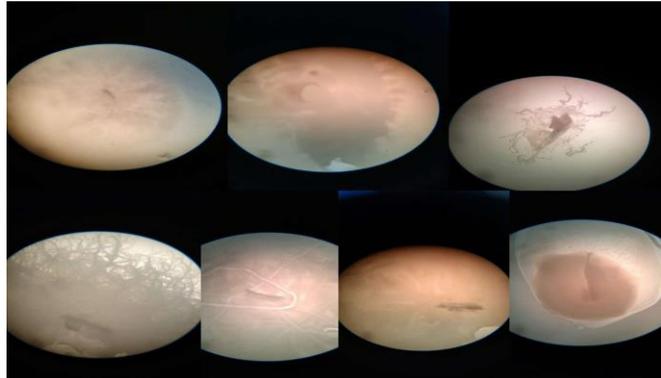


Figura 4

Hongos miceliales de las 7 muestras con presencia de hongo micelial escogidas para aislamiento e identificación a través del Estereoscopio



De las 26 muestras de vegetación, 18 se recolectaron alrededor del centro ANAM Reserva Forestal el Montuoso, 5 del sendero de los Tucanes y 3 del sendero de los Monos; de las 18 se identificaron los hongos de 6 muestras (Teca, Maquenque, Cacao, Higuero, Malagueto y Guarumo) (Tabla 1).

Tabla 1

Número de individuos por muestra aislada de vegetación

Muestra	Individuos	Géneros de individuos
Teca 1	2	Alternaria sp.; Lecythophora sp.
Maquenque 1	2	Lecythophora sp.; Scedosporium sp.
Cacao 1	3	Alternaria sp.; Aureobasidium sp.; Lecythophora sp.
Higuero 1	3	Alternaria sp.; Curvularia sp.; Phialophora sp.
Malagueto 1	3	Exophiala sp.*; Scedosporium sp.

Taxonómicamente, se clasificaron los hongos endófitos con micelio en No clavicipitáceos (Sánchez, R. et al., 2013); siendo todos de la división *Ascomycota*; 5 órdenes: *Pleosporales*, *Coniochaetales*, *Dothideales*, *Microascales*,

Chaetothyriales; 6 familias: *Pleosporaceae*, *Coniochaetaceae*, *Dothioraceae*, *Microascaceae*, *Herpotrichiellaceae*; y 8 géneros: *Alternaria sp.*, *Lecythophora sp.*, *Aureobasidium sp.*, *Scedosporium sp.*, *Exophiala sp.*, *Rhinocladiella sp.*, *Curvularia sp.*, *Phialophora sp.* (Anaisie et al., 2003) (Tabla 2).

Tabla 2

Individuos observados de los aislamientos de muestras de vegetación en los alrededores del centro ANAM Reserva Forestal El Montuoso y senderos de la RFM.

Clasificación	Orden	Familia	Género	Individuos
No clavicipitáceos	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Alternaria sp.</i>	3
			<i>Curvularia sp.</i>	1
	Coniochaetales	Coniochaetaceae	<i>Lecythophora sp.</i>	3
	Chaetothyriales	Herpotrichiellaceae	<i>Rhinocladiella sp.</i>	1
			<i>Phialophora sp.</i>	1
			<i>Exophiala sp.</i>	3
	Microascales	Microascaceae	<i>Scedosporium sp.</i>	2
	Dothideales	Dothioraceae	<i>Aureobasidium sp.</i>	1

Se tomaron dos muestras de anuros diferentes (dos individuos distintos) los cuales solo un individuo presentó crecimiento de hongo micelial en cultivo. La muestra de anuro (nombrada Rana uno) con hongo micelial manifestó crecimiento de dos géneros diferentes tras el cultivo de la muestra en medio de cultivo PDA (Tabla 3).

Tabla 3

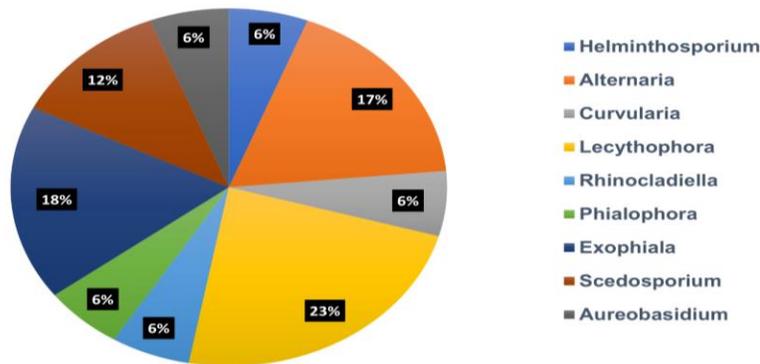
Número de individuos en muestra de anuro.

Muestra	Individuos	Género de individuos
Rana 1	2	Helminthosporium sp.; Lecythophora sp.

En la Figura 6 se muestra que, de todos los géneros aislados, el género *Lecythophora* sp. fue el que más se encontró en todas las muestras, tanto de vegetación como de anuros. (Perdomo, 2011). La prueba Binomial demostró que existe diferencia significativa en la frecuencia de presencialidad de hongos miceliales frente a levaduriformes en las muestras tomadas de los senderos Río La Villa, Reserva Forestal El Montuoso ($Z = -2.6458$, $p < 0.05$). Demostrando una menor frecuencia de ocurrencia de hongos endófitos miceliales frente a levaduriformes.

Figura 6

Ocurrencias de géneros de hongos endófitos miceliales No clavicipitaceae en la Reserva Forestal El Montuoso.



Discusión

De acuerdo a la estadística descriptiva, se demostró en los órdenes taxonómicas una media de 2 órdenes por muestra de vegetación, una varianza de muestra de 0.4 y desviación estándar de 0.63; respecto las familias una media de 2 familias por muestra de vegetación, una varianza de muestra de 0.4 y desviación estándar de 0.63; en lo que concierne a géneros, se presentó una media de 2.33 géneros de hongo endófito micelial por muestra de vegetación, una varianza por muestra de 0.26 y desviación estándar de 0.51.

Los datos muestran que los hongos del orden *pleosporales* fueron encontrados en mayor cantidad en los senderos y alrededor del centro investigativo (Tabla 2), cabe recalcar que el género *Lecythophora* fueron mayormente identificada en las muestras tomadas aisladas.

De esta forma, la familia *Pleosporaceae* fue la más abundante entre las muestras utilizadas junto al orden *Pleosporales*, las cuales estaban presente mayormente en las muestras observadas bajo el microscopio, en consecuencia, se encontró mayor cantidad de estas familias. *Lecythophora sp.* fue el género que más se identificó en vegetación notándose dominancia, 3 individuos diferentes (Urbanová et al., 2015).

La Coniochaeta, también conocida como *Lecythophora*, es un hongo ascomiceto que suele crecer en cortezas hojas e incluso el suelo las cuales presentan propiedades patógenas (Domsch et al., 1993).

árboles de los Senderos Río La Villa (Sendero Los Tucanes y Sendero de Los Monos), La Reserva Forestal El Montuoso nos dio a conocer que el género *Lecythophora sp.* fue predominante en los resultados tomados, dicho género tenía

mayor presencia en las hojas utilizadas.

La prueba estadística determinó que no hay diferencia significativa en la frecuencia de ocurrencia de hongos endófitos miceliales frente a levaduriformes; de las 28 muestras totales se obtuvo un 25% de hongos endófitos micelas y un 75% de levaduriformes. Siendo el género de los hongos miceliales más aislados el género *Lecythophora* sp., tanto de vegetación como de anuros, en donde la familia Coniochaetaceae fue la predominante.

Referencias Bibliográficas

Acosta, C. M. C. (2021). Aislamiento y caracterización de hongos endófitos aislados de *Prosopis laevigata* de los jales de Huautla, Morelos.

Alltrails. (s. f.). Consultado el 12 de diciembre de 2022. Disponible en: <https://www.alltrails.com/es/ruta/panama/herrera/el-montuoso-ruta-circular>

Anaissie, E. J., McGinnis, M. R. y Pfaller, M. A. (2003). *Clinical Mycology*. Churchill Livingstone.

Autoridad Nacional del Ambiente y Corporación de Desarrollo Ambiental, S.A. (2003). Plan de manejo de la Reserva Forestal El Montuoso. Panamá.

Brock, M; Madigan, T; Martinko, Jy Jack, P. (2004). *Biología De Los Microorganismos*. Décima Edición.

Domsch, K.H; W. Gams; T.H. Anderson (1993). *Compendium of Soil Fungi* (Reprint [der Ausg. London] 1980. ed.)

Dreyfuss, M.M. y Chapela, I.H. (1994). In *The discovery of natural products with therapeutic potential* (ed. Gullo, V.P.) 49-80. Butterworth-Heinemann, London, UK.

Ghirardi, R. (2012). Estudio de quitridiomycosis por *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios anuros del Litoral, Cuyo y Patagonia Argentina (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

Google. (s.f.). Reserva Forestal El Montuoso. Google Maps, Google. Consultado el

8 de diciembre de 2022. <https://goo.gl/maps/ibJpwLmV5B6bjgMA>

- Guix, J. C. (2021). Interacciones mutualistas entre animales y plantas. I. Introducción general. IBM. (s. f.). Prueba binomial. Consultado el 10 de diciembre de 2022. <https://www.ub.edu/portal/web/crba-es/volumen-7>
- IBM. (s. f.). Prueba binomial. Consultado el 10 de diciembre de 2022. <https://www.ibm.com/docs/es/spss-statistics/beta?topic=tests-binomial-test>
- Lips, K. R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J. D., Alford, R. A., Voyles, J., Carey, C., Livo, L., Pessier, A. P. y Collins, J. P. (2006). Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(9), 3165-3170. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506889103>
- Ohtani, M., Saka, A., Sano, F., Ohya, Y., y Morishita, S. (2004). Development of image processing program for yeast cell morphology. *Journal of bioinformatics and computational biology*, 1(04), 695-709.
- Paul, G. C., Thomas, C. R. (1998). Characterisation of mycelial morphology using image analysis. *Relation Between Morphology and Process Performances*, 1-59.
- Pedreschi, M. E., de Herrera, A. P., y Arcia, D. (2013). Reserva Forestal El Montuoso: Vinculación económica de las comunidades de influencia con su ecosistema. *Visión Antataura*, 1(1), 87-100.
- Pepper, I. L., Gerba, C. P. y Brendecke, J. W. (2011). *Environmental Microbiology: A Laboratory Manual*. Elsevier Gezondheidszorg.
- Perdomo, H. M. (2011). Caracterización fenotípica y molecular de hongos filamentosos oportunistas: *scedosporium*, *acremonium*, *phialemonium*, *lecythophora* y *paecilomyces* (Doctoral dissertation, Universitat Rovira i Virgili).
- Rodríguez, R., White, J., Arnold, A.E. y Redman, R. (2009). Fungal endophytes: Diversity and ecological roles. *New Phytol.* 182, 314-330.
- Rozo, J. A. (2009). *Sistemas De Siembra Para Hongos Y Bacterias* Objetivo General, 7. <http://www.academia.edu/25707996/>
- Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, Y. K. M., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M. C., y Macías-

Rubalcava, M. L. (2013b). 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. [https://doi.org/10.1016/s1405-888x\(13\)72084-9](https://doi.org/10.1016/s1405-888x(13)72084-9)

Urbanová, M., Šnajdr, J., y Baldrian, P. (2015). The composition of fungal and bacterial communities in forest litter and soil is largely determined by dominant trees. *Soil Biology and Biochemistry*, 84, 53-64.

Waller, F. et al. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *PNAS* 102, 13386-13391.