



Hongos endófitos aislados de manglares en la Reserva Natural San Pedro, Buenaventura

Fungal endophytes isolated from mangroves in San Pedro Nature Reserve, Buenaventura

J. Alexander Osorio^{1*}, Yajaira Ríos¹ y Riikka Linnakoski²

0000-0003-1774-616X 0000-0002-4303-6703 0000-0002-3294-8088

1. Programa de Biología, Universidad del Quindío, Carrera 15 # 12N, Armenia-Quindío, Colombia. jaosrior@uniquindio.edu.co, osorio.romero17@gmail.com*, yriosa@ugvirtual.edu.co

2. Natural Resources Institute Finland (Luke), Latokartanonkaari 9, 00790 Helsinki, Finland. riikka.linnakoski@luke.fi

* Autor de correspondencia / Corresponding author

RESUMEN

Los árboles de mangle crecen en zonas estuarinas de las regiones tropicales y subtropicales, donde prestan importantes servicios económicos, ecológicos y culturales. Los estudios han demostrado que estos árboles son importantes reservorios de microorganismos fúngicos, que comprenden una serie de hongos morfológicamente diversos incluyendo patógenos, endófitos o saprobios, desempeñando un papel clave en el ciclo de nutrientes, protección del hospedero frente a condiciones adversas y, en muchas ocasiones, el declive de los hospederos. Con el fin de determinar la diversidad de hongos endófitos asociados a árboles de mangle en la Reserva Natural San Pedro, Buenaventura, Colombia; se colectaron ramas sanas (longitud aprox. 10 cm) de *Laguncularia racemosa*, *Mora oleifera*, *Pelliciera rhizophorae* y *Rhizophora racemosa* para los respectivos aislamientos fúngicos. Se extrajo ADN y se amplificó la región del espaciador transcrito interno (ITS), seguido de análisis filogenéticos tales como Bayesiano (BI), Máxima Verosimilitud (ML) y Máxima Parsimonia (MP). En total se identificaron nueve géneros, *Bipolaris*, *Ciboria*, *Coprinellus*, *Cylindrobasidium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum* y *Neurospora* pertenecientes a ocho familias. De estos, *Fusarium*, *Lasiodiplodia* y *Neofusicoccum* son bien conocidos por su alto potencial para amenazar la salud de sus huéspedes cuando sus condiciones son adversas, igualmente los hongos endófitos también cumplen un papel importante en la producción de biocompuestos para la protección de sus hospederos.

PALABRAS CLAVE: Análisis molecular, asociación hongo-huésped, ecosistemas costeros, patógenos fúngicos.

ABSTRACT

Mangrove trees grow in estuarine zones in tropical and subtropical regions, where they provide important economic, ecological and cultural services. Studies have shown that these trees are important reservoirs of fungal microorganisms, which encompasses a range of morphologically diverse fungi that are either pathogens, endophytes or saprobes, playing a key role in nutrient cycling, host protection against adverse conditions and in many occasions host decline. To determine the diversity of endophytic fungi associated with mangrove trees in the San Pedro Natural Reserve, Buenaventura, Colombia, healthy branches (length approx. 10 cm) of *Laguncularia racemosa*, *Mora oleifera*, *Pelliciera rhizophorae* and *Rhizophora racemosa* were collected for the respective fungal isolations. DNA was extracted and the Internal Transcribed Spacer (ITS) region was amplified, followed by phylogenetic analyses such as Bayesian (BI), Maximum Likelihood (ML) and Maximum Parsimony (MP). A total of nine genera, *Bipolaris*, *Ciboria*, *Coprinellus*, *Cylindrobasidium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum* and *Neurospora* belonging to eight families were identified. Of these, *Fusarium*, *Lasiodiplodia* and *Neofusicoccum* are well known for their high potential to threaten the health of their hosts when conditions are adverse. Endophytic fungi also play an important role in the production of biocompounds for the protection of their hosts.

KEYWORDS: Coastal ecosystems, fungal pathogens, fungus-host association, molecular analysis.

INTRODUCCIÓN

Los bosques de manglar son ecosistemas altamente productivos de las áreas intermareales de las regiones tropicales y subtropicales (Spalding *et al.*, 2010; Tomlinson, 2016). Colombia tiene la tercera mayor extensión de manglares en Latinoamérica, con un área aproximada de 371 081 ha, de las cuales 282 835 ha están en la costa del Pacífico (Giri *et al.*, 2011).

En el Pacífico colombiano, los ecosistemas de manglar consisten principalmente en ocho especies: *Avicennia germinans* (L.), *Conocarpus erectus* L., *Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaertn., *Mora oleifera* (Triana ex Hemsl.) Ducke, *Pelliciera rhizophorae* Planch. y Triana, *Rhizophora harrisonii* Leechm., *Rhizophora mangle* L. y *Rhizophora racemosa* G. Mey. (García, 2010; Cornejo *et al.*, 2014; Mejía *et al.*, 2014). Estas especies también brindan servicios importantes a las comunidades locales de la región (Palacios y Cantera, 2017). Sin embargo, a pesar de estos beneficios, se ha reconocido ampliamente que una combinación de actividades humanas y eventos naturales está relacionada con el declive de estos árboles en esta parte del país (Prahl, 1989; Álvarez, 2003; López *et al.*, 2016).

En los últimos años, se ha prestado una atención considerable al potencial productivo de los ecosistemas de manglar debido a la actividad metabólica de las comunidades fúngicas (Hyde y Lee, 1995; Rineau *et al.*, 2013; Thatoi *et al.*, 2013). Este potencial ha despertado gran interés en la investigación de las asociaciones entre árboles de mangle y hongos potencialmente beneficiosos como los endófitos (Petrini, 1991; Wilson, 1995), que colonizan los tejidos internos de las plantas, protegiéndolas de factores adversos (Gilbert *et al.*, 2002; Arnold, 2007) o desempeñándose como patógenos oportunistas cuando los hospederos están bajo diferentes niveles de estrés (Slippers y Wingfield, 2007).

Para Colombia se han registrado números de hongos endófitos en plantas nativas o no nativas y sintomáticas o asintomáticas (e.g., Salazar y Garcia, 2005; Ordóñez *et al.*, 2012; Gamboa y Otero, 2016). Sin embargo, los estudios sobre estos grupos fúngicos asociados con especies de manglar en el país aún son muy escasos (Bolívar-Anillo *et al.*, 2015). El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de endófitos fúngicos asociados con especies de manglar en la Reserva Natural San Pedro (Buenaventura, Colombia), así como determinar su posible rol en el desarrollo de enfermedades con base en la literatura relevante.

INTRODUCTION

Mangrove forests are highly productive ecosystems of intertidal areas in tropical and subtropical regions (Spalding *et al.*, 2010; Tomlinson, 2016). Colombia is the third-largest mangrove country in the Latin America, with an approximate area of 371,081 ha. of which 282,835 ha. are on the Pacific coast (Giri *et al.*, 2011).

In the Colombian Pacific, mangrove ecosystems consist mainly of eight species including *Avicennia germinans* (L.), *Conocarpus erectus* L., *Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaertn., *Mora oleifera* (Triana ex Hemsl.) Ducke, *Pelliciera rhizophorae* Planch. and Triana, *Rhizophora harrisonii* Leechm., *Rhizophora mangle* L., and *Rhizophora racemosa* G. Mey. (García, 2010; Cornejo *et al.*, 2014; Mejía *et al.*, 2014). In addition, these species also provide important services to the local communities of the region (Palacios and Cantera, 2017). However, despite these benefits, combinations of human activities and natural events have been widely recognized to be associated with the decline of these trees in this part of the country (Prahl, 1989; Álvarez, 2003; López *et al.*, 2016).

In recent years, the productive potential of mangrove ecosystems has been largely considered due to the metabolic activity of fungal communities (Hyde and Lee, 1995; Rineau *et al.*, 2013; Thatoi *et al.*, 2013). This potential has aroused great interest in investigating associations between mangrove trees and potentially beneficial fungi such as endophytes (Petrini, 1991; Wilson, 1995), which colonize the internal tissues of plants by protecting them from adverse factors (Gilbert *et al.*, 2002; Arnold, 2007), or turning as opportunistic pathogens when plants are under different levels of stress (Slippers and Wingfield, 2007).

Numerous species of endophytic fungi have been reported in Colombia, either from native or non-native symptomatic or asymptomatic plants (e.g., Salazar and Garcia, 2005; Ordóñez *et al.*, 2012; Gamboa and Otero, 2016). However, studies on these fungal groups associated with mangrove species in the country remain very limited (Bolívar-Anillo *et al.*, 2015). The objective of this study was to evaluate the presence of fungal endophytes associated with mangrove species in the San Pedro Nature Reserve, Buenaventura, Colombia, and to determine their possible role in disease development based on relevant literature.

ÁREA DE ESTUDIO

La Reserva Natural San Pedro (03° 50' 06" N y 77° 15' 28" W) está ubicada en el istmo de Pichidó, en el área media de la costa pacífica colombiana, municipio de Buenaventura (Valle del Cauca). La reserva tiene una extensión de 100 ha, de las cuales el 40 % corresponde a ecosistemas de manglar y 60 % a bosques lluviosos. Tiene una temperatura anual promedio de 26 °C, una humedad relativa de 80-98 % y una precipitación anual promedio de 7 000 mm. Hay cuatro especies de manglar en esta reserva natural: *Laguncularia racemosa*, *Mora oleifera*, *Pelliciera rhizophorae* y *Rhizophora racemosa* (Fig. 1).

STUDY AREA

The San Pedro Nature Reserve (03° 50' 06" N y 77° 15' 28" W), is located at the isthmus of Pichidó, in the middle area of the Colombian Pacific coast, in the municipality of Buenaventura (Valle del Cauca). The reserve has an area of 100 ha, of which 40 % is mangrove ecosystem and 60 % rainforest. It has an average annual temperature of 26 °C, the relative humidity is 80 % to 98 %, and an average annual rainfall of 7,000 mm. Four mangrove species are present at this nature reserve, including *Laguncularia racemosa*, *Mora oleifera*, *Pelliciera rhizophorae*, and *Rhizophora racemosa* (Fig. 1).

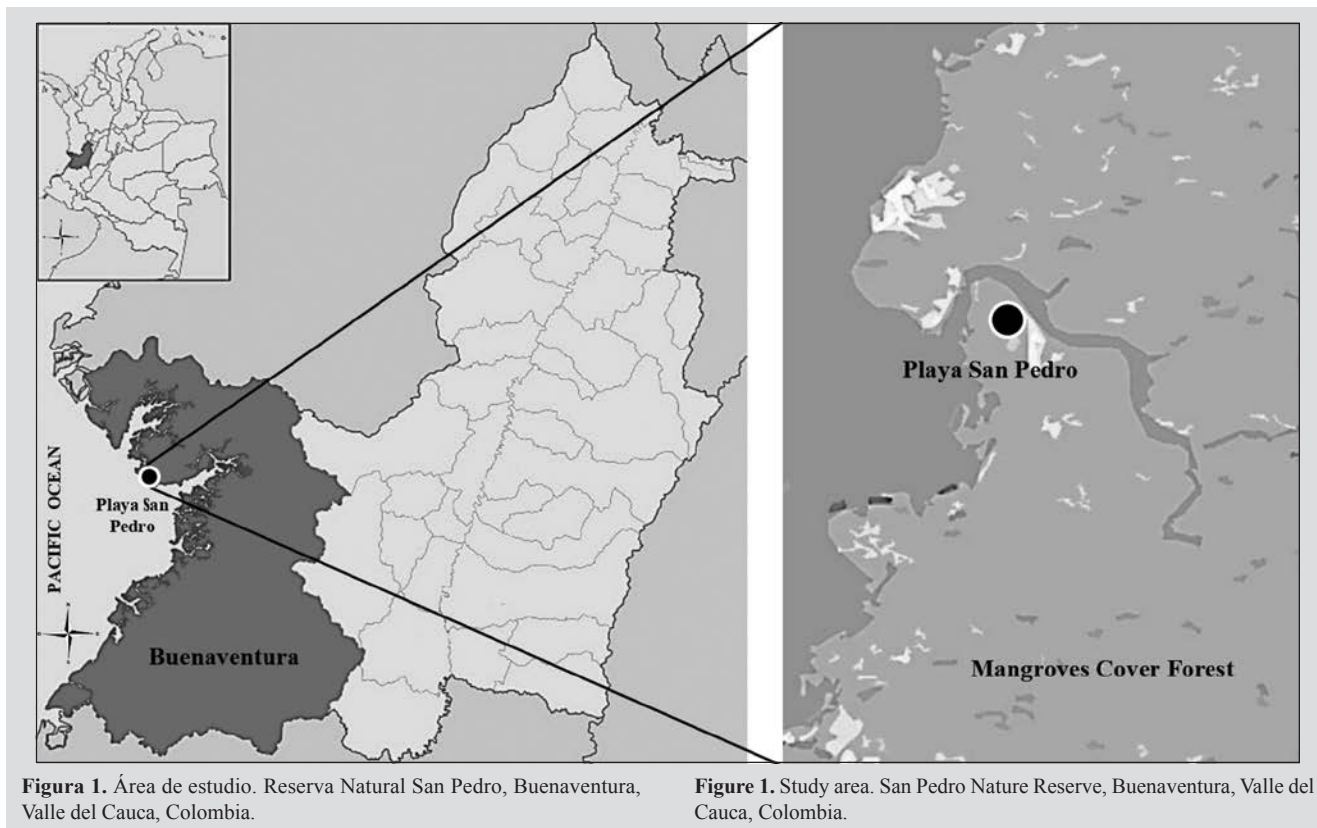


Figura 1. Área de estudio. Reserva Natural San Pedro, Buenaventura, Valle del Cauca, Colombia.

Figure 1. Study area. San Pedro Nature Reserve, Buenaventura, Valle del Cauca, Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de campo

Se realizó un reconocimiento del área de estudio, seguido de un muestreo aleatorio de segmentos de ramas asintomáticas del área media del dosel. Se recolectó un total de 20 ramas de aproximadamente 10 cm de longitud (ca.). Se colocaron cinco de cada especie de manglar (*Laguncularia racemosa*, *Mora oleifera*, *Pelliciera rhizophorae* y

MATERIALS AND METHODS

Field sampling

Prior recognition of the study area was performed, followed by a random sampling of asymptomatic branch segments from the middle part of canopy. In total 20 branches of approximately 10 cm long (ca.) were collected, five from each mangrove species including *Laguncularia racemosa*, *Mora oleifera*, *Pelliciera rhizophorae* and *Rhizophora*

Rhizophora racemosa) en bolsas de papel y se almacenaron en un refrigerador portátil. Acto seguido, las muestras fueron transferidas y preservadas en el laboratorio del Programa de Biología de la Universidad del Quindío para aislamiento fúngico. Debe tenerse en cuenta que, en este estudio, el tamaño de la muestra (el número de ramas recolectadas) dependió de los permisos de muestreo otorgados por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA).

Aislamiento fúngico

El aislamiento de endófitos se realizó siguiendo el protocolo descrito por Slippers y Wingfield (2007), con ciertas modificaciones hechas por Osorio *et al.* (2017). Las ramas recolectadas se lavaron con agua de la llave para remover el exceso de desechos y, para cada rama, se cortaron cinco porciones de 0.5 cm aproximadamente. Estos fragmentos se sumergieron en etanol al 90 % por 1 min, luego en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 4 % (1 min) y después en etanol al 70 % (1 min), finalizando con un enjuague en agua destilada (1 min).

Después de esterilizar la superficie y colocar las piezas en papel estéril para secarlas, cada fragmento se transfirió a agar de extracto de malta al 2 % (MEA; 20 g de extracto de malta, 20 g de agar Biolab en 1 L de agua destilada), el cual contenía 50 mg de estreptomycin para prevenir la colonización bacteriana. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente, en luz y oscuridad naturales. Las colonias resultantes se purificaron utilizando el método de ‘punta hifal única’, tal y como se describe en el procedimiento realizado por Osorio *et al.* (2017). Acto seguido, las colonias se separaron en morfogrupos para la posterior extracción de su ADN, la cual se llevó a cabo siguiendo la metodología de Raeder y Broda (1985).

Amplificación y secuenciación por PCR directa

Se realizó PCR directamente de cultivos puros representativos sin purificación previa de ADN, utilizando el kit Phire Plant Direct PCR (Thermo Scientific, EE. UU.) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron los cebadores ITS1-F e ITS4 (White *et al.*, 1990) para amplificar la región ITS. Las reacciones PCR de 25 µl contenían 0.5 µl de molde de ADN, 0.5 µM de los cebadores ITS1-F e ITS4, 15 µl 2 × del *buffer* PCR Phire Plant (que incluye dNTPs y MgCl₂) (Thermo Scientific) y 0.5 µl de polimerasa II de ADN Phire Hot Start (Thermo Scientific). La desnaturalización inicial se llevó a cabo a 98 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos de (1) desnaturalización a 98 °C por 5 s, (2) recocido a 55 °C por 5 s y (3) extensión a 72 °C por 20 s. La extensión final ocurrió a 72 °C por 1 min. Los productos PCR amplificados se colocaron

racemosa were placed in paper bags and stored in a portable refrigerator. They were subsequently transferred and preserved in the laboratory of the Biology Program of the Universidad del Quindío for further fungal isolation. It needs to be considered that the sampling size (number of branches collected) performed in this study depended on the sampling permits obtain from the National Environmental Licensing Authority.

Fungal isolations

The isolation of endophytes was carried out following the protocol described by Slippers and Wingfield (2007), with certain modifications made by Osorio *et al.*, (2017). The collected branches were washed with tap water to remove excess debris and for each branch, five portions of 0.5 cm approximately were cut. These fragments were submerged in 90 % ethanol for one minute, followed by sodium hypochlorite (NaOCl) at 4 % (1 min), then in 70 % ethanol (1 min), and ending with a rinse in distilled water (1 min).

After surface sterilization and the pieces were placed on sterile paper for drying, each fragment was transferred to 2 % malt extract agar (MEA; 20 g malt extract, 20 g Biolab Agar in 1 L of distilled water), containing 50 mg of streptomycin to prevent bacterial colonization. The samples were incubated at room temperature, in natural light and darkness. The resulting colonies were purified using the “single hyphal tip” method, as described in the procedure carried out by Osorio *et al.*, (2017), subsequently, the resulting colonies were separated into morph-groups for the following DNA extraction, which was performed by following the methodology of Raeder and Broda (1985).

Direct PCR amplification and sequencing

PCR was performed directly from representative pure cultures without prior DNA purification using Phire Plant Direct PCR kit (Thermo Scientific, USA) following the manufacturer’s instructions. ITS1-F and ITS4 primers (White *et al.*, 1990) were used for the amplification of the ITS region. 25 µl PCR reactions contained 0.5 µl DNA template, 0.5 µM ITS1-F and ITS4 primers, 15 µl 2 × Phire Plant PCR buffer (includes dNTPs and MgCl₂) (Thermo Scientific) and 0.5 µl Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific). Initial denaturation was performed at 98 °C for 5 min followed by 35 cycles of (1) denaturation at 98 °C for 5 s, (2) annealing at 55 °C for 5 s, and (3) extension at 72 °C for 20 s. The final extension occurred at 72 °C for 1 min. The amplified PCR products were run on 1 % agarose gels, and

en geles de agarosa, y aquellos que fueron amplificados con éxito se purificaron mediante el protocolo EXO-SAP, *i.e.*, el producto PCR (20 µl) se mezcló con 8 µl de Exo-SAP [5 µl de exonucleasa I (20 U/µl) (Fermentas, Vilnius, Lituania) y 100 µl de fosfatasa alcalina de camarón (1 U/µL) (Roche Diagnostics, Indianapolis, EE. UU.) en una mezcla de reacción de 1000 µl]. Las muestras fueron incubadas a (1) 37 °C por 15 min y (2) a 80 °C por 15 min. Los productos PCR fueron secuenciados en Macrogen Europe. Las secuencias resultantes se analizaron manualmente, y se obtuvieron secuencias de consenso utilizando el *software* Sequencher v.5.

Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas se compararon con los datos de especie en GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) realizando búsquedas BLAST mediante el algoritmo BLASTn (Altschul *et al.*, 1990). Se obtuvieron secuencias de ADN de especies estrechamente relacionadas desde GenBank y se combinaron en conjuntos de datos con las secuencias ITS de los aislados obtenidos en este estudio (Table 1). La selección del grupo externo de cada conjunto de datos se llevó a cabo con base en los resultados de estudios anteriores, incluyendo los de Sun y Guo (2012) y Osorio *et al.* (2017). Los conjuntos de datos se alinearon utilizando el programa MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>), seleccionando el método de refinamiento iterativo *G-INS-i* (Kuraku *et al.*, 2013; Katoh *et al.*, 2019), y se editaron manualmente en MEGA v. 10.1.7 (Kumar *et al.*, 2018). Se realizaron reconstrucciones filogenéticas por máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (BI) para cada conjunto de datos obtenido.

Tabla 1. Números e información de acceso en GenBank para los aislados obtenidos de árboles de mangle en la Reserva Natural San Pedro de Buenaventura (Colombia).

Especie / Specie	# del aislado / # Isolated	Anfitrión / Host	Código de acceso Genbank para la región del gen ITS / Genbank Access code for the ITS gene region
<i>Bipolaris</i> sp.	COLPR-12	<i>Pelliciera rhizophorae</i>	MW029957
<i>Bipolaris</i> sp.	COLPR-15	<i>Pelliciera rhizophorae</i>	MW029956
<i>Ciboria aestivalis</i>	COLLR-3	<i>Laguncularia racemosa</i>	MW029950
<i>Coprinellus radians</i>	COLRR-11	<i>Rhizophora racemosa</i>	MW029960
<i>Cylindrobasidium torrendii</i>	COLLR-1	<i>Laguncularia racemosa</i>	MW029959
<i>Cylindrobasidium torrendii</i>	COLPR-13	<i>Pelliciera rhizophorae</i>	MW029958
<i>Epicoccum nigrum</i>	COLRR-10	<i>Rhizophora racemosa</i>	MW029955

successfully amplified products were purified with EXO-SAP protocol: the PCR product (20 µl) was mixed with 8 µl of Exo-SAP [5 µl of Exonuclease I (20 U/µl) (Fermentas, Vilnius, Lithuania) and 100 µl of Shrimp Alkaline Phosphatase (1 U/µL) (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) in a 1000 µl reaction mixture]. The samples were incubated at (1) 37 °C for 15 minutes and (2) at 80 °C for 15 minutes. The PCR products were sequenced at Macrogen Europe. The resulting sequences were manually analyzed, and consensus sequences obtained by using Sequencher v.5 software.

Phylogenetic analysis

The obtained sequences were compared to the species data in GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) by performing BLAST searches on GenBank using the BLASTn algorithm (Altschul *et al.*, 1990). DNA sequences of closely related species were obtained from GenBank and combined into datasets with the ITS sequences of the isolates obtained in this study (Table 1). The selection of the outgroup for each dataset was made according to the results of previous studies, including those of Sun and Guo (2012) and Osorio *et al.* (2017). The data sets were aligned using the MAFFT program (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>), selecting the iterative refinement method *G-INS-i* (Kuraku *et al.*, 2013; Katoh *et al.*, 2019) and were manually edited with MEGA v. 10.1.7 (Kumar *et al.*, 2018). Phylogenetic reconstructions were performed by maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML), and bayesian inference (BI) for each dataset obtained.

Table 1. Isolate numbers and access information to GenBank of isolates obtained from mangrove trees in the San Pedro Buenaventura Nature Reserve (Colombia).

Especie / Specie	# del aislado / # Isolated	Anfitrión / Host	Código de acceso Genbank para la región del gen ITS / Genbank Access code for the ITS gene region
<i>Fusarium oxysporum</i>	COLLR-2	<i>Laguncularia racemosa</i>	MW029951
<i>Fusarium oxysporum</i>	COLPR-14	<i>Pelliciera rhizophorae</i>	MW029952
<i>Fusarium oxysporum</i>	COLMO-16	<i>Mora oleifera</i>	MW029953
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	COLLR-17	<i>Laguncularia racemosa</i>	MW029949
<i>Lasiodiplodia venezuelensis</i>	COLRR-9	<i>Rhizophora racemosa</i>	MW029948
<i>Neofusicoccum</i> sp.	COLRR-6	<i>Rhizophora racemosa</i>	MW029946
<i>Neofusicoccum</i> sp.	COLRR-7	<i>Rhizophora racemosa</i>	MW029947
<i>Neofusicoccum batangarum</i>	COLLR-5	<i>Laguncularia racemosa</i>	MW029944
<i>Neofusicoccum batangarum</i>	COLRR-8	<i>Rhizophora racemosa</i>	MW029945
<i>Neurospora crassa</i>	COLLR-4	<i>Laguncularia racemosa</i>	MW029954

Los análisis de MP se llevaron a cabo en PAUP v. 4.0b10 (Swofford, 2003), utilizando una búsqueda heurística y el algoritmo de reorganización de bisección-reconexión de árboles. Las brechas se trataron como datos faltantes, y todos los caracteres fueron tratados de manera no ordenada y con el mismo peso. Se obtuvo soporte estadístico para los nuevos mediante 1000 repeticiones bootstrap. Para los análisis de ML y BI, se obtuvieron modelos de reemplazo con antelación utilizando el *software* jModelTest v. 2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012) y los criterios de información Akaike (AIC) (Akaike, 1974). Los análisis de ML se llevaron a cabo en el programa PhyML v. 3.1 (Guindon y Gascuel, 2003), teniendo en cuenta los modelos obtenidos a través de jModelTest. Los valores de soporte para los nuevos estimaron utilizando 1000 repeticiones bootstrap de ML. Posteriormente, se determinaron las probabilidades de BI con base en el algoritmo de cadena de Markov Monte Carlo (MCMC) en MrBayes v. 3.2.7a (Ronquist *et al.*, 2012). Se realizaron dos ejecuciones independientes de manera simultánea para cinco millones de generaciones. Los valores de quemado se determinaron mediante el *software* Tracer v. 1.7.1 (Rambaut *et al.*, 2018). Los primeros 0.25 árboles muestreados que representaran la fase de quemado fueron descartados, y los restantes se utilizaron para construir el árbol de consenso. Por último, los árboles filogenéticos obtenidos de los análisis de BI, ML y MP fueron editados en FigTree v. 1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) y/o MEGA v. 10.1.7 (Kumar *et al.*, 2018).

Analyses of the MP were performed in PAUP v. 4.0b10 (Swofford, 2003) using a heuristic search and tree-bisection-reconnection (TBR) reorganization algorithm. Gaps were treated as missing data and all characters were treated as unordered type with the same weight. Statistical support for the nodes was obtained by performing 1000 bootstrap replicates. For ML and BI analyses, replacement models were previously obtained using the jModelTest software v. 2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012) using the Akaike (AIC) information criteria (Akaike, 1974). ML analyses were performed with the PhyML v. 3.1 program (Guindon and Gascuel, 2003), considering the models obtained with jModelTest. The support values for the nodes were estimated using 1000 ML bootstrap replicates. Subsequent probabilities for BI were determined based on the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algorithm that was performed on MrBayes v. 3.2.7a (Ronquist *et al.*, 2012). Two independent runs were conducted simultaneously for 5 million generations. The burn-in values were determined through Tracer software v. 1.7.1 (Rambaut *et al.*, 2018), the first 0.25 sampled trees that represented the burn-in phase were discarded and the remaining trees were used to build the consensus tree. Finally, the phylogenetic trees obtained from the BI, ML and MP analyses were edited in FigTree v. 1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) and/or MEGA v. 10.1.7 (Kumar *et al.*, 2018).

RESULTADOS

Se muestrearon 20 ramas en total, pertenecientes a cuatro especies de manglar. De estas, se aislaron 17 hongos endófitos, que representan nueve géneros pertenecientes a ocho familias, incluyendo a Botryosphaeriaceae, Didymellaceae, Nectriaceae, Physalacriaceae, Pleosporaceae, Psathyrellaceae, Sclerotiniaceae y Sordariaceae; dos en Basidiomycota y seis en Ascomycota. De estos aislados, se obtuvieron seis de *L. racemosa*, seis de *R. racemosa*, cuatro de *P. rhizophorae* y uno de *M. oleifera*.

Amplificación y secuenciación por PCR

Los fragmentos obtenidos de las secuencias ITS tenían un tamaño aproximado de entre 465 y 606 bp. Las secuencias incluidas en este estudio se depositaron en la base de datos GenBank de secuencias de ADN (Tabla 1).

Análisis filogenético

Los análisis de BI, ML y MP para la región genética ITS mostraron topologías congruentes soportadas por valores de soporte bootstrap y probabilidades subsiguientes, identificando ocho familias de hongos (Fig. 2). La filogenia generada para Botryosphaeriaceae incluyó 15 especies

RESULTS

A total of 20 branches were sampled, belonging to four mangrove species. Of these, 17 endophytic fungi were isolated, representing nine genera belonging to eight families including Botryosphaeriaceae, Didymellaceae, Nectriaceae, Physalacriaceae, Pleosporaceae, Psathyrellaceae, Sclerotiniaceae and Sordariaceae; two in the Basidiomycota and six in the Ascomycota. Of these isolates, six were obtained from *L. racemosa*, six from *R. racemosa*, four from *P. rhizophorae* and one from *M. oleifera*.

PCR amplification and sequencing

Fragments obtained from the ITS sequences, comprised approximately 465 to 606 bp in size. The sequences included in this study were deposited in the GenBank DNA sequence database (Table 1).

Phylogenetic analysis

Analyses of BI, ML and MP, for the ITS gene region showed congruent topologies supported by bootstrap values and subsequent probabilities, thus identifying eight fungal families (Fig. 2). The phylogeny generated for Botryosphaeriaceae included fifteen species previously

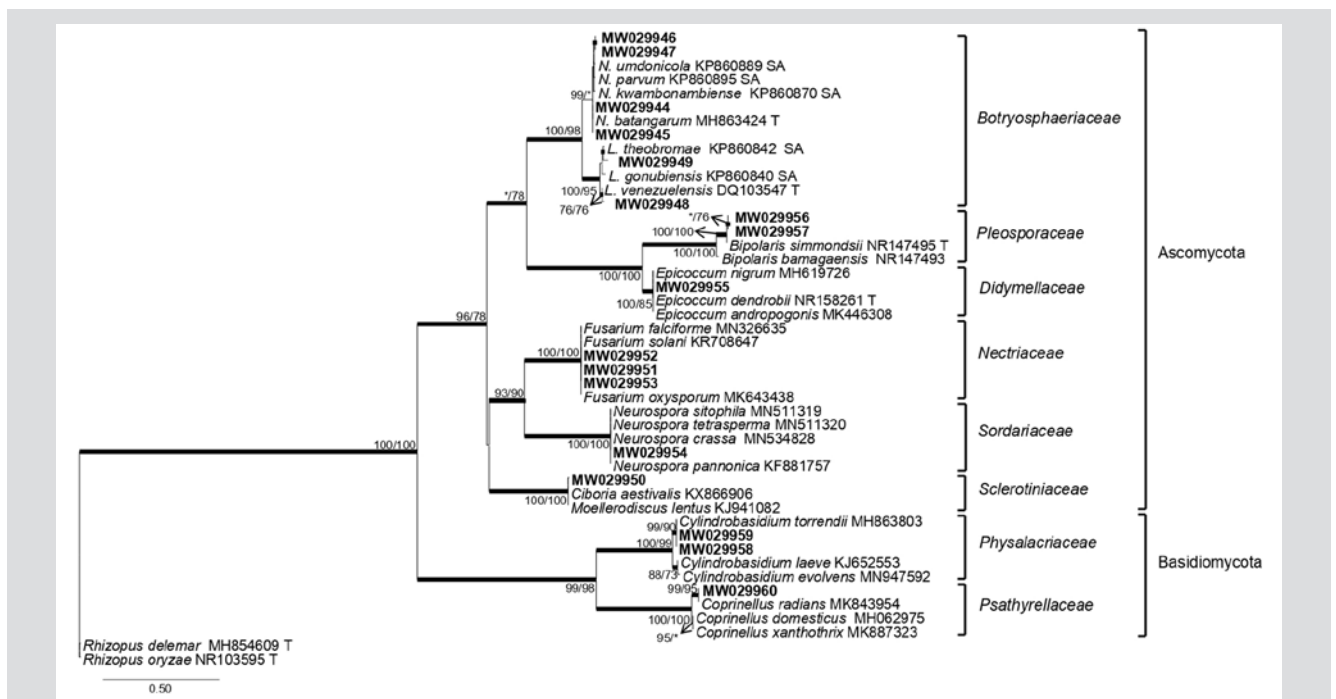


Figura 2. Familias de hongos endófitos aislados de cuatro especies de manglar. Filograma obtenido de los análisis de BI, ML y MP del conjunto de datos ITS. Las secuencias obtenidas en este estudio se muestran en negrita. Las probabilidades subsiguientes $\geq 95\%$ de BI se representan con ramas gruesas. Los valores de soporte bootstrap $> 70\%$ se indican cerca a los nodos como MP/ML. * • Valores de soporte bootstrap $< 70\%$.

Figure 2. Families of isolated endophyte fungi of four mangrove species. A phylogram obtained from the BI, ML and MP analyses of the ITS dataset. The sequences obtained in this study are in bold. The subsequent probabilities $\geq 95\%$ of BI are represented by thick branches. Bootstrap support values $> 70\%$ are indicated near nodes as MP/ML. * • Bootstrap support values $< 70\%$.

previamente descritas con base en la región ITS (Fig. 3a). En Didymellaceae, se realizó una comparación filogenética de 18 especies, de las cuales solo se obtuvo un aislado (MW029955) de los manglares (Fig. 3b). Para Nectriaceae, se tomaron 14 especies previamente descritas como referencia, y tres aislados obtenidos de árboles de mangle (MW029951, MW029952, MW029953) fueron agrupados en el mismo clado con *Fusarium falciforme* (Carrión) Summerb. y Schroers 2002, *F. oxysporum* y *F. solani* (Fig. 4a).

La filogenia de Physalacriaceae incluyó nueve especies previamente descritas. Dos aislados obtenidos de manglares (MW029959, MW029958) presentaron una estrecha relación con *Cylindrobasidium torrendii* (Fig. 4b). Para Pleosporaceae, el análisis filogenético incluyó 16 especies previamente descritas. Dos aislados obtenidos de manglares (MW029957, MW029956) formaron un clado independiente dentro de la familia (Fig. 4c). En Psathyrellaceae, los análisis filogenéticos incluyeron 13 especies, de las cuales se agrupó un único aislado de manglar (MW029960) con *Coprinellus radians* (Fig. 5a). En Sclerotiniaceae, el aislado MW029950 se agrupó estrechamente con dos especies en el mismo clado: *Ciboria aestivalis* y *Moellerodiscus lentus* (Fig. 5b). Para Sordariaceae, un aislado de manglar (MW029954) se agrupó con *Neurospora crassa*, *N. pannonica*, *N. sitophila* y *N. tetrasperma* (Fig. 5c).

described based on the ITS region (Fig. 3a). In Didymellaceae 18 species were phylogenetically compared, of which only one isolate (MW029955), was obtained from mangroves (Fig. 3b). For Nectriaceae, fourteen species described earlier were used as references; three isolates obtained from mangrove trees (MW029951, MW029952, MW029953) grouped in the same clade with *Fusarium falciforme* (Carrión) Summerb. and Schroers 2002, *F. oxysporum* and *F. solani* (Fig. 4a).

Phylogeny of Physalacriaceae included nine previously described species; two isolates obtained from mangroves (MW029959, MW029958) were closely related to *Cylindrobasidium torrendii* (Fig. 4b). In Pleosporaceae, 16 species described earlier were included in the phylogenetic analysis; two isolates obtained from mangroves (MW029957, MW029956) formed a separate clade within the family (Fig. 4c). In Psathyrellaceae, 13 species were included in the phylogenetic analyses, of these, a single isolate obtained from mangroves (MW029960) grouped with *Coprinellus radians* (Fig. 5a). In Sclerotiniaceae, the isolate (MW029950) was closely grouping with two species in the same clade, *Ciboria aestivalis* and *Moellerodiscus lentus* (Fig. 5b). In Sordariaceae, a mangrove isolate (MW029954) was grouping with *Neurospora crassa*, *N. pannonica*, *N. sitophila* and *N. tetrasperma* (Fig. 5c).

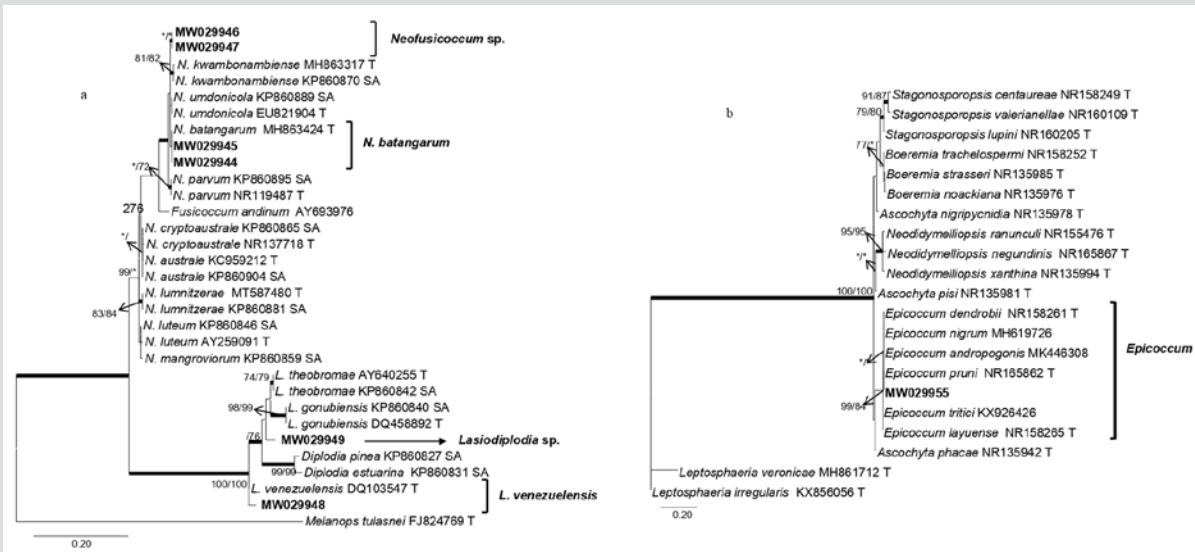


Figura 3. Filograma de géneros en Botryosphaeriaceae. Seis de los 17 aislados obtenidos de manglar están estrechamente agrupados con los géneros *Lasiodiplodia* y *Neofusicoccum* (3a). Filograma del género Didymellaceae, indicando que uno de los aislados obtenidos de *Rhizophora racemosa* (negrita) está agrupado con diferentes especies de *Epicoccum* (3b). Filogramas obtenidos de los análisis de BI, ML y MP para el conjunto de datos ITS. Las probabilidades subsiguientes $\geq 95\%$ de BI se representan con ramas gruesas. Los valores de soporte bootstrap $> 70\%$ se indican cerca a los nodos como MP/ML. * • Valores de soporte bootstrap $< 70\%$.

Figure 3. Phylogram of genera in Botryosphaeriaceae. Six of the 17 mangrove isolates are closely grouped with the genera *Lasiodiplodia* and *Neofusicoccum* (3a). A phylogram of Didymellaceae genera, indicating that one of the isolates obtained from *Rhizophora racemosa* (in bold) is grouped with different species of *Epicoccum* (3b). Phylograms obtained from BI, ML and MP analyses of the ITS dataset. The subsequent probabilities $\geq 95\%$ of IB are represented by thick branches. Bootstrap support values $> 70\%$ are indicated near nodes as MP/ML. * • Bootstrap support values $< 70\%$.

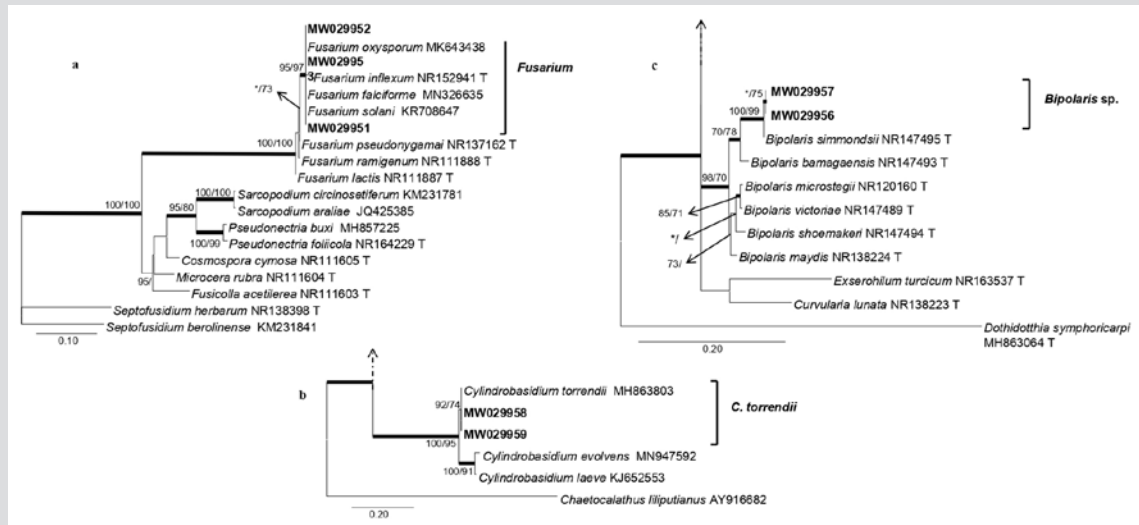


Figura 4. Análisis filogenético de los géneros en Nectriaceae. Los aislados de manglar (**negrita**) se agrupan con diferentes especies de *Fusarium* (4a). Filograma con el género *Physalacriaceae*. Los aislados obtenidos de manglares se agrupan claramente con *Cyindrobasidium torrendii* (4b). Filograma del género *Pleosporaceae*. Los aislados obtenidos de *Pelliciera rhizophorae* (**negrita**) sugieren una relación estrecha con *Bipolaris simmondsii* (4c). Filogramas obtenidos de los análisis de BI, ML y MP para el conjunto de datos ITS. Las probabilidades subsiguientes $\geq 95\%$ de BI se representan con ramas gruesas. Los valores de soporte bootstrap $> 70\%$ se indican cerca a los nodos como MP/ML. * • Valores de soporte bootstrap $< 70\%$.

Figure 4. Phylogenetic analysis of genera in Nectriaceae. Mangrove isolates (in bold) are grouped with different species of *Fusarium* (4a). Phylogram with genus *Physalacriaceae*, the isolates obtained from mangroves are clearly grouping with *Cyindrobasidium torrendii* (4b). Phylogram of *Pleosporaceae* genera. Isolations obtained from *Pelliciera rhizophorae* (in bold) suggest a close relationship with *Bipolaris simmondsii* (4c). Phylograms obtained from BI, ML and MP analyses of the ITS dataset. The subsequent probabilities $\geq 95\%$ of IB are represented by thick branches. Bootstrap support values $> 70\%$ are indicated near nodes as MP/ML. * • Bootstrap support values $< 70\%$.

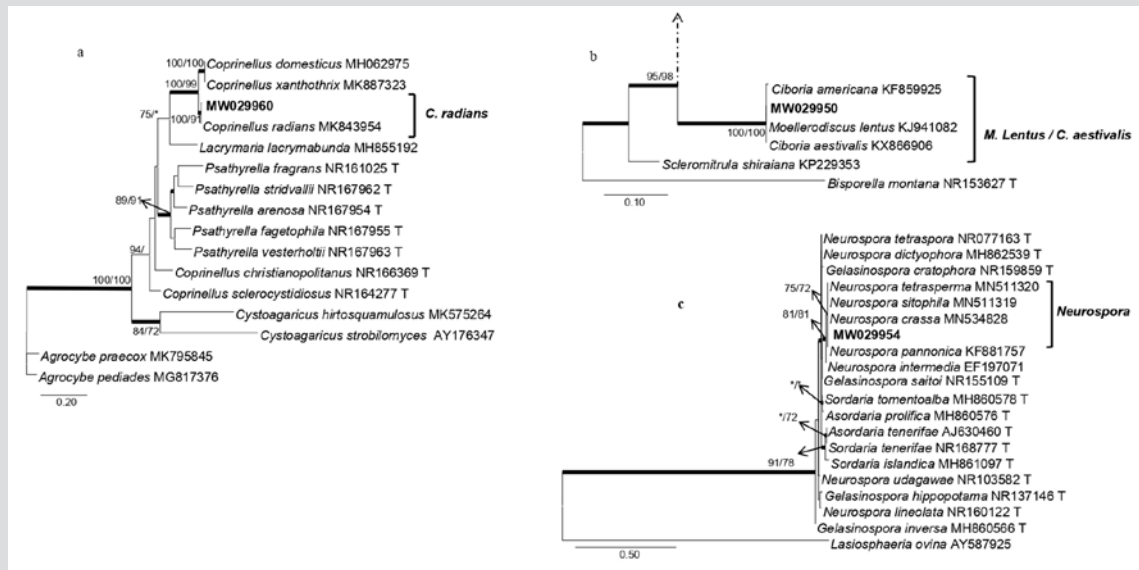


Figura 5. Filogramas obtenidos de los géneros en *Psathyrellaceae*, indicando que uno de los aislados obtenidos de *Rhizophora racemosa* (**negrita**) está estrechamente relacionado con *Coprinellus radians* (5a). Filograma de géneros en *Sclerotiniaceae*, indicando que uno de los aislados obtenidos de *Laguncularia racemosa* (**negrita**) se agrupa con *Moellerodiscus lentus* y *Ciboria aestivalis* (5b). Filograma obtenido de los géneros en *Sordariaceae*. Se muestra que los aislados obtenidos de las ramas de *Laguncularia racemosa* (**negrita**) se agrupan con cuatro especies de *Neurospora* (5c). Filogramas obtenidos de los análisis de BI, ML y MP para el conjunto de datos ITS. Las probabilidades subsiguientes $\geq 95\%$ de BI se representan con ramas gruesas. Los valores de soporte bootstrap $> 70\%$ se indican cerca a los nodos como MP/ML. * • Valores de soporte bootstrap $< 70\%$.

Figure 5. Phylograms obtained from genera in *Psathyrellaceae* indicating that one of the isolations obtained from *Rhizophora racemosa* (in bold) is closely related to *Coprinellus radians* (5a). Phylogram of genera in *Sclerotiniaceae* indicating that one of the isolates obtained from *Laguncularia racemosa* (in bold) groups with *Moellerodiscus lentus* and *Ciboria aestivalis* (5b). Phylogram obtained from genera in *Sordariaceae*, shows that isolations obtained from branches of *Laguncularia racemosa* (in bold) groups with four species of *Neurospora* (5c). Phylograms obtained from BI, ML and MP analyses of the ITS dataset. The subsequent probabilities $\geq 95\%$ of IB are represented by thick branches. Bootstrap support values $> 70\%$ are indicated near nodes as MP/ML. * • Bootstrap support values $< 70\%$.

DISCUSIÓN

Este estudio representa la primera aproximación filogenética a los hongos endófitos asociados con árboles de mangle en un área de la costa del Pacífico colombiano. Se identificaron nueve géneros fúngicos con base en datos de secuencia de ADN para la región ITS, la cual es ampliamente utilizada como un marcador molecular en la identificación de hongos y en estudios taxonómicos (Hibbett *et al.*, 2011; Joel y Bhimba, 2013). A partir del análisis filogenético, se verificó la identidad de los aislados, revelando que los endófitos recolectados en este estudio se agrupan estrechamente con especies como *Ciboria aestivalis*, *Coprinellus radians*, *Cylindrobasidium torrendii*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium oxysporum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Lasiodiplodia venezuelensis*, *Neofusicoccum batangarum* y *Neurospora crassa*. Esto, además de dos aislados que no pudieron confirmarse a nivel de especie. Se registraron *Bipolaris* sp. y *Neofusicoccum* sp. por primera vez en la costa del Pacífico colombiano.

Los hongos obtenidos en este estudio pertenecen en su mayoría a Ascomycota, con 14 aislados en distintos géneros. Entretanto, tres aislados fueron miembros de Basidiomycota. Curiosamente, estudios anteriores han confirmado que las partes aéreas y sumergidas de los árboles de mangle son mayoritariamente dominadas por ascomicetos, mientras que los basidiomicetos se encuentran en menor proporción (Alias *et al.*, 2010; Sun y Guo, 2012; Abdel *et al.*, 2014; Simões *et al.*, 2015). Esto es consistente con la actividad saprofitica que presenta un gran número de basidiomicetos (Agrios, 2005; Mohapatra, 2008). Mientras los basidiomicetos se encuentran principalmente en ambientes terrestres (Shearer *et al.*, 2007), los ascomicetos son vistos como un grupo ecológico importante, y una gran variedad de ellos aparece en ambientes diversos, incluyendo los marinos (Jones y Tan, 1987; Hyde y Jones, 1988; Abdel-Wahab, 2005; Vittal y Sarma, 2006; Alias *et al.*, 2010; Suetrong *et al.*, 2017). Además, se considera que un amplio rango de variables, incluyendo la edad del huésped, la arquitectura, los niveles de brillo, el genotipo y la altura de la copa, entre otros, afectan la estructura de las comunidades fúngicas, así como las interacciones entre endófitos y plantas (Saikkonen, 2007).

En este estudio se obtuvieron dos géneros en Botryosphaeriaceae (*Lasiodiplodia* y *Neofusicoccum*). Esto es consistente con estudios anteriores, que registran un amplio rango de hongos diversamente ecológicos en todas las áreas geográficas y climáticas del mundo (excepto en las regiones

DISCUSSION

This study represents the first phylogenetic approach of endophytic fungi associated with mangrove trees in an area of the Colombian Pacific coast. Nine fungal genera were identified based on the DNA sequence data for the ITS region, a gene region widely used as a molecular marker in fungal identification and taxonomic studies (Hibbett *et al.*, 2011; Joel and Bhimba, 2013). Based on the phylogenetic analysis, the identity of the isolates were verified and revealed that the endophytes collected in this study closely grouped with species such as *Ciboria aestivalis*, *Coprinellus radians*, *Cylindrobasidium torrendii*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium oxysporum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Lasiodiplodia venezuelensis*, *Neofusicoccum batangarum* and *Neurospora crassa*, and two isolates that could not be confirmed to species level, *Bipolaris* sp. and *Neofusicoccum* sp., all are reported for the first time at the Colombian Pacific coast.

The fungi obtained in this study belong mostly to Ascomycota, with fourteen isolates within seven genera; meanwhile, three isolates were members of Basidiomycota. Interestingly, previous studies have confirmed that the aerial and submerge parts of mangrove trees, are largely dominated by ascomycetes, while basidiomycetes have a lower proportion (Alias *et al.*, 2010; Sun and Guo, 2012; Abdel *et al.*, 2014; Simões *et al.*, 2015), this is consistent with the saprophytic activity that present a large number of Basidiomycetes (Agrios, 2005; Mohapatra, 2008). While most Basidiomycetes are mostly found in terrestrial environments (Shearer *et al.*, 2007), the Ascomycetes are considered as an important ecological group, with a wide variety occurring in diverse environments, including marine environments (Jones and Tan, 1987; Hyde and Jones, 1988; Abdel-Wahab, 2005; Vittal and Sarma, 2006; Alias *et al.*, 2010; Suetrong *et al.*, 2017). Moreover, a wide range of variables including host age, architecture, brightness levels, genotype, height of crown, among others, have been considered to affect fungal community structure, as well as endophyte-plant interactions (Saikkonen, 2007).

Two genera in the Botryosphaeriaceae, including *Lasiodiplodia* and *Neofusicoccum* were obtained in this study, it is consistent with previous studies reporting their wide range of ecologically diverse fungi, found in all geographical and climatic areas of the world (except in polar regions) (Slippers and Wingfield, 2007; Phillips *et al.*, 2013). For instance, reports of *Botryosphaeria*, *Lasiodiplodia*, and

polares) (Slippers y Wingfield, 2007; Phillips *et al.*, 2013). Por ejemplo, registros de *Botryosphaeria*, *Lasiodiplodia* y *Neofusicoccum* en manglares brasileños (De Souza *et al.*, 2013), de *Neofusicoccum* en China (Xing *et al.*, 2011) y de 14 especies pertenecientes a cuatro géneros (*Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Lasiodiplodia* y *Neofusicoccum*) en manglares sudafricanos (Osorio *et al.*, 2017) confirman la ubicuidad de las especies de esta familia fúngica.

Neofusicoccum fue el género más comúnmente aislado, dada su habilidad de habitar una amplia variedad de especies de plantas y áreas geográficas alrededor del mundo (Slippers *et al.*, 2005; Sakalidis *et al.*, 2011). Esto es consistente con nuestros resultados, según los cuales *Neofusicoccum* fue el género más comúnmente aislado, lo que indica su amplio rango geográfico (Shetty *et al.*, 2011).

Lasiodiplodia theobromae es considerado un hongo altamente fitopatógeno (Slippers y Wingfield, 2007) que se encuentra comúnmente en regiones tropicales y subtropicales (Punithalingam, 1980; Burgess *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2013; Mehl *et al.*, 2017). Estudios anteriores indican que esta especie se asocia con diferentes plantas huésped, causando enfermedades y daños serios en cultivos económicamente importantes (Coutinho *et al.*, 2017). También ha sido mencionada como el agente causal de la podredumbre, el marchitamiento y la necrosis de semillas en plantas de manglar en India (Misral, 2002), además de ser un patógeno fúngico de las plantas de mangle en el delta del Níger en Nigeria (Ukoima y Amakiri 2000), posiblemente como respuesta al desbalance de los ecosistemas de manglar. Este es, por lo tanto, un tema de preocupación, teniendo en cuenta que los manglares de Buenaventura están bajo estrés constante debido a perturbaciones antropogénicas, que se observaron durante el trabajo de campo, si bien no se encontraron síntomas obvios de enfermedad. En este sentido, es muy recomendable realizar más estudios para determinar el grado de patogenicidad de esta especie en los manglares colombianos.

Los análisis filogenéticos apoyaron la idea de que MW029948 está estrechamente relacionado con *Lasiodiplodia venezuelensis*, el cual fue aislado de ramas de *Rhizophora racemosa*. A la fecha, esta especie no ha sido ampliamente reportada en otras partes del mundo; *L. venezuelensis* es considerada como una especie rara con una distribución geográficamente limitada (Mohali, *et al.*, 2017). Este es el primer registro de *L. venezuelensis* en asociación con árboles de mangle en Colombia.

Los aislados MW029951, MW029952 y MW029953 fueron agrupados dentro del género *Fusarium*, y los análisis

Neofusicoccum in mangroves of Brazil (De Souza *et al.*, 2013), *Neofusicoccum* in China (Xing *et al.*, 2011) and fourteen species belonging to four genera, *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Lasiodiplodia*, and *Neofusicoccum* in mangroves of South Africa (Osorio *et al.*, 2017), confirms the ubiquity of the species belonging to this fungal family.

Neofusicoccum was the most commonly isolated genus, given the ability of species of this genus to inhabit a wide variety of plant species and geographical areas worldwide (Slippers *et al.*, 2005; Sakalidis *et al.*, 2011). This is consistent with our results, since *Neofusicoccum* was the most isolated genus, indicating its wide geographical range (Shetty *et al.*, 2011).

Lasiodiplodia theobromae is considered a highly phytopathogenic fungus (Slippers and Wingfield, 2007), which is commonly found in tropical and subtropical regions (Punithalingam, 1980; Burgess *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2013; Mehl *et al.*, 2017). Previous reports indicate that this species is associated with different host plants, causing plant diseases and being responsible for serious damage to crops of economic importance (Coutinho *et al.*, 2017). It has also been reported as the causal agent of rot, withering and necrosis of seeds in mangrove plants in India (Misral, 2002), and also as a fungal pathogen of mangrove plants in the Niger Delta in Nigeria (Ukoima and Amakiri 2000), possibly in response to an imbalance in the mangrove ecosystems. It is then of concern, considering that mangroves in Buenaventura are under constant stress due to the anthropogenic disturbances observed during field work, although no obvious symptoms of disease were found. In this sense, further studies are highly recommended to determine the degree of pathogenicity of this species in Colombian mangroves.

In this study, phylogenetic analyses supported that the isolate MW029948 is closely related to *Lasiodiplodia venezuelensis*, isolated from branches of *R. racemosa*. To date, this species has not been widely reported in other parts of the world; *L. venezuelensis* is considered as a rare species having geographically limited distribution (Mohali, *et al.*, 2017). This is the first report of *L. venezuelensis* associated with mangrove trees in Colombia.

The isolates MW029951, MW029952 and MW029953 grouped within the genus *Fusarium*, and subsequent analyses revealed their proximity to *F. oxysporum*, which is a widely existing species (Munkvold, 2017). This isolate was obtained from three of the four

posteriores revelaron su proximidad a *F. oxysporum*, una especie ampliamente recurrente (Munkvold, 2017). Este aislado fue obtenido de tres de los cuatro manglares muestreados en San Pedro (*L. racemosa*, *M. oleifera* y *P. rhizophorae*) y correspondió a la única especie aislada de *M. oleifera*. El género incluye un gran número de especies ubicuas que pueden colonizar un amplio rango de hábitats (Munkvold, 2017). En ambientes de manglar, este género ha sido visto colonizando los mangles de Mangalvan (Pal y Purkayastha, 1992), las hojas y ramas de *Avicennia schaueriana*, *L. racemosa* y *R. mangle* en Brasil (De Souza *et al.*, 2013) y recientemente en el microbioma de la rizosfera de manglar de *Avicennia marina* en el Mar Rojo, Arabia Saudita (Simões *et al.*, 2015). Adicionalmente, se sabe que los miembros del complejo *F. oxysporum* causan enfermedades de marchitamiento vascular y son importantes como patógenos de podredumbre en las raíces (Munkvold, 2017). Aunque *F. oxysporum* incluye cepas patógenas y no patógenas, sería importante desarrollar estudios en el futuro para investigar su patogenicidad en manglares, para así estimar la posible amenaza a estos ecosistemas.

Los miembros de Didymellaceae son cosmopolitas (Aveskamp *et al.*, 2008, 2009; Chen *et al.*, 2015a, 2015b). El aislado MW029955 reside en esta familia y guarda una estrecha relación filogenética con *Epicoccum nigrum* (99 / 100 %). Se sabe que diferentes especies de *Epicoccum* producen metabolitos secundarios bioactivos con actividad antiviral (Guo *et al.*, 2009), antifúngica (Harwoko *et al.*, 2019), antiinflamatoria (Gonda *et al.*, 2016) y citotóxica (Wang *et al.*, 2010). Entre estas especies, el complejo *E. nigrum* (Favaro *et al.*, 2011) ha sido una parte importante de la investigación sobre compuestos bioactivos de hongos endófitos aislados del manglar *Acanthus ilicifolius* L. (Yan *et al.*, 2019). Dicha investigación se ha nutrido de la amplia distribución geográfica y la alta variabilidad de huéspedes (Perveen *et al.*, 2017; Ahumada *et al.*, 2018; Rhim *et al.*, 2019; El-Sayed *et al.*, 2020).

Nuestros análisis filogenéticos confirmaron que el aislado obtenido de *R. racemosa* (MW029960) corresponde a *Coprinellus radians*. *Coprinellus* es uno de los linajes de hongos coprinoides en Psathyrellaceae (Hussain *et al.*, 2018), con aproximadamente 80 especies descritas (Kirk *et al.*, 2008; Nagy *et al.*, 2012; Gomes y Wartchow, 2014). Estos hongos son saprotrofos comunes en virutas de madera, láminas de hojas y estiércol de animales herbívoros (Schafer, 2010). *Coprinellus radians* ha sido aislada principalmente de pacientes humanos (Lu *et al.*, 2020). Sin embargo, la información sobre su relación con árboles de manglar es aún escasa. *Neurospora crassa*, aislada de ramas de *L. racemosa* en San Pedro, también

mangroves sampled in San Pedro; *L. racemosa*, *M. oleifera* and *P. rhizophorae*, and was the only isolated species from *M. oleifera*. The genus includes numerous ubiquitous species that can colonize a wide range of habitats (Munkvold, 2017). In mangrove environments the genus has been found colonizing the mangroves of Mangalvan (Pal and Purkayastha, 1992), the leaves and branches of *Avicennia schaueriana*, *L. racemosa* and *R. mangle* in Brazil (De Souza *et al.*, 2013), and recently in microbiome of the mangroves rhizosphere of *Avicennia marina* in the Red Sea, Saudi Arabia (Simões *et al.*, 2015). Also, members of the *F. oxysporum* complex are known to cause vascular withering diseases, and are important as root rot pathogens (Munkvold, 2017). Although *F. oxysporum* includes both pathogenic and nonpathogenic strains, it will be then important to conduct future studies to investigate its pathogenicity in mangroves, and thus to estimate a possible threat to these ecosystems.

Members of the Didymellaceae are cosmopolitan (Aveskamp *et al.*, 2008, 2009; Chen *et al.*, 2015a, 2015b). The isolate MW029955 resides in this family, being phylogenetically closely related to *Epicoccum nigrum* (99 / 100 %). Different species of *Epicoccum* are known to produce bioactive secondary metabolites with antiviral (Guo *et al.*, 2009), antifungals (Harwoko *et al.*, 2019), anti-inflammatory (Gonda *et al.*, 2016), and cytotoxic activities (Wang *et al.*, 2010). Among these species, the *E. nigrum* species complex (Favaro *et al.*, 2011), has been an important part of research on bioactive compounds of endophytic fungi isolated from the mangrove *Acanthus ilicifolius* L. (Yan *et al.*, 2019). Such research is also facilitated due to the wide geographical distribution and high hosts' variability (Perveen *et al.*, 2017; Ahumada *et al.*, 2018; Rhim *et al.*, 2019; El-Sayed *et al.*, 2020).

The current phylogenetic analyses confirmed that the isolate obtained from *R. racemosa* (MW029960) corresponded to *Coprinellus radians*. *Coprinellus* is one of the most important lineages of Coprinoid fungi in the Psathyrellaceae (Hussain *et al.*, 2018), with approximately 80 described species (Kirk *et al.*, 2008; Nagy *et al.*, 2012; Gomes and Wartchow, 2014). These fungi are common saprotrophs in wood chips, leaf blades and herbivorous manure (Schafer, 2010). *Coprinellus radians* has been mainly isolated from human patients (Lu *et al.*, 2020), however, information on its relationship to mangrove trees still remains very limited. *Neurospora crassa* isolated from branches of *L. racemosa* in San Pedro, was also isolated from leaves of *Rhizophora mucronata* Lam (Joel and Bhimba,

fue aislada de hojas de *Rhizophora mucronata* Lam (Joel y Bhimba, 2013) para determinar su actividad antimicrobiana y citotóxica. *Neurospora* es común en regiones tropicales y subtropicales húmedas (Turner *et al.*, 2001), y también se encuentra en sedimentos de manglar en India (Thamizhmani y Senthilkumaran, 2012) y en el microbioma de la rizosfera de los manglares marinos *Avicennia* del Mar Rojo (Simões *et al.*, 2015). Tanto *C. radians* como *N. crassa* son especies que representan una fuente promisoría de moléculas bioactivas con uso potencial en la industria farmacéutica (Demers *et al.*, 2018).

De las cuatro especies de manglar muestreadas en San Pedro, *L. racemosa* y *R. racemosa* han sido previamente registradas como huéspedes de hongos endófitos (Vázquez *et al.*, 2000; De Souza *et al.*, 2013; Ukoima *et al.*, 2013), mientras que aún no hay datos disponibles para *M. oleifera* y *P. rhizophorae*. De igual manera, aún es escasa la información sobre *Bipolaris* sp., *Ciboria aestivalis* y *Cylindrobasidium torrendii*, las cuales se han asociado con árboles de mangle. Con respecto a *M. oleifera* y *P. rhizophorae*, la primera pertenece a un género nativo de las tierras bajas de los bosques lluviosos de Centro y Suramérica y las islas del Caribe (Bernal *et al.*, 2015). La segunda es la única especie del género, y es nativa desde Centroamérica hasta Ecuador (Ulloa *et al.*, 2017). Esta distribución limitada de huéspedes, en conjunto con los escasos estudios sobre hongos asociados con ecosistemas de manglar, ilustra la poca información sobre los microorganismos fúngicos asociados con estos árboles alrededor del mundo. *Bipolaris* (MW029956 y MW029957) incluye miembros considerados como patógenos importantes para más de 60 géneros de plantas (Sivanesan, 1984; Agrios, 2005; Manamgoda *et al.*, 2011; Hyde *et al.*, 2014).

Los análisis filogenéticos también confirmaron que el aislado MW029950 obtenido de *L. racemosa* guarda una estrecha relación con *C. aestivalis*. Esta especie ha sido encontrada en especímenes de herbario de *Cydonia oblonga* Miller (Rosaceae) (Galan y Palmer, 2001). Adicionalmente, nuestros análisis soportan la idea de que los aislados MW029958 y MW029959 están estrechamente relacionados con *C. torrendii*, un hongo que causa una descomposición débil y limitada en la madera (Floudas *et al.*, 2015). Estos grupos fúngicos se registraron por primera vez en ramas asintomáticas de manglares en Colombia.

A pesar de la gran riqueza florística de Colombia, los estudios sobre su microbiota asociada aún son muy escasos. En este sentido, este estudio contribuye al conocimiento de la diversidad fúngica asociada a los árboles de mangle en Colombia.

2013) to determine their antimicrobial and cytotoxic activity. *Neurospora* is common in humid tropical and subtropical regions (Turner *et al.*, 2001), also found in mangrove sediments in India (Thamizhmani and Senthilkumaran, 2012) and in the mycobiome of the rhizosphere of the red Sea marine *Avicennia* mangroves (Simões *et al.*, 2015). Both *C. radians* and *N. crassa* are species that represent a promising source of bioactive molecules with potential use in the pharmaceutical industry (Demers *et al.*, 2018).

Of the four mangrove species sampled in San Pedro, *L. racemosa* and *R. racemosa* have previously been reported as hosts of endophytic fungi (Vázquez *et al.*, 2000; De Souza *et al.*, 2013; Ukoima *et al.*, 2013), while for *M. oleifera* and *P. rhizophorae* there is still no data available. Likewise, information for *Bipolaris* sp., *Ciboria aestivalis* and *Cylindrobasidium torrendii* known to be associated with mangrove trees remain limited. Regarding *M. oleifera* and *P. rhizophorae*, the former belongs to a genus native to lowlands of the rainforests of South America, Central America and the Caribbean islands (Bernal *et al.*, 2015), and the latter is the only species of the genus, being native to Central America from Honduras to Ecuador (Ulloa *et al.*, 2017). This limited distribution of hosts, coupled with the limited fungal studies associated with mangrove ecosystems, and illustrates the lack of information on fungal microorganisms associated with these trees worldwide. *Bipolaris* (MW029956 and MW029957) includes members considered important pathogens of more than 60 plant genera (Sivanesan, 1984; Agrios, 2005; Manamgoda *et al.*, 2011; Hyde *et al.*, 2014).

Phylogenetic analyses also confirmed that the isolate MW029950 obtained from *L. racemosa* was closely related to *C. aestivalis*. This species has been found in herbarium specimens of *Cydonia oblonga* Miller (Rosaceae) (Galan and Palmer, 2001). In addition, current analyses supported that the isolates MW029958 and MW029959 were closely related to *C. torrendii*, a fungus that causes weak and limited decomposition of wood (Floudas *et al.*, 2015). These fungal groups are reported for the first time from asymptomatic branches of mangroves in Colombia.

Despite Colombia's great floristic richness, studies in terms of its associated mycobiota remain very limited. In this sense, this study contributes to the knowledge of fungal diversity associated with mangrove trees in Colombia.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA) por las licencias de muestreo (permiso 2019080900-1) bajo el marco nacional otorgado por la resolución No. 01789. También a los estudiantes del Programa de Biología de la Universidad del Quindío por su asistencia en campo. De igual manera, se agradece a los programas de Agroindustria y Biología de la Universidad del Quindío por suministrar los espacios físicos para desarrollar los procedimientos de laboratorio.

ACKNOWLEDGMENT

We acknowledge to the National Environmental Licensing Authority (ANLA) for sampling permits (Permission: 2019080900-1) under the National Framework granted by resolution No. 01789., as well as the students from the Biology Program, Universidad del Quindío for assistance in the field. Likewise, thanks to the Agro-Industry and Biology Departments of the Universidad del Quindío for providing the physical spaces to carry out the laboratory procedures.

BIBLIOGRAFÍA / LITERATURE CITED

- Abdel, M.A., M.S. Hodhod, A.H., Bahkali and E.B. Jones. 2014. Marine fungi of Saudi Arabia. *Bot. Mar.*, 57: 323–335. <https://doi.org/10.1515/bot-2014-0010>
- Abdel-Wahab, M.A. 2005. Diversity of marine fungi from Egyptian Red Sea mangroves. *Bot. Mar.*, 48: 348–355. <https://doi.org/10.1515/BOT.2005.047>
- Agrios, G.N. 2005. *Plant pathology*. 5th ed. Elsevier/Academic Press. London. 948 p.
- Ahumada, R., V. Novoa and J. Becerra. 2018. Morphological response to salinity, temperature, and pH changes by marine fungus *Epicoccum nigrum*. *Environ. Monit. Assess.*, 191. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-7166-5>
- Akaike, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Control*, 19: 716–723. <http://dx.doi.org/10.1109/TAC.1974.1100705>
- Alias, S.A., N. Zainuddin and E.B. Jones. 2010. Biodiversity of marine fungi in Malaysian mangroves. *Bot. Mar.*, 53: 545–554. <https://doi.org/10.1515/bot.2010.066>
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215: 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Álvarez L., R. 2003. Los manglares de Colombia y la recuperación de sus áreas degradadas: revisión bibliográfica y nuevas experiencias. *Mad. Bosq.*, 9: 3–25. <https://doi.org/10.21829/myb.2003.911286>
- Arnold, A.E. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biol. Rev.*, 21: 51–66. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.003>
- Aveskamp, M.M., J. De Gruyter and P.W. Crous. 2008. Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance. *Fungal Divers.*, 31: 1–18. <https://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/31-1.pdf>
- Aveskamp, M.M., G. Verkley, J. De Gruyter, M.A. Murace, A. Perelló, J.H.C. Woudenberg, J.Z. Groenewald and P.W. Crous. 2009. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. *Mycologia*, 101: 363–382. <https://doi.org/10.3852/08-199>
- Bernal, R., S.R. Gradstein y M. Celis. 2015. Catálogo de plantas y líquenes de Colombia, *Mora oleifera* (Hemsl.) Ducke. *Inst. Cienc. Nat., Univ. Nal. Col., Bogotá*. Available at: <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co>
- Bolívar-Anillo, H.J., A.Z. Visbal, M.C. Serrano, H.S. Moreno and D.A.V. Daza. 2020. A preliminary review on the Importance of Colombian mangroves as a source of endophytic microorganisms relevant in pharmaceutical industry. *J. Trad. Chin. Med.*, 3, 006
- Burgess, T.I., P.A. Barber, S. Mohali, G. Pegg, W. de Beer and M.J. Wingfield. 2006. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia*, 98: 423–435. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832677>
- Chen, Q., J.R. Jiang, G.Z. Zhang, L. Cai and P.W. Crous. 2015a. Resolving the *Phoma* enigma. *Stud. Mycol.*, 82: 137–217. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.10.003>
- Chen, Q., K. Zhang, G.Z. Zhang and L. Cai. 2015b. A polyphasic approach to characterise two novel species of *Phoma* (Didymellaceae) from China. *Phytotaxa*, 197: 267–281. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.197.4.4>
- Coutinho, I., F., Freire, C. Lima, J. Lima, F. Gonçalves, A. Machado, A. Silva and J. Cardoso. 2017. Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. *Plant. Pathol.*, 66: 90–104. <https://doi.org/10.1111/ppa.12565>
- Cornejo, X., E. Peña, J. Cantera, P. Silverstone, R. Linares, M. Monzón and C. Bonifaz. 2014. Mangrove forest of the Pacific coast of Colombia: 12-20. In: *Plants of South American pacific mangrove swamps (Colombia, Ecuador, Peru)*.



- Darriba, D., G. Taboada, R. Doallo and D. Posada. 2012. jModelTest2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Meth.*, 9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- De Souza, S.F.L., A.S.R. Dumaresq, P.T. Lacava, R. Harakava, J.L. Azevedo, I.S. de Melo and A. Pizzirani. 2013. Species diversity of culturable endophytic fungi from Brazilian mangrove forests. *Curr. Gen.*, 59: 153–166. <https://doi.org/10.1007/s00294-013-0396-8>
- Demers, D.H., M.A. Knestrick, R. Fleeman, R. Tawfik, A. Azhari, *et al.* (2018). Exploitation of mangrove endophytic fungi for infectious disease drug discovery. *Mar. Drugs*, 16. <https://doi.org/10.3390/md16100376>
- El-Sayed, ER., A.S. Ahmed and H.K. Abdel-hakim. 2020. A novel source of the cardiac glycoside digoxin from the endophytic fungus *Epicoccum nigrum*: Isolation, characterization, production enhancement by gamma irradiation mutagenesis and anticancer activity evaluation. *J. Appl. Microbiol.*, 128: 747–762. <https://doi.org/10.1111/jam.14510>
- Favaro, L.C., F.L. De Melo, C.I. Aguilar and W.L. Araújo. 2011. Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. *PLoS One*, 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014828>
- Floudas, D., B.W. Held, R. Riley, L.G. Nagy, G. Koehler, A.S. Ransdell, H. Younus, J. Chow, J. Chiniqy, A. Lipzen, A. Tritt, H. Sun, S. Haridas, K. LaButti, R.A. Ohm, U. Kues, R.A.
- Blanchette, I.V. Grigoriev, R.E. Minto and D.S. Hibbett. 2015. Evolution of novel wood decay mechanisms in Agaricales revealed by the genome sequences of *Fistulina hepatica* and *Cylindrobasidium torrendii*. *Fungal. Gen. Biol.*, 76: 78–92. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.02.002>
- Galan, R. and J.T. Palmer. 2001. The occurrence of the rare *Ciboria aestivalis* in Europe. *Czech Mycol.*, 52: 227–287. <https://doi.org/10.33585/cmy.52404>
- Gamboa-Gaitán, M.A. and J.T. Otero-Ospina. 2016. Colombian vanilla and its microbiota. III. Diversity and structure of the endophytic community. *Acta Bot. Hung.*, 58: 241–256. <https://doi.org/10.1556/abot.58.2016.3-4.2>
- García, C. 2010. Diagnóstico de las áreas marinas y costeras protegidas, y de las áreas de manejo en el Pacífico colombiano: 65. Fundación MarViva, Colombia. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/323656733>
- Gilbert, G.S., M. Mejia and E. Rojas. 2002. Fungal diversity and plant disease in mangrove forests: salt excretion as a possible defense mechanism. *Oecologia*, 132: 278–285. <https://doi.org/10.1007/s00442-002-0966-9>
- Giri, C., E. Ochieng, L.L. Tieszen, Z. Zhu, A. Singh, T. Loveland, J. Masek and N. Duke. 2011. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. *Global Ecol. Biogeogr.*, 20: 154–159. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2010.00584.x>
- Gomes, A.R.P. and F. Wartchow. 2014. *Coprinellus arenicola*, a new species from Paraíba, Brazil. *Sydowia*, 66: 249–256. <https://doi.org/10.12905/0380>
- Gonda, S., A. Kiss-Szikszai, Z. Szucs, B. Balla and G. Vasas. 2016. Efficient biotransformation of non-steroid anti-inflammatory drugs by endophytic and epiphytic fungi from dried leaves of a medicinal plant, *Plantago lanceolata* L. *Int. Biodeter. Biodegrad.*, 108: 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.12.018>
- Guindon, S. and O. Gascuel. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Syst. Biol.*, 52: 696–704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>
- Guo, H., B. Sun, H. Gao, X. Chen, S. Liu, X. Yao, X. Liu and Y. Che. 2009. Diketopiperazines from the *Cordyceps*-colonizing fungus *Epicoccum nigrum*. *J. Nat. Prod.*, 72: 2115–2119. <https://doi.org/10.1021/np900654a>
- Harwoko, H., G. Daletos, F. Stuhldreier, J. Lee, S. Wesselborg, M. Feldbrügge, W.E.G.
- Müller, R. Kalscheuer, E. Ancheeva and P. Proksch. 2019. Dithiodiketopiperazine derivatives from endophytic fungi *Trichoderma harzianum* and *Epicoccum nigrum*. *Nat. Prod. Res.*, 18: 1–9. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1627348>
- Hibbett, D.S., A. Ohman, D. Glotzer, M. Nuhn, P. Kirk and R.H. Nilsson. 2011. Progress in molecular and morphological taxon discovery in fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biol. Rev.*, 25: 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2011.01.001>
- Hussain, S., M. Usman, N-ul-S. Afshan, H. Ahmad, J. Khan and A.N. Khalid. 2018. The genus *Coprinellus* (Basidiomycota; Agaricales) in Pakistan with the description of four new species. *MycKeys*, 39: 41–61. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.39.26743>
- Hyde, K.D. and E.B.G. Jones. 1988. Marine mangrove fungi. *P.S.Z.N.I. Mar. Ecol.*, 9: 15–33. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.1988.tb00196.x>
- Hyde, K.D. and S.Y. Lee. 1995. Ecology of mangrove fungi and their role in nutrient cycling – what gaps occur in our knowledge. *Hydrobiologia*, 295: 107–118. <https://doi.org/10.1007/BF00029117>
- Hyde, K.D., R.H., Nilsson, S.A. Alias, H.A. Ariyawansa, J.E. Blair, L. Cai, A.W.A.M de Cock, A.J. Dissanayake, S.L. Glockling, I.D. Goonasekara, M. Gorczak, M. Hahn, R.S. Jayawardena, J.A.L. Kan. M.H. Laurence, C.A. Lévesque, X. Li, J.K. Liu, S.S.N. Maharachchikumbura, D.S. Manamgoda, F.N. Martin, E.H.C. McKenzie, A.R. McTaggart, P.E. Mortimer, P.V.R. Nair, J. Pawłowska, T.L. Rintoul, R.G. Shivas, C.F.J. Spies, B.A. Summerell, P.W.J. Taylo, R.B. Terhem, D. Udayanga, N. Vaghefi, G. Walther, M. Wilk, M. Wrzosek, J.C. Xu, J.Y. Yan and N. Zhou. 2014. One stop shop: backbone trees for important phytopathogenic 5 genera: I. *Fungal Divers.*, 67: 21–125. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0298-1>

- Joel, E.L. and B.V. Bhimba. 2013. Biological activity of secondary metabolites isolated from mangrove fungi *Neurospora crassa*. J. Environ. Biol., 34: 729–32
- Jones, E.B.G. and T.K. Tan. 1987. Observations on manglicolous fungi from Malaysia. Trans. Br. mycol., 89: 390–392. <https://doi.org/10.1007/BF00029116>
- Katoh, K., J., Rozewicki and K.D. Yamada. 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization., Brief. Bioinf., 20: 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Kirk P.M., P.F. Cannon, D.W. Minter and J.A. Stalpers. 2008. Dictionary of the Fungi, 10th edn. CABI, Wallingford.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Mol. Biol. Evol., 35: 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kuraku, S., C.M. Zmasek, O. Nishimura and K. Katoh. 2013. Leaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. Nucl. Acids, 41: W22–W28. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt389>
- López, A., C. Roberts, A. Tilley, J. Hawkins and R. Cooke. 2016. Mangroves and people: Lessons from a history of use and abuse in four Latin American countries. For. Ecol. Manag., 368: 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2016.03.020>
- Lu, X., X. Wang, L. Zhang, X. Li and X. Qi. 2020. Rare fungal keratitis caused by *Coprinellus radians*. Mycopathologia, 18: 389–394. <https://doi.org/10.1007/s11046-019-00414-y>
- Manamgoda, D.S., L. Cai, A.H. Bahkali, E. Chukeatirote and K.D. Hyde. 2011. *Cochliobolus*: an overview and current status of species. Fungal Divers., 51: 3–42. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0139-4>
- Mejía, Q., J. Molina, M. Sanjuan, B. Grijalba and M. Niño. 2014. Bosque de manglar, un ecosistema que debemos cuidar: 27. Univ. Jorge Tadeo Lozano, Inst. Col. Desarr. Rur., Cartagena DT.
- Mehl, J., M.J. Wingfield, J. Roux and B. Slippers. 2017. Invasive everywhere? Phylogeographic analysis of the globally distributed tree pathogen *Lasiodiplodia theobromae*. Forests, 8. <https://doi.org/10.3390/f8050145>
- Misral, D.S. 2002. Development of mixed formation of fungal (*Trichoderma*) and bacterial (*Pseudomonas*) biocontrol agents for management of plant disease. Ph.D. Thesis, Univ. Agriculture Technology Pantnager. 185 p.
- Mohali, S.R., F. Castro, J.R. Úrbez and W.D. Gubler. 2017. First report of *Lasiodiplodia theobromae* and *L. venezuelensis* associated with blue stain on *Ficus insipida* wood from the natural forest of Venezuela. For. Path., 47: 1–5. <https://doi.org/10.1111/efp.12355>
- Mohapatra. 2008. Textbook of environmental microbiology. I K International Publishing, New Delhi. 546 p.
- Munkvold, G.P. 2017. *Fusarium* species and their associated mycotoxins. Meth. Mol. Biol., 1542:51–106. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_4
- Nagy, L.G., S. Kocsubé, Z. Csanádi, G.M. Kovács, T. Petkovits, C. Vágvölgyi and T. Papp. 2012. Re-mind the gap! Insertion–deletion data reveal neglected phylogenetic potential of the nuclear ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) of Fungi. PLoS One, 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049794>
- Ordóñez, N.F., J.T. Otero y M.C. Díez. 2012. Hongos endófitos de orquídeas y su efecto sobre el crecimiento en *Vanilla planifolia* Andrews. Acta Agron., 61: 282–290.
- Osorio, J.A., C.J. Crous, Z.W. De Beer, M.J. Wingfield and J. Roux. 2017. Endophytic Botryosphaeriaceae, including five new species, associated with mangrove trees in South Africa. Fungal. Boil., 121: 361–393. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2016.09.004>
- Pal, A.K. and R.P. Purkayastha. 1992. New parasitic fungi from Indian mangrove. J. Mycopathol. Res., 30: 173–176.
- Palacios, M.L. and J.R. Cantera. 2017. Mangrove timber use as an ecosystem service in the Colombian Pacific. Hydrobiologia, 803: 345–358. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3309-x>
- Perveen, I., M.A. Raza, T. Iqbal, I. Naz, S. Sehar and S. Ahmed. 2017. Isolation of anticancer and antimicrobial metabolites from *Epicoccum nigrum*; endophyte of *Ferula sumbul*. Microb. Pathog., 110: 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.06.033>
- Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews, J.H. and S.S. Hirano (Eds). Microbial ecology of leaves. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3168-4_9
- Phillips, A.J.L., A. Alves, J. Abdollahzadeh, B. Slippers, M.J. Wingfield, J.Z. Groenewald and P.W. Crous. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture, Stud. Mycol., 76: 51–167. <https://doi.org/10.3114/sim0021>
- Prahl, H.v. 1989. Manglares de Colombia. Villegas (Ed.), Banco Occidente. 205 p. Punithalingam, E. 1980. Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae* Pat. Vadus, Germany. 121 p.
- Punithalingam, E. 1980. Plant Diseases Attributed to *Botryodiplodia theobromae* Pat. Vadus, Germany. 121 p.
- Raeder, U. and P. Broda. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Lett. Appl. Microbiol., 1: 17–20. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479.x>



- Rambaut A, A.J. Drummond, D. Xie, G. Baele and M.A. Suchard. 2018. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst. Biol.*, 67: 901–904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
- Rhim, H., J.Y. Park, D.J. Lee and J.I. Han. 2019. *Epicoccum nigrum*-induced respiratory infection in a wild Eurasian scops owl (*Otus scops*). *J. Vet. Med.*, 81: 1348–1350. <https://dx.doi.org/10.1292/jvms.19-0172>
- Rineau, F., F. Shah, M.M. Smits, P. Persson, T. Johansson, R. Carleer, C. Troein and A. Tunlid. 2013. Carbon availability triggers the decomposition of plant litter and assimilation of nitrogen by an ectomycorrhizal fungus. *ISME J.*, 7. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.91>
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D.L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M.A. Suchard and J.P. Huelsenbeck. 2012. MRBAYES 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model selection across a large model space. *Syst. Biol.*, 61: 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Sakalidis, M.L., G.E.S.J. Hardy and T.I. Burgess. 2011. Class III endophytes, clandestine movement amongst hosts and habitats and their potential for disease; a focus on *Neofusicoccum australe* Australas. *Plant. Pathol.*, 40: 510–521. <https://doi.org/10.1007/s13313-011-0077-3>
- Saikkonen, K. 2007. Forest structure and fungal endophytes. *Fungal Biol. Rev.* 21: 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.001>
- Salazar, C.S. y M.C.C. De García. 2005. Aislamiento de hongos endófitos en rosa (*Rosa hybrida*) en Bogotá, Colombia, *Rev. Iberoam. Micol.*, 22: 99–101. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(05\)70016-4](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(05)70016-4)
- Schafer, D.J. 2010. Keys to sections of *Parasola*, *Coprinellus*, *Coprinopsis* and *Coprinus* in Britain. *Field. Mycol.*, 11: 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.fldmyc.2010.04.006>
- Shearer, C.A., E. Descals, B. Kohlmeyer, J. Kohlmeyer, L. Marvanová, D. Padgett, D. Porter, H.A. Raja, J.P. Schmit, H.A. Thorton and H. Voglymayr. 2007. Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodivers. Cons.*, 16: 49–67. <https://doi.org/10.1007/s10531-006-9120-z>
- Shetty, K.G., A.M. Minnis, A.Y. Rossman and K. Jayachandran. 2011. The Brazilian peppertree seed-borne pathogen, *Neofusicoccum batangarum*, a potential biocontrol agent. *Biol. Control.*, 56, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.09.016>
- Simões, M.F., A. Antunes, C.A. Ottoni, M.S. Amini, I. Alam, H. Alzubaidy, N.A. Mokhtar, J.A.C. Archer and V.B. Bajic. 2015. Soil and rhizosphere associated fungi in gray mangroves (*Avicennia marina*) from the Red Seada metagenomic approach. *Genom. Proteom. Bioinform.*, 13: 310–320. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.07.002>
- Sivanesan, A. 1984. The bitunicate ascomycetes and their anamorphs. J. Cramer, Vaduz, Liechtenstein. 701 p.
- Slippers, B. and M.J. Wingfield. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal. Biol. Rev.*, 21: 90–106. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>
- Slippers, B., B.A. Summerell, P.W. Crous, T.A. Coutinho, B.D. Wingfield and M.J. Wingfield. 2005. Preliminary studies on Botryosphaeria species from Southern Hemisphere conifers in Australasia and South Africa. *Australas. Plant. Pathol.*, 34: 213–220. <https://doi.org/10.1071/AP05020>
- Spalding, M., M. Kainuma and L. Collins. 2010. World atlas of mangroves. Earthscan, London. 336 p.
- Suetrong, S., S. Preedanon, A. Klayuban, W. Gundool, P. Unagul, J. Sakayaroj, W. Promchu and T. Sangtiew. 2017. Distribution and occurrence of manglicolous marine fungi from eastern and southern Thailand. *Bot. Mar.*, 60: 503–514. <https://doi.org/10.1515/bot-2016-0107>
- Sun, X. and L.D. Guo. 2012. Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. *Mycology*, 3: 65–76.
- Swofford, D.L. 2003. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thamizhmani, R. and R. Senthilkumar. 2012. Diversity of fungi in selected mangroves along the east coast of India. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl.*, 1: 29–33.
- Thatoi, H., B.C. Behera, R.R. Mishra and S.K. Dutta. 2013. Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. *Ann. Microbiol.*, 63: 1–19. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0442-7>
- Tomlinson, P. 2016. The botany of mangroves. 2nd ed. Cambridge Univ., Cambridge. 432 p.
- Turner, B.C., D.D. Perkins and A. Fairfield. 2001. *Neurospora* from natural populations: a global study. *Fungal. Genet. Biol.* 32: 67–92. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2001.1247>
- Ukoima, H.N. and M.A. Amakiri. 2000. Fungi associated with the roots of *Rhizophora mangle*, *Rhizophora harrisonii*, and *Avicennia Africana* in Port Harcourt Mangrove swamp, Rivers State. *Ecol. Environ. Cons.*, 13: 32–42.
- Ukoima, H.N., M. Ikata and G.A. Pepple. 2013. Control of *Lasiodiplodia theobromae* (PAT) on *Rhizophora racemosa* using plants extracts. *Am. J. Biotechnol. Mol. Sci.*, i 3: 1–7. <https://doi.org/10.5251/ajbms.2013.3.1.1.7>
- Ulloa, C., P. Acevedo, S. Beck, M.J. Belgrano, R. Bernal, P.E. Berry, L. Brako, M. Celis, G. Davidse, R.C. Forzza, S.R. Gradstein, O. Hokche, B. León, S. León, R.E. Magill, D.A. Neill, M.H. Nee, P.H. Raven, H. Stimmel, M.T. Strong, J.L. Villaseñor, J.L. Zarucchi, F.O. Zuloaga and M.P. Jørgensen.

2017. An integrated assessment of vascular plants species of the Americas. *Science*, 358: 1614–1617. <https://doi.org/10.1126/science.aao0398>
- Vázquez, P., G. Holguin, M.E. Puerte, A. López-Cortés and Y. Bashan. 2000. Phosphate-solubilising microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid Coastal lagoon. *Biol. Fertil. Soils*, 30: 460–46. <https://doi.org/10.1007/s003740050024>
- Vittal, B.P.R. and V.V. Sarma. 2006. Diversity and ecology of fungi on mangroves of bay of Bengal region – an overview. *Indian. J. Mar.*, 35: 308–317.
- Wang, J.M., G.Z. Ding, L. Fang, J.G. Dai, S.S. Yu, Y.H. Wang, X.G. Chen, S.G. Ma, J. Qu, S. Xu and D. Du. 2010. Thiodiketopiperazines produced by the endophytic fungus *Epicoccum nigrum*. *J. Nat. Prod.*, 73: 1240–1249. <https://doi.org/10.1021/np1000895>
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics: 315-322. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (Eds). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic, San Diego.
- Wilson D. 1995. Endophyte: The evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 73: 272–276. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Xing, X.K., J. Chen, M.J. Xu, W.H. Lin and S.X. Guo. 2011. Fungal endophytes associated with *Sonneratia* (Sonneratiaceae) mangrove plants on the south coast of China. *For. Pathol.*, 41: 334–340. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2010.00683.x>
- Yan, Z., S. Wen, M. Ding, H. Guo, C. Huang, X. Zhu, J. Huang, Z. She and Y. Long. 2019. The purification, characterization, and biological activity of new polyketides from mangrove-derived endophytic fungus *Epicoccum nigrum* SCNU-F0002. *Mar. Drugs*, 17. <https://doi.org/10.3390/md17070414>

RECIBIDO / RECEIVED: 09/07/2022

ACEPTADO / ACCEPTED: 30/01/2023