

# Biofilm of epiphytic algae and fungi in forest plantations of pinabete (*Abies guatemalensis*) in Guatemala

## Biopelícula de algas epífitas y hongos en plantaciones forestales de pinabete (*Abies guatemalensis*) en Guatemala

**Andrés Villalobos\***, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Humanidades, Universidad del Valle de Guatemala, 18 Avenida 11-95 Zona 15, Guatemala, C.P. 01015, Guatemala; **Ana Lucía Dubón**, <sup>1</sup>Laboratorio de Protección Vegetal, <sup>2</sup>Herbario UVAL. Centro de Estudios Agrícolas y Alimentarios, Universidad 3 del Valle de Guatemala, 18 Avenida 11-95 Zona 15, Guatemala, C.P. 01015, Guatemala; <sup>2</sup>**María Renée Álvarez**; **Sergio Osorio**, Coordinación de Pinabete, Instituto Nacional de Bosques (INAB), 7 Avenida 12-90 Zona 13, Guatemala, C.P. 01013, Guatemala; <sup>1</sup>**Margarita Palmieri**.

\*Corresponding author: andres.villalobos2012@gmail.com

Received: January 31, 2022.

Accepted: July 11, 2023.

Villalobos A, Dubón AL, Álvarez MR, Osorio S and Palmieri M. 2023. Biofilm of epiphytic algae and fungi in forest plantations of pinabete (*Abies guatemalensis*) in Guatemala. Mexican Journal of Phytopathology 41(3): 391-411.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2301-2>

First DOI publication: August 03, 2023.

Primera publicación DOI: 03 de Agosto, 2023.

**Abstract.** In recent years, a new pest has been reported in Guatemalan fir (*Abies guatemalensis*) plantations, a biofilm of microorganisms known as “green algae”. The objective of this research was to identify the algae and fungi that make up the biofilm growing on Guatemalan fir leaves. Leaf samples were collected from three locations where the biofilm has been reported, and the algae and fungi present on the leaves were isolated. Microorganisms

**Resumen.** En los últimos años se ha reportado la incidencia de una nueva plaga en las plantaciones de pinabete (*Abies guatemalensis*), una biopelícula de microorganismos conocida como el “alga verde”. El objetivo de esta investigación fue identificar las algas y hongos que conforman la biopelícula que crece sobre las hojas del pinabete. Se recolectaron muestras de hojas en tres localidades con presencia de la biopelícula, y se aislaron las algas y hongos presentes en estas. Se realizó el cultivo *in vitro* de los microorganismos y se identificaron por medio de microscopía de luz, en el caso de los hongos, también se realizó una extracción de ADN y una amplificación de la región ITS. A partir de 120 hojas colectadas de 15 árboles se identificaron cuatro algas de los géneros *Desmococcus*, *Klebsormidium* y la clase Trebouxiophyceae, así como 11 hongos de los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Trichoderma* y *Ulocladium*. La biopelícula que afecta a las plantaciones del

were cultured *in vitro* and identified by light microscopy; in the case of fungi, DNA extraction and amplification of the ITS region were also performed. Four algae of the genera *Desmococcus*, *Klebsormidium* and the class Trebouxiophyceae, and 11 fungi of the genera *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Trichoderma* and *Ulocladium* were identified from 120 leaves of 15 trees. It was concluded that the biofilm affecting Guatemalan fir plantations in Guatemala is composed of several species of epiphytic algae and fungi, which may vary according to the locality. The factors affecting the richness of microorganisms in the biofilm and their symbiotic relationship still need to be addressed.

**Keywords:** *Desmococcus*, *Klebsormidium*, *in vitro* culture, *Fusarium*, *Trichoderma*, ITS

The Guatemalan fir (*Abies guatemalensis*) is an endangered species in Mesoamerica and is commonly utilized as a Christmas tree in Guatemala. Over a span of 45 years, the extraction of trees and branches from natural forests has resulted in a staggering 95% reduction in populations (CONAP, 2010). This species is listed in the IUCN Red List of Threatened Species and is categorized under Appendix I of CITES, thereby prohibiting international trade. To address the national demand for Christmas trees, Guatemalan fir plantations were established in the 1990s, which not only mitigated the impact on natural forests but also contributed to species conservation. The cultivation of Guatemalan fir has emerged as an effective conservation strategy rooted in sustainable utilization (Strandby *et al.*, 2006; Strandby *et al.*, 2008).

One of the primary challenges encountered in Guatemalan fir plantations revolves around pest

pinabete en Guatemala está compuesta por varias especies de algas epifitas, hongos, las cuales pueden variar de acuerdo con la localidad. Aún es necesario abordar los factores que afectan la riqueza de microorganismos de la biopelícula y su relación simbiótica.

**Palabras clave:** *Desmococcus*, *Klebsormidium*, cultivo *in vitro*, *Fusarium*, *Trichoderma*, ITS

El pinabete (*Abies guatemalensis*) es una especie amenazada de Mesoamérica, usada comúnmente en Guatemala como árbol de navidad. La extracción de árboles y ramillas de bosques naturales llevó a una reducción del 95% de las poblaciones en 45 años (CONAP, 2010). El pinabete se encuentra en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN y en el apéndice 1 de CITES, por lo que se prohíbe el comercio internacional. En los años 90 se establecieron plantaciones de pinabete para satisfacer la demanda de árboles navideños a nivel nacional, lo que redujo el impacto sobre los bosques naturales y contribuyó a la conservación de la especie. El cultivo de pinabete ha demostrado ser una estrategia de conservación efectiva basada en el aprovechamiento sostenible (Strandby *et al.*, 2006; Strandby *et al.*, 2008).

Uno de los principales retos de las plantaciones de pinabete es el control de plagas forestales como áfidos (*Mindarus* sp.), la fumagina (*Capnodium* sp.) causada por excreciones de áfidos y la pudrición de raíz por *Phytophthora*. En los últimos años, se ha reportado una nueva plaga que está afectando significativamente las plantaciones: el “alga verde” del pinabete (Strandby *et al.*, 2008; INAB, 2018). Esta se reconoce por una cobertura polvosa de color verde que se forma sobre el tronco, las hojas y puede llegar a cubrir ramas completas. La biopelícula reduce la incidencia de luz y aumenta la

management, including aphids (*Mindarus* sp.), sooty mold (*Capnodium* sp.) resulting from aphid excretions, and root rot caused by *Phytophthora*. Recently, a noteworthy pest has been observed, significantly impacting the plantations: the “green algae” of the Guatemalan fir (Strandby *et al.*, 2008; INAB, 2018). This phenomenon is characterized by a powdery green coverage that manifests on trunks, leaves, and can even envelop entire branches. The biofilm formed by the algae diminishes light penetration and facilitates organic matter accumulation, thereby posing a risk of branch mortality. Furthermore, it compromises the aesthetic quality of the trees and diminishes their market value, consequently jeopardizing the profitability of Guatemalan fir cultivation. While the name implies an association with green algae, limited research exists regarding the identification of the algae and its potential correlation with other microorganisms, such as fungi (INAB, 2018; INAB, 2019).

Terrestrial algae have the ability to thrive on inert surfaces such as rocks and buildings, as well as on the surfaces of living organisms, including plants and animals (Novakova and Neustupa, 2015). This ecological phenomenon is referred to as epibiosis, where one organism, known as the epibiont, resides on the surface of another organism, the basibiont, potentially impacting it in various ways (Wahl, 2009). Algae frequently form symbiotic associations with other microorganisms, such as bacteria and fungi, resulting in the formation of biofilms (Freystein and Reisser, 2010).

Previous studies by multiple authors have documented instances of algae and fungi biofilms colonizing the leaves of *Abies* and other conifers in Europe and North America (Sochting, 1997; Poggio, 2002; Novakova and Neustupa, 2015). Nevertheless, this particular phenomenon has not been previously documented in *A. guatemalensis*.

acumulación de materia orgánica, lo cual puede ocasionar la muerte de las ramas. También afecta la calidad estética de los árboles y reduce su valor en el mercado, poniendo en riesgo la rentabilidad del cultivo de pinabete. Como su nombre lo sugiere, este fenómeno es causado por un alga verde, sin embargo, no hay estudios que aborden la identificación del alga, así como su posible asociación con otros microorganismos como hongos (INAB, 2018; INAB, 2019).

Las algas terrestres pueden crecer sobre superficies inertes como rocas y edificaciones, así como en la superficie de organismos vivos como plantas o animales (Novakova y Neustupa, 2015). Este último fenómeno se conoce como epibiosis, en el cual un organismo (epibionte) habita sobre la superficie de otro (basibionte), el cual puede o no verse afectado (Wahl, 2009). Las algas comúnmente se asocian con otros microorganismos para formar biopelículas, tales como bacterias y hongos (Freystein y Reisser, 2010).

Varios autores han reportado casos de biopelículas de algas y hongos creciendo sobre hojas de *Abies* y otras coníferas en Europa y Norteamérica (Sochting, 1997; Poggio, 2002; Novakova y Neustupa, 2015). Sin embargo, este fenómeno no ha sido descrito previamente en *A. guatemalensis*, por lo que el objetivo de esta investigación fue la identificación de las algas y hongos que conforman la biopelícula que crece sobre las hojas del pinabete (*Abies guatemalensis*).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Recolección de muestras.** Se visitaron tres plantaciones de pinabete en los departamentos de Chimaltenango (Finca Valle Alto), Guatemala (Finca Billebén) y San Marcos (Finca Buena Vista) durante un año, de marzo de 2019 a marzo de 2020. Estas

Consequently, the primary objective of this research endeavor was to identify the specific algae and fungi species that comprise the biofilm found on the leaves of the Guatemalan fir (*Abies guatemalensis*).

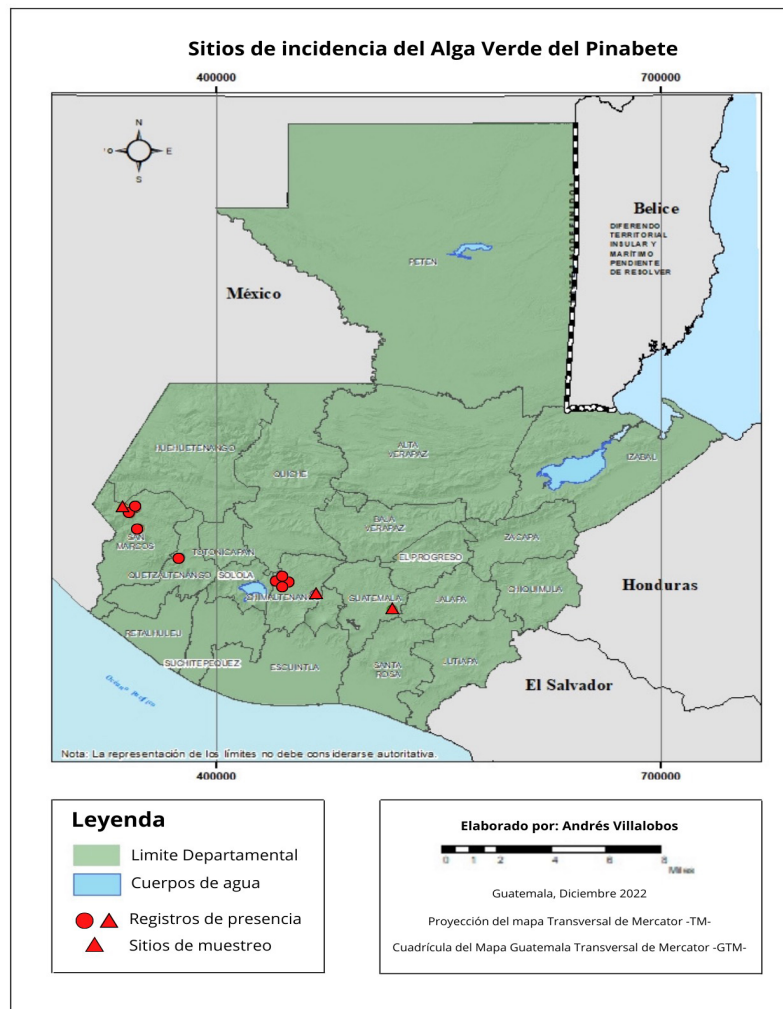
## MATERIALS AND METHODS

**Sample collection.** During a one-year period from March 2019 to March 2020, three Guatemalan fir plantations situated in the departments of Chimaltenango (Valle Alto Estate), Guatemala (Billebén Estate), and San Marcos (Buena Vista Estate) were visited. The selection of these plantations was based on records provided by the National Institute of Forests, which documented the presence of the biofilm in 10 plantations and one natural forest (Figure 1). In each plantation, a targeted sampling strategy was implemented, whereby five Guatemalan fir trees displaying signs of “green algae” infestation, with a height exceeding two meters and a diameter greater than 10 cm at a height of 1.5 m, were carefully chosen. The georeferencing of the selected trees was conducted, followed by the selection of four infested branches from each tree, with one branch being sampled at each cardinal point. Detailed photographic documentation of the branches was obtained, after which the branches were excised, placed in plastic bags, and stored in a cooler for transportation to the Plant Protection Laboratory at the Universidad del Valle de Guatemala. Subsequently, the branches were examined under a stereomicroscope, and the leaf coverings were gently scraped to facilitate microscopic analysis for the identification of algae and fungi.

**Algae identification.** Two leaves per branch were selected for analysis, resulting in a total of

plantaciones fueron seleccionadas con base a registros del Instituto Nacional de Bosques que indican la presencia de la biopelícula, la cual se ha reportado en 10 plantaciones y un bosque natural (Figura 1). En cada plantación se realizó un muestreo dirigido y se seleccionaron cinco árboles de pinabete que mostraran signos de infestación del “alga verde”, y que tuvieran una altura mayor a dos metros y un diámetro mayor a 10 cm a una altura de 1.5 m. Los árboles se georreferenciaron y en cada uno se seleccionaron cuatro ramas infestadas que estuvieran localizadas a la altura del previamente mencionada en los cuatro puntos cardinales. Se realizó un registro fotográfico de las ramas, se cortaron, se guardaron en bolsas plásticas y se almacenaron en una hielera para transportarlas al Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala. Estas se observaron bajo microscopio estereoscópico y se realizó un raspado de la cobertura de las hojas para su observación bajo microscopio de luz para la identificación de algas y hongos.

**Identificación de algas.** Se seleccionaron dos hojas de cada rama para el análisis, con un total de 8 hojas por árbol y 40 hojas por sitio de muestreo. Se realizó un raspado de la cobertura de cada hoja y se desinfectó durante 5 min con una solución de antibióticos (Gentamicina 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , Estreptomycin 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y Carbendazim 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Los raspados se filtraron al vacío y se sembraron en medio de cultivo sólido y líquido, tomando como referencia los métodos de Stanier *et al.* (1971), Andersen (2005) y Videv *et al.* (2017). Se utilizó el medio de cultivo de Kuhl y Lorenzen (1964) que está compuesto por 10mM  $\text{KNO}_3$ , 4.5mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1 \text{ H}_2\text{O}$ , 0.5mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ , 1mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ , 0.1mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ , 0.025mM  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ , 1 $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ , 1 $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4 \cdot 1 \text{ H}_2\text{O}$ , 1 $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.01 $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ , 0.01 $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ .



**Figure 1. Records of pinabete (*Abies guatemalensis*) plantations where the biofilm formed by algae and fungi was present.**  
**Figura 1. Registros de plantaciones de pinabete (*Abies guatemalensis*) con presencia de algas y hongos que conforman la biopelícula y sitios muestreados.**

eight leaves per tree and 40 leaves per sampling site. The leaf coverings were gently scraped, and each leaf was disinfested for 5 minutes using an antibiotic solution (Gentamicin 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , Streptomycin 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , and Carbendazim 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). The scrapings were then vacuum-filtered and inoculated onto solid and liquid culture media following the methods outlined by Stanier *et al.* (1971), Andersen (2005), and Videv *et al.* (2017). Kuhl and Lorenzen's (1964) culture medium was

Los cultivos en medio líquido se mantuvieron con aireación constante y bombeo de  $\text{CO}_2$  a razón de 60 burbujas por min, con una temperatura de 28 °C y un fotoperiodo de 12 h con lámparas fluorescentes. Los cultivos se supervisaron diariamente para separar los que mostraran crecimiento de bacterias y hongos, los cuales se filtraron y se sembraron en medio papa-dextrosa-agar (PDA) para la identificación de los microorganismos contaminantes. Después de una semana de crecimiento,

utilized, which consists of 10 mM KNO<sub>3</sub>, 4.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> \* 1 H<sub>2</sub>O, 0.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O, 1 mM MgSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O, 0.025 mM FeSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O, 1 μM ZnSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O, 1 μM MnSO<sub>4</sub> \* 1 H<sub>2</sub>O, 1 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.01 μM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> \* 4 H<sub>2</sub>O, and 0.01 μM CuSO<sub>4</sub> \* 5 H<sub>2</sub>O.

The liquid cultures were maintained with constant aeration and CO<sub>2</sub> pumping at a rate of 60 bubbles per minute, at a temperature of 28 °C, and under a 12-hour photoperiod using fluorescent lamps. Daily monitoring of the cultures was conducted to identify instances of bacterial and fungal growth. Subsequently, the cultures were filtered and inoculated onto potato dextrose agar (PDA) medium to facilitate the identification of contaminating microorganisms. Following one week of growth, the algae were examined under a light microscope for genus-level identification. Taxonomic keys for terrestrial algae (Graham and Wilcox, 2009; Freystein and Reisser, 2010; John and Rindi, 2015; Archibald *et al.*, 2017), as well as the current classification based on the AlgaeBase and Index Nominum Algarum databases (AlgaeBase, 2023), were consulted as references.

**Identification of fungi.** The fungi were isolated from the collected leaves using an equivalent number of samples as in the algae identification process. Segments measuring 2 cm in length were carefully excised and subjected to disinfection with a 2% sodium hypochlorite solution and distilled water. Subsequently, the plant material was inoculated onto potato dextrose agar (PDA) culture medium. Four leaves from each branch were placed in individual Petri dishes and incubated at a temperature of 28 °C for a period of 5 days. Fungal growth that appeared on the leaves was cultivated, and the resulting cultures were purified using the hyphal tipping technique (Soto *et al.*, 2017).

se realizaron observaciones bajo microscopio de luz para identificar las algas a nivel de género. Se tomaron como referencia claves taxonómicas de algas terrestres (Graham y Wilcox, 2009; Freystein y Reisser, 2010; John y Rindi, 2015; Archibald *et al.*, 2017) y la clasificación actual de acuerdo con las bases de datos AlgaeBase e Index Nominum Algarum (AlgaeBase, 2023).

**Identificación de hongos.** Los hongos se aislaron a partir de las hojas recolectadas, se utilizó el mismo número de muestras que en la identificación de algas. Se cortaron segmentos de 2 cm de largo y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% y agua destilada. El material vegetal se sembró en medio de cultivo PDA, se colocaron cuatro hojas de cada rama en una caja Petri y se incubaron a 28 °C durante 5 días. Los hongos que crecieron sobre las hojas se cultivaron y se realizó la purificación de los cultivos por medio de la técnica de punta de hifa (Soto *et al.*, 2017). Después se hicieron montajes de las estructuras reproductivas y esporas en portaobjetos y se observaron bajo microscopio de luz para identificarlos a nivel de género. Se tomaron como referencia las claves taxonómicas de Farr *et al.* (1989) y Phillips y Burdekin (1992).

**Extracción de ADN y análisis molecular de hongos.** Cinco de los hongos aislados se identificaron a nivel de especie por medio de análisis genético. Se realizó la extracción de ADN con el protocolo de CTAB de Murray y Thompson (1980). Se añadió 300 mg de micelio a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, al cual se le agregó 600 μL de buffer de extracción CTAB (2% CTAB, 1% polyvinylpyrrolidone [PVP], 100mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4M NaCl, 20mM EDTA y 0.2% 2-mercaptoetanol) precalentado a 65 °C. Se maceró el micelio con un macerador automático, se agregó 500 μL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó a 13,000

In order to achieve genus-level identification, reproductive structures and spores were mounted on microscope slides and examined under a light microscope. Taxonomic keys by Farr *et al.* (1989) and Phillips and Burdekin (1992) were utilized as references during the identification process.

**DNA extraction and molecular analysis of fungi.** Five fungi were identified at the species level through genetic analysis. DNA extraction followed the CTAB protocol by Murray and Thompson (1980). A 1.5 mL Eppendorf tube was loaded with 300 mg of mycelium, and 600  $\mu\text{L}$  of preheated CTAB extraction buffer (2% CTAB, 1% polyvinylpyrrolidone [PVP], 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, and 0.2% 2-mercaptoethanol) was added at 65 °C. The mycelium was homogenized using an automated homogenizer, followed by the addition of 500  $\mu\text{L}$  of chloroform:isoamyl alcohol (24:1). After centrifugation at 13,000 rpm for 10 minutes, the supernatant was transferred to a new tube. Subsequently, 500  $\mu\text{L}$  of cold isopropanol and 50  $\mu\text{L}$  of 7.5 M ammonium acetate were added, and the sample was incubated at -20 °C for one hour. Further centrifugation at 13,000 rpm for 10 minutes resulted in the decantation of the supernatant, which was followed by the addition of 150  $\mu\text{L}$  of cold 70% ethanol. After centrifugation at 13,000 rpm for five minutes, the supernatant was decanted, and the precipitate was air-dried at 30 °C for 20 minutes. Finally, the precipitate was resuspended in 50  $\mu\text{L}$  of preheated TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) at 65 °C and stored at 4 °C.

DNA was quantified, and the ITS region was analyzed using Polymerase Chain Reaction (PCR) with specific primers: ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTG-CGG3') and ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (White *et al.*, 1990). The target PCR product size was

rpm por 10 min y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Después se agregó 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío y 50  $\mu\text{L}$  de acetato de amonio 7.5M y se incubó a -20 °C por una hora. Se centrifugó la muestra a 13,000 rpm por 10 min y se decantó el sobrenadante, se añadió 150  $\mu\text{L}$  de etanol 70% frío y se centrifugó a 13,000 rpm durante cinco min. Se decantó el sobrenadante y se secó el precipitado a 30 °C durante 20 min, finalmente se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de amortiguador TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) precalentado a 65 °C, y se almacenó en refrigeración a 4 °C.

Se cuantificó el ADN y se analizó la región ITS por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los siguientes cebadores: ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTG-CGG3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (White *et al.*, 1990). El producto de PCR esperado fue de 650 pb. El volumen de la reacción fue de 25  $\mu\text{L}$ , el cual contenía 17.7  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril, 2.5  $\mu\text{L}$  de buffer 10X con  $\text{MgCl}_2$  a 25mM, 1  $\mu\text{L}$  de la mezcla de dNTPs (10 mM), 1.3  $\mu\text{L}$  de cada cebador (10 pmol  $\mu\text{L}^{-1}$ ) y 0.2  $\mu\text{L}$  de Taq-DNA polymerase 5U  $\mu\text{L}^{-1}$  (Invitrogen®). La reacción se realizó en un termociclador utilizando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C por 15 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 52 °C por 90 s y extensión a 72 °C por 1 min; una extensión final de 60 °C por 30 min.

Los fragmentos amplificados se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se enviaron a la empresa Macrogen, Corea para su secuenciación. Las secuencias obtenidas se analizaron y compararon con las depositadas en la base de datos GenBank de NCBI (National Center for Biotechnology Information) por medio del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), posteriormente se depositaron para obtener su número de acceso (Zhang *et al.*, 2000). Las secuencias se depositaron en el SRA (Sequence Read

expected to be 650 bp. The reaction mixture had a volume of 25  $\mu\text{L}$ , comprising 17.7  $\mu\text{L}$  of sterile distilled water, 2.5  $\mu\text{L}$  of 10X buffer containing 25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{L}$  of the dNTP mixture (10 mM), 1.3  $\mu\text{L}$  of each primer (10 pmol  $\mu\text{L}^{-1}$ ), and 0.2  $\mu\text{L}$  of Taq DNA polymerase (5U  $\mu\text{L}^{-1}$ ) (Invitrogen®). The amplification was performed in a thermocycler following this protocol: initial denaturation at 95 °C for 15 min, 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 52 °C for 90 s, extension at 72 °C for 1 min, and a final extension step at 60 °C for 30 min.

The amplified fragments were visualized using 1% agarose gel electrophoresis and sent to Macrogen, Korea for sequencing. The obtained sequences were analyzed and compared with those stored in the GenBank database of NCBI (National Center for Biotechnology Information) using the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) program. Subsequently, the sequences were deposited to acquire their respective accession numbers (Zhang *et al.*, 2000). These sequences have been deposited in the Sequence Read Archive (SRA) under the accession numbers SRR24660263, SRR24660264, SRR24660265, SRR24660266, and SRR24660267. These samples are associated with the BioProject accession number PRJNA974074.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Field observations.** Trunks and branches were discovered to be partially and fully infested with a biofilm (Figure 2). The presence of a green, powdery covering on trunks, branches, and leaves was used to identify the infestation, which originated at the base and extended upwards. In samples taken from Billebén Estate and Valle Alto Estate, branches exhibited a more pronounced biofilm with gray necrotic areas (Figure 2E), indicating an

Archive) con los números de acceso SRR24660263, SRR24660264, SRR24660265, SRR24660266 y SRR24660267. Estas muestras forman parte del número de acceso de BioProject PRJNA974074.

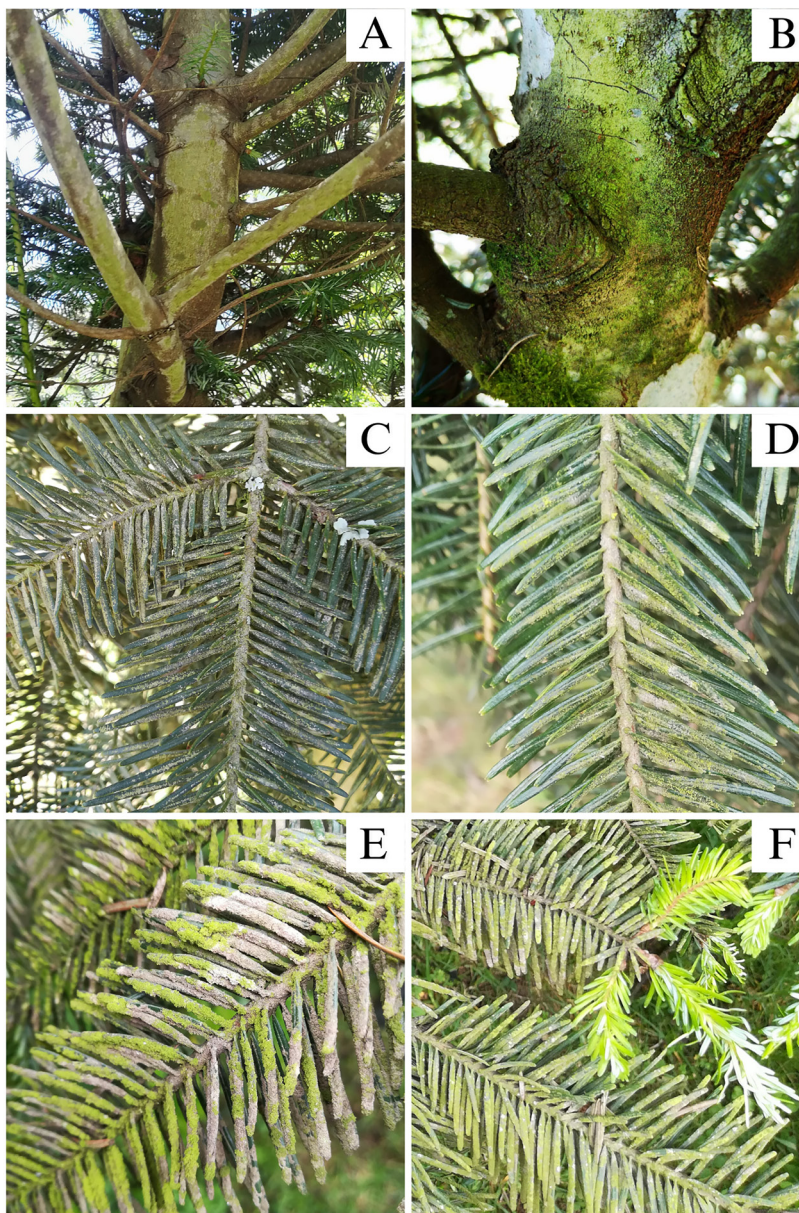
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Observaciones en campo.** Se encontraron troncos y ramas con infestación parcial y completa de la biopelícula (Figura 2). Esta se reconoció por la presencia de una cobertura verde polvosa en troncos, ramas y hojas, iniciando en la parte inferior y extendiéndose a la parte superior de las mismas. En las muestras de Finca Billebén y Finca Valle Alto se observaron ramas con una biopelícula más densa con secciones necróticas de color gris (Figura 2E), lo que indica una etapa avanzada de la infestación. Esto puede deberse a la infestación avanzada de hongos en la biopelícula, lo cual ya ha sido reportado previamente por Sochting (1997) en hojas de *Picea abies*. También se ha observado una mayor incidencia de hongos en hojas de coníferas conforme aumenta la edad de las ramas (Carroll *et al.*, 1977; Terhonen *et al.*, 2011).

Se encontró que, aún en las ramas completamente infestadas, los nuevos brotes de hojas no mostraron cobertura de la biopelícula (Figura 2F). Esta observación se realizó en octubre, y la producción de brotes inicia en mayo con la temporada de lluvias, lo que indica que los brotes pueden pasar hasta cinco meses libres de la biopelícula. Este fenómeno también ha sido reportado previamente en *Picea abies*, donde se encontró que las nuevas hojas empiezan a ser colonizadas por algas hasta seis meses después de haber brotado, y que las ramas más viejas tienen una cobertura más densa (Sochting, 1997).

Además de algas y hongos, también se encontraron musgos (Figura 3B), líquenes foliosos





**Figure 2.** Pinabete trees (*Abies guatemalensis*) infested with algal and fungal biofilm. A and B) Trunks covered by the biofilm. C and D) Branches with partial biofilm coverage. E) Branch with total biofilm coverage. F) Infested pinabete branch with leaf buds free of infestation.

**Figura 2.** Árboles de pinabete (*Abies guatemalensis*) infestados con la biopelícula de algas y hongos. A y B) Troncos cubiertos por la biopelícula. C y D) Ramas con cobertura parcial de la biopelícula. E) Rama con cobertura total de la biopelícula. F) Rama de pinabete infestada con brotes foliares libres de la infestación.

advanced stage of infestation. This occurrence can be attributed to the fungal infestation within the biofilm, as previously reported by Sochting (1997)

(Figura 3C), ácaros, diatomeas, polen y exoesqueletos de insectos en la biopelícula. Esta acumulación de detritos y materia orgánica en la biopelícula

in *Picea abies* leaves. Additionally, an increased occurrence of fungi on conifer leaves has been observed as the branches age (Carroll *et al.*, 1977; Terhonen *et al.*, 2011).

Even in branches completely infested, no biofilm coverage was observed on new leaf shoots (Figure 2F). This observation was made in October, while the onset of the rainy season is in May, when new shoots begin to emerge, suggesting that these shoots can remain biofilm-free for up to five months. Similar findings have been reported in *Picea abies*, where it was observed that new leaves become colonized by algae up to six months after bud formation, with older branches exhibiting a denser biofilm coverage (Sochting, 1997).

Traces of mosses (Figure 3B), foliose lichens (Figure 3C), mites, diatoms, pollen, and insect exoskeletons were also detected within the biofilm. This accumulation of debris and organic matter in the biofilm further hampers photosynthesis in the leaves and hastens senescence (Reuther, 1978; Sochting, 1997).

The field observations revealed that the biofilm of algae and fungi is not exclusively limited to Guatemalan fir. Leaf litter from other tree species exhibiting similar algae coverage was discovered in two plantations (Figure 4). This leaf litter was found in the canopy of affected Guatemalan fir trees, whereas the litter on the ground did not display any signs of the biofilm. This suggests that the biofilm adhered to the leaves due to their proximity to the source of inoculum.

The reasons why the Guatemalan fir is affected by the algae and fungi biofilm while other conifers in the same region, such as *Pinus maximinoi* or *P. oocarpa*, do not exhibit this phenomenon, are still unknown. According to Hoffman (1989), the growth of epiphytic algae is more influenced by physical factors such as temperature, light, and humidity than by the species of the host plant. However, other factors like bark pH and

reduce aún más la fotosíntesis en las hojas y acelera la senescencia (Reuther, 1978; Sochting, 1997).

Las observaciones en campo demostraron que la biopelícula de algas y hongos no crece únicamente sobre el pinabete. En dos plantaciones se encontró hojarasca de otras especies de árboles con la misma cobertura de algas (Figura 4). Esta hojarasca se encontró en la copa de los pinabetes afectados, mientras que la hojarasca en el suelo no mostraba presencia de la biopelícula, lo que indica que esta se adhirió a las hojas por su proximidad con la fuente del inóculo.

Aún se desconoce por qué el pinabete es afectado por la biopelícula de algas y hongos, pero en otras coníferas de la misma región no presentan dicho fenómeno, tales como *Pinus maximinoi* o *P. oocarpa*. De acuerdo con Hoffman (1989), el crecimiento de algas epífitas está más controlado por factores físicos (temperatura, iluminación, humedad) que por la especie de planta basibionte. Aun así, otros factores como el pH de la corteza y la especie del árbol influyen en la colonización de algas (Alwi *et al.*, 2015; Stifterova y Neustupa, 2015), por lo que los árboles de pinabete podrían presentar características que facilitan el crecimiento de estas.

**Identificación de algas.** En las 120 hojas de los 15 árboles analizados (5 árboles por sitio de muestreo) se encontraron cuatro especies de algas en las hojas de pinabete (Cuadro 1). El alga *Desmococcus* sp. se encontró en las tres localidades (Figura 5), dos especies diferentes del género *Klebsormidium* se encontraron en dos localidades (Finca Valle Alto y Finca Billeben) y un alga unicelular de la clase Trebouxiophyceae se encontró en una localidad (Finca Billeben), esta no fue identificada a nivel de género debido a la falta de características diagnósticas observables. No fue posible realizar análisis genético de las algas debido a la falta de cultivos puros, por lo que es necesario optimizar el método



**Figure 3.** Pinabete branches and leaves infested with the algal and fungal biofilm seen under stereoscope. A) Pinabete bark 20 X. B) Pinabete branch 20 X. C and D) Pinabete branches 10 X. E) Pinabete leaf covered by biofilm with necrotic section 20 X. F) Pinabete leaf underside 45 X.

**Figura 3.** Ramas y hojas de pinabete infestadas con la biopelícula de algas y hongos vistas bajo estereoscopio. A) Corteza de pinabete 20 X. B) Rama de pinabete 20 X. C y D) Ramas de pinabete 10 X. E) Hoja de pinabete cubierta por la biopelícula con una sección necrótica 20 X. F) Envés de hoja de pinabete 45 X.

tree species can also influence algae colonization (Alwi *et al.*, 2015; Stifterova and Neustupa, 2015), suggesting that Guatemalan fir trees may possess specific characteristics that facilitate the growth of these organisms.

de desinfección del material vegetal utilizando diferentes concentraciones de antifúngicos y tiempos de desinfección que puedan eliminar hongos y bacterias sin afectar el crecimiento las algas (Laezza *et al.*, 2022).

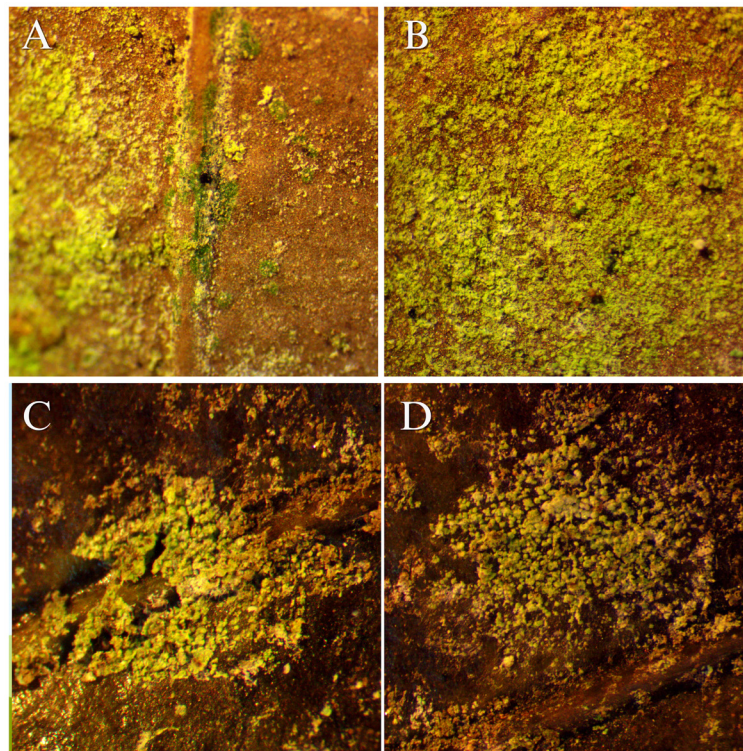


Figure 4. Angiosperm leaves found in the canopy of pinabetes infested with algae. A and B) Location: Finca Billeben, Guatemala 15 X. C and D) Location: Finca Valle Alto 15 X.  
Figura 4. Hojas de angiospermas encontradas en la copa de pinabetes infestados con algas. A y B) Localidad: Finca Billeben, Guatemala 15 X. C y D) Localidad: Finca Valle Alto 15 X.

**Algae identification.** In the 120 leaves of the 15 analyzed trees (5 trees per sampling site), four species of algae were found on the pinabete leaves (Table 1). The alga *Desmococcus* sp. was present in all three locations (Figure 5), two different species of the genus *Klebsormidium* were found in two locations (Finca Valle Alto and Finca Billeben), and a unicellular alga belonging to the class Trebouxiophyceae was found in one location (Finca Billeben). However, due to the lack of observable diagnostic characteristics, the genus of this alga could not be identified. Genetic analysis of the algae was infeasible due to the absence of pure cultures. Hence, there is a need to optimize the method of plant material disinfection by employing

Las algas identificadas en este estudio pertenecen a géneros que se han descrito como organismos formadores de biopelículas fotosintéticas en superficies naturales y artificiales como suelos, plantas, rocas y construcciones (Ljaljević-Grbić *et al.*, 2010; Rindi y Guiry, 2004; Stifterova y Neustupa, 2015). Ninguna de las algas identificadas ha sido reportada como parásitas o causantes de enfermedades en plantas, estas utilizan la corteza y las ramas como superficie para crecer, así como otros organismos epibiontes, entre ellos líquenes o musgos (Neustupa y Albrechtova 2003; Wahl, 2009).

Se encontró que la composición de especies de algas en la biopelícula puede variar de acuerdo con la localidad. Esta variación puede deberse

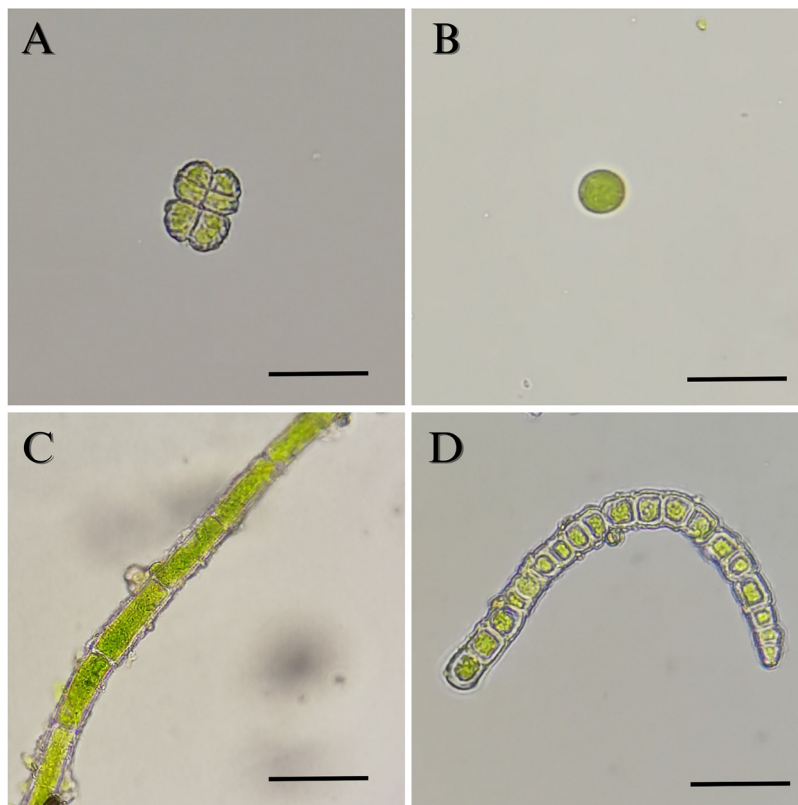
**Table 1. Comparison of algae and fungi groups found in pinabete plantations in Chimaltenango, Guatemala and San Marcos, Guatemala.****Cuadro 1. Comparación de grupos de algas y hongos encontrados en las plantaciones de pinabete en las localidades de Chimaltenango, Guatemala y San Marcos, Guatemala.**

Clasificación	Localidades		
	Finca Billeben, Guatemala	Finca Valle Alto, Chimaltenango	Finca Buena Vista San Marcos
<b>Algas</b>			
<i>Desmococcus</i> sp.	X	X	X
<i>Klebsormidium</i> sp1.	X		
<i>Klebsormidium</i> sp2.		X	
Trebouxiophyceae	X		
<b>Hongos</b>			
<i>Alternaria</i> sp.	X		
<i>Aspergillus</i> sp.	X		
<i>Fusarium equiseti</i>		X	
<i>F. graminearum</i>		X	
<i>Fusarium</i> sp.		X	
<i>Mucor hiemalis</i>			X
<i>Mucor</i> sp.		X	
<i>Trichoderma koningiopsis</i>			X
<i>Trichoderma viride</i>			X
<i>Trichoderma</i> sp.	X		
<i>Ulocladium</i> sp.	X		

different concentrations of antifungal agents and disinfection durations that effectively eliminate fungi and bacteria while preserving algal growth (Laezza *et al.*, 2022).

The algae identified in this study belong to genera that have been documented as photosynthetic biofilm-forming organisms on both natural and artificial surfaces, including soil, plants, rocks, and structures (Ljaljević-Grbić *et al.*, 2010; Rindi and Guiry, 2004; Stifterova and Neustupa, 2015). None of the identified algae have been reported as parasites or pathogens of plants. Instead, they utilize the bark and branches as suitable substrates for growth, often coexisting with other epibiotic organisms such as lichens or mosses (Neustupa and Albrechtova, 2003; Wahl, 2009).

a la madurez y la edad de la cobertura sobre las hojas. Se ha demostrado que existe una sucesión en las biopelículas de microorganismos similar a la que sucede en los bosques, ya que la abundancia y riqueza de especies de algas varía de acuerdo con el tiempo (Neustupa y Albrechtova, 2003; Poggio, 2002). El alga *Desmococcus* sp. se encontró en todas las localidades, lo que sugiere que es un colonizador temprano en la biopelícula (Schnurr y Allen, 2015). Por otra parte, las algas filamentosas como *Klebsormidium* suelen ser colonizadores tardíos (Sochting, 1997). Esto implica que las localidades de Finca Billeben y Finca Valle Alto presentan árboles con una biopelícula más desarrollada y de mayor edad. En estas mismas localidades se encontraron ramas con parches necróticos con una infestación avanzada de hongos.



**Figure 5.** Algae isolated from pinabete leaves infested with algal and fungal biofilm. A) *Desmococcus* sp. 400 X. B) *Trebouxiophyceae* 400 X. C) *Klebsormidium* sp1. 400 X. D) *Klebsormidium* sp2. 400 X. Scale bar equals 10  $\mu\text{m}$ .  
**Figura 5.** Algas aisladas a partir de hojas de pinabete infestados con biopelícula de algas y hongos. A) *Desmococcus* sp. 400 X. B) *Trebouxiophyceae* 400 X. C) *Klebsormidium* sp1. 400 X. D) *Klebsormidium* sp2. 400 X. La barra de escala equivale a 10  $\mu\text{m}$ .

The species composition of algae within the biofilm was found to vary across different locations, likely influenced by the maturity and age of leaf coverage. Similar to forest ecosystems, a succession of microorganism biofilms occurs, resulting in fluctuations in algae abundance and species richness over time (Neustupa and Albrechtova, 2003; Poggio, 2002). The alga *Desmococcus* sp. was consistently present in all locations, indicating its role as an early colonizer in the biofilm (Schnurr and Allen, 2015). In contrast, filamentous algae such as *Klebsormidium* tend to colonize the biofilm at later stages (Sochting, 1997). Consequently, the Finca Billebén and Finca Valle Alto locations

La variabilidad en la riqueza de especies también puede deberse a factores como el pH de la corteza, la humedad, iluminación y concentración de nitrógeno y fósforo (Novakova y Neustupa, 2015). La intensidad de manejo de un bosque también puede afectar las especies de una biopelícula, ya que los bosques que tienen una mayor frecuencia de raleos y podas presentan una menor cobertura de dosel y una mayor riqueza de especies de algas (Glaser *et al.*, 2018; Stifterova y Neustupa, 2015). Estos factores ambientales y antropogénicos deberán ser abordados en futuras investigaciones para conocer cómo afectan el desarrollo de la biopelícula en las hojas del pinabete.

harbor trees with more developed and mature biofilms. Additionally, these locations exhibited branches with necrotic patches, indicating an advanced fungal infestation.

The variability in species richness can also be attributed to factors such as bark pH, humidity, light exposure, and nitrogen and phosphorus concentration (Novakova and Neustupa, 2015). Forest management practices can also influence the species composition of the biofilm, as forests with higher frequencies of thinning and pruning exhibit reduced canopy coverage but higher species richness of algae (Glaser *et al.*, 2018; Stifterova and Neustupa, 2015). These environmental and anthropogenic factors should be further investigated in future research to elucidate their impact on the development of biofilm on pinabete leaves.

**Identification of fungi.** From the analysis of 120 leaves collected from 15 trees, a total of 11 fungal species were isolated from Pinabete leaves (Table 1), representing six genera (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Trichoderma*, and *Ulocladium*). These genera comprise organisms with diverse ecological roles, including pathogens, saprophytes, and beneficial species. Through ITS region sequencing, five of the fungal species were identified at the species level (Table 2). When comparing the sequences of this study with those of the NCBI gene bank, homology ranged from 93.3 to 97.6 % (Table 2). This low homology may be due to other variants or species. Therefore, further morphological and molecular studies are considered pertinent.

Three species of *Trichoderma* (*Trichoderma* sp., *T. koningiopsis*, *T. viride*) were identified in Finca Billeben (Guatemala) and Finca Buena Vista (San Marcos). These species are known for their antagonistic effects against pathogens, particularly *Fusarium*, and have previously been isolated from *Abies* and other conifer leaves in Europe

**Identificación de hongos.** A partir de las 120 hojas de los 15 árboles analizados, se aislaron 11 especies de hongos que se encontraron en las hojas de pinabete (Cuadro 1), pertenecientes a seis géneros (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Trichoderma* y *Ulocladium*). Estos géneros corresponden a organismos que se conocen como patógenos, saprófitos y benéficos. Cinco de los hongos se identificaron molecularmente a nivel especie por la amplificación de la región ITS (Cuadro 2). Al comparar las secuencias de este estudio con las del banco de genes del NCBI, se observó una homología que osciló entre 93.3 al 97.6 % (Cuadro 2). Esta baja homología puede deberse a que sean otras variantes o especies. Por lo que se considera pertinente realizar más estudios morfológicos y moleculares.

Se encontraron tres especies de *Trichoderma* (*Trichoderma* sp., *T. koningiopsis*, *T. viride*) en la Finca Billeben (Guatemala) y la Finca Buena Vista (San Marcos). Estas especies son antagónicas de patógenos como *Fusarium*, y han sido aisladas previamente a partir de hojas de *Abies* y otras coníferas de Europa (Hanackova *et al.*, 2015; Hayes, 1965; Tokumasu *et al.*, 1994). Los hongos *Alternaria* sp. y *Ulocladium* sp. también se encontraron en la Finca Billeben (Guatemala), estos hongos pueden causar necrosis en hojas y se han reportado afectando especies arbóreas (Danelia *et al.*, 2021; Vannini and Vettraino, 2000).

En la finca Valle Alto se encontraron dos especies de *Fusarium*: *F. equiseti* y *F. graminearum*. Esta última causa la podredumbre del tallo en maíz y afecta principalmente a gramíneas, a pesar de esto, ha sido aislada a partir de numerosas familias de plantas. Las esporas del hongo se depositan y acumulan en hojas y se convierten en una fuente de inóculo para gramíneas (Miller *et al.*, 2007). En este caso, las esporas de este hongo posiblemente se transportaron desde plantaciones de maíz aledañas, ya que este cultivo suele asociarse con el pinabete en un modelo agroforestal (INAB, 2019).

**Table 2. Percentage of sequence similarity of ITS region sequences of fungi isolated and identified from pinabete leaves**  
**Cuadro 2. Porcentaje de similitud de secuencias de la región ITS de hongos aislados e identificados de hojas de pinabete.**

ID	Especie	Cobertura (%)	Homología (%)	Referencia de BLAST	Accesión
ITS seq of <i>Fusarium</i> b	<i>Fusarium equiseti</i>	99.5	97.65	<i>F. equiseti</i> isolate Anna6 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	MN498032.1
ITS seq of <i>Fusarium</i> R	<i>F. graminearum</i>	99.65	96	<i>F. graminearum</i> isolate PAK-14 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	MH054924.1
ITS seq of <i>Mucor</i> h	<i>Mucor hiemalis</i>	99.31	93.55	<i>M. hiemalis</i> isolate SL71_64a_Y2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	MN105537.1
ITS seq of <i>Trichoderma</i> k	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	98.32	96.14	<i>T. koningiopsis</i> isolate XXTF7 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	MN602642.1
ITS seq of <i>Trichoderma</i> v	<i>T. viride</i>	97.23	94.23	<i>T. viride</i> strain CTCCSJ-A-SD33116 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	MF632117.1

(Hanackova *et al.*, 2015; Hayes, 1965; Tokumasu *et al.*, 1994). Additionally, the fungi *Alternaria* sp. and *Ulocladium* sp. were found in Finca Billeben

No se encontró ningún género de hongos que estuviera en común en todas las localidades, los géneros *Mucor* y *Trichoderma* se encontraron en dos



(Guatemala). These fungi have been associated with leaf necrosis and have been reported to impact various tree species (Danelia *et al.*, 2021; Vannini and Vettrano, 2000).

In Finca Valle Alto, two species of *Fusarium* were identified: *F. equiseti* and *F. graminearum*. The latter is known to cause stalk rot in maize and primarily affects grasses, although it has been isolated from various plant families. Fungal spores are deposited and accumulate on leaves, serving as a potential source of inoculum for grasses (Miller *et al.*, 2007). In this particular case, the spores of this fungus were likely transported from neighboring maize plantations, as maize is commonly associated with pinabete in an agroforestry model (INAB, 2019).

No fungal genus was found to be shared across all locations. However, the genera *Mucor* and *Trichoderma* were observed in two out of the three locations, and these genera have previously been co-isolated from decomposing conifer leaves (Hanackova *et al.*, 2015; Hayes, 1965; Tokumasu *et al.*, 1992).

Under microscopic observation of the biofilm scrapings, a close association between green algae and fungi was evident. Fungal mycelium with the accumulation of unicellular algae (Trebouxiophyceae) surrounding it was observed (Figure 6A and B), as well as fungal hyphae and spores adhering to filaments of the alga *Klebsormidium* sp. (Figure 6C and D). Terrestrial filamentous algae, including this genus, produce an extracellular matrix of polysaccharides that serve as attachment sites for other algae, cyanobacteria, and fungi (Warren *et al.*, 2019). Additionally, fungal hyphae adhere to other components of the biofilm, such as soil particles, contributing to their aggregation and compaction (Belnap *et al.*, 2003). The exact nature of the relationship, whether mutualistic, commensalistic, or parasitic,

de las tres localidades, y estos han sido aislados en conjunto en hojas de coníferas en descomposición (Hanackova *et al.*, 2015; Hayes, 1965; Tokumasu *et al.*, 1992).

Al observar los raspados de la biopelícula bajo microscopio se encontró que las algas verdes y hongos están estrechamente relacionados. Se observó micelio de hongos con acumulación de algas unicelulares (Trebouxiophyceae) alrededor (Figura 6A y B), así como hifas y esporas de hongos adheridos a filamentos del alga *Klebsormidium* sp. (Figura 6C y D). Este y otros géneros de algas filamentosas terrestres producen una matriz extracelular de polisacáridos a la cual pueden adherirse otras algas, cianobacterias y hongos (Warren *et al.*, 2019). Además, las hifas de los hongos se adhieren a otros componentes de la biopelícula, como partículas de suelo, para agregarlos y compactarlos (Belnap *et al.*, 2003). Aún no está claro si existe una relación de mutualismo, comensalismo o parasitismo entre los microorganismos que conforman la biopelícula, lo cual deberá ser abordado en futuras investigaciones.

## CONCLUSIONES

La biopelícula que afecta a las plantaciones del pinabete en Guatemala está compuesta por algas epifitas, hongos y materia orgánica. En 15 árboles de pinabete en tres localidades se encontraron algas de los géneros *Desmococcus*, *Klebsormidium* y de la clase Trebouxiophyceae. Estas algas no son organismos parásitos del pinabete, sino que lo utilizan como soporte de manera similar a líquenes y otros epibiontes. También se encontraron hongos de los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Trichoderma* y *Ulocladium*, los cuales se han reportado como hongos patógenos, saprófitos y benéficos. Se encontró que la riqueza de especies

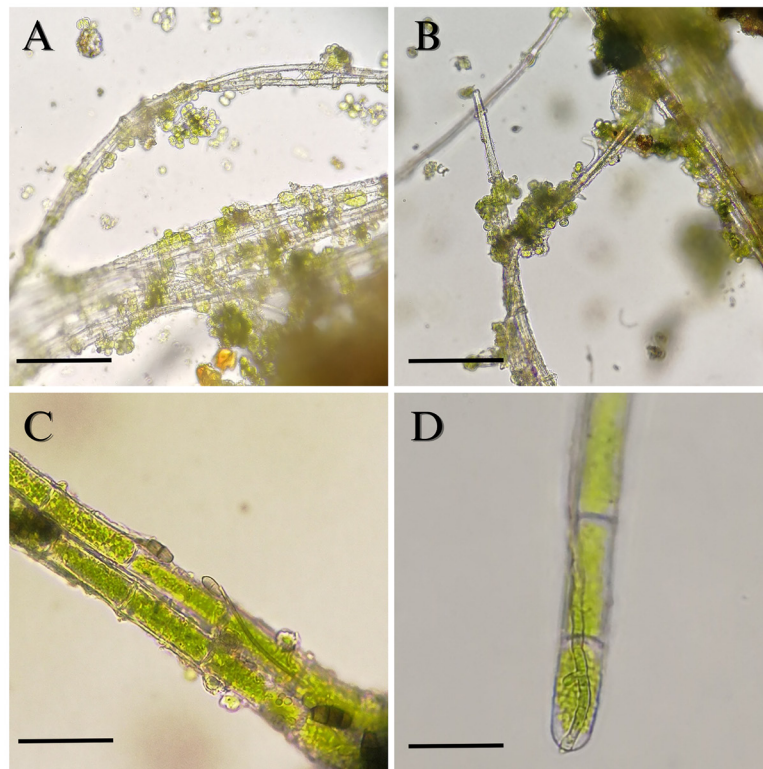


Figure 6. Scrapings of pinabete leaf biofilm seen under microscopy from pinabete leaves infested with the biofilm. A and B) Fungal mycelium surrounded by unicellular algae 400 X. C and D) *Klebsormidium* sp1 filaments surrounded by fungal hyphae and spores 400 X. Scale bar equals 10  $\mu$ m.

Figura 6. Raspados de la biopelícula de hojas de pinabete vistos bajo microscopio partir de hojas de pinabete infestados con la biopelícula. A y B) Micelio de hongos rodeado de algas unicelulares 400 X. C y D) Filamentos de *Klebsormidium* sp1 rodeados de hifas y esporas de hongos 400 X. La barra de escala equivale a 10  $\mu$ m.

among the microorganisms comprising the biofilm remains to be elucidated and should be the focus of future investigations.

## CONCLUSIONS

The biofilm affecting pinabete plantations in Guatemala is composed of epiphytic algae, fungi, and organic matter. Algae from the genera *Desmococcus*, *Klebsormidium*, and the class Trebouxiophyceae were found on 15 pinabete trees across three locations. These algae do not

de algas y hongos varía de acuerdo con la localidad, lo cual puede deberse a factores ambientales o antropogénicos.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos a Salvador Pira, José Billeb y Antonio Pineda, productores de pinabete, por apoyar en la colecta de muestras, así como a Patricia Herrera, María Bermúdez, Leyda Hernández, Julio Álvarez y Melvin Hernández, personal del Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala, por su apoyo en el aislamiento y análisis genético de los hongos.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

act as parasites but rather utilize pinabete as a substrate, akin to lichens and other epibionts. Fungi belonging to the genera *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Trichoderma*, and *Ulocladium* were also present, exhibiting a range of pathogenic, saprophytic, and beneficial characteristics. Furthermore, the species richness of both algae and fungi demonstrated variability among the locations, which could be attributed to environmental or anthropogenic factors.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge Salvador Pira, José Billeb, and Antonio Pineda, pinabete producers, for their valuable support in sample collection. Grateful appreciation is also extended to Patricia Herrera, María Bermúdez, Leyda Hernández, Julio Álvarez, and Melvin Hernández from the Plant Protection Laboratory at the University of Valle de Guatemala for their assistance in fungal isolation and genetic analysis.

## CITED LITERATURE

- AlgaeBase. 2023. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway: <https://www.algaebase.org/content/?tc=accept&undefined> (consulta, marzo 2023).
- Alwi I, Asmida I, Khairiyah S, Buyong F, Mohamad N, Daud D and Rusop M. 2015. Bark pH as a factor affecting the density of epiphytic terrestrial algae in Taman Wetland Putrajaya, Malaysia. *Journal of Applied and Physical Sciences* 1: 13-18. <https://doi.org/10.20474/japs-1.1.4>
- Andersen R. 2005. *Algal Culturing Techniques*. First Edition. Elsevier. Amsterdam, Netherlands. 592p. Disponible en línea: <https://www.elsevier.com/books/algal-culturing-techniques/andersen/978-0-12-088426-1>
- Archibald J, Simpson AG and Slamovits CH. 2017. *Handbook of the Protists*. Second Edition. Springer. Dordrecht, Netherlands. 1657p. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-28149-0>
- Belnap J, Budel B and Lange OL. 2003. Biological Soil Crusts: Characteristics and distribution. Pp 3-30. *In*: Belnap J and Lange OL (eds.). *Biological Soil Crusts: Structure, Function and Management*. Vol 150. Springer. Dordrecht, Netherlands. 479p. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-56475-8>
- Carroll F, Muller E and Sutton BC. 1977. Preliminary Studies on the Incidence of Needle Endophytes in some European Conifers. *Sydowia* 29: 87-103. [https://www.zobodat.at/pdf/Sydowia\\_29\\_0087-0103.pdf](https://www.zobodat.at/pdf/Sydowia_29_0087-0103.pdf)
- CONAP (Consejo Nacional de Áreas Protegidas). 2010. *Estrategia Nacional Para la Conservación del Pinabete (Abies guatemalensis Rehder) 2008-2017*. Documento técnico No. 80(01-2010). Guatemala, Guatemala. 106p. Disponible en línea: <https://conap.gob.gt/conservacion-del-pinabete/>
- Danelia I, Zaqariashvili N, Amiranashvili L, Badridze G and Kvitsiani S. 2021. The mycological study of conifers in Tbilisi and its surroundings. *Journal of Forest Science* 67: 464-476. <https://doi.org/10.17221/79/2021-JFS>
- Farr DF, Bills GF, Chamuris GP and Rossman AY. 1989. *Fungi on plants and plant products in the United States*. First Edition. APS Press. Minnesota, USA. 1252p. Disponible en línea: <https://my.apsnet.org/APSSStore/Product-Detail.aspx?WebsiteKey=2661527A-8D44-496C-A730-8CFEB6239BE7&iProductCode=40993>
- Freystein K and Reisser W. 2010. Green Biofilms on Tree Bark: more than just algae. Pp: 559-573. *In*: Sekbach J and Grube M (eds.). *Symbioses and Stress. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*. Vol. 17. Springer. Dordrecht, Netherlands. 615p. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-9449-0\\_29](https://doi.org/10.1007/978-90-481-9449-0_29)
- Glaser K, Baumann K, Leinweber P, Mikhailyuk T and Karsten U. 2018. Algal richness in BSCs in forests under different management intensity with some implications for P cycling. *Biogeosciences* 15: 4181-4192. <https://doi.org/10.5194/bg-15-4181-2018>
- Graham LE and Wilcox LW. 2009. *Algae*. Second Edition. PrenticeHall. New Jersey, USA. 1416p. Disponible en línea: <https://www.worldcat.org/title/algae/oclc/750763673>
- Hanackova Z, Koukol O, Stursova M, Kolarik M and Baldrian P. 2015. Fungal succession in the needle litter of a montane *Picea abies* forest investigated through strain isolation and molecular fingerprinting. *Fungal Ecology* 13: 157-166. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.09.007>
- Hayes AJ. 1965. Studies on the decomposition of coniferous leaf litter, II. Changes in external features and succession of microfungi. *Journal of Soil Science* 16: 242-258. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1965.tb01435.x>
- Hoffmann L. 1989. Algae of terrestrial habitats. *Botanical Reviews* 55: 77-105. <https://doi.org/10.1007/BF02858529>
- INAB (Instituto Nacional de Bosques). 2018. *Manual de campo para el manejo sanitario de plantaciones de árboles navideños de pinabete*. Cooperativa Integral Agrícola Joya Hermosa de las Tres Cruces R.L. Guatemala, Guatemala. 26p. Disponible en línea: <https://inab.gob.gt/images/profor/Manual%20de%20Campo%20para%20el%20Manejo%20Sanitario%20de%20Plantaciones%20de%20arboles%20navidenos%20de%20Pinabete.pdf>

- INAB (Instituto Nacional de Bosques). 2019. Paquete Tecnológico Forestal para Pinabete *Abies guatemalensis* Rehder, versión 1.0. Serie técnica DT-032-2019. Departamento de Investigación Forestal. Guatemala, Guatemala. 58p. Disponible en línea: <https://www.inab.gob.gt/images/publicaciones/PTF%20PINABETE.pdf>
- John D and Rindi F. 2015. Filamentous (Nonconjugating) and Plantlike Green Algae. Pp: 375-427. In: Wehr JD, Sheath RG and Kociolek JP (eds.). Freshwater algae of North America: Ecology and Classification. Second Edition. Academic Press. Washington, USA. 1066p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385876-4.00008-6>
- Kuhl A and Lorenzen H. 1964. Handling and Culturing of Chlorella. Pp: 159-187. In: Prescott DM (eds.). Methods in Cell Biology. Vol 1. Elsevier. Amsterdam, Netherlands. 464p. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)62092-0](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)62092-0)
- Ljaljević-Grbić M, Vukojević J, Subakov-Simić G, Krizmanić J and Stupar M. 2010. Biofilm forming cyanobacteria, algae and fungi in two historic monuments in Belgrade, Serbia. Archives of Biological Sciences 3: 625-631. <https://doi.org/10.2298/ABS1003625L>
- Laezza C, Salbitani G and Carfagna S. 2022. Fungal Contamination in Microalgal Cultivation: Biological and Biotechnological Aspects of Fungi-Microalgae Interaction. Journal of Fungi 10: 1099-1105. <https://doi.org/10.3390/jof8101099>
- Miller SS, Reid LM, Harris LJ. 2007. Colonization of maize silks by *Fusarium graminearum*, the causative organism of gibberella ear rot. Canadian Journal of Botany 85: 369-376. <https://doi.org/10.1139/B07-027>
- Murray M and Thompson W. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 19: 4321-4325. <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>
- Neustupa J and Albrechtová J. 2003. Aerial algae on spruce needles in the Krusne Hory Mts., Czech Republic. Czech Phycology Olomouc 3: 161-167. <https://fottee.czechphycology.cz/pdfs/fot/2003/01/15.pdf>
- Novakova R and Neustupa J. 2015. Microalgal biofilms on common yew needles in relation to anthropogenic air pollution in urban Prague, Czech Republic. Science of the Total Environment 508: 7-12. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.11.031>
- Phillips D and Burdekin DA. 1992. Diseases of Forest and Ornamental Trees. Second Edition. The MacMillan Press. London, England. 581p. <https://doi.org/10.1007/978-1-349-10953-1>
- Poggio L. 2002. Epiphytic algae on Norway spruce needles in Sweden: geographical distribution, time-trends and influence of site factors. Department of Forest Soils, Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Sweden. 32p. Disponible en línea: [https://stud.epsilon.slu.se/11831/1/poggio\\_1\\_171016.pdf](https://stud.epsilon.slu.se/11831/1/poggio_1_171016.pdf)
- Rindi F and Guiry MR. 2004. Composition and spatial variability of terrestrial algal assemblages occurring at the bases of urban walls in Europe. Phycologia 3: 225-235. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-43-3-225.1>
- Schnurr P and Allen DG. 2015. Factors affecting algae biofilm growth and lipid production: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 52: 418-429. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.090>
- Sochting U and Sutton BC. 1997. *Scolecotecha cornuta* gen. et sp. nov. on needles of *Picea abies* from Denmark. Mycological Research 101: 1366-1370. <https://doi.org/10.1017/S0953756297004048>
- Sochting U. 1997. Epiphyllitic cover on spruce needles in Denmark. Annales Botanici Fennici 34: 157-164. <http://www.jstor.org/stable/23726495>
- Soto PA, Rodríguez AG, Fernández YL, Pedraza ME, López PL, Díaz CM y Fernández SP. 2017. Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp.: Enfoque aplicado a la investigación. Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas (8): 1867-1880. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i8.708>
- Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M and Cohen-Bazire G. 1971. Purification and Properties of Unicellular Blue-Green Algae (Order Chroococcales). Bacteriological Reviews 35: 171-205. <https://doi.org/10.1128/br.35.2.171-205.1971>
- Stifterova A and Neustupa J. 2015. Community structure of corticolous microalgae within a single forest stand: evaluating the effects of bark surface pH and tree species. Fottea Olomouc 2: 113-122. <https://doi.org/10.5507/fot.2015.013>
- Strandby U, Prado JP, Sorensen M and Kollmann J. 2006. Conservation and utilization of *Abies guatemalensis* Rehder – an endemic conifer in Central America. Biodiversity and Conservation 15: 3131-3151. <http://dx.doi.org/10.1007/s10531-005-5405-x>
- Strandby U, Prado JP, Brauner U, Smith C, Nielsen C, Sorensen M and Kollmann J. 2008. Conservation through utilization: a case study of the vulnerable *Abies guatemalensis* in Guatemala. Oryx 2: 206-213. <https://doi.org/10.1017/S0030605308007588>
- Terhonen E, Marco T, Sun H, Jalkanen R, Kasanen R, Vuorinen M, Asiegbu F. 2011. The effect of latitude, season and needle-age on the mycota of Scots pine (*Pinus sylvestris*) in Finland. Silva Fennica 3: 301-317. <https://doi.org/10.14214/sf.104>
- Tokumasu S, Aoki T and Oberwinkler F. 1994. Fungal succession on fir needles in Germany. Mycoscience 35: 29-37. <https://doi.org/10.1007/BF02268525>
- Vannini A and Vettraino AM. 2000. *Ulocladium chartarum* as the causal agent of a leaf necrosis on *Quercus pubescens*. Forest Pathology 30: 297-303. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0329.2000.00210.x>
- Videv PV, Gartner G, Uzunov BA, Dimitrova PH and Stoyneva-Gartner MP. 2017. Epimycotic Algae on the Medicinal Fungus *Trametes versicolor* (L.) Lloyd. International Journal of Advanced Research in Botany 3: 18-26. <http://dx.doi.org/10.20431/2455-4316.0302004>
- Wahl M. 2009. Epibiosis. Pp: 61-72. In: Wahl M (eds.). Marine Hard Bottom Communities. Ecological Studies. Vol 206.

- Springer. Dordrecht, Netherlands. 446p. [https://doi.org/10.1007/b76710\\_4](https://doi.org/10.1007/b76710_4)
- Warren SD, St. Clair LL, Stark LR, Lewis LA, Pombubpa N, Kurbessoianm T, Stajich JE, and Aanderud ZT. 2019. Reproduction and Dispersal of Biological Soil Crust Organisms. *Frontiers in Ecology and Evolution* 344: 1-18. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00344>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp: 315 –322. *In*: Junis MA (eds.). *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press. San Diego, United States. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L and Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7:203-214. <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>