



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES

CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

**“ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD DE HONGOS ENDÓFITOS
ASOCIADA A LA ENDÓSFERA FOLIAR DE ESPECIES
FORESTALES NATIVAS Y EXÓTICAS USANDO TÉCNICAS
DEPENDIENTES DE CULTIVO”.**

Trabajo de titulación

Tipo: Proyecto de Investigación.

Presentado para optar el grado académico de:

INGENIERA FORESTAL

AUTORA: ALLISON CAMILA UVIDIA CALLES

DIRECTOR: Ing. PABLO ISRAEL ÁLVAREZ ROMERO Ph.D.

Riobamba – Ecuador

2021

© 2021, Allison Camila Uvidia Calles

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo las citas bibliográficas del documento, siempre y cuando se reconozca el derecho de autor.

Yo, Allison Camila Uvidia Calles, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 22 de marzo del 2021

Allison Camila Uvidia Calles

060483109-9

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

El Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de titulación: Tipo: Proyecto de Investigación “**ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD DE HONGOS ENDÓFITOS ASOCIADA A LA ENDÓSFERA FOLIAR DE ESPECIES FORESTALES NATIVAS Y EXÓTICAS USANDO TÉCNICAS DEPENDIENTES DE CULTIVO**”, realizado por la señorita: **ALLISON CAMILA UVIDIA CALLES**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal autoriza su presentación.

FIRMA

FECHA

Ing. M.Sc. Carlos Francisco Carpio Coba



Firmado electrónicamente por:
**CARLOS
FRANCISCO
CARPIO COBA**

2021-03-22

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

PABLO ISRAEL
ALVAREZ
ROMERO

Firmado digitalmente por
PABLO ISRAEL
ALVAREZ
ROMERO

Ing. Pablo Israel Álvarez Romero Ph.D.

2021-03-22

DIRECTOR DE TRABAJO DE

TITULACIÓN

JUAN HUGO
RODRIGUEZ
GUERRA

Firmado digitalmente por JUAN HUGO
RODRIGUEZ GUERRA
Fecha: 2021.05.03
19:39:39 -05'00'

Ing. M.Sc. Juan Hugo Rodríguez Guerra

2021-03-22

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DEDICATORIA

Para mis padres, para mi hermana Jocelyne quien ha sido mi mayor ejemplo de responsabilidad y demostrarme que con constancia los objetivos se logran.

Para mis abuelitos Pedro y Carmen, quienes siempre quisieron ver triunfar a sus nietas.

Para Bruno el eje central de mi vida, desde las noches de estudio hasta la escritura de este proyecto.

Camila

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres por guiarme en cada paso de mi vida, a mis hermanas por ser mi impulso diario.

A mi Tribunal de Trabajo de integración curricular: Ing. Hugo Rodríguez por extenderme su confianza y amistad, Ing. Pablo Álvarez por impartirme sus amplios conocimientos con paciencia.

Camila

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO 1

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	4
1.1 Especies forestales nativas y exóticas.....	4
1.1.1 <i>Ocotea heterochroma</i> Mez & Sodiro.....	4
1.1.1.1 Clasificación taxonómica de <i>Ocotea heterochroma</i> Mez & Sodiro	4
1.1.1.2 Descripción botánica y ecológica de <i>Ocotea heterochroma</i> Mez & Sodiro	5
1.1.2 <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz	5
1.1.2.1 Clasificación taxonómica Moritz ex Turcz	5
1.1.2.2 Descripción botánica y ecológica de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz.	5
1.1.3 <i>Eucalyptus globulus</i> Labill.....	6
1.1.3.1 Clasificación taxonómica de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill	6
1.1.3.2 Descripción botánica y ecológica de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill	6
1.1.4 <i>Pinus radiata</i> D. Don.....	6
1.1.4.1 Clasificación taxonómica de <i>Pinus radiata</i> D.Don.....	6
1.1.4.2 Descripción botánica y ecológica de <i>Pinus radiata</i> D.Don.....	7
1.2 Hongos endófitos.....	8
1.3 Técnicas de aislamiento de hongos endófitos	8
1.4 Usos biotecnológicos potenciales de hongos endófitos para la producción	

sustentable.....	9
------------------	---

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO	11
2.1 Materiales y métodos.....	11
2.1.1 Caracterización del lugar	11
2.1.1.1 Localización	11
2.1.1.2 Ubicación geográfica.....	12
2.1.1.3 Características climáticas.....	12
2.1.2 Materiales y equipos	12
2.1.2.1 Materiales de campo	12
2.1.2.2 Material biológico	12
2.1.2.3 Medios de cultivo.....	12
2.1.2.4 Materiales de laboratorio	12
2.1.2.5 Equipos de laboratorio.....	12
2.1.2.6 Insumos de laboratorio	13
2.1.2.7 Materiales y equipos de oficina e informáticos.....	13
2.2 Metodología	13
2.2.1 Fase de campo	13
2.2.1.1 Recolección de folíolos de especies forestales nativas y exóticas	13
2.2.2 Fase de Laboratorio.....	14
2.2.2.1 Aislamiento de hongos endófitos de especies forestales nativas y exóticas.....	14
2.2.2.2 Caracterización cultural de hongos endófitos	14
2.2.2.3 Caracterización morfológica mediante observación de estructuras microscópicas .	14
2.2.2.4 Conservación de cepas.....	15
2.2.2.5 Identificación molecular de hongos endófitos aislados	15
2.2.3 Análisis de datos en Software.....	16
2.2.3.1 Análisis Filogenético.....	16
2.2.3.2 Cálculo de la diversidad de la microbiota endófito fúngica de la endósfera foliar de	

<i>especies forestales nativas y exóticas</i>	17
---	----

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	18
3.1 Hongos endófitos obtenidos de especies forestales nativas y exóticas	18
3.1.1 Abundancia relativa	18
3.1.2 Caracterización morfológica, molecular y filogenética de 9 géneros y un orden	19
3.1.2.1. <i>Género: Colletotrichum</i>	19
3.1.2.2. <i>Género: Pestalotiopsis</i>	23
3.1.2.3 <i>Género: Trichoderma</i>	26
3.1.2.4. <i>Género: Penicillium</i>	29
3.1.2.5 <i>Género: Xylaria</i>	32
3.1.2.6 <i>Género: Coniochaeta</i>	35
3.1.2.7 <i>Género: Arthrimum</i>	38
3.1.2.8 <i>Género: Pyrenochaeta</i>	41
3.1.2.9 <i>Género: Phaeoacremonium</i>	44
3.1.2.10 <i>Orden: Diaporthales</i>	47
3.1.3 Cálculo de la diversidad de la microbiota endófito fúngica de la endósfera foliar de especies forestales nativas y exóticas	49
3.1.3.1. <i>Cálculo de riqueza de especies, diversidad de Shannon y Simpson de la primera colecta</i>	49
3.1.3.2. <i>Cálculo de riqueza de especies, diversidad de Shannon y Simpson de la segunda colecta</i>	51
CONCLUSIONES	54
RECOMENDACIONES	55
GLOSARIO	
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Clasificación taxonómica de <i>Ocotea heterochroma</i> Mez & Sodiro.....	4
Tabla 2-1:	Clasificación taxonómica de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz.....	5
Tabla 3-1:	Clasificación taxonómica de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill.....	6
Tabla 4-1:	Clasificación taxonómica de <i>Pinus radiata</i> D.Don	6
Tabla 1-2:	Detalle de los primers utilizados para el proceso de amplificación.....	16
Tabla 1-3:	Clasificación taxonómica del género <i>Colletotrichum</i>	19
Tabla 2-3:	Identificación de las secuencias TEF1- α del género <i>Colletotrichum</i> mediante BLAST en el GenBank.....	21
Tabla 3-3:	Clasificación taxonómica del género <i>Pestalotiopsis</i>	23
Tabla 4-3:	Identificación de las secuencias TEF1- α del género <i>Pestalotiopsis</i> mediante BLAST en el GenBank.....	24
Tabla 5-3:	Clasificación taxonómica del género <i>Trichoderma</i>	26
Tabla 6-3:	Identificación de las secuencias TEF1- α del género <i>Trichoderma</i> mediante BLAST en el GenBank.	27
Tabla 7-3:	Clasificación taxonómica del género <i>Penicillium</i>	29
Tabla 8-3:	Identificación de las secuencias TEF1- α del género <i>Penicillium</i> mediante BLAST en el GenBank	30
Tabla 9-3:	Clasificación taxonómica del género <i>Xylaria</i>	32
Tabla 10-3:	Identificación de las secuencias TEF1- α del género <i>Xylaria</i> mediante BLAST en el GenBank	33
Tabla 11-3:	Clasificación taxonómica del género <i>Coniochaeta</i>	35
Tabla 12-3:	Identificación de las secuencias TEF1- α del género <i>Coniochaeta</i> mediante BLAST en el GenBank	36
Tabla 13-3:	Clasificación taxonómica del género <i>Arthrinium</i>	38
Tabla 14-3:	Identificación de las secuencias TEF1- α del género <i>Arthrinium</i> mediante BLAST en el GenBank	39
Tabla 15-3:	Clasificación taxonómica del género <i>Pyrenochaeta</i>	41
Tabla 16-3:	Identificación de las secuencias TEF1- α del género <i>Pyrenochaeta</i> mediante BLAST en el GenBank.....	42
Tabla 17-3:	Clasificación taxonómica del género <i>Phaeoacremonium</i>	44
Tabla 18-3:	Identificación de las secuencias TEF1- α del género <i>Phaeoacremonium</i> mediante BLAST en el GenBank.....	45
Tabla 19-3:	Clasificación taxonómica del orden Diaporthales	47
Tabla 20-3:	Identificación de las secuencias TEF1- α del orden Diaporthales mediante BLAST	

en el GenBank.	48
Tabla 21-3: Riqueza de especies, diversidad de Shannon y Diversidad de Simpson de especies forestales nativas y exóticas, primera colecta.....	49
Tabla 22-3: Riqueza de especies, diversidad de Shannon y Diversidad de Simpson de especies forestales nativas y exóticas, segunda colecta.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-2:	Georreferenciación del lugar de investigación.....	11
Figura 1-3.	Colonias aisladas ejemplares del género <i>Colletotrichum</i> en medio de cultivo PDA.....	20
Figura 2-3.	Microcultivo de <i>Colletotrichum</i> observado al microscopio con el lente 40X.....	20
Figura 3-3.	Árbol filogenético de <i>Colletotrichum</i> inferido a partir del método de máxima parsimonia.	22
Figura 4-3.	Colonias aisladas ejemplares del género <i>Pestalotiopsis</i> en medio de cultivo PDA.	23
Figura 5-3.	Microcultivo de <i>Pestalotiopsis</i> observado al microscopio. A lente 40X, B-C lente 100x.	24
Figura 6-3.	Árbol filogenético de <i>Pestalotiopsis</i> inferido a partir del método de máxima parsimonia.	25
Figura 7-3.	Colonias aisladas ejemplares del género <i>Trichoderma</i> en medio de cultivo PDA.	26
Figura 8-3.	Microcultivo de <i>Trichoderma</i> observado al microscopio con el lente 40X.....	27
Figura 9-3.	Árbol filogenético de <i>Trichoderma</i> inferido a partir del método de máxima parsimonia.	28
Figura 10-3.	Colonias aisladas ejemplares del género <i>Penicillium</i> en medio de cultivo PDA.	29
Figura 11-3.	Microcultivo de <i>Penicillium</i> observado al microscopio con el lente 40X.....	30
Figura 12-3.	Árbol filogenético de <i>Penicillium</i> inferido a partir del método de máxima parsimonia.	31
Figura 13-3.	Colonias aisladas ejemplares del género <i>Xylaria</i> en medio de cultivo PDA.....	32
Figura 14-3.	Microcultivo de <i>Xylaria</i> observado al microscopio con el lente 40X.	33
Figura 15-3.	Árbol filogenético de <i>Xylaria</i> inferido a partir del método de máxima parsimonia.....	34
Figura 16-3.	Colonias aisladas ejemplares del género <i>Coniochaeta</i> en SNA y PDA (B).....	35
Figura 17-3.	Microcultivo de <i>Coniochaeta</i> observado al microscopio con el lente 100X.	36
Figura 18-3.	Árbol filogenético de <i>Coniochaeta</i> inferido a partir del método de máxima parsimonia.	37
Figura 19-3.	Colonias aisladas ejemplares del género <i>Arthrimum</i> en medio de cultivo PDA.	38
Figura 20-3.	Microcultivo de <i>Arthrimum</i> observado al microscopio con el lente 40X.....	39
Figura 21-3.	Árbol filogenético de <i>Arthrimum</i> inferido a partir del método de máxima parsimonia.	40

Figura 22-3.	Colonia aislada en PDA (A) y Microcultivo de <i>Pyrenochaeta</i> observado al microscopio con el lente 40X (B-C-D).....	41
Figura 23-3.	Árbol filogenético de <i>Pyrenochaeta</i> inferido a partir del método de máxima parsimonia.	43
Figura 24-3.	Colonia aislada en PDA (A) y Microcultivo de <i>Phaeoacremonium</i> observado al microscopio con el lente 40X (B-C-D).....	44
Figura 25-3.	Árbol filogenético de <i>Phaeoacremonium</i> inferido a partir del método de máxima parsimonia.	46
Figura 26-3.	Colonia aislada en PDA (A) y Microcultivo de Diaporthales observado al microscopio con el lente 40X (B).....	47

ÍNDICE DE GRÁFICOS

- Gráfico 1-3.** Abundancia relativa de géneros de endófitos fúngicos (%) de la endosfera foliar de especies forestales nativas y exóticas. 18
- Gráfico 2-3.** Índice de riqueza, diversidad de Shannon y Simpson de morfotipos aislados de la endósfera foliar de especies forestales nativas y exóticas, primera colecta..... 50
- Gráfico 3-3.** Índice de riqueza, diversidad de Shannon y Simpson de morfotipos aislados de la endósfera foliar de especies forestales nativas y exóticas, segunda colecta..... 52

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: ACTIVIDADES REALIZADAS EN LA FASE DE CAMPO

ANEXO B: ACTIVIDADES REALIZADAS EN LA FASE DE LABORATORIO

ANEXO C: PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN IDGEN

ANEXO D: EVALUACIÓN DE CRECIMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS

ANEXO E: PROCEDIMIENTOS REALIZADOS EN SOFTWARE

ANEXO F: SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS DE LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR
DE MORFOTIPOS

RESUMEN

En esta investigación se estudió la diversidad de hongos endófitos asociada a la endósfera foliar de dos especies forestales nativas: Laurel Amarillo (*Ocotea heterochroma* Mez & Sodiro) y Cedro (*Cedrela montana* Moritz ex Turcz) y dos exóticas: Eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) y Pino (*Pinus radiata* D. Don.), en la provincia de Chimborazo, cantón Penipe, parroquia El Altar. Un total de 360 fragmentos de foliolos provenientes de 12 individuos fueron sembrados en medio de cultivo Potato Dextrosa Agar (PDA), teniendo como resultado 37 morfotipos de hongos endófitos que fueron evaluados cada 7, 14 y 21 días y posteriormente individualizados para análisis moleculares mediante la extracción de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) de treinta de estos debido a que se descartaron aquellos que aparecieron solo una vez, se realizó el ensamblaje de secuencias y se construyeron árboles filogenéticos a partir de secuencias de nucleótidos extraídos de la región Translation Elongation Factor (TEF) 1-alpha gene. Se determinó la presencia de 9 géneros y un orden de hongos endófitos, de los cuales los más diversos fueron *Xylaria*, *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, Diaporthales con una abundancia relativa del 72,09%, mientras que el 27,91% restante perteneció a los géneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Pyrenochaeta*, *Coniochaeta* y *Phaeoacremonium*. Los análisis de índice de riqueza, cálculo de Diversidad de Shannon y Simpson indicaron que la diversidad de hongos endófitos se encontró presente en mayor proporción en las especies forestales nativas.

Palabras clave: <HONGOS>, <ENDÓFITOS>, <LAUREL AMARILLO (*Ocotea heterochroma*)>, <CEDRO (*Cedrela montana*)>, <EUCALIPTO (*Eucalyptus globulus*)>, <PINO (*Pinus radiata*)>, <Ácido Desoxirribonucleico (ADN)>, <NATIVAS>.

LUIS
ALBERTO
CAMINOS
VARGAS

Firmado digitalmente por
LUIS ALBERTO CAMINOS
VARGAS
Nombre de
reconocimiento (DN):
c=EC, l=RIOBAMBA,
serialNumber=0602766974,
cn=LUIS ALBERTO CAMINOS
VARGAS
Fecha: 2021.04.22
15:33:02 -0500



1060-DBRA-UTP-2021

ABSTRACT

The diversity of endophytic fungi associated with the foliar endosphere of two native forest species was studied: Yellow Laurel (*Ocotea heterochroma* Mez and Sodiro) and Cedar (*Cedrela montana* Moritz ex Turcz) and two exotics: Eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill) and Pine (*Pinus radiata* D. Don.). This research was conducted in the province of Chimborazo, in the town of Penipe, in El Altar zone. A total of 360 leaflet fragments from 12 individuals were seeded in Potato Dextrose Agar (PDA) culture medium, resulting in 37 morphotypes of endophytes and fungi that were evaluated every 7, 14 and 21 days. After this process, they were individualized for molecular analysis by means of Deoxyribonucleic acid (DNA) of thirty ones that appeared only once were discarded. Sequence assembly was performed, and phylogenetic trees were constructed from nucleotide sequences extracted from the Translation Elongation Factor (TEF) 1-alpha gene region. The presence of 9 genera and an order of endophytic fungi was determined, of which the most diverse were *Xylaria*, *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, Diaporthales with a relative abundance of 72.09%. On the other hand, the remaining 27.91% belonged to the genera *Trichoderma*, *Penicillium*, *Pyrenochaeta*, *Coniochaeta* and *Phaeoacremonium*. The richness index analysis, the Shannon and Simpson Diversity calculation indicated that the diversity of endophytic fungi was found to be present in a higher proportion in native forest species.

Keywords: <FUNGI>, <ENDOPHYTES>, <YELLOW LAUREL (*Ocotea heterochroma*)>, <CEDAR (*Cedrela montana*)>, <EUCALYPTUS (*Eucalyptus globulus*)>, <PINE (*Pinus radiata*)>, <Deoxyribonucleic Acid (DNA)>, <NATIVE>.

Riobamba, April 29, 2021

Translated by:



Firmado
digitalmente por
DENNYS VLADIMIR
TENELANDA LOPEZ
Fecha: 2021.04.29
21:24:14 -05'00'

Mgs. Dennys Tenelanda López

PROFESSOR OF EFL

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos, en especial los hongos, poseen una gran importancia metabólica para producir una amplia variedad de moléculas bioactivas y actualmente se utilizan para producir numerosos productos comerciales en un mercado que se estima en miles de millones de dólares. La comercialización de productos terapéuticos microbianos comenzó con el descubrimiento de la penicilina hace 70 años (Ferrara 2006). Inicialmente utilizados solamente como agentes antibacterianos, estos productos han evolucionado para los usos más diversos, que incluyen la inhibición de la biosíntesis de colesterol y terapias como la inmunosupresión en pacientes trasplantados (Cragg y Newman 2001).

A pesar de la variedad de agentes terapéuticos derivados de hongos, esta es un área con enorme potencial y en auge, ya que las estimaciones indican la existencia de 1,5 millones de especies de hongos, de los cuales solamente el 5% se ha descrito y estudiado en la literatura (Hawksworth 2001). Dentro de este grupo de hongos con gran potencial biotecnológico se encuentran los hongos endófitos, que son microorganismos que habitan los espacios intercelulares de todas las especies de plantas vivas inclusive las arbóreas, y que han sido poco estudiados teniendo un gran potencial para la exploración en la medicina, la agricultura, en la producción forestal y en la industria (Petrini 1991 citado en Vaz et al. 2018).

Los hongos endófitos al contrario de los microorganismos patógenos no causan enfermedades aparentes en sus hospederos (Petrini 1991). Así, los hongos endófitos pueden promover la sanidad de las plantas hospederas, favoreciendo el potencial adaptativo de las plantas frente a condiciones adversas generadas por el estrés del medio ambiente. Es conocido que hongos endófitos favorecen a las plantas cuando estas están sometidas a estrés hídrico, a la salinidad, al estrés oxidativo, y a la acidez del suelo o contra el ataque de insectos y microorganismos por medio de la producción de una variedad de compuestos secundarios como alcaloides, terpenoides, esteroides y compuestos aromáticos repelentes o tóxicos a sus enemigos. Esta relación de tipo simbiótico entre plantas y hongos endófitos confiere una mayor habilidad competitiva y permite un desarrollo pleno, traducido por las altas tasas de germinación y enraizamiento, mayor biomasa en los tejidos y mayor producción de semillas (Scharidl et al. 2007; Selosse, Baudoin y Vandenkoornhuyse 2004).

El estudio de la diversidad de los hongos endófitos en especies vegetales y arbóreas es de extrema importancia por proveer de informaciones fundamentales para la evaluación de la diversidad y distribución fúngica global, además de revelar nuevas ocurrencias de especies de hongos y del potencial biotecnológico que estos microorganismos poseen (Stone, Polishook y White 2004).

A. ANTECEDENTES

Los registros de los hongos endófitos provienen desde el año 1898, en donde se observó toxicidad en algunos animales que consumían semillas o partes aéreas del pasto, sin embargo esta suposición se hizo válida en 1977 por Bacon, quien relacionó la presencia del hongo *Neotyphodium coenophialum* al envenenamiento del ganado llamado síndrome de verano, en 1980 Funk sugirió que algunos hongos mutualistas defienden a la planta huésped del ataque del herbívoro, en la actualidad estos organismos son muy estudiados debido a los metabolitos secundarios que producen y tienen diversa actividad biológica (Sánchez et al. 2013).

B. PROBLEMA

Los hongos endófitos constituyen fuentes potenciales de productos biotecnológicos como metabolitos, enzimas y fitorreguladores, teniendo un rol fundamental en el crecimiento, desarrollo y sanidad de las plantas, sin embargo, actualmente no se tiene información sobre la composición y diversidad de hongos endófitos de especies forestales nativas y exóticas en el Ecuador y esta información es indispensable para implementar estrategias sustentables de manejo y aprovechamiento silvicultural.

C. JUSTIFICACIÓN

Teniendo en cuenta la importancia de los hongos endófitos en los sistemas agrícolas y forestales, este estudio representa además de la perspectiva taxonómica, de la perspectiva del conocimiento y protección de la biodiversidad, una gran alternativa para la obtención de hongos con potenciales diferenciados para investigaciones científicas y utilización en la biotecnología e industria forestal. Considerando, el papel fundamental de los hongos endófitos en los sistemas agrícolas y forestales, la gran diversidad de especies forestales nativas existentes en el Ecuador y de la ausencia de estudios de microorganismos endófitos en especies forestales en nuestro país, este trabajo propone el estudio de la composición y diversidad de hongos endófitos asociada a la endósfera foliar de especies forestales nativas y exóticas.

D. OBJETIVOS

GENERAL

- Estudiar la diversidad de hongos endófitos asociada a la endósfera foliar de especies forestales nativas y exóticas usando técnicas dependientes de cultivo.

ESPECÍFICOS

- Identificar morfológicamente los principales grupos de hongos endófitos asociados a la endósfera foliar de dos especies forestales nativas: *Ocotea heterochroma* Mez & Sodiro y *Cedrela montana* Moritz ex Turcz y dos exóticas: *Eucalyptus globulus* Labill y *Pinus radiata* D. Don.
- Caracterizar molecularmente los principales grupos de hongos endófitos asociados a la endósfera foliar de dos especies forestales nativas: *Ocotea heterochroma* Mez & Sodiro y *Cedrela montana* Moritz ex Turcz y dos exóticas: *Eucalyptus globulus* Labill y *Pinus radiata* D. Don.
- Determinar la diversidad de la microbiota endófito fúngica de la endósfera foliar de dos especies forestales nativas: *Ocotea heterochroma* Mez & Sodiro y *Cedrela montana* Moritz ex Turcz y dos exóticas: *Eucalyptus globulus* Labill y *Pinus radiata* D. Don.

E. HIPÓTESIS

NULA

Las comunidades de hongos endófitos asociadas a la endósfera foliar de especies forestales nativas y exóticas no divergen en su composición y diversidad.

ALTERNATIVA

Las comunidades de hongos endófitos asociadas a la endósfera foliar de especies forestales nativas y exóticas divergen en su composición y diversidad

CAPÍTULO 1

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 Especies forestales nativas y exóticas

El Ecuador tiene 2.616.546 millones de hectáreas de bosques que tienen como finalidad la producción forestal con fines comerciales y la contribución de la industria forestal al producto interno bruto (PIB) supera los \$ 600 millones/año, por lo que, su contribución al PIB es del 3,2 % (Ecuador Forestal 2015). En el Ecuador existen bosques nativos y exóticos. Los bosques nativos se caracterizan por la presencia de árboles y arbustos de múltiples especies que son originadas de esos hábitats, pueden ser regenerados por sucesión natural y poseen una alta biodiversidad de flora y fauna (Ecuador Forestal 2016).

Los bosques exóticos o plantaciones forestales se caracterizan por estar compuestos de árboles establecidos por plantación y/o siembra deliberada, en el cual las especies forestales plantadas son introducidas para el uso en la industria forestal. Las especies forestales exóticas tienen como principal ventaja que originan beneficios económicos a corto plazo, sin embargo, las especies forestales nativas tienen la ventaja de preservar la fauna y flora, reducir la degeneración de los suelos y preservar los nichos ecológicos (Martínez et al. 2011).

1.1.1 *Ocotea heterochroma* Mez & Sodiro

1.1.1.1 Clasificación taxonómica de *Ocotea heterochroma* Mez & Sodiro

Tabla 1-1: Clasificación taxonómica de *Ocotea heterochroma* Mez & Sodiro

Reino	Plantae
Phylum	Streptophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Laurales
Familia	Lauraceae
Género	<i>Ocotea</i>
Especie	<i>Ocotea heterochroma</i>

Fuente: (Schoch C., et al. 2020).

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

1.1.1.2 Descripción botánica y ecológica de *Ocotea heterochroma* Mez & Sodiro

El laurel amarillo (*Ocotea heterochroma* Mez & Sodiro) es una de las maderas más cotizadas en los bosques nativos y primarios. Son árboles corpulentos, poseen hojas de aproximadamente 10 cm de largura, coriáceas, con los nervios amarillentos, de los cuales el principal es aplanado y largo. Es una especie corta, de tronco muy duro y voluminoso. Crece en bosques maduros entre los 2900 y 3300 metros, con frecuencia se encuentran tocones con rebrotes y árboles aislados en potreros (Vargas, 2002: p.351).

1.1.2 *Cedrela montana* Moritz ex Turcz

1.1.2.1 Clasificación taxonómica Moritz ex Turcz

Tabla 2-1: Clasificación taxonómica de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.

Reino	Plantae
Phylum	Streptophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Sapindales
Familia	Meliaceae
Género	<i>Cedrela</i>
Especie	<i>Cedrela montana</i>

Fuente: (Schoch C., et al. 2020).

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

1.1.2.2 Descripción botánica y ecológica de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.

Árboles de hasta 35 metros de altura, con hojas de 20-55 cm de longitud, presenta de 8-13 pares de pinnas, hojas ovaladas, ápice acuminado, base esférica en ocasiones desigual, márgenes enteros; inflorescencias terminales o subterminales tirsoideas, lenticeladas, flores unisexuales nevado amarillentas, de hasta 6 cm de largo. Su distribución va desde los bosques montanos desde Venezuela hasta Perú, en la región se le encuentra desde cerca de los 1700 hasta los 3000 msnm (Vargas, 2002: p.439). Es una de las maderas más apreciadas, se emplea en obra de viviendas y ebanistería. Sus frutos son cápsulas leñosas, de hasta 6 cm de longitud y las semillas entre 2-3 cm. Se reconoce por la largura de las inflorescencias que pueden registrar hasta 40 cm (Vargas, 2002: p.439).

1.1.3 *Eucalyptus globulus* Labill

1.1.3.1 Clasificación taxonómica de *Eucalyptus globulus* Labill

Tabla 3-1: Clasificación taxonómica de *Eucalyptus globulus* Labill

Reino	Plantae
Phylum	Streptophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Myrtales
Familia	Myrtaceae
Género	Eucalyptus
Especie	<i>Eucalyptus globulus</i>

Fuente: (Schoch C., et al. 2020).

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

1.1.3.2 Descripción botánica y ecológica de *Eucalyptus globulus* Labill

Es un árbol de rápido crecimiento, posee hojas en disposición alterna, lanceoladas, la mayoría acuminadas, sus puntas curvadas y agudas en la base, nervio central bien marcado, brillantes y su textura endurecida, flores blancas y solitarias con el cáliz y corola unidos por una lámina que cubre el cáliz y el pistilo, los frutos son grandes cápsulas leñosas de hasta 2.5 cm de largo de color azabache y con gran variedad de semillas en su interior (ADEFOR,1995).

Eucalyptus globulus es la principal especie plantada sobre la meseta central entre las alturas de 1 800 y 3 300 msnm (FAO, citado en Juela, 2015: p.3). El uso principal es la producción maderera para pulpa (Vargas, 2002: p.479).

1.1.4 *Pinus radiata* D. Don

1.1.4.1 Clasificación taxonómica de *Pinus radiata* D. Don

Tabla 4-1: Clasificación taxonómica de *Pinus radiata* D. Don

Reino	Plantae
Phylum	Streptophyta
Clase	Pinopsida
Orden	Pinales
Familia	Pinaceae
Género	Pinus
Especie	<i>Pinus radiata</i>

Fuente: (Schoch C., et al. 2020).

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

1.1.4.2 Descripción botánica y ecológica de Pinus radiata D.Don

Árbol de hasta 60 m de altura y 100 cm de DAP, tronco cónico y recto, corteza café, a sus hojas se las denomina acículas y vienen dispuestas en fascículos de tres, flores masculinas con estambres peltados, las femeninas se encuentran en conos, fruto en forma estróbilos, parecido a una piña, contiene semillas aladas (Vinueza, 2013). Se cultiva para la producción de pulpa y como ornamental en parques de poblaciones de tierra fría (Vargas, 2002: p.88).

Estudios sobre diversidad de hongos determinaron que el número de especies de estos microorganismos puede ser de aproximadamente 1,5 millones. Sin embargo, se estima que de 70.000 a 100.000 especies de hongos fueron aisladas e identificadas actualmente, lo que representa apenas el 5% del total del número de hongos estimado (Hawksworth 2001). Los hongos son microorganismos de gran importancia, pues desempeñan papeles ecológicos críticos en el ciclo global del carbono y en el reciclaje de nutrientes, además de ser fundamentales para la sobrevivencia de otros organismos. Los hongos también presentan un gran potencial para la biotecnología y para la industria agrícola y forestal (Baker et al. 2008).

El término endófito fue introducido por De Bary (1866) y fue aplicado a cualquier microorganismo presente dentro del tejido de las plantas. Actualmente, el concepto que es más comúnmente utilizado es el de Petrini (1991), según el cual los hongos endófitos son aquellos microorganismos que habitan el tejido vegetal durante alguna fase de su ciclo de vida, colonizando el tejido interno de las plantas, pero sin causar enfermedad al hospedero. El concepto de Schulz y Boyle (2005) adiciona que son hongos cuya colonización nunca ocasiona síntomas visibles y enfermedad en los hospederos, en cualquier momento específico, o sea, sobre cualquier condición, no ocurrirá evidencia de síntomas y enfermedad causados por estos hongos. Estos simbioses pueden tener efectos profundos en la ecología y en la evolución de las plantas, modelando las comunidades de plantas y manifestando fuertes efectos sobre la composición de las comunidades y en la diversidad de otros organismos asociados (Omacini et al. 2001).

Los endófitos pueden ser transmitidos de forma vertical o horizontal. La transmisión vertical ocurre por medio de las semillas y está íntimamente asociada a algunas especies de plantas, por otro lado, en la transmisión horizontal el ingreso de estos microorganismos ocurre a partir del ambiente (Brem y Leuchtman 2002; Rodriguez et al. 2009; Saikkonen 2004).

De modo general, dos grandes grupos de hongos endófitos son reconocidos basados en la taxonomía, en la planta hospedera, en la función ecológica y en las diferencias evolutivas. Los endófitos Clavicipitaceous (C-endófitos) colonizan las gramíneas y los endófitos no

Clavicipitaceous (NC-endófitos) colonizan plantas no vasculares, coníferas y angiospermas (Rodríguez et al. 2009).

La colonización exitosa por endófitos depende de muchas variables, incluyendo el tipo de tejido de las plantas o el genotipo, las cepas microbianas y factores ambientales bióticos y abióticos. Adicionalmente, la diversidad de hongos endófitos puede variar en diferentes partes de la planta hospedera y en locales geográficamente distintos. Algunos estudios indican que las tasas de colonización pueden ser diferentes entre hojas, tallos y otros órganos y algunos hongos tienen especificidad por algunas familias de plantas hospederas (Durán et al. 2005; Kumar y Hyde 2004; Rubini et al. 2005).

1.2 Hongos endófitos

Las asociaciones que los hongos endófitos presentan con las plantas hospederas pueden ser complejas, ya que estos hongos colonizan los tejidos vivos del hospedero. La interacción entre endófitos y hospederos puede variar de mutualismo a parasitismo y depende del estado fisiológico, de las especies y de los constituyentes químicos de la planta. Además de eso, las condiciones abióticas también afectan estas interacciones (Gilbert y Strong 2007). Los hongos endófitos pueden haber desarrollado estrechas asociaciones biológicas y el resultado de estas asociaciones se refleja en la producción de sustancias bioactivas por el hongo endófito (Stone, Bacon y White 2000). Los 16 metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos en sus hospederos pueden ser utilizados como defensas bioquímicas contra herbívoros, patógenos y otros organismos competidores (Strobel 2006; Schulz y Boyle 2005).

El potencial del uso de hongos endófitos como agentes en el control biológico de enfermedades y plagas en sistemas agrícolas y forestales, en la inducción de la resistencia en los hospederos, en la promoción del crecimiento vegetal, en el aumento de la tolerancia al estrés por sequía o calor y en la producción de metabolitos secundarios de interés para la salud humana ha sido demostrado en diferentes estudios (Arnold y Herre 2003; Cao et al. 2009; Dingle y Mcgee 2003; Márquez et al. 2007; Mousa y Raizada 2013; Wang et al. 2013). La diversidad oculta de hongos endófitos en los ecosistemas forestales puede tener un rol importante, mejorando la idoneidad de todo el ecosistema forestal (Terhonen et al. 2019).

1.3 Técnicas de aislamiento de hongos endófitos

Los estudios de diversidad de la comunidad cultivable de hongos endófitos o por técnicas dependientes de cultivo de tejido foliar de plantas son basados principalmente en el aislamiento por medio de la fragmentación de tejidos del hospedero en medios de cultivo apropiados (Hata,

Atari y Sone 2002; Lin et al. 2007; Wang et al. 2007; Rakotoniriana et al. 2008; Joshee et al. 2009; Zhang, Nagabhyru y Schardl 2009). Sin embargo, la composición de especies observada al utilizar este método es afectada por el tamaño del fragmento foliar, favoreciendo especies dominantes y de crecimiento rápido (Gamboa, Laureano y Bayman 2003; Rakotoniriana et al. 2008). La mayoría de los estudios de aislamiento de hongos endófitos del tejido foliar han usado fragmentos muy grandes y si estos estudios fuesen repetidos, usando fragmentos de tamaño pequeño, otras especies fúngicas pueden ser reveladas, o que permitiría un mejor entendimiento de la diversidad real de hongos endófitos (Gamboa, Laureano y Bayman 2003).

Así, las nuevas metodologías de aislamiento han sido exploradas para la obtención de mejores resultados. Entre esas metodologías está el método de filtración de partículas utilizado primeramente en el aislamiento de hongos de la serrapilhera (BILLS et al. 2004). Este método permite cuantificar una mayor diversidad de aislados fúngicos debido a la separación de los fragmentos de esa planta en partículas pequeñas lo que permite aislar especies raras, dado que el número de especies aumenta importantemente con la disminución de la densidad de tejido colonizado. Esas partículas son generalmente plaqueadas en un medio de cultivo conteniendo antibióticos para retardar el crecimiento de bacterias y de hongos de crecimiento rápido, lo que favorece a la obtención de especies (Paulus, Gadek y Hyde 2003; Collado et al. 2007; BILLS et al. 2004).

La utilización del método de filtración de partículas asociada al cultivo por extinción (Collado et al. 2007), adaptado por Unterseher y Schnittler (2009), para el aislamiento de hongos endófitos se basa de que la diversidad de especies cultivables aumenta con la reducción de la densidad de inóculo asociada a una extinción, en el sentido común de reducción del número de partículas que son plaqueadas y en la reducción del área plaqueada.

1.4 Usos biotecnológicos potenciales de hongos endófitos para la producción sustentable

El descubrimiento de nuevos compuestos químicos naturales es muy importante para la formulación de nuevos medicamentos y los hongos endófitos han recibido cada vez más atención debido a la producción de compuestos bioactivos, especialmente aquellos exclusivos de sus plantas hospederas, estos hongos son importantes no solamente a partir de una perspectiva ecológica, sino también desde el punto de vista bioquímico y molecular (Kusari, Hertweck y Spiteller 2012). Desde la descubierta de la penicilina y su aplicación, el siglo XX acompañó la descubierta, el aislamiento y la caracterización química de una amplia variedad de productos naturales a partir de hongos, incluyendo alcaloides, terpenoides, flavonoides, ácidos fenólicos, quinonas, esteroides y otros (Hoffmeister y Keller 2007; Tan y Zou 2001). Algunos compuestos obtenidos de endófitos presentan funciones antibióticas y de control biológicos (Gunatilaka 2006; Strobel 2006; Tan y Zou 2001).

En relación al control biológico, este puede ser definido como un producto conteniendo organismos vivos, sus metabolitos activos y/o subproductos con actividad directa en la fisiología de la planta y/o control de enfermedades de plantas (Wilson 1997). En experimentos utilizando hongos endófitos in vitro fue demostrado que algunas especies de hongos endófitos presentaron la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos. Los hongos endófitos *Alternaria tenuissima*, *Thielavia subthermophila*, *Alternaria* sp., *Nigrospora oryzae*, *Colletotrichum truncatum* y *Chaetomium* sp. inhibieron el crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Fusarium oxysporum* (Kumar et al. 2011; Kumar y Kaushik 2013).

El hongo endófito *Acremonium zeae* produce el antibiótico pirrocidina (A e B), que tiene actividad antifúngica significativa contra los hongos productores de micotoxinas *Aspergillus flavus* y *Fusarium verticillioides* (Wicklów y Poling 2009). Adicionalmente, hongos pertenecientes al género *Phomopsis* son conocidos como productores de metabolitos secundarios con actividades biológicas diversas, incluyendo compuestos antimicrobianos, antifúngicos, antimaláricos y antitumorales.

Los metabolitos secundarios biosintetizados por hongos endófitos, tienen un papel muy importante dentro de la industria biotecnológica, un claro ejemplo de estos compuestos es la fuente latente de fármacos está representado por el taxol, un diterpeno obtenido del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*), que es muy usado en enfermedades cancerígenas de ovario y de mama, además de otras aplicaciones en enfermedades proliferativas de los tejidos (Wani et al. 1971).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Materiales y métodos

2.1.1 Caracterización del lugar

2.1.1.1 Localización

Los foliolos de las especies forestales nativas y exóticas fueron colectados en el campo de la parroquia el Altar, localizado en el cantón Penipe, provincia de Chimborazo. El material colectado fue almacenado, identificado y transportado hasta el Laboratorio de Fitopatología de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

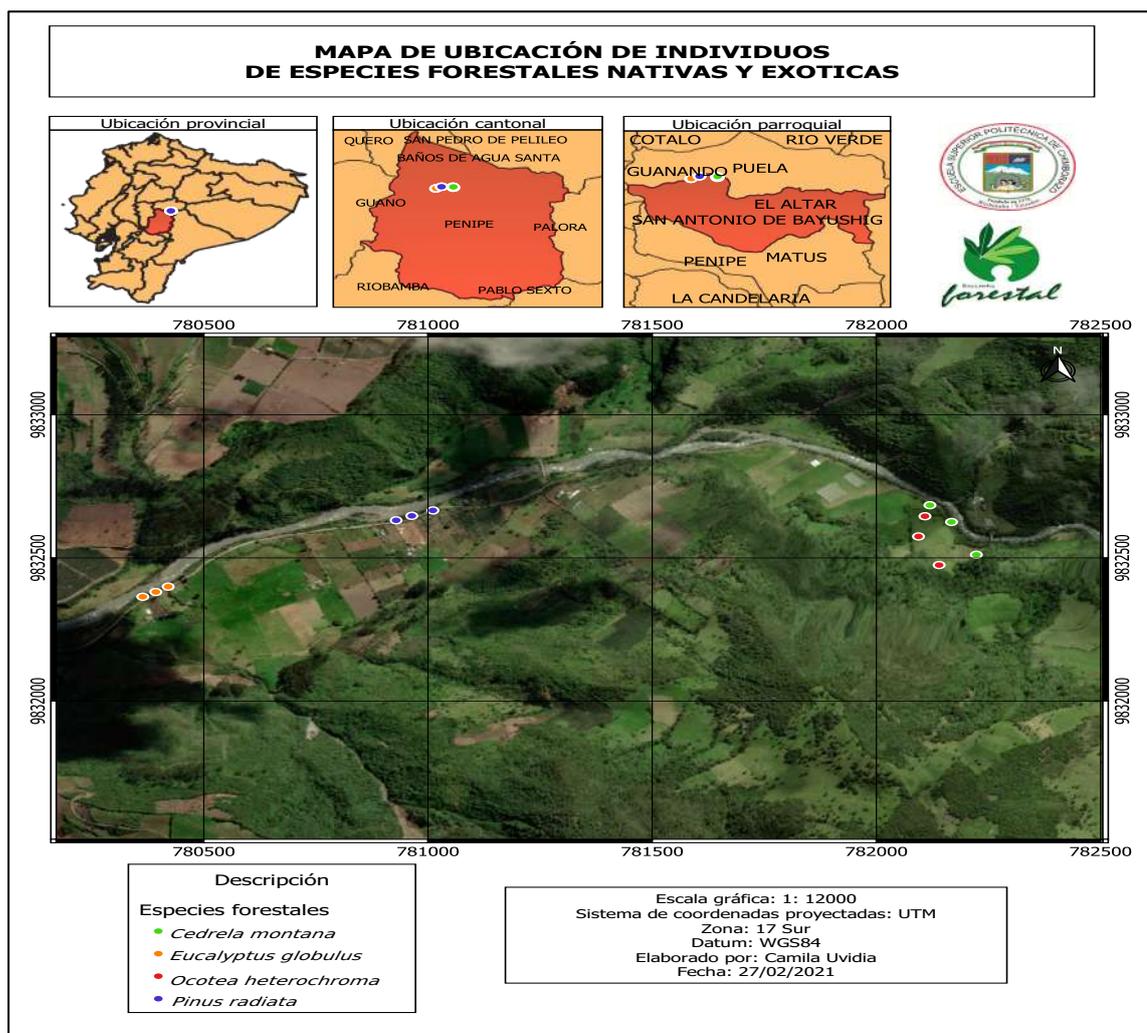


Figura 1-2: Georreferenciación del lugar de investigación.

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

2.1.1.2 *Ubicación geográfica*

Altitud: 2622 msnm

Coordenadas UTM

X: 781426

Y: 9831183

2.1.1.3 *Características climáticas*

Temperatura media anual: 13.8 °C

Precipitación media anual: 571.8 mm

Humedad relativa: 48,80 % (INAMHI, 2019).

2.1.2 *Materiales y equipos*

2.1.2.1 *Materiales de campo*

- Libreta de apuntes, cámara fotográfica, marcador, bolsas de papel, caja de espuma flex, GPS, podón aéreo, pintura

2.1.2.2 *Material biológico*

- 360 fragmentos de foliolos de *Ocotea heterochroma* Mez & Sodiro, *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, *Eucalyptus globulus* Labill y *Pinus radiata* D. Don.

2.1.2.3 *Medios de cultivo*

- Potato Dextrosa Agar (PDA Difco™)
- Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA)

2.1.2.4 *Materiales de laboratorio*

- Mechero bunsen, puntas de micropipetas (1000 µL), cajas de petri de vidrio (90 mm Ø), matraz erlenmeyer (500 mL), microtubos (1.5 mL), bisturí, pinzas de laboratorio (longitud 200 mm), vaso de precipitación (100 mL), probeta graduada (500 mL), placas porta y cubre objetos, marcador permanente punta fina, antibióticos (Cloramphenicol, Streptomycina)

2.1.2.5 *Equipos de laboratorio*

- Cámara de flujo laminar vertical (BIOBASE BSC-1500IIA2-X) 20, autoclave (BKQ-B100II), microscopio óptico (LEICA DM 150), microscopio óptico (SWIFT M10), baño María (CENCO 97013-16), destilador de agua (BOECO WS 8000), incubadora

(J.P.SELECTA 2001249), balanza de precisión (RADWAG AS220.R2), secador de vidrio (SELECTA 2000381)

2.1.2.6 *Insumos de laboratorio*

- Solución lactoglicerol, alcohol al 75 %, hipoclorito de sodio al 1 % (clorox), agua desionizada estéril, fundas plásticas transparentes de polietileno (20 x 40 cm), papel toalla, papel aluminio, cinta adhesiva

2.1.2.7 *Materiales y equipos de oficina e informáticos*

- Computadora, impresora, hojas de registro, papel de impresión.

2.2 Metodología

2.2.1 *Fase de campo*

2.2.1.1 *Recolección de foliolos de especies forestales nativas y exóticas*

Para la recolección se eligieron 3 individuos de cada especie en estudio, una vez identificado el árbol, se procedió a fotografiar cada uno de estos, después fue marcado con pintura, se señaló: árbol 1, árbol 2, árbol 3. Seguidamente se registraron las coordenadas UTM de donde se encontró ubicado el individuo. Posteriormente se localizó una rama del individuo donde se visualizó aspecto de foliolos sanos y se la cortó con ayuda de un podón aéreo, se eligieron de 6 a 8 foliolos que presentaron mejor estado y se recolectó en una bolsa de papel, se las etiquetó y se las insertó en una hielera térmica para asegurar que el material se conserve fresco.

Este procedimiento se realizó para todas las especies en estudio: *Ocotea heterochroma* Mez & Sodiro, *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, *Eucalyptus globulus* Labill y *Pinus radiata* D. Don. Se obtuvo un total de 12 árboles identificados, etiquetados, georreferenciados y sus respectivos foliolos recolectados, para la presente investigación se realizaron 2 colectas, la primera en el mes de agosto y la segunda en el mes de octubre. Finalmente se llevaron las muestras para continuar con el estudio en laboratorio (ANEXO A).

2.2.2 Fase de Laboratorio

2.2.2.1 Aislamiento de hongos endófitos de especies forestales nativas y exóticas

El método utilizado fue el propuesto por (Souza et al. 2004). Las muestras foliares de 5 cm fueron sometidas a la desinfestación superficial con alcohol al 70% durante 1 min seguido de hipoclorito de sodio al 2 % durante 1 min y tres lavados con agua destilada estéril. Para controlar la desinfestación 50 µL de agua del último lavado fue plaqueado en medio de cultivo PDA. De las hojas desinfestadas se eliminaron los bordes, obteniendo muestras de 0,5 cm² que posteriormente fueron colocadas en PDA con Cloramphenicol 50 ppm y Streptomycina 50 ppm. En cada caja con medio de cultivo se depositaron 5 fragmentos de hoja equidistantes de cada especie forestal desinfestada (ANEXO B). Las cajas fueron colocadas y mantenidas en incubadora a una temperatura de 24 °C sin exposición a la luz y después de 7,14 y 21 días fueron evaluadas y transferidas a nuevas cajas Petri con PDA para la individualización de las colonias.

2.2.2.2 Caracterización cultural de hongos endófitos

Para la caracterización cultural de los aislados de hongos endófitos provenientes de la endósfera foliar de especies forestales nativas y exóticas, se realizó la individualización de colonias en medio de cultivo PDA, se los mantuvo en la incubadora a 24 °C entre 7 y 14 días, este periodo varió por cuanto el crecimiento del hongo fue indefinido por el tiempo en el que tardó en desarrollarse, para la descripción macroscópica se usó el manual de Micología descrito por Shtayeh, et al. (1998: p.11), para ello se evaluaron parámetros como: color de la colonia, cambios del mismo de acuerdo al medio en el que creció, textura de la superficie de la colonia, borde, forma y elevación de la colonia. Para determinar el color miceliar se usó una guía digital de colores PANTONE.

2.2.2.3 Caracterización morfológica mediante observación de estructuras microscópicas

Para la identificación de estructuras fúngicas se realizaron dos métodos: el método de microcultivo y realización de placas de colonias reactivadas en medio de cultivo PDA y SNA. Para el método de microcultivo se siguió la metodología utilizada por Mafia y Alfenas (2016: pp.216-217) colocando papel filtro en la base de la caja petri, seguido de un bastón de vidrio como base que sirvió de soporte de la placa porta objetos, se colocó un fragmento de medio de cultivo (SNA) con cerca de 1 cm² de área y 2 mm de espesor, se transfirió un fragmento de micelio e inmediatamente se colocó la placa cubre objetos, la lámina quedó fijada y para ello se presionó ligeramente con un bisturí, transcurridos los 3-18 días dependiendo del cultivo se revisó el

crecimiento, se observaron las estructuras y esporas del aislado con el lente 40X del microscopio óptico, es importante recalcar que todos los materiales deben estar previamente esterilizados (Mafia y Alfenas, 2016: p.216-217).

Para el segundo método se prepararon placas porta objetos con una gota de lactoglicerol, se colocó una porción de micelio que fue transferido mediante un bastón metálico, se lo cubrió con una placa cubre objetos, también se adhirió una pequeña proporción de micelio con el bastón metálico en cinta adhesiva y se lo pegó en una placa porta objetos previamente preparada con lactoglicerol, esto se lo realizó con el objetivo de que las estructuras no se fragmenten, el micelio con el que se trabajó sobre la placa creció en medio de cultivo PDA Y SNA, fue importante tener a los ejemplares en los dos medios de cultivo para verificar en cuál de ellos se desarrollaron y se observaron de mejor manera las estructuras reproductivas de los hongos. Se evaluaron 20 conidias de cada aislado fúngico y se consideraron las variables dimensión (μm) y forma, número de septos, color, dimensión de los conidióforos en el caso de encontrarlos en los microcultivos, número de ápices basales y apicales en el caso de *Pestalotiopsis*, además se evaluó el grosor (μm) de 4 hifas por cada cultivo, para la determinación final de dimensiones se realizó un promedio. Las estructuras evaluadas se compararon con literatura especializada, según Gary y Hebbar (2015: pp.120-121) para la descripción de estructuras del género *Trichoderma*, para el caso de *Pestalotiopsis* se usó la descripción microscópica descrita por Maharachchikumbura, et al. (2014: pp. 121-186). La caracterización morfológica se realizó de acuerdo a los resultados del análisis molecular, que determinó 9 géneros y un orden.

2.2.2.4 Conservación de cepas

Para este procedimiento se siguió la metodología utilizada por (Mafia y Alfenas, 2016: pp.94-95). En donde se sugiere el almacenamiento en agua por método de Castellani ya que es muy utilizado para almacenar aislados fúngicos. Para hongos u organismos crecidos en medio sólido, por tiempo suficiente que permitió la retirada de los discos de cultivo con micelio, los cuales fueron colocados en micro tubos estériles con aproximadamente 1 ml de agua destilada estéril, se colocaron 5 discos por cada micro tubo, se conservaron a una temperatura de 10 °C o se los llevó a una refrigeradora para que estos se mantengan hidratados.

2.2.2.5 Identificación molecular de hongos endófitos aislados

Para la extracción de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) se utilizó aproximadamente 50 mg de micelio de hongos que estuvieron en crecimiento durante 15 días a una temperatura de 24 °C en medio de cultivo PDA después de su individualización y evaluación final. El ADN genómico fue extraído siguiendo el protocolo de Id Gen, 2021 (ANEXO C).

Para la amplificación de hongos se utilizaron los primers EF1-983F /2218R (Tabla 1-2), siguiendo el protocolo de desnaturalización inicial de 95 °C por 5 minutos, seguido de una desnaturalización de 33 ciclos a 95 °C por 30 segundos, un anhelamiento de 57 °C durante 30 s, una extensión a una temperatura de 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C durante 10 minutos, para la amplificación se usó la enzima Green goTaq®.

Tabla 1-2: Detalle de los primers utilizados para el proceso de amplificación

PCR PRIMERS	Pares de oligonucleótidos iniciadores	REFERENCIA
EF1-983F	GCY CCY GGH CAY CGT GAY TTY AT	Rehner y Buckley (2005)
EF1-2218R	ATG ACA CCR ACR GCR ACR GTY TG	Rehner y Buckley (2005)

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

Los productos fueron purificados y se enviaron a secuenciar en MACROGEN KOREA, mediante el método Sanger, Garrigues (2017) indicó que en este procedimiento una hebra de ADN complementaria a una hebra usada como modelo se redujo secuencialmente en presencia de una ADN polimerasa, que constituyó cuatro desorribonucleicos de la secuencia de ADN (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) y cuatro didesoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP). Cuando la ADN polimerasa se incorporó aleatoriamente en ddNTP, la reacción se detuvo, por lo que se generaron fragmentos de diferentes longitudes con el mismo terminal ddNTP.

Los electroferogramas obtenidos fueron editados manualmente en el programa SeqAssem v7/2008 en donde las secuencias consenso fueron ensambladas, se realizó una identificación utilizando la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando la restricción `nucleotide pubmed[filter]` con el objetivo de que las comparaciones se realicen con secuencias asociadas a publicaciones científicas.

2.2.3 *Análisis de datos en Software*

2.2.3.1 *Análisis Filogenético*

Para este procedimiento, se descargaron las secuencias de pares de bases de ADN de los géneros de interés en el NCBI en la opción nucleótidos para realizar la comparación, se seleccionaron las cadenas y fueron descargadas en formato FASTA, una vez obtenidas las secuencias fueron copiadas en el editor de texto Notepad++ incluyendo la secuencia obtenida del análisis molecular.

Posteriormente se trabajó en el programa MEGAX (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), se seleccionaron las secuencias y se realizó un alineamiento con la herramienta MUSCLE, se verificaron los exones y los intrones para realizar un corte de las cadenas en el inicio y final, se guardó el documento en formato FASTA y se continuó con el proceso de análisis filogenético, se trabajó con la opción de Test Maximum Parsimony Tree, para generar el árbol filogenético se eligió una prueba de arranque de 1000 repeticiones, un 95% de nivel de corte, realizado el árbol se concluyó con un análisis de los porcentajes de nuestra secuencia, se comparó y verificó el género del hongo en estudio con las otras secuencias, comparando así sus ancestros comunes. Se construyeron un total de 9 árboles filogenéticos: uno por cada género producto de la identificación molecular, las secuencias con las que se trabajó se detallan en el ANEXO F.

2.2.3.2 Cálculo de la diversidad de la microbiota endófito fúngica de la endósfera foliar de especies forestales nativas y exóticas

Para el cálculo de la diversidad microbiota endófito fúngica se observó la frecuencia de cada morfotipo mediante la realización de matrices y se estableció el número de veces que el morfotipo se repitió, se tabularon los datos en una planilla formato (.xlsx), se usó el programa iNEXT desarrollado por Hsieh, et al. (2013) junto con el programa R 1.4 que estimó el número de especies efectivas y calculó la diversidad de Shannon y Simpson.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

3.1 Hongos endófitos obtenidos de especies forestales nativas y exóticas

3.1.1 Abundancia relativa

Se obtuvieron 37 morfotipos de los cuales el filo fúngico de todos los morfotipos fue Ascomycota (100%), el 100% representó a la clase Sordariomycetes. El orden más abundante presente fue Xylariales con 45,74%, en segundo lugar estuvo presente el orden Glomerellales con 24,03%, en tercer y cuarto lugar Diaporthales y Eurotiales con 10,08% y 3,88% respectivamente, el 10,76% corresponde a Hypocreales, Eurotiales y Coniochaetales, el 1,56% representa a Pleosporales y Togniniales. Después de realizados los análisis moleculares el 2,33% no se pudo identificar y el 5,43% pertenece a los singletons razón por la que no fueron considerados para análisis posteriores en esta investigación.

Además, se evaluó la abundancia por familia con un 27,13% para Xylariaceae, 24,03% para Glomerellaceae, 10,85% para Sporocadaceae, 7,75% para Apiosporaceae, el 12,42% pertenece a las familias Hypocreaceae, Aspergillaceae, Coniochaetaceae, Cucurbitariaceae, Togniniaceae y el 17,83% no se pudo clasificar a nivel de familia.

El género más común encontrado en la microbiota endófito fúngica de la endósfera foliar fue *Xylaria* con 27,13%, el segundo *Colletotrichum* 24,03%, el tercero más diverso *Pestalotiopsis* con 10,85 %, en cuarto lugar *Arthrinium* con 7,75%, el 12,41% perteneció a los géneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Pyrenochaeta*, *Phaeoacremonium* y *Coniachaeta* y el 17,83% restante abarcó a morfotipos que no lograron clasificarse a nivel de género (Gráfico 1-3).

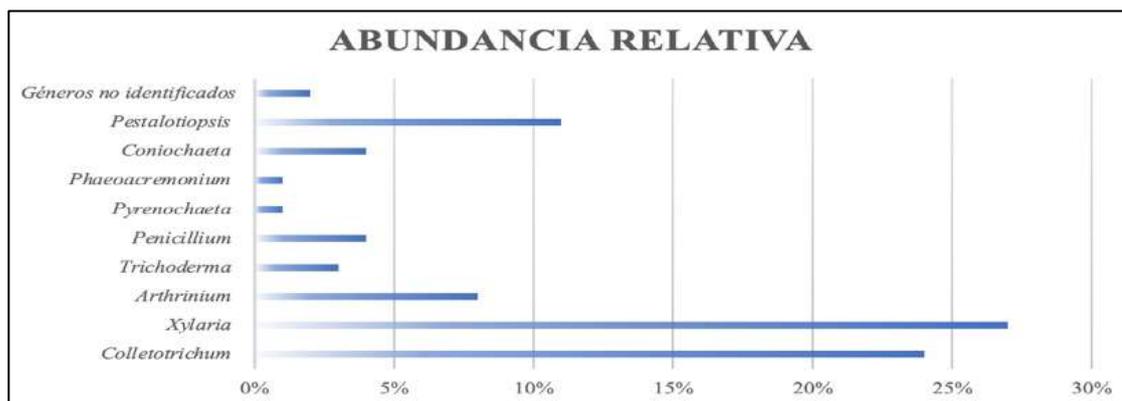


Gráfico 1-3. Abundancia relativa de géneros de endófitos fúngicos (%) de la endosfera foliar de especies forestales nativas y exóticas.

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

Xylaria fue el género en común presente en la microbiota endófito fúngica de la endósfera foliar de las dos especies forestales nativas y dos exóticas. *Colletotrichum* estuvo presente en las dos especies forestales nativas en estudio: *Ocotea heterochroma* Mez & Sodiro, *Cedrela montana* Moritz ex Turcz. Y en una exótica *Eucalyptus globulus* Labill.

El género *Arthrinium* estuvo concurrente en foliolos de *Ocotea heterochroma* Mez & Sodiro y *Pinus radiata* D.Don. El Orden Diaporthales fue únicamente encontrado entre especies nativas *Ocotea heterochroma* Mez & Sodiro, *Cedrela montana* Moritz ex Turcz., el género *Trichoderma* solo estuvo presente en la endósfera foliar de *Cedrela montana* Moritz Ex Turcz. *Penicillium* fue aislado de *Cedrela montana* Moriz ex Turcz y *Eucalyptus globulus* Labill. *Pyrenochaeta* y *Phaeoacremonium*, fueron géneros hallados de nomófilos de *Eucalyptus globulus* Labill. Los géneros *Coniochaeta* y *Pestalotiopsis* estuvieron presentes en *Pinus radiata* D.Don.

Esto demuestra la estrecha relación de géneros, algunos endófitos fúngicos solo se encuentran presentes entre nativas, otros entre exóticas, mientras que otros géneros presentes compartieron relación nativas:exóticas. Estos resultados muestran coocurrencia con estudios realizados por Pérez-Jaramillo, Mendes y Raaijmakers (2016), quienes nos indican que cuando existen especies introducidas influye la composición de la comunidad microbiana. Por otra parte una investigación realizada por Gamboa, Laureano y Bayman (2003) en fragmentos de foliolos de *Guarea guidonia* mostró a *Colletotrichum* y *Xylaria* como resultado del aislamiento de hongos endófitos, esto concuerda con dos de los géneros aislados de la presente investigación.

3.1.2 Caracterización morfológica, molecular y filogenética de 9 géneros y un orden hallados en la endósfera foliar de especies forestales nativas y exóticas

3.1.2.1 Género: *Colletotrichum*

Tabla 1-3: Clasificación taxonómica del género *Colletotrichum*

Reino	Fungí
Phylum	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Glomerellales
Familia	Glomerellaceae
Género	<i>Colletotrichum</i>

Fuente: (Schoch C., et al. 2020).

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021

***Colletotrichum* descripción de características macroscópicas y microscópicas**

Las colonias de *Colletotrichum* crecidas en medio de cultivo PDA durante 7 días a 24°C presentaron forma circular y borde entero. El micelio mostró una elevación de tipo convexa y una coloración blanquecina con un anillo central color rosáceo (Fig. 1-3 A-D). Colonias con elevación de tipo cúpula presentaron colores grisáceos y bordes algodonosos blanquecinos (Fig. 1-3 B-F). Colonias completamente blanquecinas y ligeras manchas rosáceas, con elevación de tipo cúpula (Fig. 1-3 C-G-H). Colonia con elevación de tipo cúpula, presentó un mosaico de colores: rosáceo, gris y negro (Fig. 1-3 E).

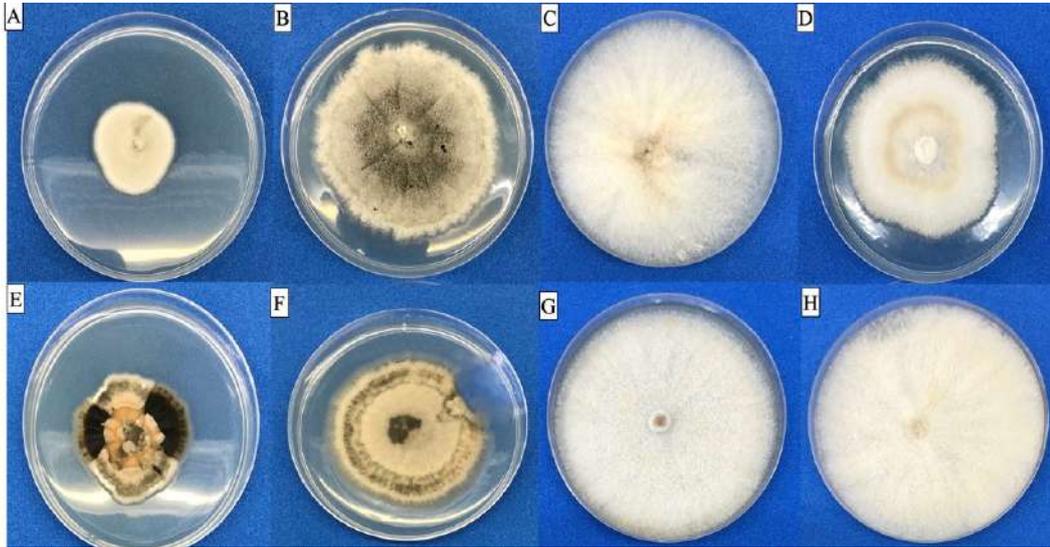


Figura 1-3. Colonias aisladas ejemplares del género *Colletotrichum* en medio de cultivo PDA

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

Conidias ovoides, unicelulares, hialinas, la longitud se presentó desde los 0,5 μ m hasta los 0,7 μ m, y un ancho promedio de 0,25 μ m (Fig. 2-3 A-C). Se observó la presencia de conidióforos junto con conidias (Fig. 2 B). Hifas hialinas y septadas de 0,28 μ m de ancho (Fig. 2-3 D).

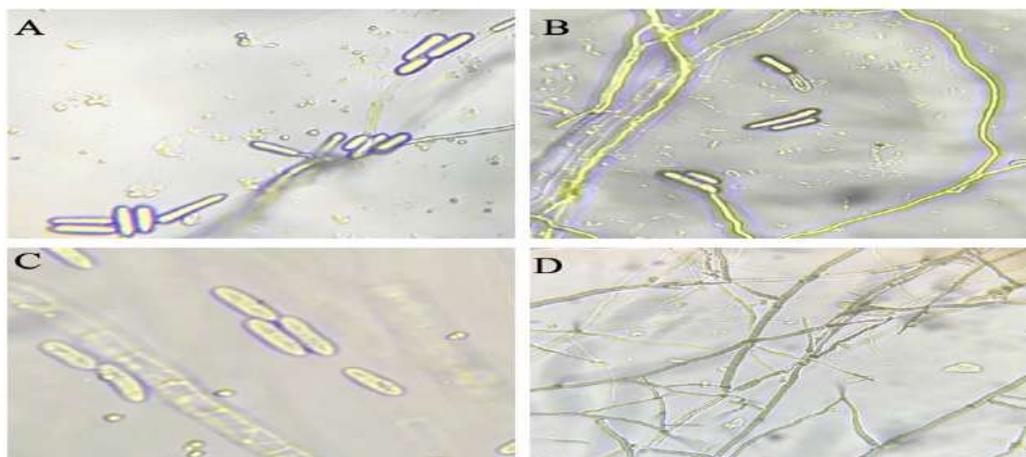


Figura 2-3. Microcultivo de *Colletotrichum* observado al microscopio con el lente 40X.

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

Las características culturales fueron similares a las descritas por Castro, et al. (2003) donde se describió que el color micelial del género *Colletotrichum* va desde crema, blanquecino a grisáceo, además estudios realizados por Dam, et al. (2012) coinciden que las características morfológicas fueron similares a las encontradas en este género.

Identificación molecular y árbol filogenético de *Colletotrichum* de secuencias TEF (Translation Elogation Factor) 1-alpha gene.

Para la construcción del árbol filogenético se combinaron todas las secuencias que mostraron pertenecer al género *Colletotrichum* producto del análisis molecular y de la búsqueda realizada en BLAST del NCBI de los hongos endófitos de la endósfera foliar de especies forestales nativas y exóticas realizada con la región TEF1- α (Tabla 2-3).

Tabla 2-3: Identificación de las secuencias TEF1- α del género *Colletotrichum* mediante BLAST en el GenBank.

CÓDIGO	ESPECIE DE AISLAMIENTO	GÉNERO	IDENTIDAD (%)	ACCESIÓN
H13	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Colletotrichum</i>	91,87	<u>GU994508.1</u>
H14	<i>Cedrela montana</i>	<i>Colletotrichum</i>	94,8	<u>GU994490.1</u>
H15	<i>Ocotea heterochroma</i>	<i>Colletotrichum</i>	95,27	<u>GU994490.1</u>
H16	<i>Cedrela montana</i>	<i>Colletotrichum</i>	91,86	<u>GU994508.1</u>
H17	<i>Ocotea heterochroma</i>	<i>Colletotrichum</i>	95,02	<u>GU994494.1</u>
H18	<i>Ocotea heterochroma</i>	<i>Colletotrichum</i>	91,96	<u>GU994508.1</u>
H19	<i>Cedrela montana</i>	<i>Colletotrichum</i>	95	<u>GU994490.1</u>
H20	<i>Cedrela montana</i>	<i>Colletotrichum</i>	91,88	<u>GU994508.1</u>

Fuente: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

El número de los nudos representó el porcentaje del valor de arranque en 1000 réplicas, cada rama posee un código inicial, que pertenece al acceso a GenBank. El árbol mostró que se obtuvieron altos porcentajes que demostraron relación filogenética entre las secuencias obtenidas de hongos endófitos de *Colletotrichum* aisladas de *Ocotea heterochroma*, *Cedrela montana* y *Eucalyptus globulus* con cadenas de nucleótidos almacenadas en el GenBank, todos los aislados se agruparon por lo que es posible que pertenezcan a un mismo grupo. El grupo externo utilizado fue *Rhizopus oryzae*. (Fig. 3-3). No existen suficientes secuencias TEF1- α almacenadas en el GenBank, por lo que resultó complejo llegar a que especie pertenecen los aislados obtenidos.

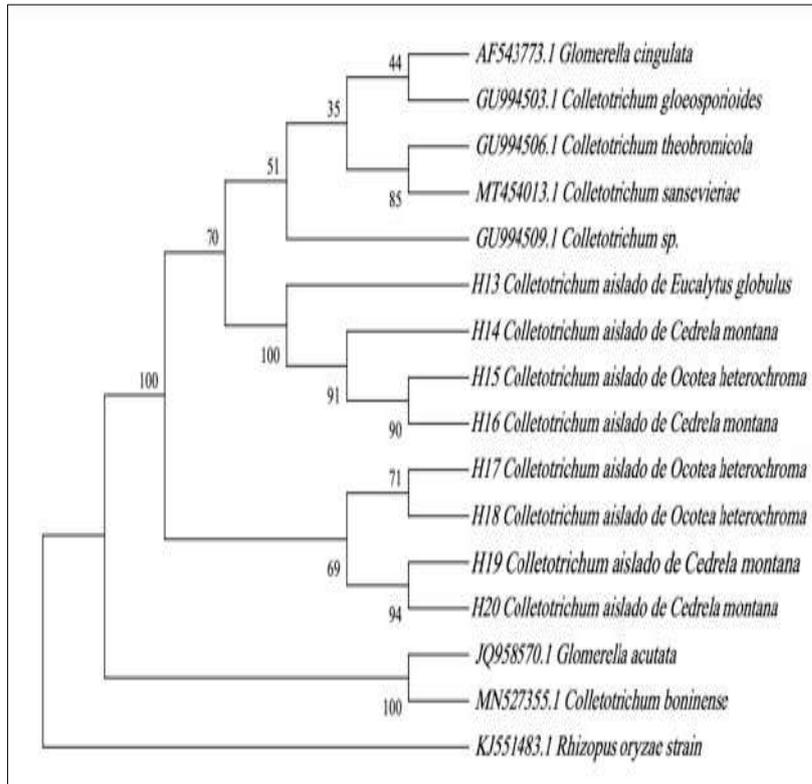


Figura 3-3. Árbol filogenético de *Colletotrichum* inferido a partir del método de máxima parsimonia.

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

En BLAST de secuencias obtenidas producto del análisis molecular coinciden con las secuencias del artículo *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. asociado a *Theobroma cacao* y otras plantas en Panamá: las filogenias multilocus distinguen a los patógenos asociados al hospedero de los endófitos asintomáticos. Si bien es cierto que *Colletotrichum* es un género reportado en varios estudios por su patogenicidad, como en la investigación realizada por Than, et al. (2008) quienes señalan a este género como potencial de infección sobre todo con enfermedades relacionadas a la antracnosis, no obstante, otros estudios como los realizados por Bettucci, et al. (1999) indicaron que *Colletotrichum* estuvo presente en la microbiota endofítica de ramas sanas de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus grandis*.

3.1.2.2 Género: *Pestalotiopsis*

Tabla 3-3: Clasificación taxonómica del género *Pestalotiopsis*

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Xylariales
Familia	Sporocadaceae
Género	<i>Pestalotiopsis</i>

Fuente: (Schoch C., et al. 2020).

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

***Pestalotiopsis* descripción de características macroscópicas y microscópicas**

Las colonias en medio de cultivo PDA evaluadas a los 15 días presentaron colores beige, amarillentas con manchas grises y micelio aéreo algodonoso color blanquecino, forma filamentosa, elevación de tipo cúpula y un borde ondulado (Fig. 4-3 A-B-C).

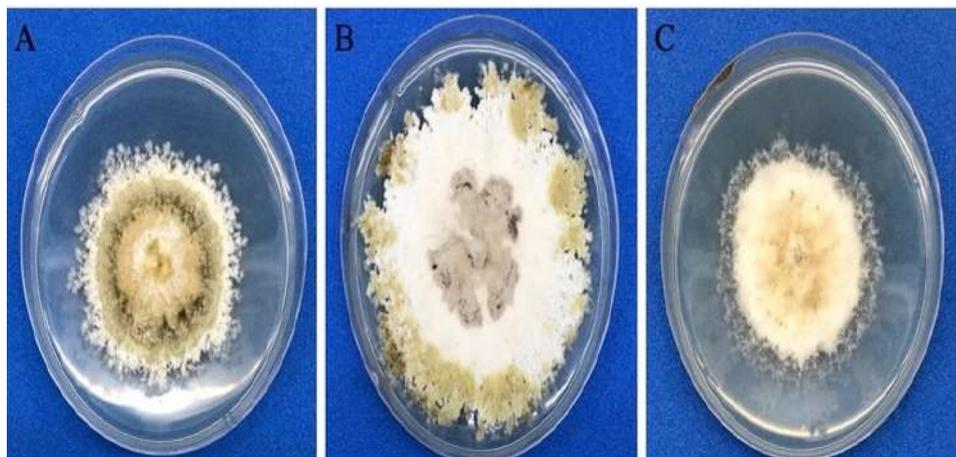


Figura 4-3. Colonias aisladas ejemplares del género *Pestalotiopsis* en medio de cultivo PDA.

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

Las conidias estaban constituidas por 4 células, presentaron 3 septos, la célula apical fue hialina y las otras células versicolores (Fig. 5-3 A-B), las conidias formadas de 3 apéndices apicales y un apéndice basal con una longitud de aproximadamente $0,7\mu\text{m}$ y un ancho promedio de $0,25\mu\text{m}$ (Fig. 5-3 B). Las hifas fueron septadas y hialinas, con un grosor de $0,5\mu\text{m}$ (Fig. 5-3 C).

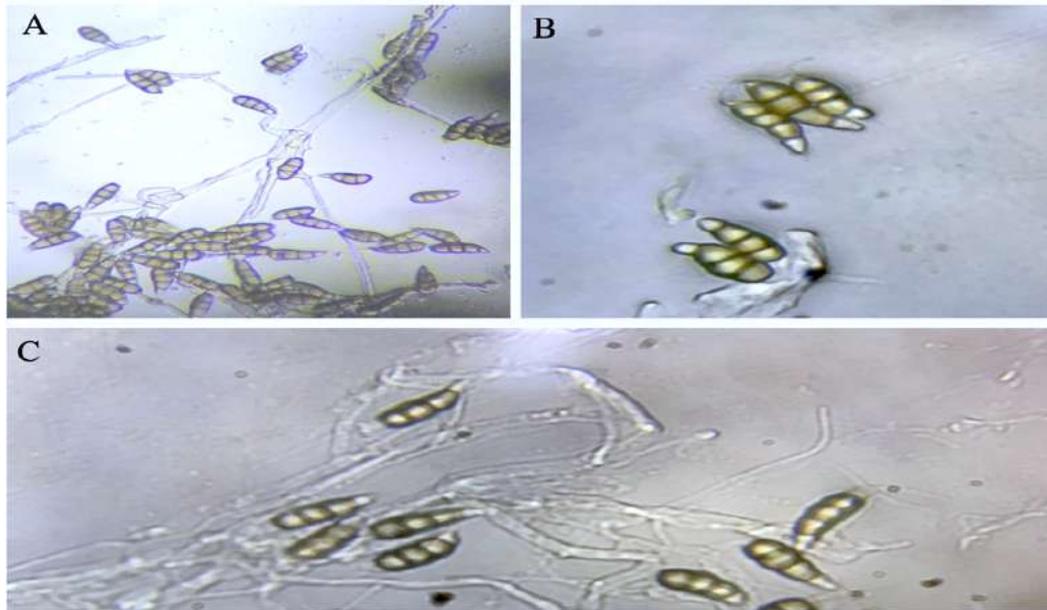


Figura 5-3. Microcultivo de *Pestalotiopsis* observado al microscopio. A lente 40X, B-C lente 100x.

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

La caracterización cultural y morfológica coincide con la descrita por Maharachchikumbura et al. (2014) donde se describe la presencia de micelio aéreo denso y blanquecino con manchas color amarillentas. Sin embargo difiere en la descripción de estructuras microscópicas en el trabajo de investigación realizado por Limón (2017: p.32) quien describe que cada conidia presentó 5 células, 2 hialinas en los extremos y 3 versicólicas en el centro.

Identificación molecular y árbol filogenético de *Pestalotiopsis* de secuencias *TEF* (*Translation Elogation Factor*) *1-alpha* gene.

Para la construcción del árbol filogenético se combinaron todas las secuencias que mostraron similitud con el género *Pestalotiopsis* producto del análisis molecular y de la búsqueda realizada en BLAST del NCBI de los hongos endófitos obtenidos de la endósfera foliar de la especie forestal exótica *Pinus radiata* realizada con la región *TEF1- α* (Tabla 4-3).

Tabla 4-3: Identificación de las secuencias *TEF1- α* del género *Pestalotiopsis* mediante BLAST en el GenBank.

CÓDIGO	ESPECIE DE AISLAMIENTO	GÉNERO	IDENTIDAD %	ACCESIÓN
H21	<i>Pinus radiata</i>	<i>Pestalotiopsis</i>	98,41	MN795055.1
H22	<i>Pinus radiata</i>	<i>Pestalotiopsis</i>	98,16	MN795055.1

Fuente: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

El número de los nudos representó el porcentaje del valor de arranque en 1000 réplicas, cada rama posee un código inicial, que corresponde al acceso a GenBank. Se interpretó que las secuencias de ADN aisladas de *Pinus radiata* D. Don pertenecieron al género *Pestalotiopsis* con un 87% de compatibilidad para el primer aislado H21, y un 70% de compatibilidad para el segundo aislado H22 (Fig. 6-3).

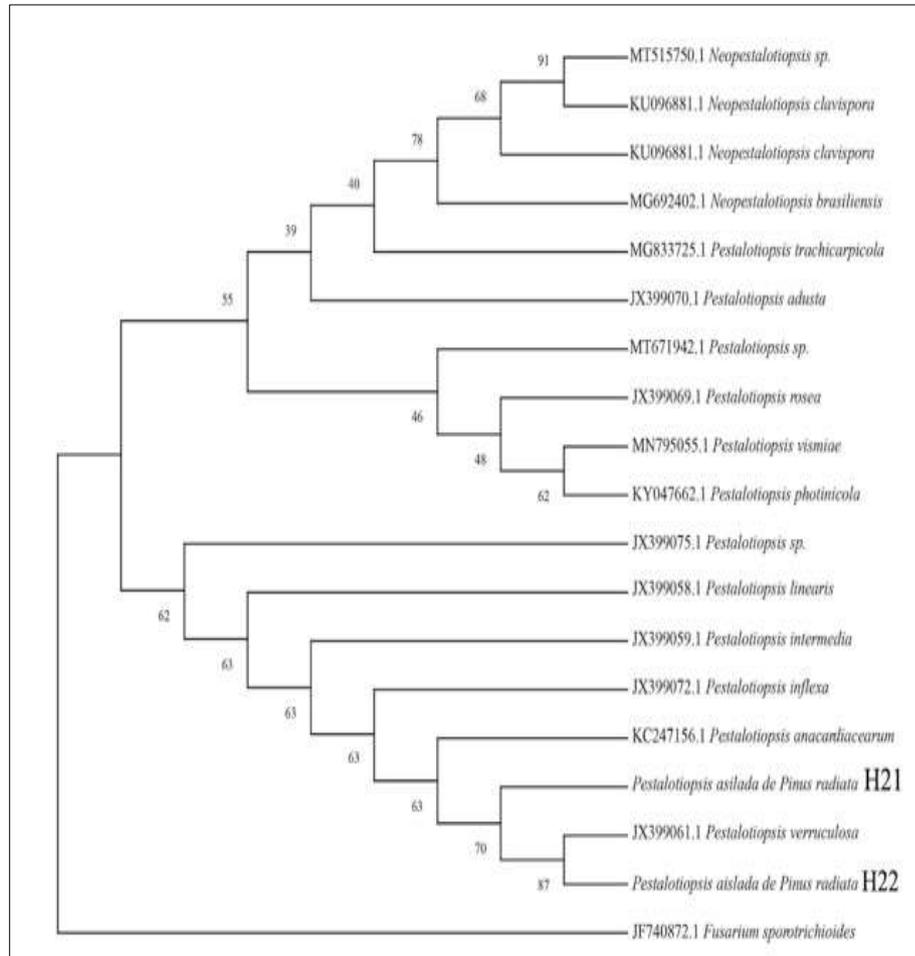


Figura 6-3. Árbol filogenético de *Pestalotiopsis* inferido a partir del método de máxima parsimonia.

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

Bajo, et.al. (2008), en su investigación detallaron a *Pestalotiopsis* como un género que ataca principalmente a coníferas, causando necrosis en tejidos y a veces muerte de las plantas, por el contrario, Strobel, et al. (1996) relataron a este género como un hongo endófito mediante estudios realizados en corteza interna de una rama de *Taxus wallachiana*, se demostró que este hongo produce taxol micelial, esta información complementa que nuestro género aislado se encuentra dentro del grupo de endófitos.

3.1.2.3 Género: *Trichoderma*

Tabla 5-3: Clasificación taxonómica del género *Trichoderma*

Reino	Fungí
Phylum	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Hypocreaceae
Género	<i>Trichoderma</i>

Fuente: (Schoch C., et al. 2020).

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

***Trichoderma* descripción de características macroscópicas y microscópicas**

Las colonias variaron su tonalidad debido al medio de cultivo en el que crecieron, tal es el caso en medio Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) donde se observó micelio verde oscuro y blanquecino (Fig. 7-3 A), mientras que en PDA el micelio se presentó muy algodonoso inicialmente de color blanquecino (Fig. 7-3 B) al pasar 5 días adquirió la coloración verde típica de *Trichoderma*.

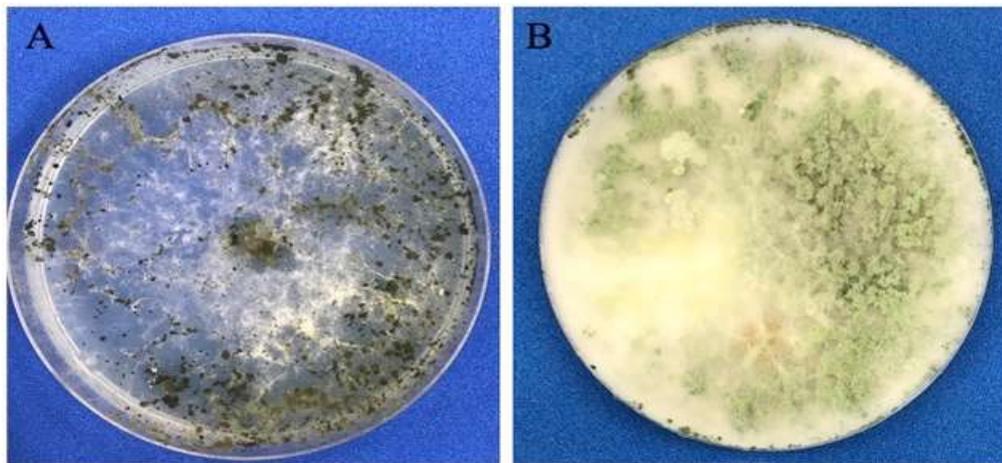


Figura 7-3. Colonias aisladas ejemplares del género *Trichoderma* en medio de cultivo PDA.

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

Se observó la presencia de abundantes conidias hialinas de forma elipsoidal de aproximadamente $0,25\mu\text{m}$ de largo y $0,2\mu\text{m}$ de ancho, dispuestas en grupos de 3, 4 y 5 (Fig. 8-3A), hifas septadas y hialinas de aproximadamente $0,45\mu\text{m}$, presencia de conidióforos (Fig. 8-3B).

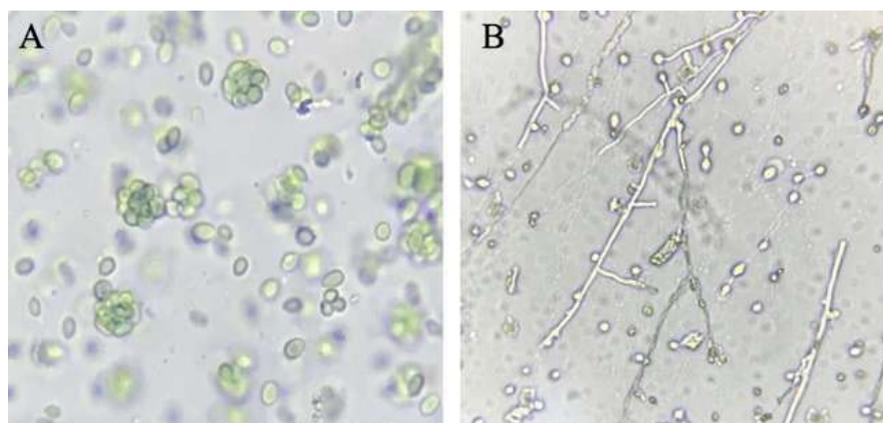


Figura 8-3. Microcultivo de *Trichoderma* observado al microscopio con el lente 40X.

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

Los resultados de este género coinciden con los estudios realizados por (García-Núñez et al. 2017) quienes realizaron la caracterización cultural de *Trichoderma* como agente de control biológico, las estructuras microscópicas coinciden las descritas por Gary y Hebbar (2015: p.120-121) acerca del clado *Longibrachiatum*.

Identificación molecular y árbol filogenético de *Trichoderma* de secuencias *TEF* (Translation Elogation Factor) 1- α gene.

Para la construcción del árbol filogenético se combinaron todas las secuencias que mostraron similitud con el género *Trichoderma* producto del análisis molecular y de la búsqueda realizada en BLAST del NCBI del hongo endófito obtenido de la endósfera foliar de la especie forestal nativa *Cedrela montana* realizada con la región TEF1- α (Tabla 6-3).

Tabla 6-3: Identificación de las secuencias TEF1- α del género *Trichoderma* mediante BLAST en el GenBank.

CÓDIGO	ESPECIE DE AISLAMIENTO	GÉNERO	IDENTIDAD %	ACCESIÓN
H23	<i>Cedrela montana</i>	<i>Trichoderma</i>	98,08	<u>XM_006963994.1</u>

Fuente: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

El número de los nudos representó el porcentaje del valor de arranque en 1000 réplicas. El número de acceso al GenBank corresponde al código inicial. La secuencia de nucleótidos H23 aislada de *Cedrela montana* Moritz ex Tucz. se agrupa al clado *Longibrachiatum* con una compatibilidad del 64%. La secuencia externa que se utilizó fue *Protocrea farinosa* (Fig. 9-3).

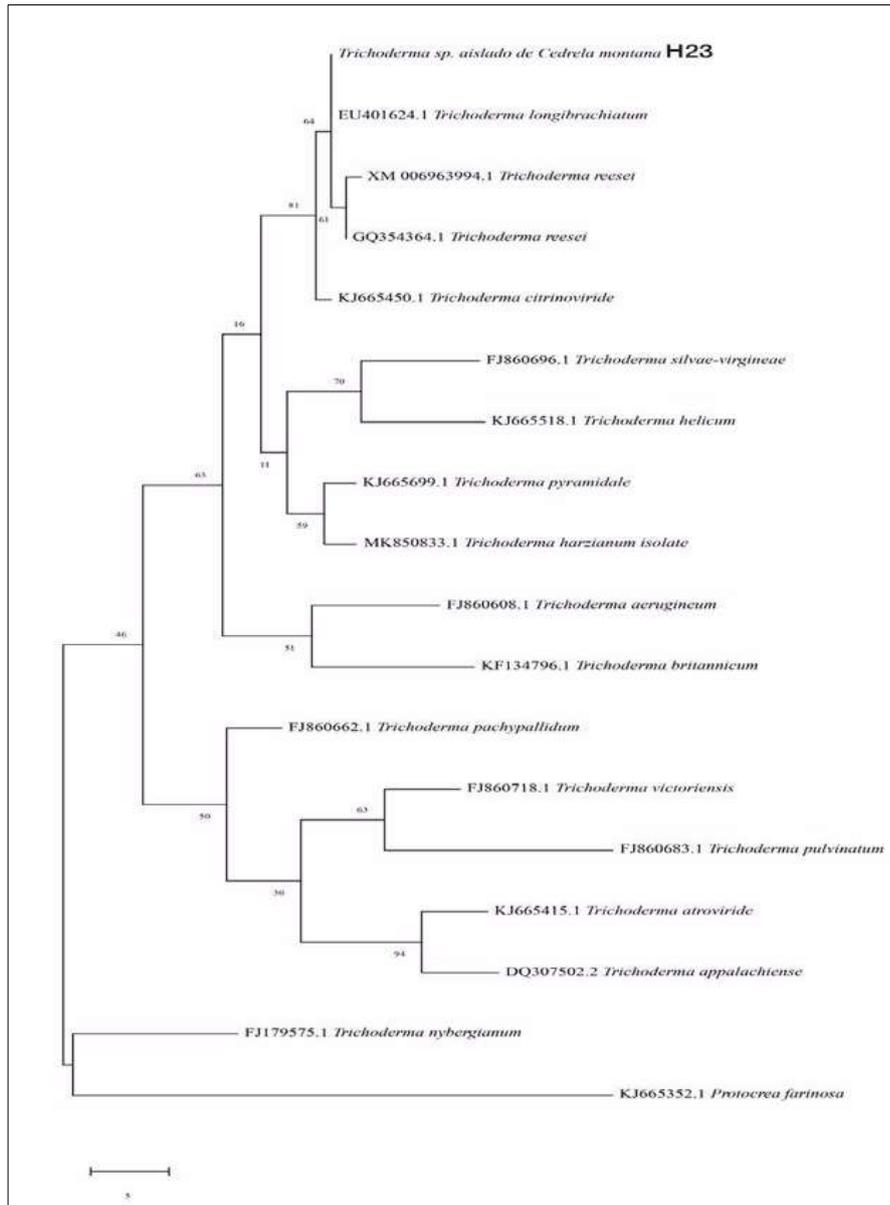


Figura 9-3. Árbol filogenético de *Trichoderma* inferido a partir del método de máxima parsimonia.

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

El aislamiento de *Trichoderma* como hongo endófito de una especie nativa, fue un gran indicador, ya que este es un hongo potencialmente conocido por su control biológico. En una investigación realizada por Shentu, et al. (2014) mostraron al hongo endófito *Trichoderma brevicompactum*, donde se expuso que existen metabolitos activos, se aisló extractos de cultivo de este hongo mediante fraccionamiento guiado por bioactividad e identificado como 4-acetoxi-12,13-epoxi-9 - tricoteceno (tricodermina), Trichodermin tiene una marcada actividad inhibitoria antifúngica sobre *Rhizoctonia solani*, también se observó una fuerte inhibición para *Botrytis cinerea*.

3.1.2.4 Género: *Penicillium*

Tabla 7-3: Clasificación taxonómica del género *Penicillium*

Reino	Fungí
Phylum	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Eurotiales
Familia	Aspergillaceae
Género	<i>Penicillium</i>

Fuente: (Schoch C., et al. 2020).

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

***Penicillium* descripción de características macroscópicas y microscópicas**

La colonia presentó una coloración blanquecina cremosa con un círculo central color verde claro, forma circular, borde entero algodonoso y elevación de tipo cúpula aislada de *Eucalyptus globulus* Labill (Fig. 10-3 A). Colonia de crecimiento rápido coloración verde y puntos de micelio blanquecino algodonoso, forma circular, borde entero, elevación de tipo chata aislada de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz (Fig. 10-3 B).

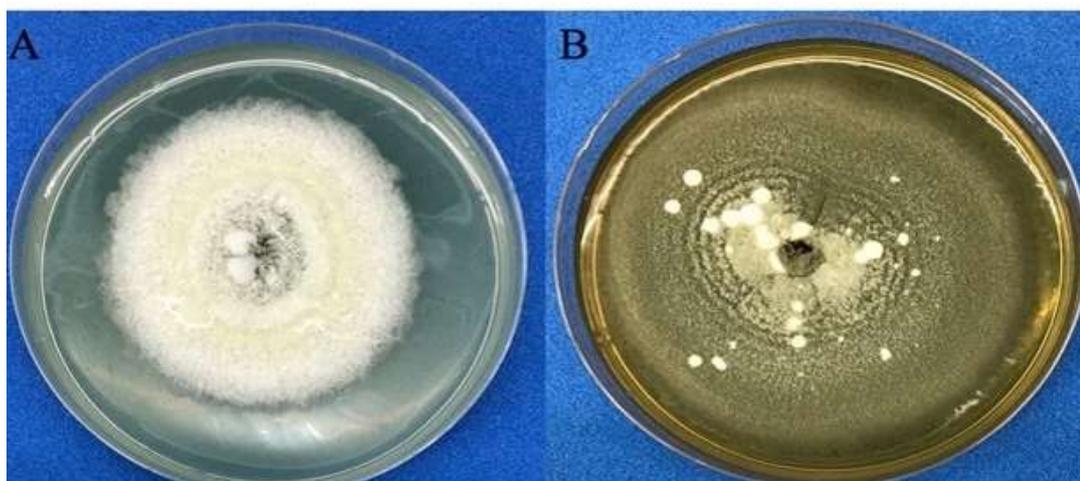


Figura 10-3. Colonias aisladas ejemplares del género *Penicillium* en medio de cultivo PDA.

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

Los conidios midieron 0,1 μm de ancho y 0,2 μm de largo con una forma elipsoidal y presentaron disposición en columnas (Fig. 11-3 A-B). El conidióforo presentó un promedio de 4,8 μm de largo del cual se desprendían filidies ampuliformes de 0,4 μm de largo (Fig. 11-3 A-C). Además, se observó la presencia de hifas hialinas y septadas de aproximadamente 0,5 μm de ancho (Fig.11-3 D).

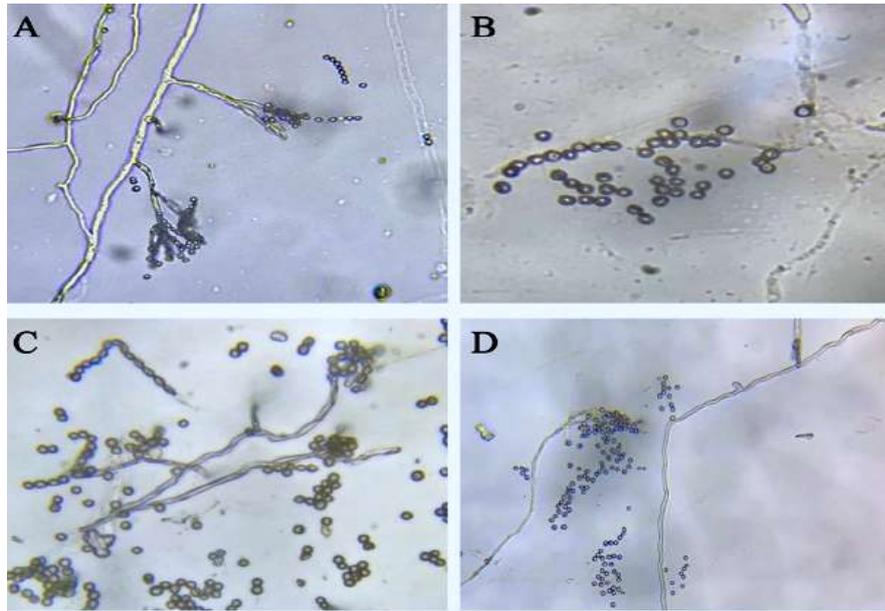


Figura 11-3. Microcultivo de *Penicillium* observado al microscopio con el lente 40X.

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

Una investigación realizada por Molar et al. (2013) describen similares resultados a los obtenidos en cuanto a caracterización cultural y las estructuras microscópicas sobre el género *Penicillium*.

Identificación molecular y árbol filogenético de *Penicillium* de secuencias *TEF* (Translation Elogation Factor) 1- α gene.

Para la construcción del árbol filogenético se combinaron todas las secuencias que mostraron similitud con el género *Penicillium* producto del análisis molecular y de la búsqueda realizada en BLAST del NCBI de los hongos endófitos obtenidos de la endósfera foliar de especies forestales nativas y exóticas realizada con la región TEF1- α (Tabla 8-3).

Tabla 8-3: Identificación de las secuencias TEF1- α del género *Penicillium* mediante BLAST en el GenBank

CÓDIGO	ESPECIE DE AISLAMIENTO	GÉNERO	IDENTIDAD %	ACCESIÓN
H24	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Penicillium</i>	99,16	LT615315.1
H25	<i>Cedrela montana</i>	<i>Penicillium</i>	90,48	XM_002558686.1

Fuente: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

Se demostró relación filogenética entre la cadena de nucleótidos aislado H25 de *Cedrela montana* con un 92% de compatibilidad con una secuencia almacenada en el Genbank de *Penicillium* sp., la cual también enraíza al aislado H24 de *Eucalyptus globulus* con un 42%. La secuencia externa que se utilizó fue *Monilochaetes farinosa* (Fig. 12-3).

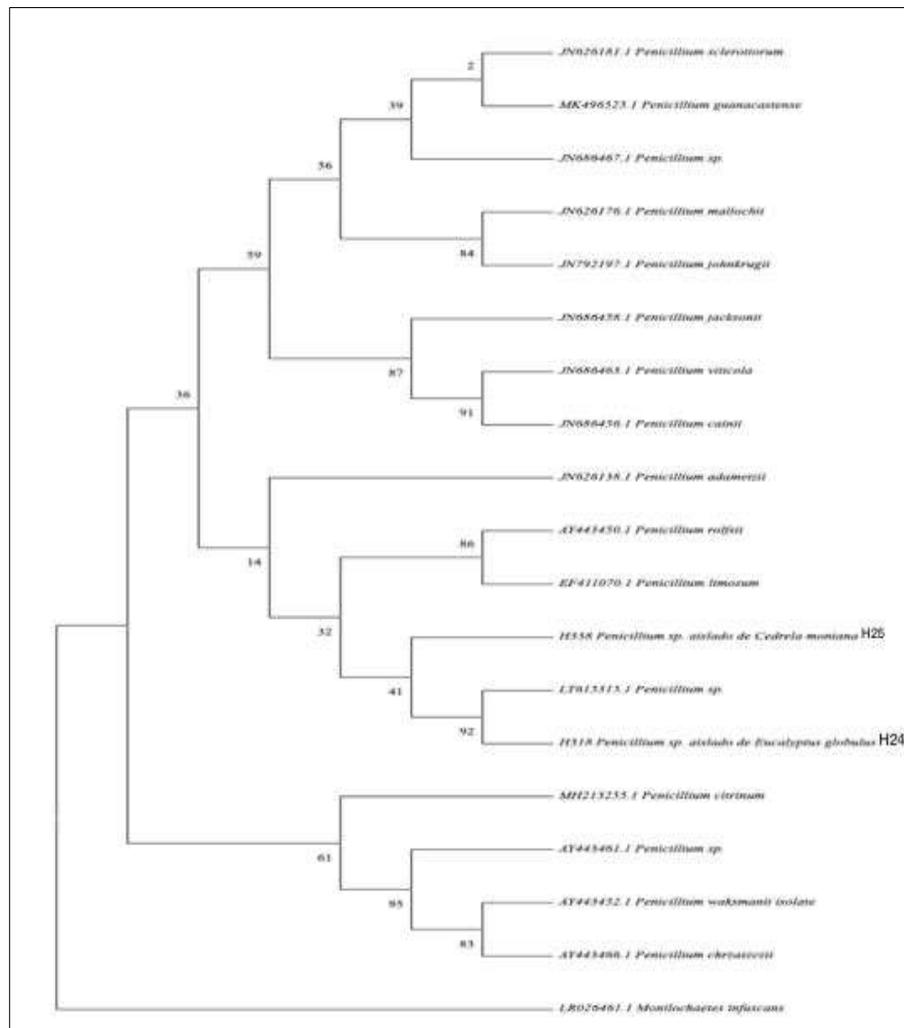


Figura 12-3. Árbol filogenético de *Penicillium* inferido a partir del método de máxima parsimonia.

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

Sánchez et al. (2013), describen a *Penicillium* como un hongo endófito con actividad biológica antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* y *E. coli*, este fue aislado de *Mauritia flexuosa*, una especie de palmera, esto nos demuestra que el género aislado está cumpliendo una función importante en *Cedrela montana* y *Eucalyptus globulus* ya que no causa ningún daño en la endósfera foliar de los individuos.

3.1.2.5 Género: *Xylaria*

Tabla 9-3: Clasificación taxonómica del género *Xylaria*

Reino	Fungí
Phylum	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Xylariales
Familia	Xylariaceae
Género	<i>Xylaria</i>

Fuente: (Schoch C., et al. 2020).

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

***Xylaria* descripción de características macroscópicas y microscópicas**

Se observaron colonias de crecimiento lento, algodonosas blanquecinas (Fig. 13-3 B-C-E) algunas se evaluaron a los 21 días de crecimiento con manchas color negro o grisáceas (Fig. 13-3 A-D-F). Todos los aislados presentaron forma irregular, de borde ondulado y una elevación de tipo cúpula, se presentaron abundantes estromas.

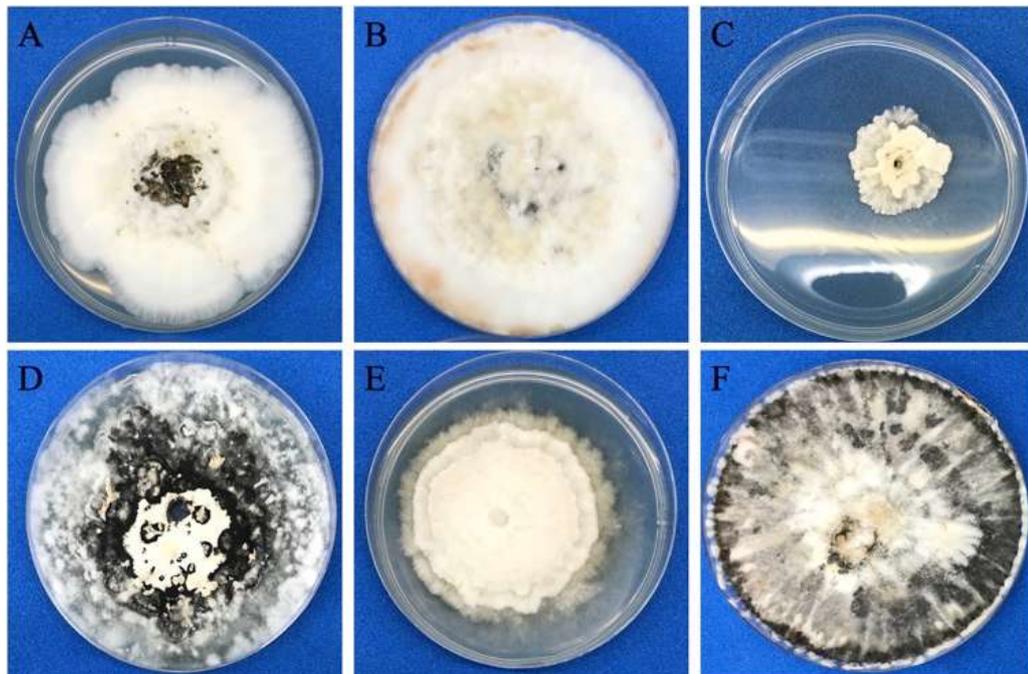


Figura 13-3. Colonias aisladas ejemplares del género *Xylaria* en medio de cultivo PDA.

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

Las conidias presentaron una forma elipsoidal, hialinas con un ancho de $0,3\mu\text{m}$ y un largo de $0,4\mu\text{m}$ (Fig. 14-3 A-B), se observó la presencia de conidióforos y clamidosporas (Fig. 14-3 C-D), también se mostraron las hifas septadas y hialinas de $0,2\mu\text{m}$ de ancho.

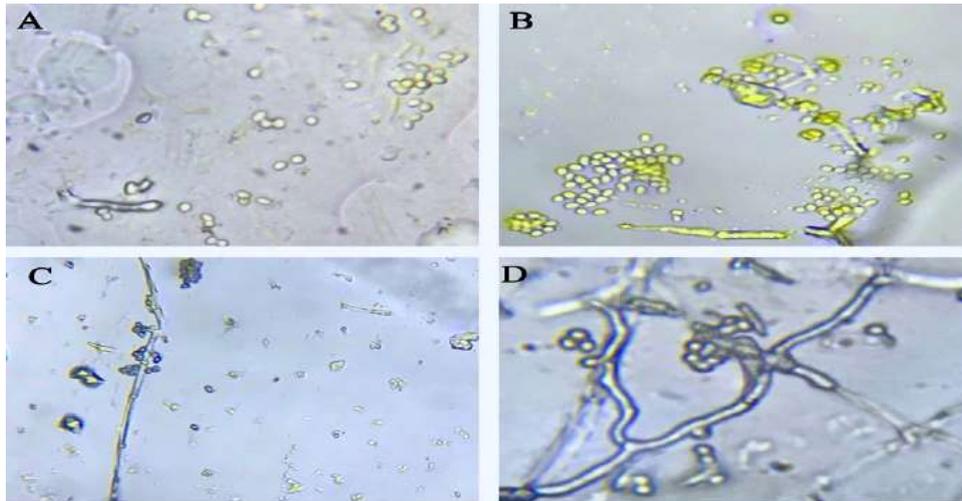


Figura 14-3. Microcultivo de *Xylaria* observado al microscopio con el lente 40X.

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

Los resultados en la descripción del género *Xylaria* coinciden con los mencionados por (Peršoh et al. 2009) donde se muestra amplia relación en la descripción morfológica especialmente de las conidias.

Identificación molecular y árbol filogenético de *Xylaria* de secuencias *TEF* (Translation Elogation Factor) 1- α gene.

Para la construcción del árbol filogenético se combinaron todas las secuencias que mostraron similitud con el género *Xylaria* producto del análisis molecular y de la búsqueda realizada en BLAST del NCBI de los hongos endófitos obtenidos de la endósfera foliar de especies forestales nativas y exóticas realizada con la región *TEF1- α* (Tabla 10-3).

Tabla 10-3: Identificación de las secuencias *TEF1- α* del género *Xylaria* mediante BLAST en el GenBank

CÓDIGO	ESPECIE DE AISLAMIENTO	GÉNERO	IDENTIDAD %	ACCESIÓN
H26	<i>Ocotea heterochroma</i>	<i>Xylaria</i>	93,20	DQ471042.1
H27	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Xylaria</i>	93,57	DQ471042.1
H28	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Xylaria</i>	93,67	DQ471042.1
H29	<i>Pinus radiata</i>	<i>Xylaria</i>	92,65	DQ471042.1
H30	<i>Cedrela montana</i>	<i>Xylaria</i>	94,09	DQ471042.1
H31	<i>Cedrela montana</i>	<i>Xylaria</i>	94,88	DQ471042.1
H32	<i>Cedrela montana</i>	<i>Xylaria</i>	94,77	DQ471042.1

Fuente: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

El número de los nudos representó el porcentaje del valor de arranque en 1000 réplicas. El número de acceso al GenBank corresponde al código inicial. Se demostró relación filogenética debido a los indicadores de porcentajes asociados a las cadenas de nucleótidos almacenados en el Genbank y la relación con los nucleótidos aislados H26, de *Ocotea heterochroma*, H29 *Pinus radiata*, H27 Y H28 *Eucalyptus globulus* y H30, H31, H32 de *Cedrela montana* pertenecientes a este género. Se demuestra que existe similitud entre las secuencias, sin embargo, resultó complejo asociarlos a una especie, es por ello que únicamente se establece el género debido al resultado de los análisis moleculares. La secuencia externa que se utilizó fue *Cladosporium sp.* (Fig. 15-3).

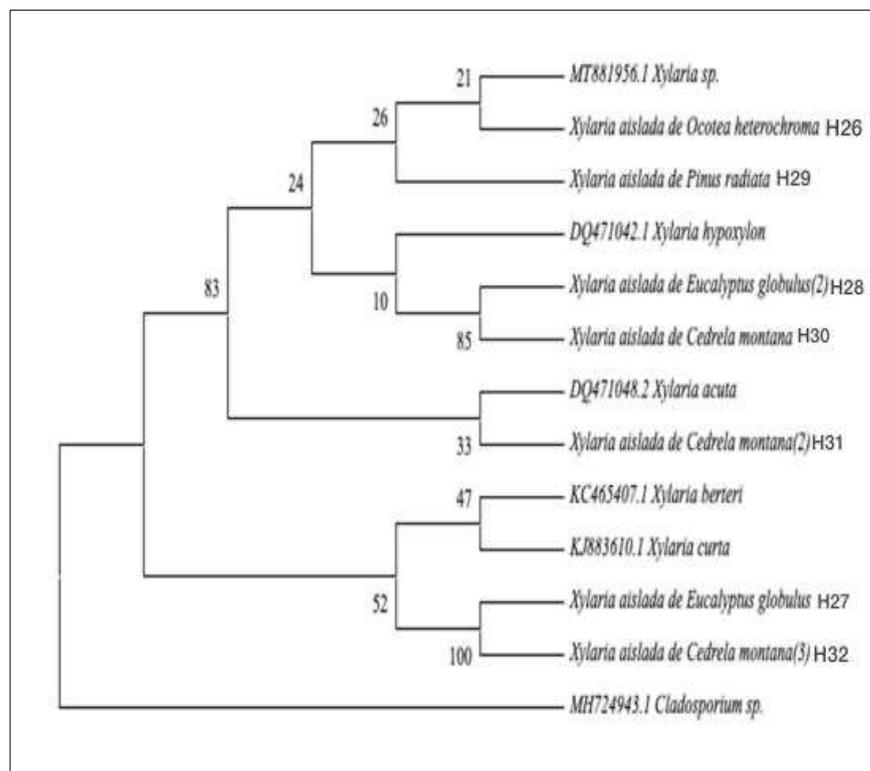


Figura 15-3. Árbol filogenético de *Xylaria* inferido a partir del método de máxima parsimonia.

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

Gamboa (2006), mostró que el género *Xylaria* es un hongo endófito relevante, concordando con los resultados del presente trabajo. En investigaciones realizadas Bayman et al. (1998) se obtuvo como resultado a *Xylaria sp.* aislada de *Casuarina*, este estudio afirma que es un endófito propio de regiones tropicales, difiriendo de esta investigación debido a que el clima en donde habitan las 4 especies en estudio es el propio de la región Sierra ecuatoriana. Sin embargo, se puede relacionar la presencia de este endófito a la abundancia de especies introducidas en el sector.

3.1.2.6 Género: *Coniochaeta*

Tabla 11-3: Clasificación taxonómica del género *Coniochaeta*

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Coniochaetales
Familia	Coniochaetaceae
Género	<i>Coniochaeta</i>

Fuente: (Schoch C., et al. 2020).

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

***Coniochaeta* descripción de características macroscópicas y microscópicas**

El color de las colonias difiere del medio de cultivo en el que creció, marrón claro en Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) (Fig.16-3 A), presentó micelio marrón oscuro con anillos grisáceos centrales en Potato Dextroxa Agar (PDA). En ambos medios conservó una forma circular, elevación convexa y borde entero.

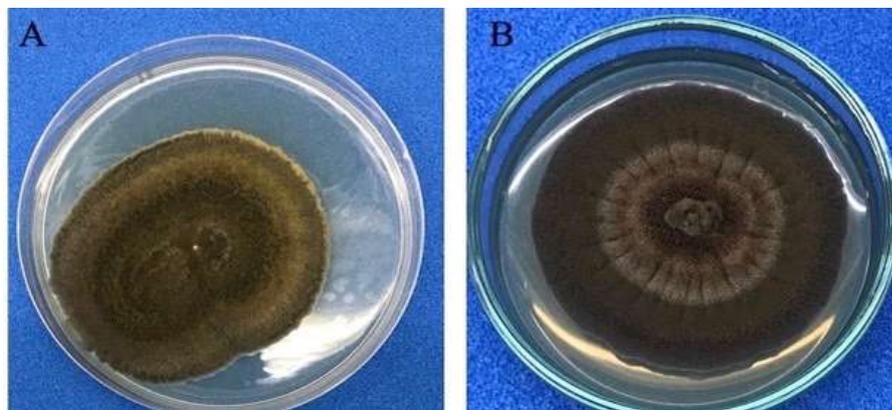


Figura 16-3. Colonias aisladas ejemplares del género *Coniochaeta* en SNA y PDA (B).

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

Al pasar 15 días en luz blanca, el microcultivo de *Coniochaeta* produjo células conidiógenas y conidias que surgieron de la hifa (Fig.17-3A). Las conidias fueron de forma ovoide de 0,3 μm de ancho y 0,5 μm de largo (Fig. 17-3 B), se pudo observar la presencia de hifas hialinas y septadas de aproximadamente 0,5 μm de ancho (Fig.17-3 C).

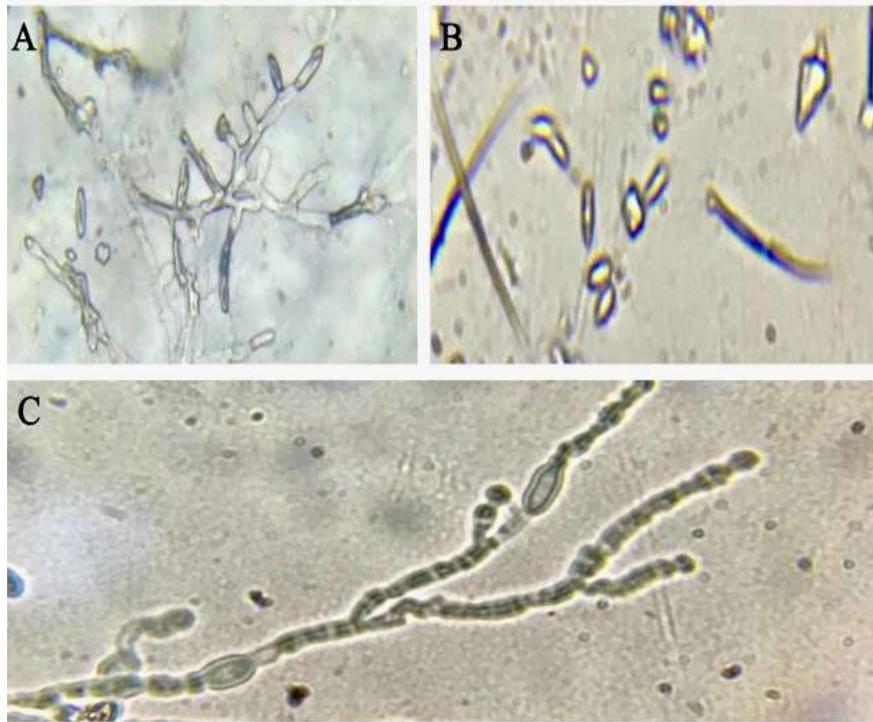


Figura 17-3. Microcultivo de *Coniochaeta* observado al microscopio con el lente 100X.

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

Las características microscópicas y macroscópicas son similares a las estudiadas por (Khan et al. 2013) donde describe características en cuanto al micelio color marrón oscuro, se afirma además que existen células conidiógenas y conidios ovoides, estos resultados concuerdan también con los obtenidos por Harrington et al. (2019),

Identificación molecular y árbol filogenético de *Coniochaeta* de secuencias *TEF* (Translation Elogation Factor) 1-alpha gene.

Para la construcción del árbol filogenético se combinaron todas las secuencias que mostraron similitud con el género *Coniochaeta* producto del análisis molecular y de la búsqueda realizada en BLAST del NCBI de los hongos endófitos obtenidos de la endósfera foliar de la especie exótica *Pinus radiata* realizada con la región TEF1- α (Tabla 12-3).

Tabla 12-3: Identificación de las secuencias TEF1- α del género *Coniochaeta* mediante BLAST en el GenBank

CÓDIGO	ESPECIE DE AISLAMIENTO	GÉNERO	IDENTIDAD %	ACCESIÓN
H33	<i>Pinus radiata</i>	<i>Coniochaeta</i>	99,2	<u>MK693152.1</u>

Fuente: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

El número de los nudos representó el porcentaje del valor de arranque en 1000 réplicas. El número de acceso al GenBank corresponde al código inicial. Se demostró alta relación filogenética debido a la similitud del 96% de la secuencia de nucleótidos de *Coniochaeta* aislado a partir de *Pinus radiata* (H33) con una secuencia de nucleótidos almacenada en el GenBank, se pudo definir que la especie aislada fue *Coniochaeta fasciculata*. La secuencia externa que se utilizó fue *Thamnidium elegans* (Fig. 18-3).

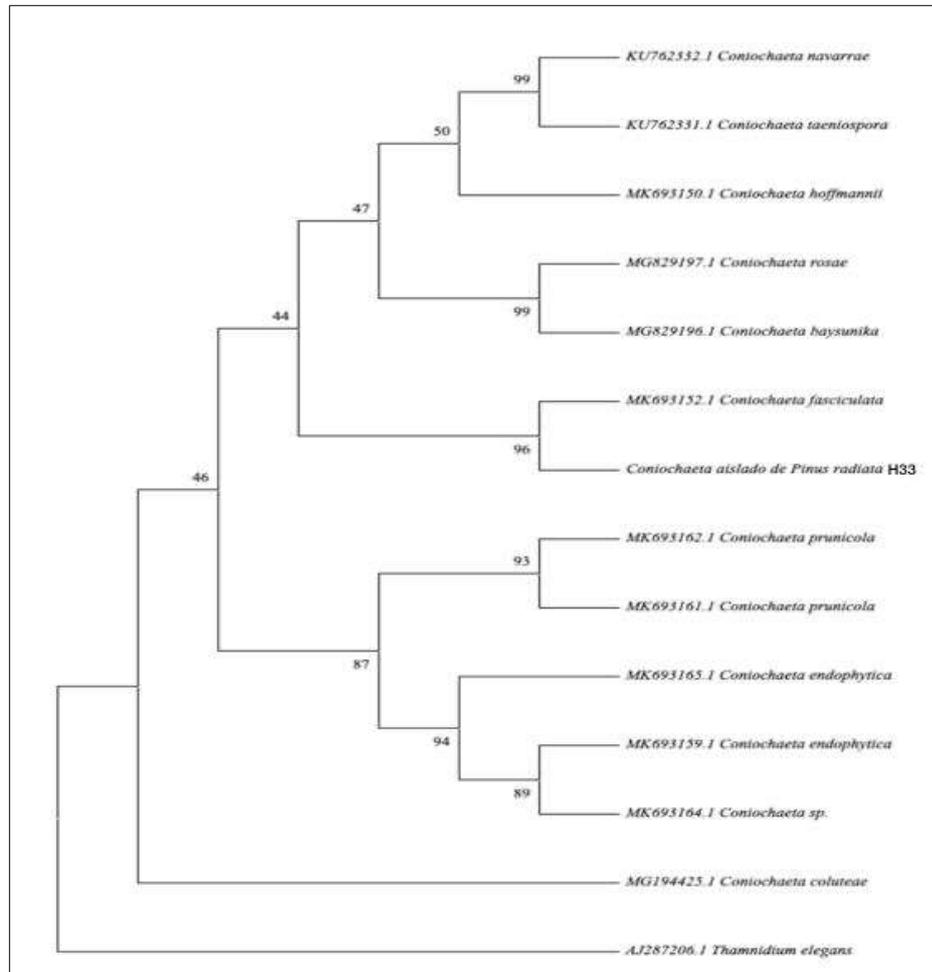


Figura 18-3. Árbol filogenético de *Coniochaeta* inferido a partir del método de máxima parsimonia.

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

En BLAST de las secuencias producto del análisis molecular coinciden con las secuencias del artículo *Coniochaeta endophytica*, un endófito foliar asociado con tejido fotosintético sano de *Platycladus orientalis* realizada por Harrington et al. (2019), determinando positivamente al género *Coniochaeta* encontrado en este estudio ya que se describió como un género ecológicamente diverso que contiene numerosas cepas endofíticas, también se demuestra estrecha relación por cuanto la investigación nos indicó que *Coniochaeta* es un género aislado propiamente de las coníferas y *Pinus radiata* pertenece a este grupo.

3.1.2.7 Género: *Arthrinium*

Tabla 13-3: Clasificación taxonómica del género *Arthrinium*

Reino	Fungí
Phylum	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Xylariales
Familia	Apiosporaceae
Género	<i>Arthrinium</i>

Fuente: (Schoch C., et al. 2020).

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

***Arthrinium* descripción de características macroscópicas y microscópicas**

Las colonias presentaron en micelio algodonoso aéreo blanquecino, con manchas de color beige, la aislada de *Ocotea heterochroma* (Fig.19-3 A) tuvo un crecimiento rápido, mientras que la aislada de *Pinus radiata* un crecimiento lento (Fig.19-3 B), presentaron una forma irregular, borde ondulado y elevación de tipo cúpula.

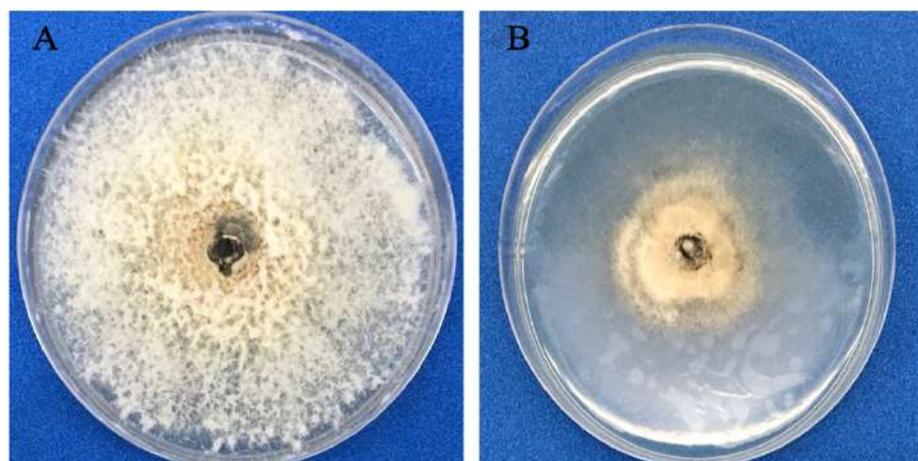


Figura 19-3. Colonias aisladas ejemplares del género *Arthrinium* en medio de cultivo PDA.

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

Se evaluó el microcultivo a los 18 días de haber permanecido en luz blanca para estimular la producción de esporas. Se observó la presencia de conidios lisos, elipsoidales de color marrón 0,4µm de largo y 0,3µm de ancho (Fig. 20-3 A-B). Presentó hifas hialinas y septadas de un promedio de 0,3µm de ancho (Fig. 20-3 B-C).

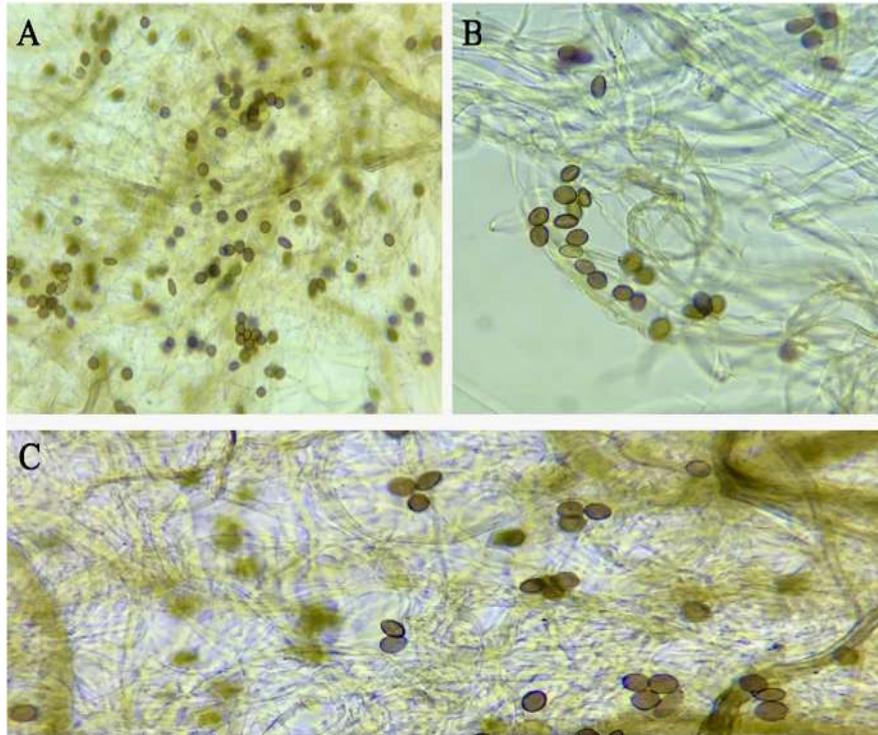


Figura 20-3. Microcultivo de *Arthrinium* observado al microscopio con el lente 40X.

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

Un estudio del género *Arthrinium* realizado en *Carex spp.* por Pintos et al. (2019) muestra relación con los resultados sobre todo en cuanto a la descripción de conidias aisladas.

Identificación molecular y árbol filogenético de *Arthrinium* de secuencias *TEF* (Translation Elogation Factor) *1-alpha* gene.

Para la construcción del árbol filogenético se combinaron todas las secuencias que mostraron similitud con el género *Arthrinium* producto del análisis molecular y de la búsqueda realizada en BLAST del NCBI de los hongos endófitos obtenidos endósfera foliar de especies forestales nativas y exóticas realizada con la región *TEF1- α* (Tabla 14-3).

Tabla 14-3: Identificación de las secuencias *TEF1- α* del género *Arthrinium* mediante BLAST en el GenBank

CÓDIGO	ESPECIE DE AISLAMIENTO	GÉNERO	IDENTIDAD %	ACCESIÓN
H34	<i>Ocotea heterochroma</i>	<i>Arthrinium</i>	97	MK313853.1
H35	<i>Pinus patula</i>	<i>Arthrinium</i>	95,83	MK313853.1

Fuente: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

El número de los nudos representó el porcentaje del valor de arranque en 1000 réplicas. El número de acceso al GenBank corresponde al código inicial que estuvo presente en cada rama. Se interpretó que el análisis molecular de las cadenas de nucleótidos tuvo amplia relación filogenética con las secuencias almacenadas en el GenBank del género en estudio, en este caso se mostró que existe una similitud del 100% de *Arthrinium sp.* con el aislado H34 de *Ocotea heterochroma*, además el aislado H35 de *Pinus radiata* se enraizó con una especie de *Arthrinium esportense* con el 89% de similitud. Los análisis moleculares, morfológicos y filogenéticos afirman que el hongo endófito encontrado perteneció al género *Arthrinium*. El grupo externo usado fue *Rhizoctonia solani* (Fig. 21-3).

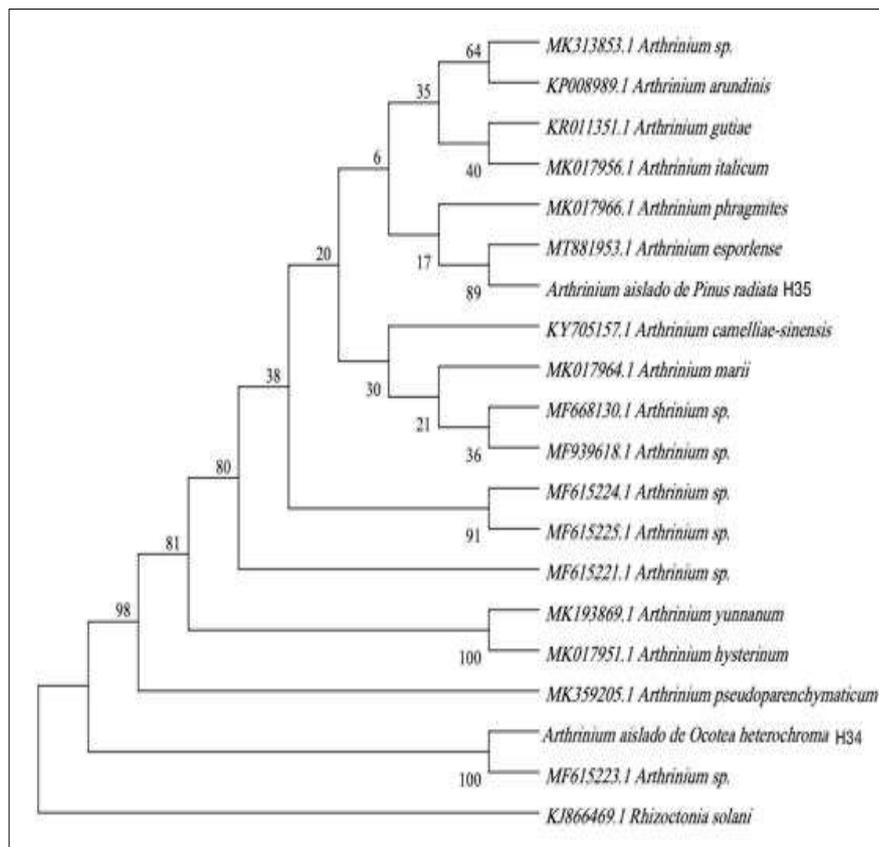


Figura 21-3. Árbol filogenético de *Arthrinium* inferido a partir del método de máxima parsimonia.

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

En BLAST las cadenas de nucleótidos producto del análisis molecular coinciden con las secuencias del artículo sobre *Arthrinium phyllostachium* aislado a partir de tallos de *Phyllostachys heteroclada* realizada por Yang, et al. (2019), otros estudios como los realizados por Pansanit y Pripdeevech (2008) describieron al hongo *Arthrinium sp.* como un endófito productor de metabolitos secundarios, de donde se obtuvieron los extractos de acetato de etilo que posteriormente se sometieron a estudios donde mostraron actividad antibacteriana, esta información complementa a *Arthrinium* hallado en esta investigación como endófito.

3.1.2.8 Género: *Pyrenochaeta*

Tabla 15-3: Clasificación taxonómica del género *Pyrenochaeta*

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Pleosporales
Familia	Cucurbitariaceae
Género	<i>Pyrenochaeta</i>

Fuente: (Schoch C., et al. 2020).

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

***Pyrenochaeta* descripción de características macroscópicas y microscópicas**

La colonia a los 15 días de crecimiento en medio de cultivo (PDA) en incubación a 24°C, presentó una coloración negra olivácea y ligero micelio aéreo color grisáceo oscuro, de forma circular, borde entero y elevación de tipo chata (Fig. 22-3 A).

Para la observación de estructuras microscópicas, el microcultivo creció alrededor de 18 días con luz blanca y se observó conidióforos de 2µm de largo del cual se desprenden conidios de picnidios (Fig.22-3 B-D). Las conidias redondas se encontraron dispuestas en grupos de 3 hasta 8, algunas solitarias, estas tenían una dimensión de 0,2µm de largo y 0,2µm de ancho. (Fig.22-3C). Se observaron hifas hialinas y septadas de 0,45µm de ancho.

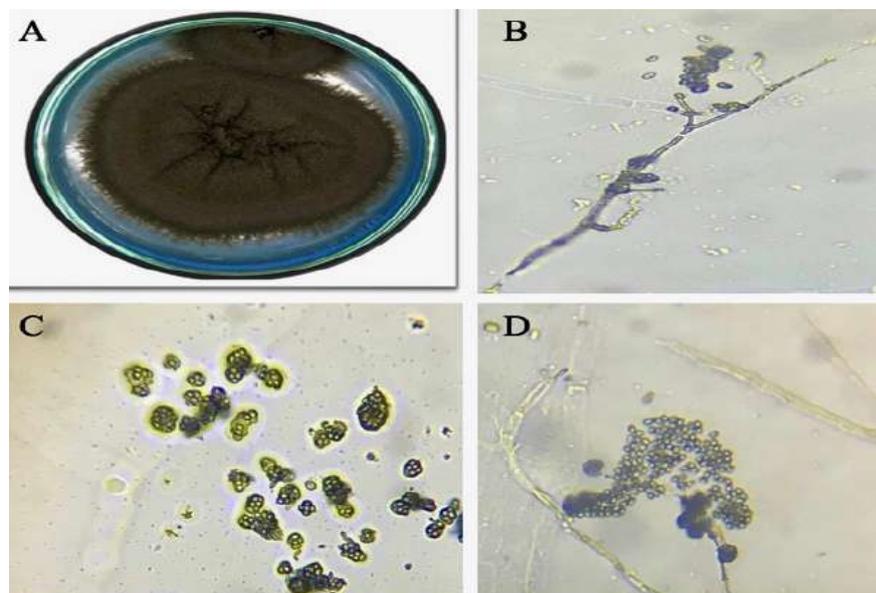


Figura 22-3. Colonia aislada en PDA (A) y Microcultivo de *Pyrenochaeta* observado al microscopio con el lente 40X (B-C-D).

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

Estudios realizados por Lević et al. (2012) muestran que las características macroscópicas y morfológicas del género *Pyrenochaeta* coinciden con las halladas en esta investigación.

Identificación molecular y árbol filogenético de *Pyrenochaeta* de secuencias *TEF* (Translation Elogation Factor) 1-*alpha* gene.

Para la construcción del árbol filogenético se combinó la secuencia que mostró similitud con el género *Pyrenochaeta* producto del análisis molecular y de la búsqueda realizada en BLAST del NCBI del hongo endófito obtenido en la endósfera foliar de la especie forestal exótica *Eucalyptus globulus* realizada con la región TEF1- α (Tabla 16-3).

Tabla 16-3: Identificación de las secuencias TEF1- α del género *Pyrenochaeta*

CÓDIGO	ESPECIE DE AISLAMIENTO	GÉNERO	IDENTIDAD %	ACCESIÓN
H36	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Pyrenochaeta</i>	93,37	<u>LT797110.1</u>

mediante BLAST en el GenBank.

Fuente: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

El número de las ramas representó el porcentaje del valor de arranque en 1000 réplicas. El número de acceso al GenBank corresponde al código inicial que apareció en cada rama. Se determinó que existió relación filogenética del aislado H36 proveniente de *Eucalyptus globulus*, por cuanto la similitud alcanza un 50% con una secuencia del género *Pyrenochaeta* almacenado en el GenBank. La secuencia externa usada fue *Botrytis cinerea*. (Fig. 23-3).

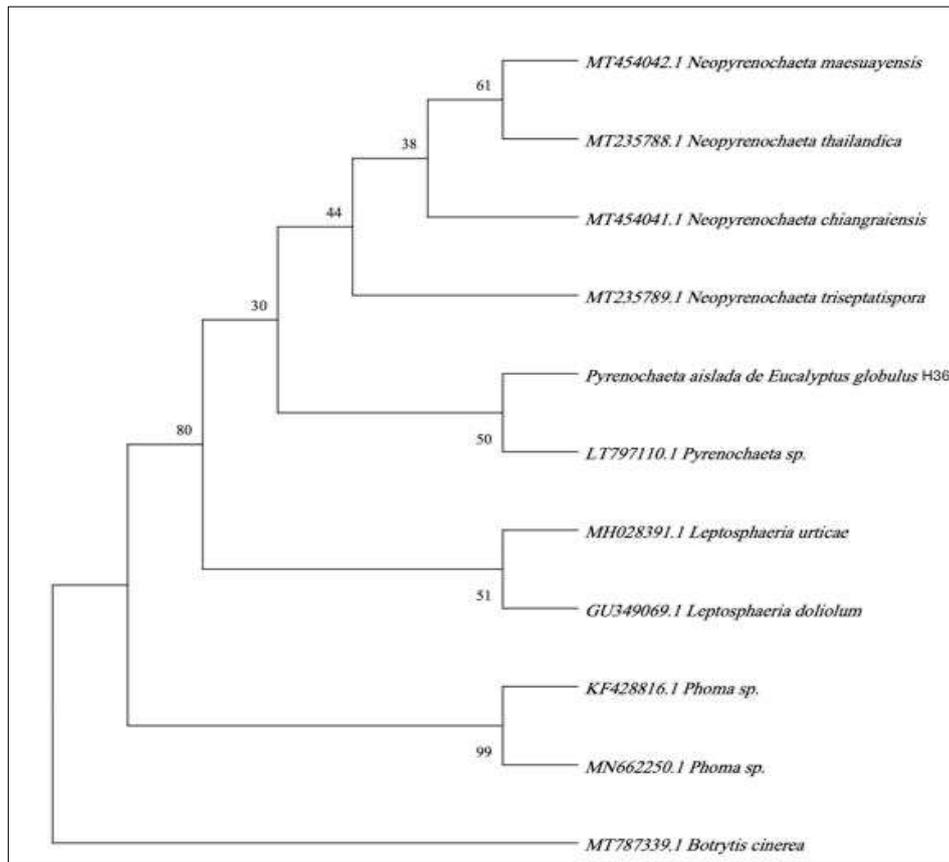


Figura 23-3. Árbol filogenético de *Pyrenochaeta* inferido a partir del método de máxima parsimonia.

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

La investigación realizada por Lin, et al. (2011), mostró el uso de una cepa de *Pyrenochaeta sp.* debido a su actividad citotóxica contra las células HEPG-2, al realizar esta investigación se aislaron nuevo cuatro metabolitos denominados pirenocaetamida, pirenocuetólido, piroquetoxi y pirenocuetoxi, esto muestra que *Pyrenochaeta* aislada de *Eucalyptus globulus* es un hongo endófito relevante del cual se pueden realizar estudios químicos para analizar sus metabolitos secundarios.

3.1.2.9 Género: *Phaeoacremonium*

Tabla 17-3: Clasificación taxonómica del género *Phaeoacremonium*

Reino	Fungí
Phylum	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Togniniales
Familia	Togniniaceae
Género	<i>Phaeoacremonium</i>

Fuente: (Schoch C., et al. 2020).

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

***Phaeoacremonium* descripción de características macroscópicas y microscópicas**

El crecimiento micelial fue evaluado a los 15 días después de que el aislado permaneciera en la incubadora a 24°C en medio de cultivo PDA, en donde se determinó que el micelio es de tipo algodonoso color beige oliváceo con ligeras manchas amarillentas, pero se observó que al pasar los días este adquirió una coloración verdosa (Fig. 24-3 A).

El microcultivo estuvo expuesto a luz blanca durante 15 días, se observó que produjo conidias de forma ovoide, con dimensiones de 0,25µm de ancho y 0,35µm de largo (Fig. 24-3 B). Se evidenció la presencia de conidióforos y fialides de las cuales se desprendían agrupaciones de conidias e hifas hialinas y septadas de un promedio de 0,35µm de ancho (Fig. 24-3 C-D).

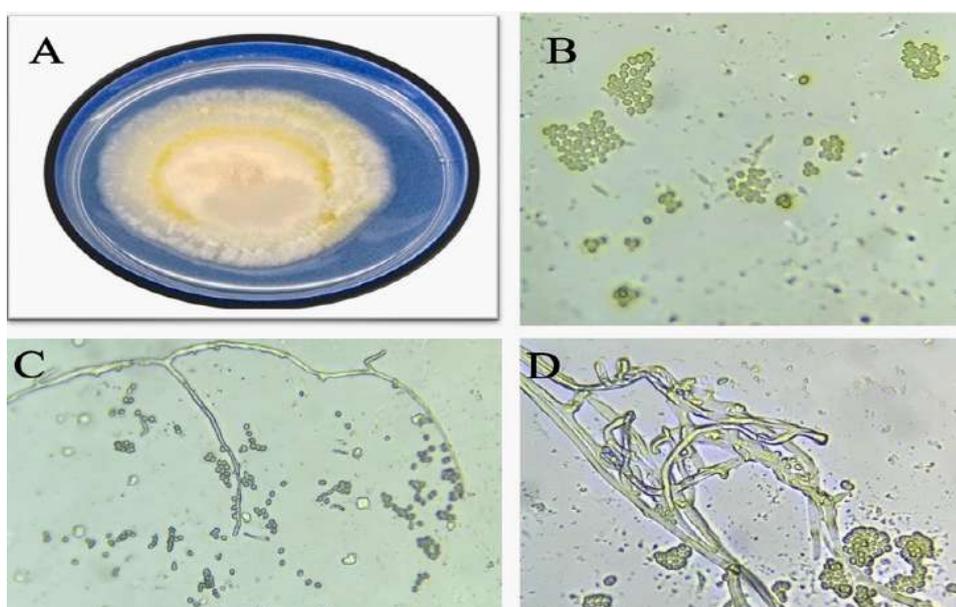


Figura 24-3. Colonia aislada en PDA (A) y Microcultivo de *Phaeoacremonium* observado al microscopio con el lente 40X (B-C-D).

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

Los resultados en cuanto a descripción macroscópica se asocian a los descritos por Ye et al. (2020), además los estudios realizados por (Essakhi et al. 2008) muestran que las estructuras microscópicas coinciden sobre todo cuando de conidias se trata.

Identificación molecular y árbol filogenético de *Phaeoacremonium* de secuencias *TEF* (Translation Elogation Factor) *1-alpha* gene.

Para la construcción del árbol filogenético se combinó la secuencia que mostró similitud con el género *Phaeoacremonium* producto del análisis molecular y de la búsqueda realizada en BLAST del NCBI del hongo endófito obtenido en la endósfera foliar de la especie forestal exótica *Eucalyptus globulus* realizada con la región TEF1- α (Tabla 16-3).

Tabla 18-3: Identificación de las secuencias TEF1- α del género *Phaeoacremonium* mediante BLAST en el GenBank.

CÓDIGO	ESPECIE DE AISLAMIENTO	GÉNERO	IDENTIDAD %	ACCESIÓN
H37	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Phaeoacremonium</i>	91,74	XM_007918033.1

Fuente: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

El número de las ramas representó el porcentaje del valor de arranque en 1000 réplicas. El número de acceso al GenBank corresponde al código inicial que estuvo presente en cada rama. Se interpretó que existió relación filogenética por cuanto se mostró enraizamiento entre la especie *Phaeoacremonium minima* mostrando similitud del 67% con la cadena de nucleótidos H37 aislada de *Eucalyptus globulus*. El grupo externo usado fue *Galactomyces geotrichum* (Fig. 25-3).

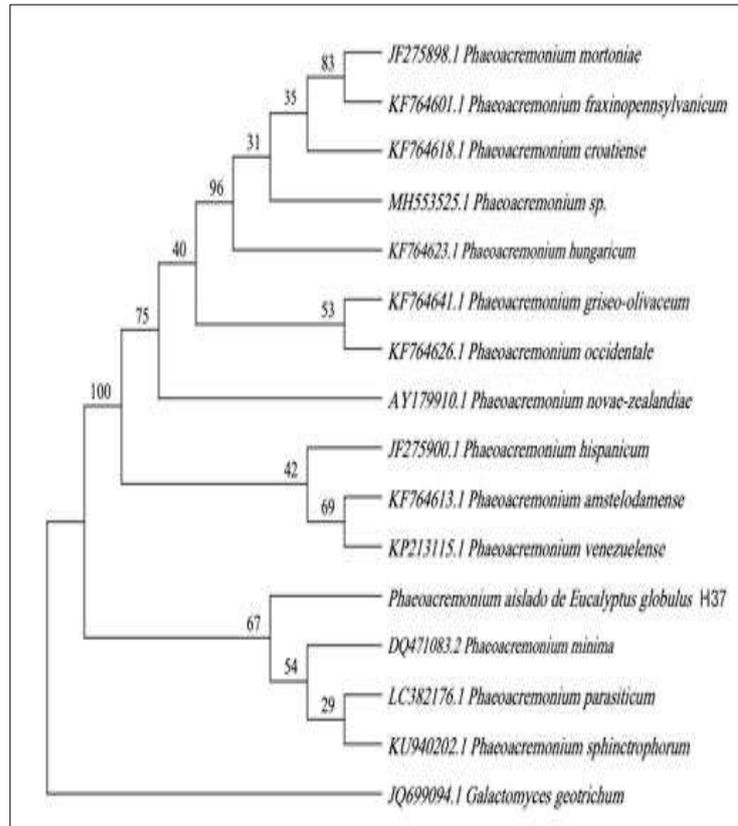


Figura 25-3. Árbol filogenético de *Phaeoacremonium* inferido a partir del método de máxima parsimonia.

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

En BLAST las cadenas de nucleótidos producto del análisis molecular coinciden con las secuencias del artículo denominado: Una filogenia de cinco genes de Pezizomycotina, el subfilo más grande de Ascomycota, investigación desarrollada por Spatafora, et al. (2008). *Phaeoacremonium* fue un hongo endófito aislado de folíolos sanos de *Eucalyptus globulus* esto concuerda con el estudio desarrollado por Silva et, al. (2017) quienes indican a este género como hongo endófito, además realizaron análisis químicos donde se extrajeron compuestos que fueron activos contra los hongos fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* y *C. sphaerosperum*.

3.1.2.10 Orden: Diaporthales

Tabla 19-3: Clasificación taxonómica del orden Diaporthales

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Diaporthales

Fuente: (Schoch C., et al. 2020).

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

Diaporthales descripción de características macroscópicas y microscópicas

Al cabo de 15 días de crecimiento en medio de cultivo PDA, la colonia presentó micelio algodonoso de coloración blanquecina, forma circular, borde entero y elevación de tipo cúpula (Fig. 26-3 A). Las conidias presentaron forma globosa, hialinas de tamaño muy pequeño de $0,1\mu\text{m}$ de ancho y $0,1\mu\text{m}$ de largo, se observó la presencia de conidióforos de $1,3\mu\text{m}$ ancho e hifas septadas y hialinas.

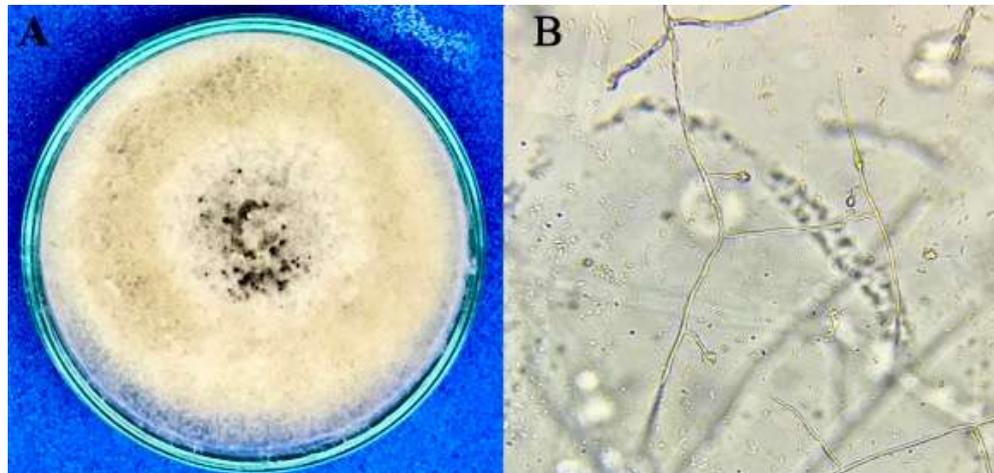


Figura 26-3. Colonia aislada en PDA (A) y Microcultivo de Diaporthales observado al microscopio con el lente 40X (B).

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

Las características de las conidias son similares a las estudiadas por (Fu et al. 2013), quien indica que estas poseen forma globosa a subglobosa, hialina y lisa, sin embargo estas características se presentan en conidias del organismo *Ophioidiaporthe cyatheae*, a pesar de que esta especie está dentro del orden Diaporthales no se puede afirmar que pertenece a la misma, debido a que la información de las secuencias de nucleótidos obtenidas en el análisis molecular solo reflejan en el GenBank como orden Diaporthales.

Identificación molecular del orden Diaporthales de secuencias *TEF* (Translation Elogation Factor) *1-alpha* gene.

Búsqueda realizada en BLAST del NCBI del hongo endófito obtenido en la endósfera foliar de las especies forestales nativas *Ocotea heterochroma* y *Cedrela montana* realizada con la región TEF1- α (Tabla 20-3).

Tabla 20-3: Identificación de las secuencias TEF1- α del orden Diaporthales mediante BLAST en el GenBank.

CÓDIGO	ESPECIE DE AISLAMIENTO	ORDEN	IDENTIDAD %	ACCESIÓN
H37	<i>Ocotea heterochroma</i>	Diaporthales	96,7	<u>JX570892.1</u>
H38	<i>Cedrela montana</i>	Diaporthales	95,52	<u>JX570892.1</u>
H39	<i>Cedrela montana</i>	Diaporthales	95,68	<u>JX570892.1</u>

Fuente: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

3.1.3 Cálculo de la diversidad de la microbiota endófito fúngica de la endósfera foliar de especies forestales nativas y exóticas

3.1.3.1 Cálculo de riqueza de especies, diversidad de Shannon y Simpson de la primera colecta

Ocotea heterochroma fue la especie que presentó mayor promedio de riqueza de morfotipos con un índice de 25,4, mientras que *Pinus radiata* es la especie con menos estimación de riqueza con un índice de 5 (Tabla 21-3). La diversidad de Shannon calculada por especie forestal indicó a *Ocotea heterochroma* como la especie más diversa con índice de 13,96, la diversidad de Simpson complementó que esta especie es la más diversa con un índice de 9. Los cálculos de Diversidad de Shannon y Simpson señalaron a *Pinus radiata* como la especie con menor diversidad con valores de 5,16 y 5,14 respectivamente (Tabla 21-3). Se determinó que las especies forestales nativas *Ocotea heterochroma* y *Cedrela montana* tuvieron mayor diversidad de morfotipos que las especies exóticas (Gráfico 2-3).

Tabla 21-3: Riqueza de especies, diversidad de Shannon y Diversidad de Simpson de especies forestales nativas y exóticas, primera colecta

TIPO DE ESPECIE	ESPECIE	Riqueza de especie ^a	Intervalos de confianza		Diversidad de Shannon ^a	Intervalos de confianza		Diversidad de Simpson ^a	Intervalos de confianza	
Nativa	<i>Ocotea heterochroma</i>	25,4	13,01	113,88	13,96	9	22,04	9	7,66	12,24
Nativa	<i>Cedrela montana</i>	12,08	12	14,27	11,63	10,64	13,65	10,63	9,57	12,35
Exótica	<i>Pinus radiata</i>	5	5	6,13	5,16	4,72	6,06	5,14	4,5	6,37
Exótica	<i>Eucalyptus globulus</i>	10,72	5,92	40,37	9,89	4,37	20,14	6,72	3,76	15,02

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

^a = muestra que los valores estuvieron dentro de los intervalos de confianza.

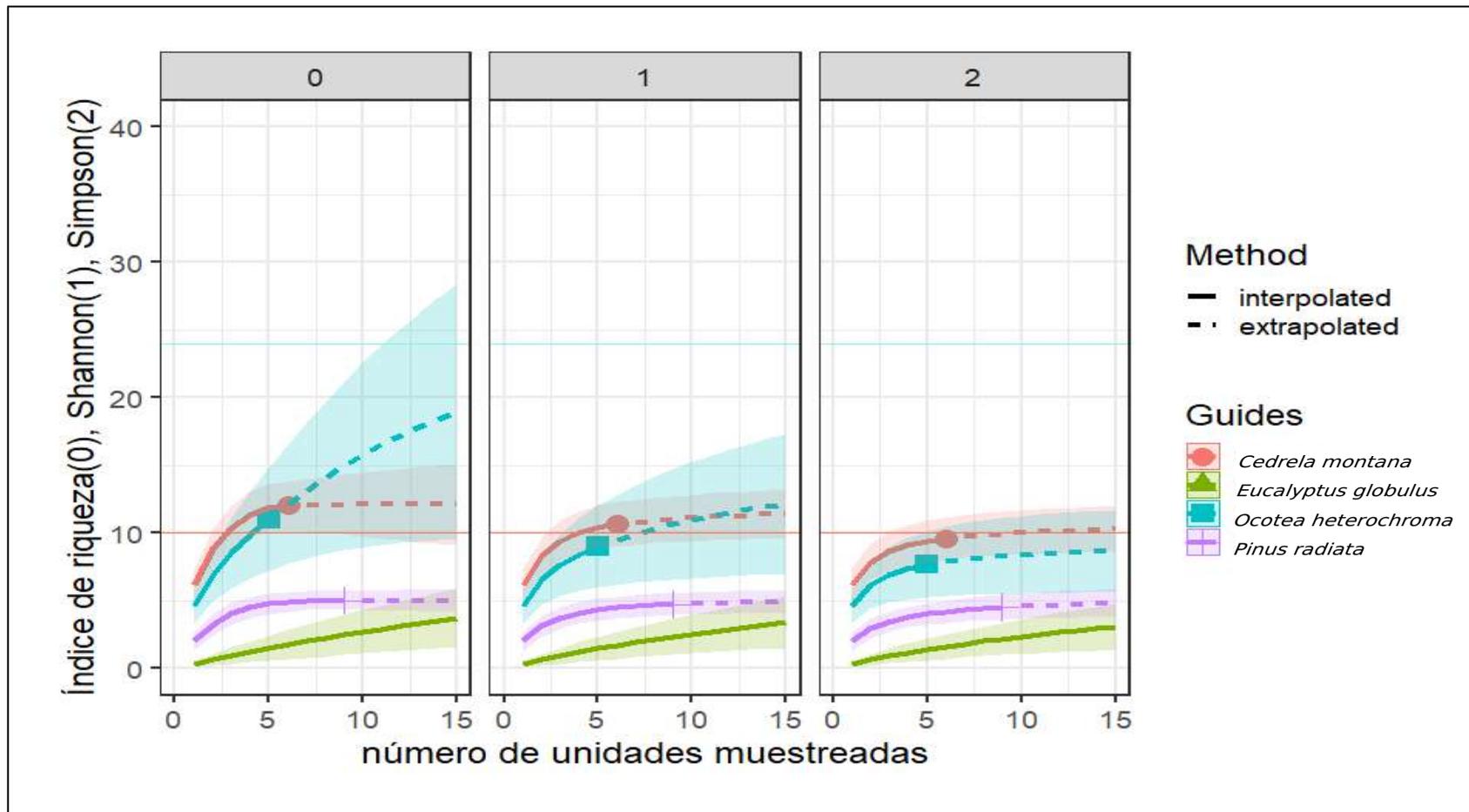


Gráfico 2-3. Índice de riqueza, diversidad de Shannon y Simpson de morfotipos aislados de la endósfera foliar de especies forestales nativas y exóticas, primera colecta.

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

3.1.3.2 Cálculo de riqueza de especies, diversidad de Shannon y Simpson de la segunda colecta

Cedrela montana fue la especie que presentó mayor promedio de riqueza de morfotipos con un índice de 10,45, mientras que *Eucalyptus globulus* fue la especie con menos estimación de riqueza con índice de 5 (Tabla 22-3). La diversidad de Shannon calculada por especie forestal, indicó que *Cedrela montana* presentó mayor diversidad de morfotipos con un número efectivo de 10,70, Simpson complementó la diversidad con un índice de 10,48. Los cálculos de Diversidad de Shannon y Simpson señalaron a *Pinus radiata* como la especie con menor diversidad de morfotipos con valores de 5,18 y 4,6 respectivamente (Tabla 22-3). Al analizarse estos datos se determinó que *Cedrela montana* fue la especie forestal nativa con mayor diversidad de morfotipos y a *Pinus radiata* como la especie forestal exótica con mayor diversidad de morfotipos, los resultados de la colecta número dos mostraron que las dos especies forestales nativas *Ocotea heterochroma* y *Cedrela montana* presentaron mayor diversidad de hongos endófitos en la endósfera foliar (Gráfico 3-3).

Tabla 22-3: Riqueza de especies, diversidad de Shannon y Diversidad de Simpson de especies forestales nativas y exóticas, segunda colecta

TIPO DE ESPECIE	ESPECIE	Riqueza de especie ^a	Intervalos de confianza		Diversidad de Shannon ^a	Intervalos de confianza		Diversidad de Simpson ^a	Intervalos de confianza	
Nativa	<i>Ocotea heterochroma</i>	6	6	7,26	6,12	5,75	6,95	6,14	5,55	7,21
Nativa	<i>Cedrela montana</i>	10,45	10,03	15,79	10,70	8,93	13,28	10,48	8,11	13,78
Exótica	<i>Pinus radiata</i>	5,85	5,06	16,79	5,18	4,29	6,91	4,6	3,93	6,14
Exótica	<i>Eucalyptus globulus</i>	5	5	6,02	5,48	4,96	6,37	5,95	4,92	7,27

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

^a = muestra que los valores estuvieron dentro de los intervalos de confianza.

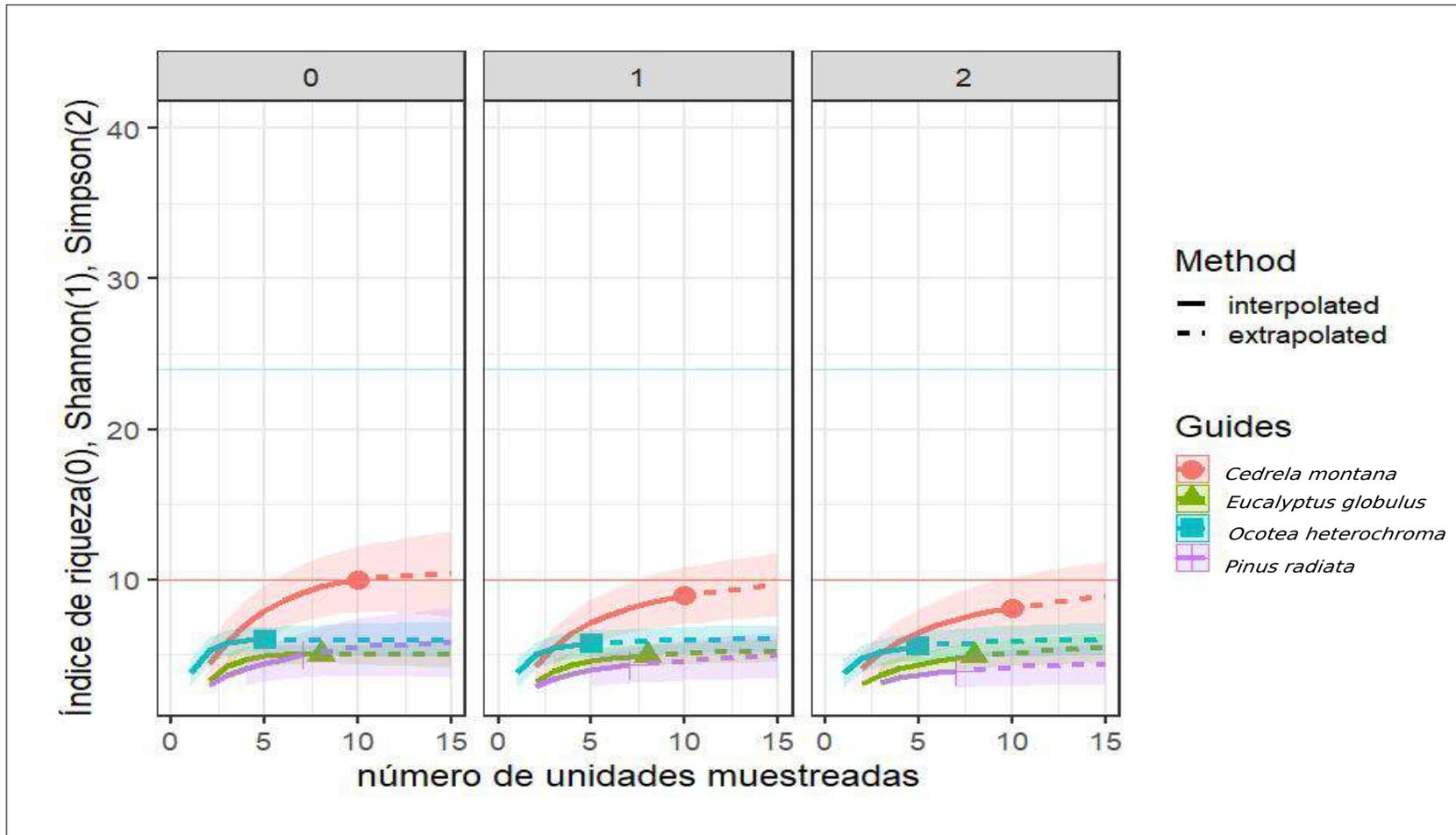


Gráfico 3-3. Índice de riqueza, diversidad de Shannon y Simpson de morfotipos aislados de la endósfera foliar de especies forestales nativas y exóticas, segunda colecta.

Realizado por: Uvidia Calles, Allison, 2021.

Este estudio demostró que las plantas nativas *Cedrela montana* y *Ocotea heterochroma* son hospederas de la mayor diversidad de hongos endófitos en la endósfera foliar esto puede complementar a la información detallada por Lei, et al., (2010), quienes informaron que las especies nativas responden evolutivamente a las plantas exóticas, reduciendo o eliminando los impactos invasores, sin embargo estos señalan que las especies exóticas pueden alterar la diversidad de microorganismos que poseen las plantas nativas. Además, tanto Habte y Manjunath (1991), como Koide 1991 y Hetrick et al. (1992), citados en Klironomos (2003) agregan que el que las plantas se beneficien de la asociación de hongos endófitos depende de varios factores, incluidos los genotipos de los organismos involucrados y las condiciones ambientales en las que interactúan.

Todos los géneros obtenidos como resultado del aislamiento de hongos de la endósfera foliar de especies forestales nativas y exóticas, poseen un gran potencial debido a su importancia como explican Rana et al. (2019: pp. 1-13) quienes relataron que estos albergan una alta gama de metabolitos secundarios, compuestos bioactivos de hongos endófitos que son productores naturales de medicamentos y que una de las principales áreas de la investigación de hongos endófitos se ha dirigido a la biorremediación, esta tiene una importancia tanto en el ámbito económico como en el ambiental, ya que muchos de estos tienen posibles biorrefinerías lignocelulósicas, son productores de hidrolasa extracelular, enzimas como pectinasas, celulasas, lipasas, amilasas, como mecanismo de resistencia frente a organismos patógenos y para obtener nutrición del hospedero.

Esta investigación tuvo como resultado el aislamiento de géneros como *Penicillium*, Chow y Ting (2015), destacaron a este como un productor de la enzima asparaginasa, Sunita et al. (2013) describieron a *Colletotrichum* y *Xylaria* como productores de amilasa, celulasa, lipasa, pectinasa, proteasa, géneros también encontrados en este estudio. *Trichoderma* género de gran importancia en el mundo del control biológico se obtuvo en esta investigación, este mostró evidencias moleculares y filogenéticas de pertenecer al clado *Longibrachiatum* haciéndolo relación con el artículo descrito por Zhang et al. (2018), en donde se mostró una potente actividad que inhibe el crecimiento de fitopatógenos, se descubrió por primera vez el control biológico efectivo de *Valsa mali* y la presencia de compuestos activos como ftalato de diisobulito y ftalato de mono 2-hetilhexilo, se describe a estos como compuestos toxicológicos, también como producto se logró aislar *Pestalotiopsis*, Ding et al. (2008) expusieron la extracción del componente bioactivo ácido ambuico y sus derivados mediante dicho hongo endófito, en donde se mostró la actividad antimicrobiana de bacterias *Staphylococcus aureus*.

Aduciendo la importancia a la parte forestal, Doty (2011: 151-156) indicó que los hongos endófitos pueden promover directamente el crecimiento de los árboles y mejorar su salud al prevenir patógenos e incrementar la tolerancia al estrés.

CONCLUSIONES

- Se identificaron las características morfológicas de 37 morfotipos de hongos endófitos asociados a la endósfera foliar de dos especies forestales nativas: *Ocotea heterochroma* Mez & Sodiro y *Cedrela montana* Moritz ex Turcz y dos exóticas: *Eucalyptus globulus* Labill y *Pinus radiata* D. Don. Los géneros de hongos endófitos más encontrados fueron *Xylaria* con 27,13%, el segundo *Colletotrichum* 24,03%, seguido de *Pestalotiopsis* con 10,85%, *Arthrinium* con 7,75%, el 12,41% abarcó a los géneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Pyrenochaeta*, *Phaeocreamonium* y *Coniachaeta*.
- Se caracterizaron molecularmente 9 géneros de hongos endófitos: *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Xylaria*, *Arthrinium*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Pyrenochaeta*, *Phaeocreamonium*, *Coniochaeta* y el orden Diaporthales.
- La diversidad de la microbiota endófito fúngica mediante análisis de índice de riqueza, Diversidad de Shannon y Diversidad de Simpson, determinó que las comunidades de hongos endófitos asociadas a la endósfera foliar en las especies forestales nativas posee mayor diversidad que las especies forestales exóticas.

RECOMENDACIONES

- Realizar el aislamiento de hongos endófitos con otros métodos adicionales a los utilizados en este estudio como el método de dilución, para evaluar la diferencia y variación de diversidad con el método de fragmentación realizado en este estudio.
- Con los hongos endófitos obtenidos en este estudio realizar investigaciones sobre metabolitos secundarios para observar los beneficios que estos podrían proporcionar.
- Se recomienda realizar la amplificación de ADN de otras regiones adicionales como beta tubulina, RNA polimerasa II, para realizar análisis multilocus para la caracterización molecular.

GLOSARIO

Ampuliforme: de forma de botella, hinchada, particularmente en la parte basal. Se aplica especialmente a la célula conidiógena llamada fiálide (Ulloa y Halin, 2006: p.19).

Clamidospora: espora de tipo asexual, recubierta por una pared celular recta y de tipo perdurable, que funciona como espora de resistencia o latencia: respecto a su ontogenia, las clamidosporas se consideran como conidios holotáticos, pero su función es de sobrevivencia mas bien que propagativa (Ulloa y Halin, 2006: p.105).

Colonia: grupo de individuos de la misma especie que viven conjuntamente. En los hongos el término se refiere generalmente a la masa de hifas (micelio) o células individuales que proliferan desde un punto central para formar una entidad en las características típicas de la especie (Ulloa y Halin, 2006: p.113).

Conidio: o conidia, espora asexual nucleada, inmóvil, que generalmente se forma en el ápice o a un lado de una célula esporógena especializada (Ulloa y Halin, 2006: p.120).

Conidióforo: hifa, simple o ramificada, que está morfológica y/o fisiológicamente diferenciada de una hifa somática para producir y portar conidios (Ulloa y Halin, 2006: p.121).

Estroma: masa compacta de hifas somáticas, sobre la cual se producen hifas fértiles que generan órganos reproductores sexuales o asexuales (Ulloa y Halin, 2006: p.218).

Fialide: tipo de célula conidiógena, que produce conidios blásticos en sucesión basípeta a partir de un locus (Ulloa y Halin, 2006: p.236).

Hialina: transparente e incoloro, como si fuera de cristal, o por lo menos diáfano (Ulloa y Halin, 2006: p.285).

Picnidio: cuerpo fructífero asexual con una cavidad interna forrada con conidióforos, característicos de los hongos asexuales: *Phoma*, *Phomosis*, *Pyrenochaeta*, *Botryodiplodia* (Ulloa y Halin, 2006: p.436).

BIBLIOGRAFÍA

ADEFOR. *Comportamiento de especies forestales del género Eucalyptus* [blog] Cajamarca, Perú: Ediciones cultural peruana. (1995). [Consulta: 2021-02-15]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4876/1/33T0147.pdf>

BAJO, J., et al. “Cultural characteristics and pathogenicity of *Pestalotiopsis funerea* on *Cupressus arizonica*”. *Forest Pathology* [en línea], 2008, (USA) 38 (4), PP 263-274. [Consulta: 02 de marzo 2021]. ISSN: 1439-0329. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0329.2008.00545.x>

BAYMAN, Paul, et al. “Distribution and dispersal of *Xylaria* endophytes in two tree species in Puerto Rico”. *Mycological research* [en línea], 1998, (Reino Unido) 102 (8), pp. 944-948. [Consulta: 03 de marzo 2021]. ISSN: 09537562. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0953756208609727>

BETTUCCI, L., et al. “Endophytic mycobiota of healthy twigs and the assemblage of species associated with twig lesions of *Eucalyptus globulus* and *E. grandis* in Uruguay”. *Mycological Research* [en línea], 1999, (Reino Unido) 103 (4), pp 468-472. [Consulta: 02 de marzo 2021]. ISSN: 0953-7562. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S095375620860297X>

CHOW, Y. & TING, A. “Endophytic L-asparaginase-producing fungi from plants associated with anticancer properties”. *Journal of advanced research* [en línea], 2015, (Egipto) 6 (6), pp. 869-876. [Consulta: 08 de marzo 2021]. ISSN: 2090-1232. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123214000873>

DAMM, U., et al. “The *Colletotrichum acutatum* species complex”. *Studies in mycology* [en línea], 2012, (Países Bajos) 73 (1), pp. 37-113. [Consulta: 02 de marzo 2021]. ISSN: 0166-0616. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166061614600762>

DING, Gang, et al. “Ambuic acid and torreyanic acid derivatives from the endolichenic fungus *Pestalotiopsis sp.*”. *Journal of Natural Products* [en línea], 2009, (USA) 72 (1), pp. 182-186. [Consulta: 08 de marzo 2021]. ISSN:1520-6025. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np800733y>

DOTY, Sharon. *Endophytes of Forest Trees* [en línea]. *Growth-promoting endophytic fungi of forest trees*. Dordrecht-Holanda: Springer, 2011, pp.151-156. [Consulta: 08 de marzo 2021]. Disponible en: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-94-007-1599-8>

ECUADOR FORESTAL. *Ficha técnica N° 13 Pinus radiata*. [Consulta: 08 de febrero de 2021]. Disponible en: <https://ecuadorforestal.org/fichas-tecnicas-de-especies-forestales/ficha-tecnica-no-13-pino-pinus-radiata/>

ESSAKHI, S., et al. “Molecular and phenotypic characterization of novel *Phaeoacremonium* species isolated from esca diseased grapevines”. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* [en línea], 2008, (USA) 21 (1), pp. 119-134. [Consulta: 02 de marzo 2021]. ISSN:1878-9080. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20396582/>

FERRARA, M. “Fungos Endofíticos. Potencial para a Produção de Substâncias Bioativas Endophytic F otential for the Production of Bioactive Substances”. *Revista Fitos* [en línea], 2006, (Brasil) 2 (1), pp. 73-79. [Consulta: 10 abril 2020]. ISSN: 1808-9569. Disponible en: <https://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/43/pdf>

GAMBOA, Miguel. “Hongos endófitos tropicales: Conocimiento actual y perspectivas”. *Acta Biológica Colombiana* [en línea], 2006, (Colombia) 11 (1), pp. 3-20. [Consulta: 02 de marzo 2021]. ISSN: 1900-1649. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/27153>

GARCÍA, H., et al. “Morphological and molecular characterization of native of *Trichoderma* and its potential biocontrol against *Phytophthora infestans*”. *Mexican Journal of Phytopathology* [en línea], 2017, (México) 35(1), pp. 58-79. [Consulta: 02 de marzo 2021]. ISSN: 2007-8080. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092017000100058&script=sci_arttext&tlng=en

GARRIGUES, Fran. *Sanger: Estrategia de secuenciación de Primera Generación*[blog]. *Curiosidades de la genética*, 2017. [Consulta: 10 abril 2020]. Disponible en: <https://genotipia.com/sanger/>

HARRINGTON, A., et al. “*Coniochaeta endophytica* sp. nov., a foliar endophyte associated with healthy photosynthetic tissue of *Platycladus orientalis* (Cupressaceae)”. *Plant and Fungal Systematics* [en línea], 2019, (Alemania) 64 (1), pp. 65-79. [Consulta: 02 de marzo 2021]. ISSN: 2244-7459. Disponible en: <https://content.sciendo.com/applib/error404/null>

HSIEH, T., et al. *iNEXT online: interpolation and extrapolation (Version 1.0) [Software]* [blog]. [Consulta: 01 de marzo 2021]. Disponible en: http://chao.stat.nthu.edu.tw/wordpress/software_download/inext-online/

JUELA, T. Caracterización de las propiedades físicas de la madera de *Eucalyptus saligna* Smith en la provincia de Loja. [En línea] (Trabajo de titulación). (Pregrado). Universidad Nacional de Loja., Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, Ingeniería Forestal. Loja, Ecuador. 2015. [Consulta: 2021-02-19].

KHAN, Z., et al. “*Coniochaeta polymorpha*, a new species from endotracheal aspirate of a preterm neonate, and transfer of *Lecythophora* species to *Coniochaeta*”. *Antonie Van Leeuwenhoek* [en línea], 2013, (Países Bajos) 104 (2), pp. 243-252. [Consulta: 02 de marzo 2021]. ISSN: 0003-6072. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10482-013-9943-z>

KLIRONOMOS, John N. “Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi”. *Ecology* [en línea], 2003, (USA) 9 (1), pp. 2292-2301. [Consulta: 04 de marzo 2021]. ISSN: 1365-2745. Disponible en: <https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1890/02-0413>

Lei, Y., et al. “The impact of alien plant invasion on biodiversity and the evolutionary response of protist”. *Biodiversity Science* [en línea], 2010, (China) 8 (6), pp. 622-630. [Consulta: 04 de marzo 2021]. ISSN: 2151-3740. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Yanbao-Lei/publication/50425293_Impacts_of_alien_plant_invasions_on_biodiversity_and_evolutionary_responses_of_native_species/links/0fcfd509a055bebfa3000000/Impacts-of-alien-plant-invasions-on-biodiversity-and-evolutionary-responses-of-native-species.pdf

LEVIĆ, J., et al. “Simple and efficient method for detection and identification of *Pyrenochaeta terrestris* on maize root”. *Crop Protection* [en línea], 2012, (Suiza) 38 (2), pp. 66-71. [Consulta: 03 de marzo 2021]. ISSN: 2151-3740 0261-2194. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0261219412000762>

LIMÓN, M. Caracterización morfológica y molecular de *Pestalotiopsis* spp. asociado a cáncer de tallo de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) en el occidente de México [en línea] (Trabajo de Titulación). (Maestría). Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Jalisco México). 2017. pp. 32. [Consulta: 02 de marzo 2021]. Disponible en:

<http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/handle/123456789/6048>

LIN, Ting, et al. “Secondary metabolites of *Pyrenochaeta sp.* B36, an endophytic fungus from *Annona squamosa* L”. Natural product research [en línea], 2011, (Reino Unido) 25 (10), pp. 1008-1013. [Consulta: 03 de marzo 2021]. ISSN: 1478-6427. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2010.534997>

MAHARACHCHIKUMBURA, S., et al. “*Pestalotiopsis* revisited”. Studies in Mycology [en línea], 2014, (Países Bajos) 79 (1), pp 121-186. [Consulta: 18 de febrero 2021]. ISSN: 0166-0616. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166061614000116>

MOLAR, R., et al. “Identificación Morfológica y Molecular de *Penicillium oxalicum* Causante de Pudrición de Tallos y Frutos de Tomate”. Revista mexicana de fitopatología [en línea], 2013, (México) 31 (1), pp. 13-19. [Consulta: 03 de marzo 2021]. ISSN 0185-3309. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092013000100002

PANSANIT, Acharavadee & PRIPDEEVECH, Patcharee. “Antibacterial secondary metabolites from an endophytic fungus, *Arthrinium sp.* MFLUCC16-1053 isolated from *Zingiber cassumunar*”. Mycology [en línea], 2018, (USA) 9 (4), pp. 264-272. [Consulta: 02 de marzo 2021]. ISSN: 2150-1211. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21501203.2018.1481154>

PÉREZ, L., et al. “*Caracterización morfológica y patogénica de Colletotrichum sp. como agente causal de antracnosis en ñame Dioscorea sp.*”. Revista Colombiana de Micología [en línea], 2003, (Colombia) 1(1), pp: 24-35. [Consulta: 02 de marzo 2021]. ISSN: 0123-3475. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77650104>

PERŠOH, D., et al. “Molecular and morphological evidence for the delimitation of *Xylaria hypoxylon*”. Mycologia [en línea], 2009, (USA) 101 (2), pp. 256-268. [Consulta: 02 de marzo 2021]. ISSN:1757-2536. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3852/08-108>

PINTOS, Ángel, et al. “Six new species of *Arthrinium* from Europe and notes about *A. caricicola* and other species found in *Carex spp.* hosts”. MycoKeys [en línea], 2019 (Bulgaria) 49 (1), pp. 15-48. [Consulta: 03 de marzo 2021]. ISSN:1314-4057. Disponible en: <https://mycokeys.pensoft.net/article/32115/>

RANA, Kusam Lata, et al. *Recent advancement in white biotechnology through fungi* [en línea]. *Endophytic fungi: biodiversity, ecological significance, and potential industrial applications*. Cham- Alemania: Springer, 2019, pp. 1-13. [Consulta: 08 de marzo 2021]. Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-10480-1_1

REHNER, Stephen A.; BUCKLEY, Ellen. “A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs”. *Mycologia* [en línea], 2005, (USA) 97 (1), pp. 84-98. [Consulta: 01 de marzo 2021]. ISSN: 66044-8897. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/7381379_A_Beauveria_phylogeny_inferred_from_nuclear_ITS_and_EF1_sequences_Evidence_for_cryptic_diversification_and_links_to_Cordyceps_teleomorphs

SAMUELS, Gary; & HEBBER, Prakash. *Trichoderma: identification and agricultural applications*. Minnesota- USA: APS Press, 2015 pp. 120-121.

SÁNCHEZ, R., et al. “Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina”. *TIP Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas* [en línea], 2013, (México) 16 (2), pp. 132-146. [Consulta: 03 de marzo 2021]. ISSN: 1405-888X. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=46580>

SCHARDL, C., et al. “Loline alkaloids: currencies of mutualism”. *Phytochemistry* [en línea], 2007, (Inglaterra) 68 (7), pp. 980-996. [Consulta: 08 de marzo 2021]. ISSN: 0031-9422. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942207000490>

SCHOCH, C., et al. *NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools* [blog]. Oxford, 2020 [Consulta: 03 de marzo 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>

SHENTU, X., et al. “Antifungal activity of metabolites of the endophytic fungus *Trichoderma brevicompactum* from garlic”. *Brazilian journal of microbiology* [en línea], 2014, (Brasil) 45 (1), pp. 248-254. [Consulta: 02 de marzo 2021]. ISSN: 1517-8382. Disponible en: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822014005000036&script=sci_arttext

SHTAYEH, M.; et al. *Mycology manual* [en línea]. Nablus-Palestina: Nablus POB, 1998. [Consulta: 18 de febrero 2021]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/profile/Mohammed->

SaleemAliShtayeh/publication/233945721_Laboratory_Manual_for_Mycology/links/57fcc86708aeb857afa08757/Laboratory-Manual-for-Mycology.pdf

SILVA, G., et al. “Lactone derivatives produced by a *Phaeoacremonium sp.*, an endophytic fungus from *Senna spectabilis*”. Journal of natural products [en línea], 2017, (USA) 80 (5), pp. 1674-1678. [Consulta: 03 de marzo 2021]. ISSN: 1520-6025. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jnatprod.5b00828>

SPATAFORA, J., et al. “A five-gene phylogeny of Pezizomycotina”. Mycologia [en línea], 2006, (USA) 98 (6), pp. 1018-1028. [Consulta: 03 de marzo 2021]. ISSN: 66044-8897. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15572536.2006.11832630>

STROBEL, G., et al. “Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*”. Microbiology [en línea], 1996, (Reino Unido) 142 (2), pp. 435-440. [Consulta: 02 de marzo 2021]. ISSN:1350-0872. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/13500872-142-2-435?crawler=true>

SUNITHA, V, et al. “Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants”. World Journal of Agricultural Sciences [en línea], 2013, (Pakistan) 9 (1), pp. 01-09. [Consulta: 08 de marzo 2021]. ISSN: 1817-3047. Disponible en: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.415.162&rep=rep1&type=pdf>

THAN, P., et al. “Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chili (*Capsicum spp.*) in Thailand”. Plant Pathology [en línea], 2008. (Reino Unido) 57 (3), pp: 562-572. [Consulta: 02 de marzo 2021]. ISSN: 0032-0862. Disponible en: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3059.2007.01782.x>

ULLOA, Miguel; & HANLIN, Richard. *Nuevo Diccionario Ilustrado de Micología*. Minnesota-U.S.A.: The American Phytopathological Society, 2006. ISBN-13: 978-0-89054-341-2, pp. 19-436.

VAZ, A., et al. “A multiscale study of fungal endophyte communities of the foliar endosphere of native rubber trees in Eastern Amazon”. Scientific reports [en línea], 2018, (Inglaterra) 8 (1), pp. 1-11. [Consulta: 08 de marzo 2021]. ISSN: 2045-2322. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-34619-w>

YANG, Chun-Lin, et al. “Introducing *Arthrinium phyllostachium* sp. nov.(Apiosporaceae, Xylariales) on *Phyllostachys heteroclada* from Sichuan Province, China”. *Phytotaxa* [en línea], 2019. (Nueva Zelanda) 406 (2), pp. 91-110. [Consulta: 03 de marzo 2021]. ISSN: 1179-3163. Disponible en: <https://www.biotaxa.org/Phytotaxa/article/view/phytotaxa.406.2.2>

YE, Q. T., et al. “First Report of *Phaeoacremonium minimum* Associated with Grapevine Trunk Diseases in China”. *Plant Disease* [en línea], 2020, (USA) 104 (4), pp. 1259-1259. [Consulta: 03 de marzo 2021]. ISSN: 0191-2917. Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-08-19-1649-PDN>

ZHANG, Shuwu, et al. “Identification of the antifungal activity of *Trichoderma longibrachiatum* T6 and assessment of bioactive substances in controlling phytopathogens”. *Pesticide biochemistry and physiology* [en línea], 2018, (USA) 147 (1), pp. 59-66. [Consulta: 08 de marzo 2021]. ISSN: 1095-9939. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048357518300038>



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

**DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS DEL APRENDIZAJE
UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL**

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 05/05/2021

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Allison Camila Uvidia Calles
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Recursos Naturales
Carrera: Ingeniería Forestal
Título a optar: Ingeniera Forestal
f. Analista de Biblioteca responsable: Lic. Luis Caminos Vargas Mgs.



1060-DBRA-UTP-2021