

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Diversidad de hongos endófitos en la Cueva de “Los Tayos” (Morona Santiago; Ecuador)

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada

en Ciencias Biológicas

PAULA CAMILA SILVA QUITIGÜIÑA

Quito, 2020

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Srta. Paula Camila Silva Quitigüiña ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. María Eugenia Ordóñez Maldonado

Directora de la Disertación

Quito, 09 de octubre del 2020

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi madre Zahira Elizabeth por apoyarme con cada decisión de mi vida y tener fe en mí. Como mi apoyo diario a mis abuelos Eduardo y Mariani, que me guiaron en mis años universitarios, sin duda ellos son una gran parte de este logro académico. A mi hermana Nina Rafaela por sus buenas ideas y sus palabras de apoyo, a Tailuma Zahira por contagiarme su positivismo y darme ánimos en momentos que me sentía cansada. A mi tía Verónica Samarcanda por ser un ejemplo de esfuerzo y disciplina, a pesar de su atareada vida, siempre está para mí, aclarando mis dudas y revisando mis escritos. A mis primos Julián, Lía y Martín que me impulsan a seguir esforzándome con la confianza y amor que nos une. A Juan Fernando que me brindó su ayuda y consejos para terminar esta licenciatura con ganas.

A mi directora de tesis, María Eugenia Ordoñez Maldonado, por corregir mi trabajo escrito y ser el apoyo que necesité para culminar mi tesis y llegar a obtener el título universitario. A Alexandra Narváez por darme la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal y guiarme en mi proceso de aprendizaje. Le agradezco a Fernando Marín y Carolina Castro por su tiempo y orientación en este trabajo de laboratorio. Así mismo, agradezco a Santiago Burneo y Jennifer Yáñez por sus valiosos comentarios y sugerencias para la culminación de esta tesis.

Esta investigación se llevó a cabo con recursos de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a la cual extiendo mis agradecimientos, así también por brindarme oportunidades para desarrollarme como una profesional y engrandecer mis conocimientos a través de la convivencia interdisciplinaria dentro y fuera del campus, con maestros capacitados en los campos académicos que me interesan.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AA	Agar agua
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
° C	Grados Celsius
CEQCA	Colección de Endófitos Quito Católica
CaCO ₂	Carbonato de calcio
F	Forward strand
H	Representación del Índice de Shannon
ITS	Internal Transcribed Spacer
Kb	Kilo-base
mL	Micro-litro
mm ²	Milímetros cuadrados
MEA	Malt Extract Agar
No.	Número
PAST	Paleontological Statistics
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
pH	Potencial de Hidrógeno
PUCE	Pontificia Universidad Católica del Ecuador
S	Representación de Riqueza de especies

R Reverse strand

μg Micro-gramo

μL Micro-litro

V Voltios

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1 ZONA DE ESTUDIO	3
3.2. CUEVAS KÁRSTICAS.....	3
3.3. VEGETACIÓN DENTRO DE CUEVAS	5
3.4. HONGOS ENDÓFITOS	6
3.5. AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS	7
4. OBJETIVOS	9
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	9
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS	10
4.1. ÁREA DE ESTUDIO	10
4.2. MUESTREO Y COLECCIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS	10
4.3. AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS Y CONDICIONES DE CULTIVO ..	11
4.4. CLASIFICACIÓN Y COMPARACIÓN MORFOTÍPICA DE HONGOS ENDÓFITOS.....	12
4.5. EXTRACCIÓN DE ADN DE HONGOS ENDÓFITOS.....	12
4.6. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS ENDÓFITOS	13
4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DIVERSIDAD DE ENDÓFITOS FÚNGICOS EN LA CUEVA DE LOS TAYOS	13
5. RESULTADOS.....	15
5.1. IDENTIFICACIÓN DE PLANTAS HOSPEDERAS DE HONGOS ENDÓFITOS EN LA CUEVA DE LOS TAYOS	15
5.2. CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS ENDÓFITOS.....	21
5.3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS HONGOS ENDÓFITOS.....	50
5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE DIVERSIDAD DE HONGOS ENDÓFITOS	56
5.4.1. DIVERSIDAD DE HONGOS ENDÓFITOS EN LOS TEJIDOS DE HOJAS Y TALLOS	57
5.4.2. DIVERSIDAD DE HONGOS ENDÓFITOS ENTRE ESPECIES VEGETALES ..	59

5.4.3. DIVERSIDAD DE HONGOS ENDÓFITOS ENTRE ZONAS DE LA CUEVA DE LOS TAYOS.....	60
5.4.4. DIVERSIDAD DE HONGOS ENDÓFITOS ENTRE ZONAS DE LA CUEVA DE LOS TAYOS.....	62
6. DISCUSIÓN	63
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	73
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
9. ANEXOS.....	92

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Mapa y fotografías de las plantas de la Cueva de Los Tayos (A, B y C)** espécimen vivo (izq), espécimen seco (der.). A, plantas hospederas colectadas en la zona de “Daylight”: A.1., *Trema* sp. (familia Magnoliaceae); A.2., *Euterpe precatória* (familia Arecaceae); A.3., Sp3 (familia no identificada). B, plantas hospederas colectadas en la zona de “Galería”: B.1., Sp1 (familia Asteraceae); B.2., *Virola* sp. (familia); B.3., *Oenocarpus bataua* (familia Arecaceae). C, Plantas hospederas colectadas en la zona de “Domo”: Sp2 (familia no identificada). D, Mapa de la Cueva de Los Tayos realizado por la expedición inglesa de 1976 (Toulkeridis, et al., 2015) con los puntos de colecta de plantas hospederas..... 17
- Figura 2. Curva de acumulación de especies** basada en la riqueza (S) de especies de endófitos fúngicos (con una confianza > 95%) de la Cueva de Los Tayos (N=48) (Bernardo y Goyes, 2004). 56
- Figura 3. Riqueza total de especies en cada géneros de hongos endófitos** aislados de las siete plantas hospederas de la Cueva de Los Tayos..... 57
- Figura 4. Índices de diversidad alfa de tejidos de tallo y hoja.** A, Índice de diversidad de Shannon con rarefacción al tejido con menor número de aislados (Hojas=21); B, gráfica de diversidad entre ambos tejidos a partir de los valores de alfa de Fisher que relacionan el número de individuos (aislados) con el número de géneros presentes (Moreno, Barragan, Pineda y Pavon 2011)..... 59
- Figura 5. Regresión lineal simple** con línea ajustada que muestra la diversidad de géneros endófitos aisladas de cada especie hospedera (Frost, 2018): D, Domo; G.T., Galería de Los Tayos y Z.D., Zona Daylight. 60
- Figura 6. Gráfica del índice de Shannon con rarefacción** a la zona con menor número de muestras endófitas fúngicas (N=3, Domo). Z.D., Zona Daylight; G.T., Galería de Los Tayos; D., Domo. 61
- Figura 7. Índices de diversidad alfa entre plantas etioladas y no etioladas.** A, Índice de Shannon y B, relación de la riqueza de especies de hongos endófitos presentes en plantas etioladas vs. no etioladas con rarefacción a la muestra con menor número de géneros de hongos endófitos (N=7) (Monro et al., 2018). 62

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de las muestras vegetales con el grado de luminosidad en su sitio de colecta, hábitat e identificación taxonómica.....	18
Tabla 2. Número de fragmentos vegetales analizados de morfotipos totales y de secuencias de hongos endófitos aislados de las siete plantas hospederas de la Cueva de Los Tayos.....	21
Tabla 3. Morfotipos de 69 hongos endófitos aislados en cajas Petri con medio de cultivo PDA 1X a temperatura ambiente (~23°C) de las siete especies de plántulas colectadas dentro de la Cueva de Los Tayos. Se muestran fotografías a los 7 y 14 días, con una vista del anverso o colonia y reverso del plato Petri respectivamente.....	222
Tabla 4. Identificación molecular de los 48 hongos endófitos de acuerdo a los resultados obtenidos por homología usando la herramienta BLAST en el NCBI. Se registra el porcentaje de cobertura, máxima Identidad (Max ID) y el valor-e (E value) para la secuencia con mayor similitud (Portero, 2013). Se describe también: la planta hospedera, código de morfotipo al que corresponde y tejido del que se aisló.....	52
Tabla 5. Índices de riqueza alfa de hongos endófitos en hojas y tallos con cálculos de riqueza (S), diversidad de Shannon (H) y alfa de Fisher (αF).....	58
Tabla 6. Índices de diversidad alfa de especies presentes en cada zona de la cueva..	61

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Variables Bioclimáticas del bosque siempreverde piemontano que se encuentra fuera a la Cueva de Los Tayos (Hijmans et al., 2005; WorldClim–Global Climate, 2014).....	921
Anexo 2. Secuencia nucleotídica (cebadores) usados para la identificación molecular de hongos endófitos de la Cueva de Los Tayos (Portero, 2013).....	92
Anexo 3. Tabla de Geneious 9.0.5 de las cuatro secuencias de ADN de <i>Mycoleptodiscus</i>.	93
Anexo 4. Tabla de Geneious 9.0.5 de las secuencias de ADN de las tres especies de <i>Diaporthe</i> alineadas con secuencias de la base de datos de BLAST.	93
Anexo 5. Tabla de Geneious 9.0.5 de las dos secuencias de ADN de <i>Xylaria</i> alineadas con secuencias de la base de datos de BLAST.	93
Anexo 6. Tabla de Geneious 9.0.5 de las dos secuencias de ADN de <i>Hypoxylon</i> alineadas con secuencias de la base de datos de BLAST.....	93

1. RESUMEN

La Cueva de Los Tayos es un conjunto de cavidades subterráneas de geotipo kárstico ubicada en las estribaciones de la Cordillera del Cóndor al sureste de Ecuador. Este estudio brinda el primer registro de diversidad de hongos endófitos asociados a la vegetación presente en la Cueva de Los Tayos. En total, se aislaron 69 hongos endófitos a partir de fragmentos de hojas y tallos de las siete especies vegetales creciendo dentro de la cueva, que fueron clasificados en 42 morfotipos según sus características macroscópicas. Mediante el uso de los cebadores universales en eucariotas ITS1/ITS4 se obtuvieron las secuencias de ADN de 48 hongos endófitos, los cuales pertenecen únicamente al filum Ascomycota. Se encontraron patrones de diversidad relacionados a su frecuencia de colonización según el tejido vegetal, especie de planta, estado de etiolación y zona de la cueva. Se registró una predominancia de los géneros *Xylaria* y *Mycoleptodiscus*, con una mayor riqueza en tallos que en hojas. Además, las plantas con mayor riqueza de hongos endófitos fueron las que crecen en zonas luminosas, identificándose 11 géneros: *Xylaria*, *Mycoleptodiscus*, *Diaporthe*, *Colletotrichum*, *Dactylonectria*, *Fusarium*, *Mucor*, *Neonectria*, *Phomopsis*, *Sporothrix* y *Talaromyces*. La especie vegetal etiolada de la zona del Domo muestra un género propio, *Hypoxylon*. El muestreo y la caracterización de endófitos fúngicos es un desafío emergente entorno a la necesaria comprensión de su papel ecológico y promete dilucidar nuevas especies y compuestos bioquímicos útiles. Con esta nueva información de hongos endófitos de una cueva kárstica de un bosque tropical amazónico, se pone hincapié en la necesidad de aumentar exploraciones de organismos microscópicos y brinda información biológica útil para la conservación de este ecosistema.

Palabras clave: *Ascomycota*, *endófitos*, *geotipo*, *kárstico*, *hongos*.

2. ABSTRACT

“Cueva de Los Tayos” is a set of underground karst geotype cavities located in the northern slopes of the Condor mountain range in Southeastern Ecuador. This study provides the first report of “Los Tayos” cave’s vegetation and endophytic fungi associated with it. Sixty-nine endophytic fungi were isolated from leafs and stems of the seven plants growing inside the cave, these were classified into 42 morphotypes based on their macroscopic characteristics. Through the use of eukaryote’s universal primers ITS1 / ITS4, the DNA sequences of 48 endophytic fungi were obtained; all belong to the phylum Ascomycota. Diversity patterns were found related to their colonization frequency according to plant tissue, plant species, etiolation and cave area. There is a predominance of the genera *Xylaria* and *Mycoleptodiscus*, with greater richness in stems than leaves. In addition, plants with the highest richness of endophytic fungi were those that grew in lighted areas with 11 identified genera: *Xylaria*, *Mycoleptodiscus*, *Diaporthe*, *Colletotrichum*, *Dactylonectria*, *Fusarium*, *Mucor*, *Neonectria*, *Phomopsis*, *Sporothrix* and *Talaromyces*. The etiolated plant species of the Dome area shows its own genus, *Hypoxylon*. Sampling and characterization of endophytic diversity is an emerging challenge in order to understand its ecological role, and promises to uncover new species and useful biochemical compounds. This new information on endophytic fungi from caves in an Amazonian tropical forest emphasizes the need for further exploration of microscopic organisms and provides useful information for conservation of this ecosystem.

Keywords: *Ascomycota*, *endophytes*, *karst*, *geotype*, *fungi*.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 ZONA DE ESTUDIO

La Cueva de Los Tayos es una formación natural subterránea de geotipo kárstico que se remonta a la época terciaria (Pazmiño, Oña, Villacis y Pineda, 2017), ubicada en las estribaciones de la Cordillera del Cóndor (latitud 3°8'S, longitud 78°14'O, altitud ~800 m., largo total conocido: 4.6 km., profundidad: 201 m) (Toulkeridis et al., 2015). Su nombre se origina de las aves nocturnas que viven en su interior, cuyo nombre común es "tayos" (Caprimulgiformes: Steatornithidae, *Steatornis caripensis*). Esta cueva se encuentra en una zona de topografía heterogénea del bosque siempreverde piemontano de las Cordilleras del Cóndor-Kutukú, en la provincia de Morona Santiago y es la de mayor dimensión que se conoce en el Ecuador (Neill y Guevara, 2013; Toulkeridis et al., 2015).

La cueva se encuentra dentro del territorio Shuar, pueblo que por su folklore la protegía como lugar sagrado y se restringió el acceso por muchos años (Pazmiño, Oña, Villacis y Pineda, 2017). La primera expedición acreditada se realizó en 1976 y, a pesar de involucrar a más de cien personas, entre los que se incluían científicos (Porrás, 1978; Toulkeridis et al., 2015), no se generaron publicaciones biológicas importantes.

El ecosistema circundante externo a la Cueva de Los Tayos está estructurado por un bosque denso gracias a las precipitaciones significativas y condiciones climáticas constantes (Anexo 1). El dosel cuenta con árboles de gran tamaño (30–40 m. de altura) y el sotobosque incluye arbustos y árboles de menor tamaño (2–5 m. de altura) (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2013; Gázquez et al., 2016). El suelo tiene un alto nivel de carbonato de calcio (CaCO₂) y su pH normalmente se mantiene neutro o ligeramente ácido (6,5–7,5) (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2013).

3.2. CUEVAS KÁRSTICAS

Las cuevas de geotipo kárstico son formaciones geológicas conformadas por roca de arenisca y prominentes espeleotemas (estalactitas y estalagmitas) (Ginés, 2003; Constantin et al., 2019). Se originan por disolución de roca caliza (compuesta por carbonatos de calcio) resultado de la acción de aguas ácidas, denominadas así por sus altos niveles de ácido carbónico. La disolución da lugar a la formación de canales horizontales o galerías, aberturas verticales o simas, y zonas amplias o cavernas que se comunican por canales de agua, medio por el que ingresa materia orgánica en descomposición y semillas (Ginés, 2003; Toulkeridis et al., 2015).

A pesar de la escasa información científica resultante de incursiones previas a la Cueva de Los Tayos se puede inferir las características que comparte con otras cuevas kársticas, como poseer suelos pobres en nutrientes, presentar agua con elevados niveles de ácido carbónico (acumulados en el proceso de filtración) y exhibir especies vegetales similares a la flora externa circundante (Mulec y Kubešová, 2010; Zimmerman y Vitousek, 2012). Algunos géneros botánicos abundantes del bosque siempreverde piemontano de las Cordilleras del Cóndor-Kutukú en la provincia de Morona Santiago son: *Euterpe*, *Dictyocaryum*, *Wettinia*, *Socratea* (familia Arecaceae), *Stenopadus* (familia Asteráceae), *Compsonaura* (familia Myristicaceae), *Inga* y *Erythrina* (familia Fabaceae), *Sanango* (familia Solanaceae), *Alchornea*, *Dendrothrix* y *Croton* (familia Euphorbiaceae), *Clusia* y *Tovomita* (familia Clusiaceae), *Dacryodes* (familia Burseraceae), *Digomphia* (familia Bignoniaceae), *Graffenrieda* y *Phainantha* (familia Melastomataceae), *Ilex* (familia Aquifoliaceae), *Prunus* (familia Rosaceae), *Costus* (familia Costaceae) y numerosas especies de la familia Rubiaceae (Neill y Guevara, 2013; Cardoso et al., 2017; EcuRed, 2018).

En cuevas kársticas se pueden distinguir tres zonas: entrada, crepúsculo y oscuridad. La zona más luminosa es la entrada y usualmente presenta una mayor riqueza de plantas; en la Cueva de Los Tayos esta es una amplia claraboya bajo los 70 metros de altura que preceden la entrada principal a la cueva, denominada Zona Daylight (Figura 1). La zona crepuscular, que en este estudio corresponde al inicio de la Galería (Figura 1), está mayormente sumida en la oscuridad y normalmente soporta escasa vegetación, ya que la luz que filtra (menos del 0,04 % de la luz solar presente en la superficie) no es suficiente para su desarrollo (Michelle, 2017; Mulec, 2018). La zona oscura es la más extensa en una cueva, la zona de El Domo (Figura 1)

que tiene una ubicación central en la Cueva de Los Tayos y forma parte de una cámara que mide 70 metros de largo por 30 de ancho y hasta 25 de altura (Davis, 2011; Swanson y Pilla, 2012); no posee luz natural y en esta se encuentran plántulas que llegan arrastradas por agua subterránea, germinan y mueren una vez agotados los nutrientes de la semilla (Pla et al., 2015; Miranda et al., 2020).

3.3. VEGETACIÓN DENTRO DE CUEVAS

En cuevas, la vegetación que crece generalmente no logra desarrollar partes reproductivas, sino que muere transcurridas sus primeras etapas de desarrollo a partir de su germinación, esto debido a varios factores, principalmente la falta de luz y nutrientes extra-embrionarios (Truyens et al., 2015). De las semillas que logran germinar brotan primordios vegetativos, como las hojas embrionarias, diferentes a las hojas verdaderas o funcionales de la etapa adulta. Se necesita de experticia para identificar taxonómicamente a las plántulas; por lo general, su morfología varía en su estado adulto (Arnold et al., 2003; Tuyens et al., 2015).

La principal explicación de la baja cobertura, diversidad y abundancia vegetal dentro de las cuevas se debe a la ausencia de luz (indispensable para los procesos fotosintéticos), siendo necesarias adaptaciones fisiológicas, como el reordenamiento de cloroplastos (Michelle, 2017; Mulec, 2018), etiolación (pérdida parcial o total de los pigmentos clorofílicos en los tejidos) (Mulec, 2018) y asociaciones con microorganismos micorrícicos y endófitos (especies de hongos y bacterias) para su desarrollo (Gagne-Bourque, 2011; Ramalho et al., 2018).

Debido a los gradientes edáficos y de luminosidad que provocan adaptaciones en las plantas y microorganismos asociados a éstas, las cuevas se consideran ecosistemas promotores de especiación (Sánchez et al., 2012; Pla et al., 2015). Al interior de cuevas tropicales se ha reportado vegetación compuesta por árboles pequeños que no exceden el metro y medio de alto, plantas gramíneas y otras angiospermas, siendo estas últimas colonizadoras eficaces en hábitats de poca luz (Suryanarayanan, 2011; Gagne-Bourque, 2011; Bayu et al., 2017).

3.4. HONGOS ENDÓFITOS

El reino Fungi posee organismos eucariontes osmótrofos que presentan dos características típicas de su estado trófico: poseen hifas con paredes celulares de quitina y se dispersan por esporas aéreas (Cavalier-Smith, 2001). Los hongos que se asocian internamente a las plantas se conocen como "endófitos". Estos hongos microscópicos crecen inter o intracelularmente en las plantas y al tener las condiciones ambientales adecuadas sus interacciones con la planta hospedera son mutualistas, aunque no hay certeza sobre los mecanismos de acción específicos en cada planta, ésta se beneficia del hongo según sus necesidades en el ecosistema que habita (Gagne-Bourque, 2011; Kusari y Spiteller, 2012; Vasundhara et al., 2019). Así, mientras la planta provee alimento y protección a los endófitos, estos confieren a la planta adaptabilidad a condiciones de estrés, tanto abióticas (luminosidad, pH, salinidad y/o temperatura) como bióticas (herbivoría, alteración en sus tasas de germinación, crecimiento y reproducción) a través de la producción de metabolitos secundarios (Huang et al., 2008; Truyens et al., 2015; Bayu et al., 2017; Ávalos et al., 2018)..

Los hongos son productores de una variedad de moléculas bioactivas, muchas proveen beneficios al hospedero por poseer actividades antimicrobianas, antivirales, insecticidas y antioxidantes, entre otras (Lacap et al., 2003; Salgado 2005; Gamboa-Gaitán 2006; Mejía et al., 2008; Sreekanthet al., 2011). Estos bio-compuestos son útiles en industrias químicas, farmacéuticas, agrícolas y médicas, para la elaboración de productos fitotóxicos, antiinflamatorios, antitumorales, citotóxicos, inmunosupresores e inhibidores específicos de ciertas proteínas; en consecuencia, resulta necesario ampliar la caracterización y estudio de estos organismos (Pelaez et al., 1998; Arnold, 2007; Sieber, 2007; Aly et al., 2010; Higginbotham et al., 2013; Wang et al., 2013; Marín et al., 2018; Segaran y Sathiavelu, 2019; Vasundhara et al., 2019; Gupta et al., 2020; Mohamed et al., 2020).

Por estudios microbiológicos fúngicos se sabe que existen taxones que han sido aislados una sola vez y taxones como *Acremonium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum* y *Penicillium*, que son dominantes en estudios de diversidad endófito (Koilaraj et al., 2000; Gamboa-Gaitán, 2006; Monro et al., 2018). Los taxones fúngicos también difieren según el tejido del que se

aíslan; así es que, algunos pueden colonizar varios tejidos o ser específicos de un tejido de la planta (Finlay y Clay, 2007; Rodriguez et al., 2009; Gond et al., 2012; Gupta et al., 2020) por lo que es útil investigar las especies de hongos que alberga cada tejido vegetal para saber la diversidad que se espera encontrar en cada tejido y la preferencia de nicho de las especies de hongos endófitos (Arnold et al., 2000; Arnold y Lutzoni, 2007; Hilarino et al., 2011).

El proceso de colonización se puede dar de dos maneras: la primera, se denomina horizontal e inicia por la llegada de esporas a la superficie de la planta para posteriormente ingresar por heridas o estomas; la segunda, se denomina vertical e incluye la colonización de tejidos desde las semillas infectadas, presentándose casi exclusivamente en gramíneas (Arnold et al., 2003; Kuldau y Bacon, 2008). Para establecer una interacción favorable con la planta, los hongos manipulan el sistema de defensa del hospedero, y se alcanza una estabilidad metabólica entre ambos organismos (Arnold y Lutzoni, 2007; Reiher, 2011).

3.5. AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS

El aislamiento *in vitro* de hongos endófitos y el uso de métodos de identificación moleculares ha permitido confirmar que todos los tejidos vegetales pueden albergar linajes fúngicos diversos (Yu et al., 2010; Vasundhara et al., 2019; Mohamed et al., 2020). Para el estudio de estos microorganismos difíciles de clasificar taxonómicamente, se han desarrollado métodos simplificados de clasificación a través de características morfológicas compartidas (morfotipos), que generalmente implican un examen microscópico del tejido del huésped y del hongo aislado (Lacap et al., 2003; Soteras, et al., 2013). Esta clasificación se debe respaldar con técnicas moleculares de identificación, como el secuenciamiento de ADN del hongo aislado (Guo et al., 2000; Lacap et al., 2003; Suryanarayanan, 2011; Heredia-Acuna, 2014).

Los hongos endófitos son hiperdiversos y porcentualmente más abundantes en los trópicos que en zonas templadas, con un patrón de mayor especificidad a especies hospederas. (Sieber, 2007; Tedersoo et al., 2010). Por otro lado, la frecuencia y proporción de endófitos generalistas (que colonizan más de una especie de hospedero y/o tejido vegetal) dependen de la estructura del bosque y la densidad de endófitos fúngicos en cada planta; así es que, se registra

una mayor frecuencia de infecciones en zonas de vegetación densas y compactas, en comparación con lugares abiertos (Saikkonen, 2007; McGuire et al., 2012; Higginbotham et al., 2013).

La riqueza de estos microorganismos según la especie de planta hospedera y el tejido vegetal del que se aísla es muy heterogénea. Existen géneros de hongos endófitos con especies

Determinar la presencia e identificación de hongos endófitos en las muestras de tallos y hojas de plantas colectadas en la Cueva de Los Tayos es importante para registros de riqueza y diversidad de especies fúngicas a nivel global. Este estudio pionero de hongos endófitos presentes en vegetación de la Cueva de Los Tayos brinda información biológica importante para la ciencia y pone en perspectiva la importancia de estos microorganismos como fuente de metabolitos secundarios que enriquezcan la investigación en Ecuador.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Explorar la presencia de hongos endófitos en las plantas de la Cueva de los Tayos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar si existe asociación de hongos endófitos con la flora presente en la Cueva de los Tayos.

Establecer la identidad taxonómica de los hongos endófitos aislados.

Estimar la riqueza y diversidad de hongos endófitos presentes en las plantas que crecen en la Cueva de los Tayos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ÁREA DE ESTUDIO

Este estudio se llevó a cabo con la expedición científica del proyecto “Cueva de los Tayos” financiado por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), conformada por un equipo multidisciplinario de investigadores. Esta primera y única expedición tomó lugar el mes de noviembre del 2018 en la provincia de Morona Santiago, cantón Limón Indanza (Coordenadas: 3°03'05"S, 78°12'19"O). Se marcó el sitio de colecta de todas las muestras en una copia física del mapa realizado por la expedición inglesa de 1976, A. Champion (Toulkeridis, et al., 2015), puesto que no es posible tomar puntos GPS dentro de la cueva. Las muestras botánicas se transportaron al laboratorio de Biotecnología Vegetal en el Centro de Investigaciones para la Salud en América Latina (CISeAL) de la PUCE, para el posterior aislamiento de los hongos endófitos asociados.

4.2. MUESTREO Y COLECCIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS

Se tomaron muestras de todas las plantas presentes en la cueva durante temporada de baja precipitación ~180 mm mensuales y temperatura constante de ~19°C (Anexo 1), utilizando un muestreo aleatorio simple (Whalley y Hardy, 2000; Tóth y Feest, 2007). Siguiendo los protocolos de seguridad pertinentes para evitar cualquier contaminación, se colectaron dos muestras con tallo y hojas que no presentaban signos de enfermedad o herbivoría de cada planta encontrada. Una de las muestras se prensó como muestra de herbario siguiendo el protocolo del Herbario QCA para su posterior identificación (Neill y Guevara, 2013; Barriga, Toasa, Montúfar y Tye, 2017). La segunda muestra se guardó en funda plástica *ziploc* sin aire para mantener el tejido fresco e intacto hasta su procesamiento en el laboratorio de Biotecnología Vegetal (Upadhyaya, Gowda y Sastry, 2008; Summy et al., 2011).

Los datos de campo registrados para cada planta colectada fueron: zona de colecta, sustrato sobre el cual crecía la planta, y descripción *in situ* de las características vegetativas

(alto de la planta en centímetros, coloración y características foliares). La fotografía *ex situ* e identificación botánica se realizó en el Herbario QCA a partir de las muestras físicas prensadas y secas, cada una con su serie de campo y fotografía *in situ*. El Mtr. Álvaro Pérez del Herbario QCA identificó las plántulas mediante la observación de rasgos morfológicos, sin ayuda de claves botánicas. Una vez identificadas las plantas hospederas, se les designó un código y se las ingresó en el Herbario QCA de la PUCE con los protocolos de este laboratorio (Bernardo y Goyes, 2004; Portero, 2013; Marín et al., 2018). Dos especies de plántulas se lograron identificar hasta nivel de género (*Virola* y *Trema*); tanto estas como las plántulas de las que no fue posible determinar el género y especie, se registraron como especies desconocidas Sp. seguidas de un número que las identifique (Joppa et al., 2011; Rull, 2012).

4.3. AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se sometieron trozos de hojas y pedazos de tallos a esterilización superficial a través de lavados con etanol al 95%, cloro al 5% y etanol al 70%, siguiendo el protocolo del laboratorio de Biotecnología Vegetal (Strobel, 2003; Portero, 2013; Marín et al., 2018). Una vez obtenidas las muestras estériles, se cortaron las hojas en pequeños segmentos cuadrangulares (aproximadamente 4 mm²) y trozos longitudinales de los tallos (aproximadamente de 7 mm. de largo). Los tejidos cortados de hoja se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo agar extracto de malta en concentración de 1 en 10 (MEA 1:10, por sus siglas en inglés) y los de tallo en medio de cultivo agar papa dextrosa en concentración de 1 en 10 (PDA por sus siglas en inglés 1:10). Las cajas Petri se incubaron a temperatura ambiente (~23 °C) y se inspeccionaron cada 24 horas hasta observar crecimiento de micelio (Rodríguez, et al., 2009). Una vez confirmada la presencia de hongos por la presencia de micelio, se revisaron individualmente las placas en el estereomicroscopio para descartar cualquier contaminación con otros microorganismos (hongos del ambiente y/o bacterias). Los aislados contaminados se volvieron a plaquear con la técnica de estriado en agar-agua (AA) hasta obtener un cultivo aislado puro. Cada endófito aislado se transfirió a cajas Petri con medio de cultivo agar papa dextrosa 1X (PDA) mediante un aislamiento monospórico hasta obtener cultivos axénicos (Strobel, 2003; Portero, 2013; Marín et al., 2018). Se tomaron fotografías de la parte superior e

inferior de las cajas a los 7 y 14 días, lo cual favoreció a su caracterización en los distintos morfotipos (Lacap et al., 2003; Wei et al., 2007; Hilarino et al., 2011; Portero, 2013).

4.4. CLASIFICACIÓN Y COMPARACIÓN MORFOTÍPICA DE HONGOS ENDÓFITOS

Se asignaron códigos a todos los endófitos aislados y se siguió el protocolo del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la PUCE para su criopreservación e ingreso a la colección de hongos endófitos Quito Católica (CEQCA) (Marín et al., 2018; Portero, 2013). Para la clasificación en morfotipos se tomaron en cuenta las siguientes características de las colonias: forma, tamaño (diámetro), color de la superficie superior e inferior, elevación, textura, porcentaje de crecimiento en caja y producción de metabolitos difundidos en el agar (Portero, 2013; Heredia-Acuna, 2014). Se utilizó los morfotipos agrupados según la especie vegetal hospedera y tejido del que se aislaron (hojas o tallos), para obtener algunos análisis de diversidad que se describen más adelante (Suryanarayanan, 2011; Harrison y Griffin, 2020).

4.5. EXTRACCIÓN DE ADN DE HONGOS ENDÓFITOS

Se obtuvo una placa de cultivo axénico de cada morfotipo, de entre siete y catorce días de crecimiento para la extracción de ADN y se empleó el protocolo de extracción de ADN de hongos con Chelex® 100, siguiendo la metodología estandarizada en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la PUCE (Camacho et al., 1997 y Bucheli et al., 2000). Se verificó la calidad de ADN extraído y su concentración con espectrofotometría (NanoDrop®) (Portero, 2013; Marín et al., 2018). Se conservaron a 4°C alícuotas a una concentración de 50 µg/µl (Portero, 2013; Marín et al., 2018). Posteriormente, se usaron dichas muestras en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región del espaciador interno transcrito (ITS) usando los cebadores universales en eucariotas ITS1/ITS4 (Anexo 2) (White, Bruns, Lee y Taylor, 1990), siguiendo la metodología estandarizada en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal (Portero, 2013). Los amplicones obtenidos se visualizaron usando SYBR Green en la corrida del gel de agarosa al 1%, con escalera de 1 Kb, en una cámara de electroforesis con 70V constantes durante una hora y media. Finalmente, los 48 amplicones obtenidos se guardaron a -20°C y

posteriormente se enviaron a los laboratorios de Macrogen (Macrogen Inc.), obteniéndose la secuencia de nucleótidos.

4.6. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS ENDÓFITOS

Las secuencias obtenidas de los productos de PCR de las regiones del ITS1, ITS2 y 5.8S se alinearon con MUSCLE en el programa MEGA 10.1.8. (Kusari et al., 2009; Portero, 2013). Tras la alineación de las cadenas F (*forward*, por sus siglas en inglés) y R (*reverse*, por sus siglas en inglés), se obtuvieron secuencias consenso de los 48 amplicones. Las identificaciones taxonómicas se obtuvieron mediante análisis de homología de las secuencias consenso obtenidas con secuencias públicamente disponibles en GenBank (base de datos de secuencias genéticas del Centro Nacional para la Información Biotecnológica-NCBI, por sus siglas en inglés) usando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Las secuencias que presentaron una cobertura de $\geq 98\%$, un valor E de 0.0 y porcentaje de similitud $\geq 98\%$, fueron identificadas según el taxón reportado para el mejor hit en BLAST (Arnold y Lutzoni, 2007; Portero, 2013). La identificación de especies es tentativa.

4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DIVERSIDAD DE ENDÓFITOS FÚNGICOS EN LA CUEVA DE LOS TAYOS

Para estimar la diversidad de endófitos fúngicos se realizaron análisis con estimadores paramétricos únicamente con las muestras identificadas molecularmente. Se realizaron curvas de acumulación de especies con Past 4.03 para evaluar la riqueza o número acumulativo de especies a partir de los resultados del esfuerzo de muestreo invertido en su búsqueda (Unterseher y Schnittler, 2010; Monro et al., 2018). Se usó el programa Past 4.03 para calcular índices de diversidad y valorar la diversidad de especies fúngicas en tejidos de tallos y hojas de las siete especies vegetales.

Se calcularon tres índices de diversidad a partir de los datos obtenidos para comparar la diversidad específica de cada una de las tres zonas de la cueva (Daylight, Campamento y Domo), usando el número de especies fúngicas identificadas a partir de los aislados totales de las plántulas (Arnold et al., 2007; Colwell et al., 2004; Nizam et al., 2012).

El índice de Shannon calculado con rarefacción al tamaño de muestra menor (hojas) permitió saber la diversidad prediciendo a qué especie pertenecerá un individuo elegido al azar de un total de muestras. Su rango va desde 0 hasta el número total de especies, el cero indica baja diversidad (que solo hay una especie), mientras que el logaritmo del número total de especies en la muestra significa que todas las especies están representadas por el mismo número de individuos. Para calcular el Índice de Shannon se usa la siguiente expresión: $H' = - \sum p_i \ln p_i$; donde la variable p_i representa la abundancia proporcional de la especie i (Pla, 2006; Pyron, 2010).

El índice de Simpson (1-D) se calculó para saber la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar dentro de una misma zona de la cueva, sean de la misma especie. El Índice de Simpson (1-D) tiene un rango de 0 a 1, siendo mayor mientras mayor es la diversidad de la zona de la cueva y más cercano a 0, mientras menor diversidad exista en la zona de la cueva. Este cálculo se obtiene de la suma de los cuadrados del número total de organismos de una misma especie de hongo endófito, dividido para el número total de organismos de todas las especies (He y Hu, 2005; Morris et al., 2014).

El alfa de Fisher se calculó para encontrar la relación entre el número de individuos y el número de especies presentes, así se estimó la riqueza de especies en las distintas zonas de la cueva (He y Hu, 2005; López y Duque, 2010). Para calcular el Índice alfa de Fisher se usa la siguiente expresión: $S = \alpha \ln(1 + n/\alpha)$, donde S es el número de especies, n el número de individuos y α el alfa de Fisher (Arnold et al., 2001; Ott et al., 2008; Oreja et al., 2010; Moreno, Barragan, Pineda y Pavon 2011; Monro et al., 2018).

Los gráficos de diversidad se realizaron en Past 4.03 para visualizar las relaciones entre las siete plantas y el número de hongos endófitos de cada una (Ott et al., 2008; McGuire et al., 2012; Oliveira et al., 2012). Finalmente, se calculó la riqueza de especies en plantas etioladas y plantas sin etiolación para encontrar relación de esta característica fisiológica con la diversidad de hongos endófitos dentro de la cueva (Wang et al., 2018).

5. RESULTADOS

5.1. IDENTIFICACIÓN DE PLANTAS HOSPEDERAS DE HONGOS ENDÓFITOS EN LA CUEVA DE LOS TAYOS

La cobertura vegetal dentro de la Cueva de Los Tayos fue baja con referencia al número de individuos sanos por zona de colecta. Se colectaron 14 plantas (siete especies con su duplicado) que fueron registradas por fotografías *in situ* (planta viva en su sustrato) y especímenes testigo *ex situ* (especimen fijado seco) (Figura 1). Estas siete muestras vegetales se clasificaron como en estadio de plántulas debido a sus características vegetativas y tamaño, y ninguna presentó órganos sexuales desarrollados (Figura1).

Dos muestras se identificaron a nivel de especie como miembros de la familia *Arecaceae*, *Oenocarpus bataua* y *Euterpe precatoria*; dos muestras se identificaron solo hasta nivel de género, *Trema* sp. (Familia *Cannabaceae*) y *Viola* sp. (Familia *Myristicaceae*); y tres muestras fueron consideradas de la siguiente manera: sp1 (familia *Asteraceae*), sp2 (sin familia) y sp3 (sin familia). El lugar en las que las muestras fueron colectadas dentro de la cueva, condiciones de luz, sustrato y sus características fisiológicas se presentan en la Tabla 1.

En la Zona *Daylight* (Figura1) se colectaron tres especies vegetales creciendo sobre un sustrato rocoso con tierra negra y pedazos de madera en descomposición: *Euterpe precatoria*; especie desconocida (sp3) y *Trema* sp. La galería de Los Tayos (Figura 1) fue la segunda zona con mayor número de plántulas en crecimiento donde se colectaron tres especies sobre una fina capa de tierra negra: *Viola* sp.; *Oenocarpus bataua* y una especie desconocida (sp1). Finalmente, la zona del Domo (Figura 1); presentó pocas plántulas creciendo sobre un sustrato rocoso, todas eran de la especie desconocida (sp2) (Tabla 2).

A.1.



A.2.



A.3.



B.1.



B.2.



B.3.



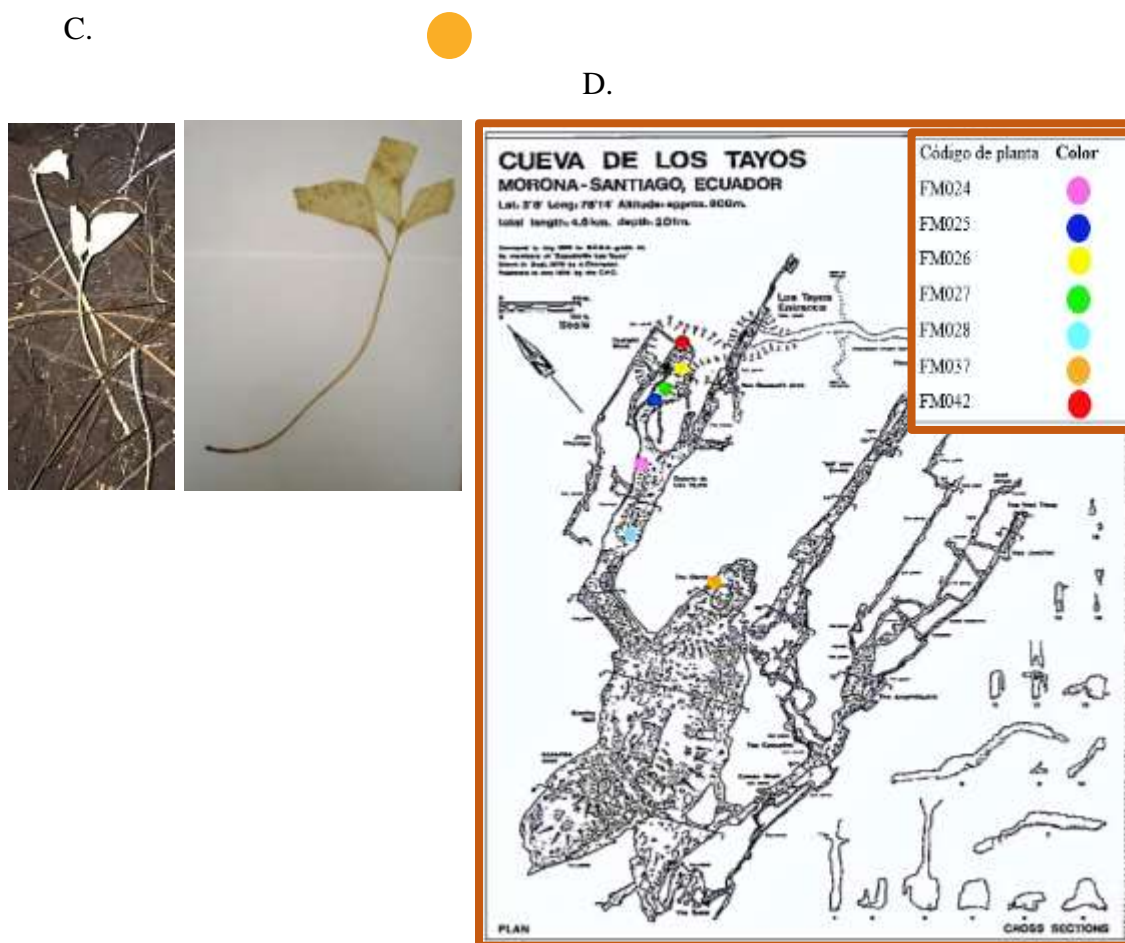


Figura 1. Mapa y fotografías de las plantas de la Cueva de Los Tayos (A, B y C) espécimen vivo (izq), espécimen seco (der.). A, plantas hospederas colectadas en la zona de “Daylight”: A.1., *Trema* sp. (familia Magnoliaceae); A.2., *Euterpe precatoria* (familia Arecaceae); A.3., Sp3 (familia no identificada). B, plantas hospederas colectadas en la zona de “Galería”: B.1., Sp1 (familia Asteraceae); B.2., *Virola* sp. (familia); B.3., *Oenocarpus bataua* (familia Arecaceae). C, Plantas hospederas colectadas en la zona de “Domo”: Sp2 (familia no identificada). D, Mapa de la Cueva de Los Tayos realizado por la expedición inglesa de 1976 (Toulkeridis, et al., 2015) con los puntos de colecta de plantas hospederas.

Tabla 1. Descripción de las muestras vegetales con el grado de luminosidad en su sitio de colecta, hábitat e identificación taxonómica.

Código de planta	luminosidad	Hábitat	Descripción botánica	Orden	Familia	Género y especie
FM024	Baja	Galería: planta sobre fino sustrato de tierra negra.	Planta verde de 30 cm de alto, hojas oblongas, simples y alternas con bordes enteros, nerviación pinnada y ápice acuminado, etiolación en sus hojas y tallo.	Magnoliales	Myristicaceae	<i>Virola</i> sp.
FM025	Baja	Galería: planta sobre sustrato de tierra negra junto a un riachuelo.	Planta etiolada de aproximadamente 30 cm de alto, hoja simple única con borde entero, lámina paralelinervia bífida y ápice acuminado.	Arecales	Areaceae	<i>Oenocarpus bataua</i>
FM026	Alta	<i>Daylight:</i> planta sobre fino sustrato de tierra negra	Planta verde de aproximadamente 10 cm de alto, hojas simples y opuestas, nervadura palmada,	No identificada	No identificada	Sp 3.

FM027	Alta	<p>junto a un riachuelo.</p> <p><i>Daylight:</i> planta sobre sustrato de tierra negra, junto a un riachuelo.</p>	<p>lámina cordada con borde entero y ápice caudado</p> <p>Planta verde de 10 cm de alto, hojas compuestas y opuestas, lámina trifida con borde entero y nerviación paralela con ápice acuminado.</p>	Arecales	Areceaceae	<i>Euterpe precatoria</i>
FM028	Baja	<p>Galería: planta sobre sustrato rocoso con tierra negra junto a un riachuelo.</p>	<p>Planta verde de 15 cm de altura, hojas lanceoladas simples y opuestas, márgenes crenados, envés pubescente y ápice caudado.</p>	Asterales	Asteraceae	Sp 1.
FM037	Nula	<p>Domo:</p> <p>Sustrato rocoso con fina capa de tierra negra.</p>	<p>Planta etiolada de 25 cm de altura, hojas simples y opuestas, nerviación palmada, margen entero y ápice cuspidado.</p>	No identificada	No identificada	Sp 2.

FM042	Alta	<i>Daylight:</i> planta creciendo sobre troncos en descomposició n depositados sobre un sustrato rocoso.	Planta verde de 20 cm de altura, hojas lanceoladas simples y alternas, margen crenado, nerviación pinnada y ápice caudado.	Rosales	Cannabaceae	<i>Trema</i> sp.
-------	------	---	--	---------	-------------	------------------

5.2. CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS ENDÓFITOS

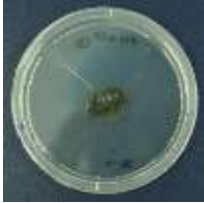
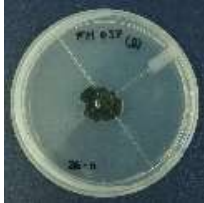
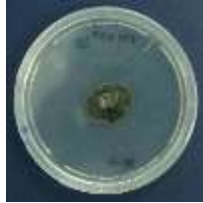
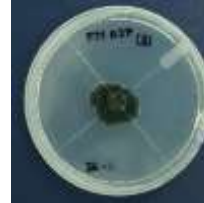




Del total de siete especímenes vegetales colectados, se aislaron 69 hongos endófitos a partir de fragmentos sanos de 27 hojas y 37 tallos (Tabla 2). Los 69 aislados se clasificaron dentro de 42 morfotipos, siendo 16 morfotipos exclusivos de tejidos de hojas, 21 exclusivos del tejido de tallos y cinco compartidos en ambos tejidos (Tabla 3).

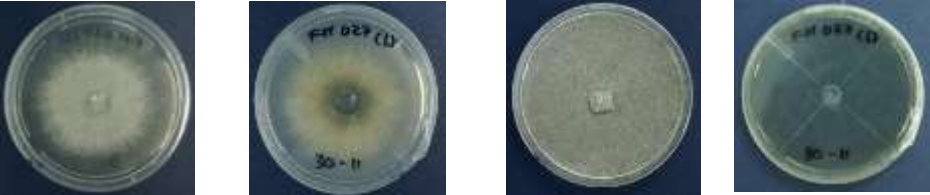

Tabla 2. Número de fragmentos vegetales analizados, de morfotipos totales y de secuencias de hongos endófitos aislados de las siete plantas hospederas de la Cueva de Los Tayos.




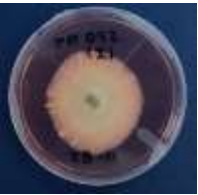

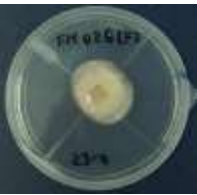

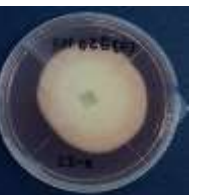



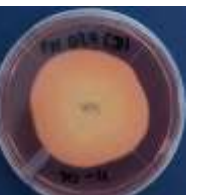
	Código de planta hospedera							Total
	FM027	FM024	FM025	FM026	FM028	FM037	FM042	
Fragmentos de hojas	8	6	3	4	3	0	3	27
Fragmentos de tallos	3	11	4	5	5	4	5	37
Morfotipos	11	15	7	8	7	4	7	42
Aislados totales	13	18	7	9	10	4	8	69
Aislados secuenciados	11	15	5	3	7	3	4	48
Familias de hongos	2	7	1	2	2	1	3	10
Géneros de hongos	2	8	1	2	3	2	4	13
Especies de hongos	3	12	2	2	3	2	4	28
Planta etiolada	No	No	Sí	No	No	Sí	No	

Al comparar la clasificación morfológica con los taxones identificados con base en secuenciamiento de ADN se observan diez morfotipos distintos correspondientes con *Xylaria* sp1., tres morfotipos de *Mycocleptodiscus* sp1. (Anexo 3), dos morfotipos tanto de *Penicillium* sp1. como de *Hypoxylon* sp1. Además, se observa que *Xylaria* sp1. comparte uno de sus morfotipos con *Xylaria* sp3, al igual que *Diaporthe* sp2. con *Diaporthe* sp3. (Tabla 3 y Anexo 4).

Tabla 3. Morfotipos de 69 hongos endófitos aislados en cajas Petri con medio de cultivo PDA 1X a temperatura ambiente (~23°C) de las siete especies de plántulas colectadas dentro de la Cueva de Los Tayos. Se muestran fotografías a los 7 y 14 días, con una vista del anverso o colonia y reverso del plato Petri respectivamente.

Morfo tipo	Código PUCE	No. de hongos	Descripción ¹	Fotografías			
				7 días (superior)	7 días (inferior)	14 días (superior)	14 días (inferior)
1	CEQCA-V5531	1	Presenta hifas que no sobresalen del agar; crecimiento en forma irregular; borde dentado; color negro en la parte superior; coloración inferior negra. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 20% de la placa (crecimiento lento).				
				Planta: FM037 Tallo			
2	CEQCA-V5532	1	Presenta hifas que sobresalen del agar de forma elevada; crecimiento en forma circular; borde fimbriado; color blanco y				

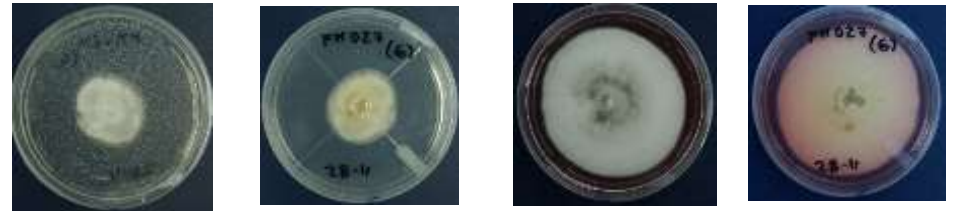
- 3 CEQCA-V5533 1 Presenta hifas que no sobresalen del agar; crecimiento en forma irregular; borde fimbriado; color gris verdoso en la parte superior; coloración inferior negra. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 100% de la placa (crecimiento rápido). Planta: FM025 Tallo
- 
- 4 CEQCA-V5564 1 Presenta hifas que sobresalen del agar de forma plana; crecimiento en forma circular; borde fimbriado; color blanco y beige grisáceo en la parte superior; coloración inferior Planta: FM027 Hoja
- 
- 4 CEQCA-V5564 1 Presenta hifas que sobresalen del agar de forma plana; crecimiento en forma circular; borde fimbriado; color blanco y beige grisáceo en la parte superior; coloración inferior Planta: FM026

5	CEQCA- V5560	6	<p>negro y beige. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 100% de la placa (crecimiento rápido).</p>	Tallo				
			<p>Presenta hifas que sobresalen del agar de forma elevada; crecimiento en forma circular; borde entero; color blanco y gris en la parte superior; coloración inferior blanca.</p>	Planta: FM042				
	CEQCA- V5552		<p>Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 75% de la placa (crecimiento rápido). Presenta metabolitos difundidos que dan al agar una coloración rosada fuerte después de la primera semana de crecimiento.</p>	Tallo				
				Planta: FM026				
	CEQCA- V5534			Hoja				

Planta: FM024

Hoja

CEQCA-
V5611



Planta: FM027

Tallo

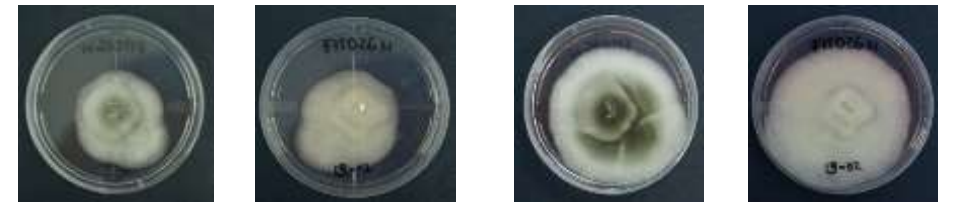
CEQCA-
V5539



Planta: FM028

Hoja

CEQCA-
V5528



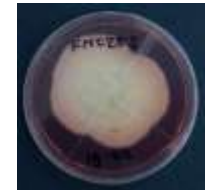
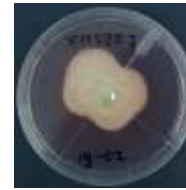
Planta: FM026

Tallo

6 CEQCA-
V5546

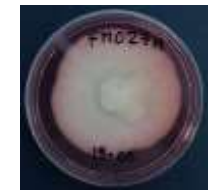
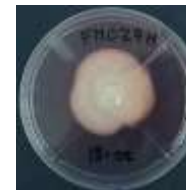
3

Presenta hifas que sobresalen del agar de forma elevada; crecimiento en forma circular; borde entero; color blanco en la parte superior; coloración inferior blanco. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 75% de la placa (crecimiento rápido). Presenta metabolitos difundidos que dan al agar una coloración rosada fuerte desde de la primera semana de crecimiento.



Planta: FM025
Hoja

CEQCA-
V5561


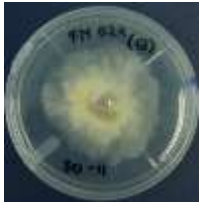



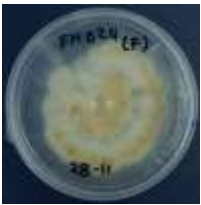








Planta: FM027
Hoja




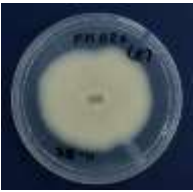


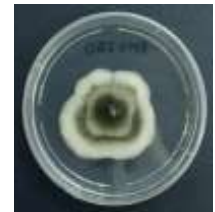


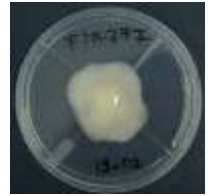


CEQCA-
V5584



Planta: FM027
Hoja

7	CEQCA- V5569	2	Presenta hifas que sobresalen del agar de forma elevada; crecimiento en forma irregular; borde fimbriado; color blanco amarillento en la parte superior; coloración inferior blanco y beige. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 100% de la placa (crecimiento rápido).					Planta: FM024 Tallo
	CEQCA- V5537							Planta: FM024 Tallo
8	CEQCA- V5538	1	Presenta hifas que sobresalen del agar de forma plana; crecimiento en forma circular; borde entero; color blanco y beige en la parte superior; coloración inferior blanca, marrón y beige. Presenta un porcentaje de crecimiento					Planta: FM042 Tallo

9	CEQCA-V5547	1	<p>correspondiente al 90% de la placa (crecimiento rápido).</p> <p>Presenta hifas que sobresalen del agar de forma plana; crecimiento en forma irregular; borde dentado; color blanco y beige en la parte superior; coloración inferior marrón rojizo, negra y beige. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 100% de la placa (crecimiento rápido). Presenta metabolitos difundidos que dan al agar una coloración amarilla.</p>					<p>Planta: FM028 Tallo</p>
10	CEQCA-V5548	1	<p>Presenta hifas que sobresalen del agar de forma plana y elevada; crecimiento en forma irregular; borde entero; color blanco y gris en la parte superior; coloración inferior blanco, marrón y beige.</p>					<p>Planta: FM027 Hoja</p>

11	CEQCA- V5540	10	Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 80% de la placa (crecimiento rápido).				
			Presenta hifas que sobresalen del agar de forma elevada; crecimiento en forma circular; borde entero; color blanco y gris verdoso en la parte superior; coloración inferior blanca. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 75% de la placa (crecimiento rápido).	Planta: FM027			
	CEQCA- V5543			Hoja			
							
				Planta: FM028			
	CEQCA- V5544			Tallos			
							

Planta: FM027

Hoja

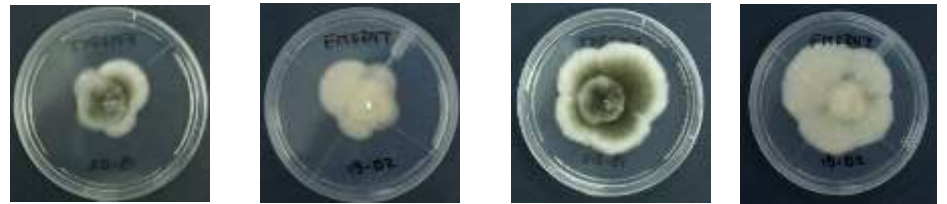
CEQCA-
V5555



Planta: FM028

Tallo

CEQCA-
V5579



Planta: FM024

Tallo

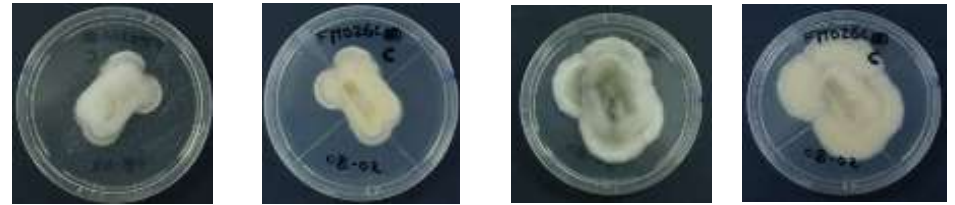
CEQCA-
V5563



Planta: FM025

Tallo

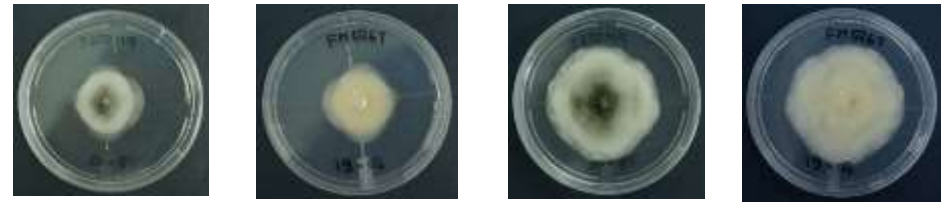
CEQCA-
V5605



Planta: FM026

Hoja

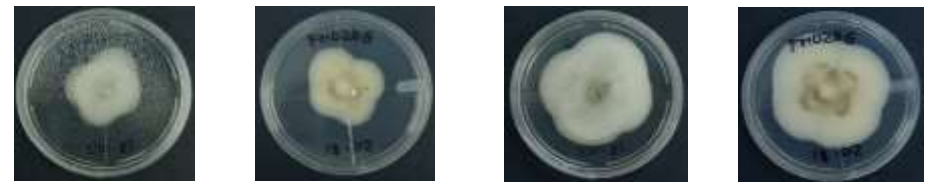
CEQCA-
V5607



Planta: FM026

Tallo

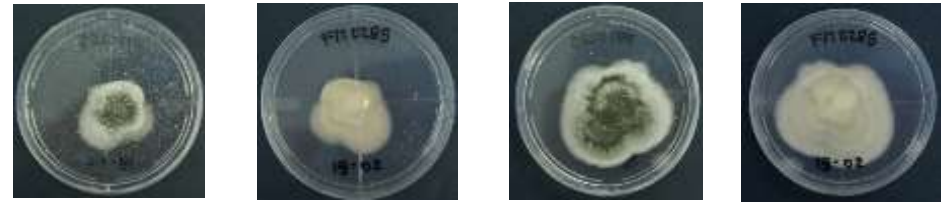
CEQCA-
V5578



Planta: FM028

Hoja

CEQCA-
V5583



Planta: FM028

Tallo

12 CEQCA-
V5556

4

Presenta hifas que sobresalen del agar de forma elevada; crecimiento en forma circular; borde entero; color blanco y gris en la parte superior; coloración inferior blanca amarillenta. Presenta un



porcentaje de crecimiento correspondiente al 50% de la placa (crecimiento rápido). Presenta

Tallo

CEQCA-
V5562

metabolitos difundidos que dan al agar una coloración rosada débil

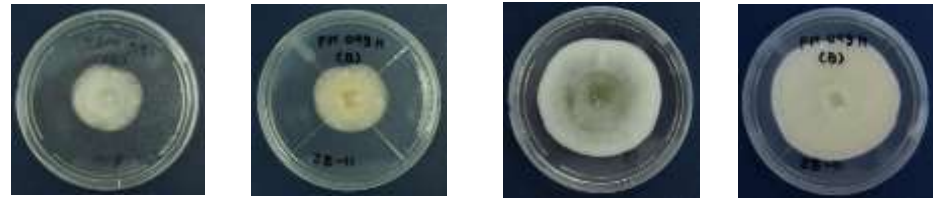


Planta: FM027

Tallo

CEQCA-
V5541

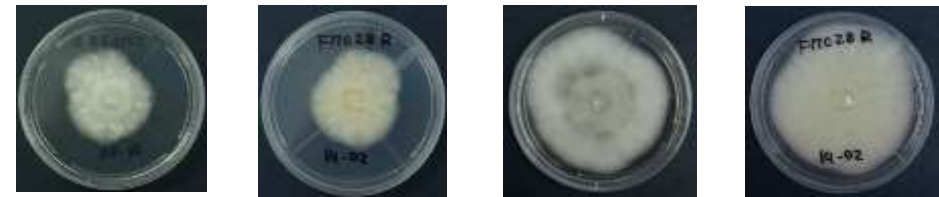
después de la segunda semana
de crecimiento.



Planta: FM042

Tallo

CEQCA-
V5577

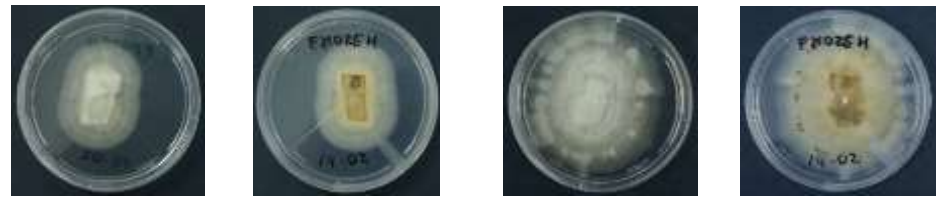


Planta: FM028

Tallo

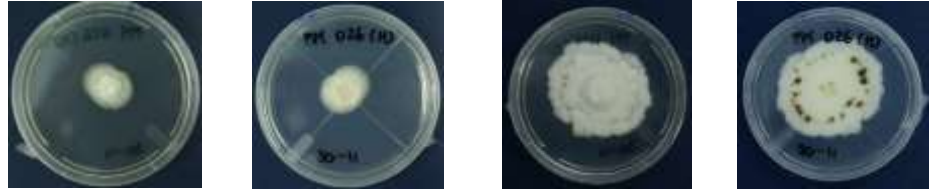
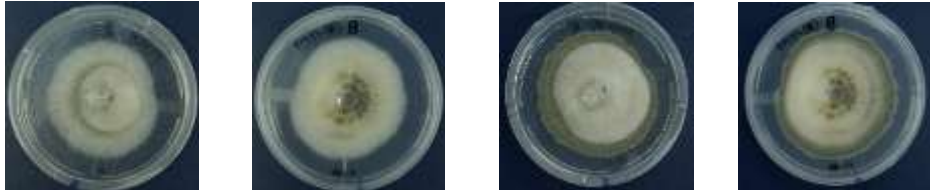
13 CEQCA-
V5549

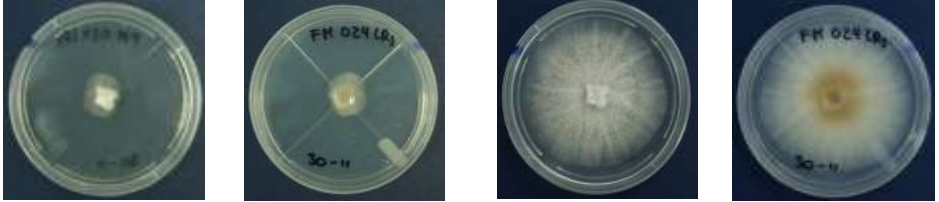

1 Presenta hifas que sobresalen
del agar de forma elevada;
crecimiento en forma irregular;
borde dentado; color blanco en
la parte superior; coloración
inferior blanco y beige.
Presenta un porcentaje de
crecimiento correspondiente al


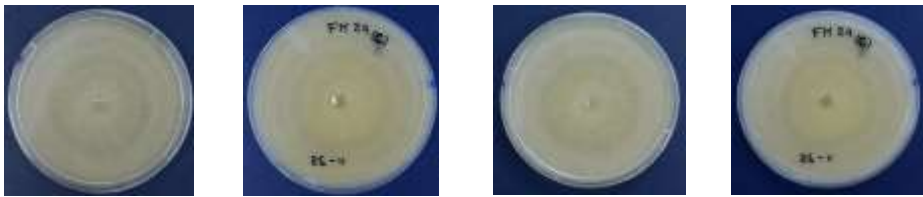


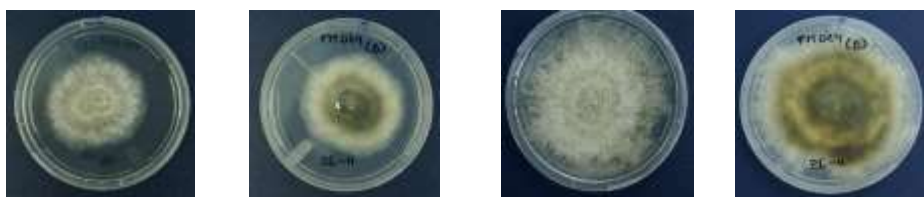

Planta: FM025

Hoja

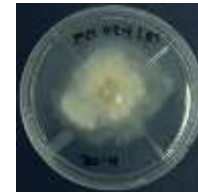
- 90% de la placa (crecimiento rápido).
- 14 CEQCA-V5554 1 Presenta hifas que sobresalen del agar de forma plana; crecimiento en forma irregular; borde dentado; color blanco en la parte superior; coloración inferior blanco, marrón y beige. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 75% de la placa (crecimiento rápido).
- 
- Planta: FM026
Hoja
- 15 CEQCA-V5557 1 Presenta hifas que sobresalen del agar de forma elevada; crecimiento en forma circular; borde dentado; color blanco y gris verdoso en la parte superior; coloración inferior blanca, beige y gris verdosa. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al
- 
- Planta: FM042
Hoja

- 80% de la placa (crecimiento rápido).
- 16 CEQCA-V5535 1 Presenta hifas que sobresalen del agar de forma elevada; crecimiento en forma circular; borde fimbriado; color blanco en la parte superior; coloración inferior blanca con beige. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 90% de la placa (crecimiento rápido).
- Planta: FM024
Hoja
- 
- 17 CEQCA-V5550 1 Presenta hifas que sobresalen del agar de forma elevada; crecimiento en forma circular; borde dentado; color blanco en la parte superior; coloración inferior blanca. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 95% de la placa (crecimiento rápido).
- Planta: FM037
Tallo
- 

- | | | | | | |
|----|-----------------|---|---|---|--------------------------------|
| 18 | CEQCA-
V5610 | 1 | <p>Presenta hifas que sobresalen del agar de forma elevada; crecimiento en forma circular; borde entero; color blanco en la parte superior; coloración inferior blanco, beige y marrón. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 100% de la placa (crecimiento rápido).</p> |  | <p>Planta: FM027
Hoja</p> |
| 19 | CEQCA-
V5565 | 1 | <p>Presenta hifas que sobresalen del agar de forma elevada; crecimiento en forma circular; borde fimbriado; color blanco hueso en la parte superior; coloración inferior blanco hueso. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 100% de la placa (crecimiento rápido).</p> |  | <p>Planta: FM024
Tallo</p> |

- | | | | | | |
|----|-----------------|---|---|---|-----------------------|
| 20 | CEQCA-
V5567 | 1 | Presenta hifas que sobresalen del agar de forma plana; crecimiento en forma irregular; borde fimbriado; color blanco y amarillo en la parte superior; coloración inferior blanco, beige y marrón. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 100% de la placa (crecimiento rápido). |  | Planta: FM024
Hoja |
| 21 | CEQCA-
V5570 | 1 | Presenta hifas que sobresalen del agar de forma plana; crecimiento en forma circular; borde dentado; color blanco y marrón en la parte superior; coloración inferior blanco, beige y marrón. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 85% de la placa (crecimiento rápido). |  | Planta: FM025
Hoja |

- 22 CEQCA- 1 Presenta hifas que sobresalen del agar de forma plana; crecimiento en forma irregular; borde dentado; color blanco en la parte superior; coloración inferior blanco y beige. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 100% de la placa (crecimiento rápido).
- 23 CEQCA- 1 Presenta hifas que sobresalen del agar de forma elevada; crecimiento en forma irregular; borde entero; color blanco y verde en la parte superior; coloración inferior blanco hueso. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 40% de la placa (crecimiento lento).



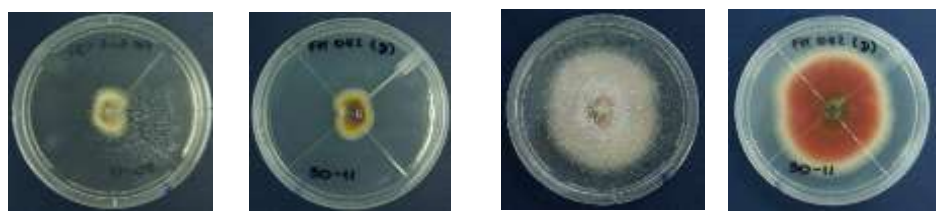
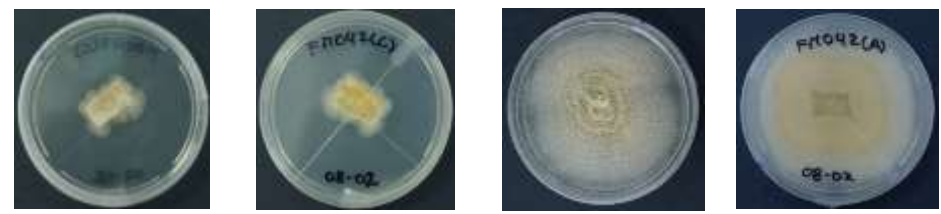
Planta: FM024

Tallo



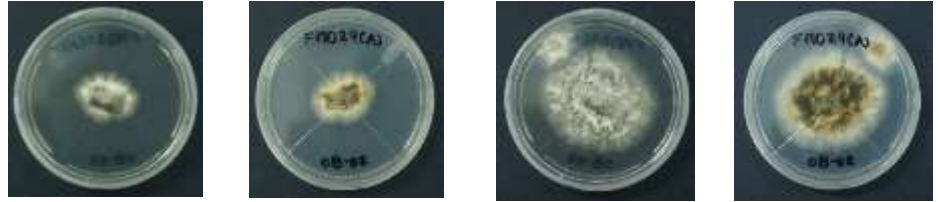

Planta: FM024

Tallo

- | | | | | | |
|----|-----------------|---|--|---|------------------------|
| 24 | CEQCA-
V5572 | 1 | Presenta hifas que sobresalen del agar de forma plana; crecimiento en forma circular; borde entero; color rosado y blanco en la parte superior; coloración inferior blanco, beige y rosado. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 70% de la placa (crecimiento rápido). |  | Planta: FM042
Hoja |
| 25 | CEQCA-
V5585 | 1 | Presenta hifas que sobresalen del agar de forma plana; crecimiento en forma circular; borde fimbriado; color blanco, amarillo y beige en la parte superior; coloración inferior blanco y beige. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 95% de la placa (crecimiento rápido). |  | Planta: FM042
Tallo |

26	CEQCA- V5529	1	Presenta hifas que no sobresalen del agar; crecimiento en forma irregular; borde fimbriado; color blanco en la parte superior; coloración inferior blanca, beige y marrón. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 50% de la placa (crecimiento rápido).					Planta: FM026 Tallo
27	CEQCA- V5574	2	Presenta hifas que sobresalen del agar de forma elevada; crecimiento en forma circular; borde entero; color blanco en la parte superior; coloración inferior beige. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 50% de la placa (crecimiento rápido).					Planta: FM027 Hoja
	CEQCA- V5575		Presenta hifas que sobresalen del agar de forma elevada; crecimiento en forma circular; borde entero; color blanco en la parte superior; coloración inferior beige. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 50% de la placa (crecimiento rápido).					Planta: FM028

28	CEQCA-V5593	2	<p>Presenta hifas que sobresalen del agar de forma plana; crecimiento en forma irregular; borde fimbriado; color blanco y gris en la parte superior; coloración inferior negra.</p>	Hoja				
				Planta: FM024				
	CEQCA-V5599		<p>Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 100% de la placa (crecimiento rápido).</p>	Hoja				
				Planta: FM024				
29	CEQCA-V5576	1	<p>Presenta hifas que sobresalen de forma plana; crecimiento en forma irregular; borde fimbriado; color gris verdoso y blanco en la parte superior; coloración inferior beige y negra. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente</p>	Tallo				
				Planta: FM027				
				Tallo				

- al 100% de la placa (crecimiento rápido).
- 30 CEQCA-V5592 1 Presenta hifas que sobresalen del agar de forma plana; crecimiento en forma irregular; borde fimbriado; color blanco y beige en la parte superior; coloración inferior blanco, amarillo y marrón. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 80% de la placa (crecimiento rápido).
- 
- Planta: FM024
Hoja
- 31 CEQCA-V5595 1 Presenta hifas que sobresalen del agar de forma plana; crecimiento en forma irregular; borde fimbriado; color blanco en la parte superior; coloración inferior blanca, beige y negro. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 100% de la placa (crecimiento rápido).
- 
- Planta: FM024
Tallo

32 CEQCA-
V5594

5

Presenta hifas que sobresalen del agar de forma plana; crecimiento en forma irregular; borde fimbriado; color blanco en la parte superior; coloración inferior blanco, beige y negro.

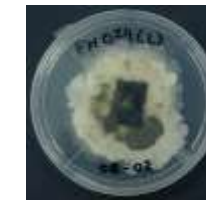


Planta: FM024

Hoja

CEQCA-
V5598

Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 75% de la placa (crecimiento rápido).



Planta: FM024

Tallo

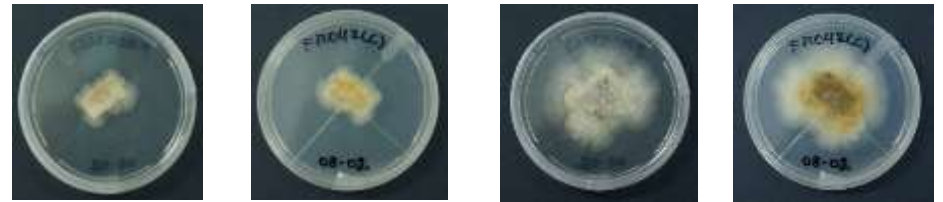
CEQCA-
V5601



Planta: FM025

Tallo

CEQCA-
V5586



Planta: FM042
Hoja

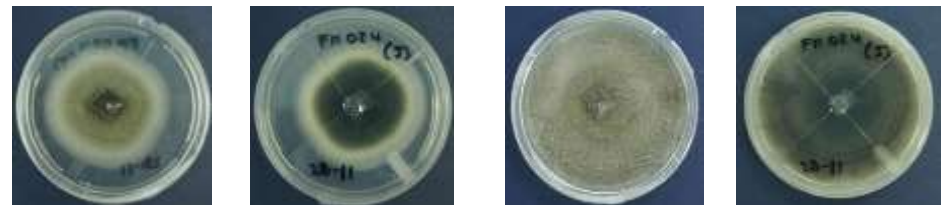
CEQCA-
V5587



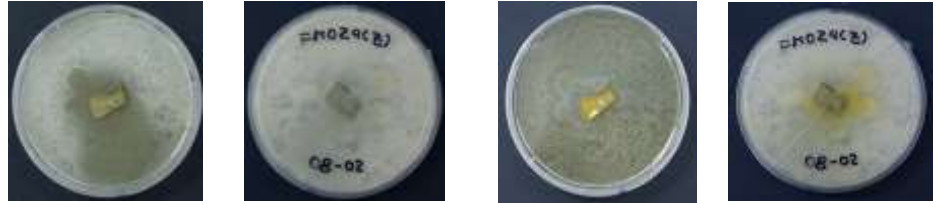

Planta: FM042
Tallo


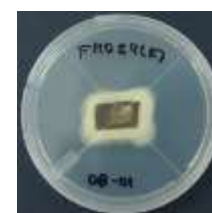
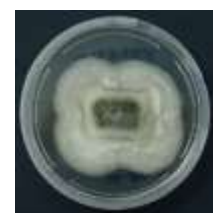
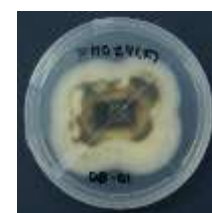


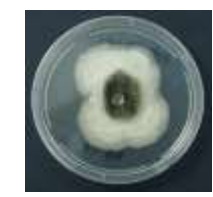


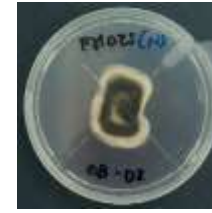
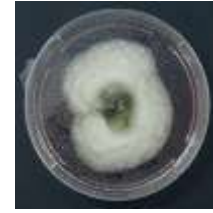
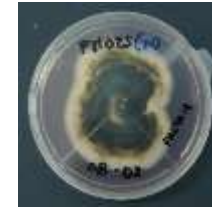
33 CEQCA-
V5596


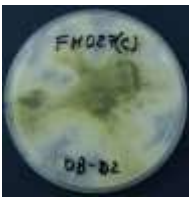


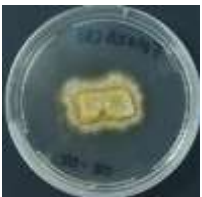



1 Presenta hifas que sobresalen del agar de forma plana; crecimiento en forma circular; borde entero; color gris y blanco en la parte superior; coloración inferior gris y negro. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente




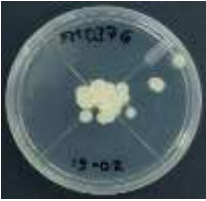
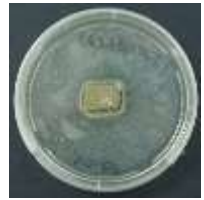





Planta: FM024
Tallo

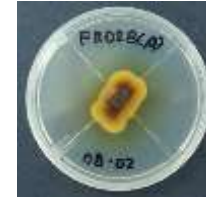
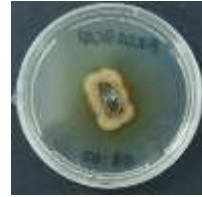
- al 100% de la placa (crecimiento rápido).
- 34 CEQCA-V5600 1 Presenta hifas que sobresalen del agar de forma plana; crecimiento en forma irregular; borde entero; color gris y blanca en la parte superior; coloración inferior blanco y amarillo. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 100% de la placa (crecimiento rápido).
- Planta: FM024
Tallo
- 
- 35 CEQCA-V5604 1 Presenta hifas que sobresalen del agar de forma plana; crecimiento en forma circular; borde fimbriado; color blanco y beige en la parte superior; coloración inferior blanco y beige. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 45% de la placa (crecimiento lento).
- Planta: FM026
Hoja
- 

36	CEQCA- V5597	2	Presenta hifas que sobresalen del agar de forma elevada; crecimiento en forma circular; borde entero; color blanco y gris en la parte superior; coloración inferior marrón, blanca y beige. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 60% de la placa (crecimiento rápido).					Planta: FM024
	CEQCA- V5608							Planta: FM027
				Tallo				
								Planta: FM025
37	CEQCA- V5602	1	Presenta hifas que sobresalen del agar de forma elevada; crecimiento en forma circular; borde entero; color blanco y gris en la parte superior; coloración inferior blanco, beige y marrón. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 70% de la					Tallo

38	CEQCA-V5609	1	<p>placa (crecimiento rápido). Presenta metabolitos difundidos que dan al agar una coloración rosada débil.</p> <p>Presenta hifas que no sobresalen del agar; crecimiento en forma irregular; borde entero; color beige, blanco y verde en la parte superior; coloración inferior blanco, amarillo y verde. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 100% de la placa (crecimiento rápido).</p>					<p>Planta: FM027 Hoja</p>
39	CEQCA-V5613	1	<p>Presenta hifas que sobresalen del agar de forma plana; crecimiento en forma irregular; borde dentado; color beige y blanco en la parte superior; coloración inferior marrón y amarillo. Presenta un</p>					<p>Planta: FM028 Tallo</p>

			<p>porcentaje de crecimiento correspondiente al 80% de la placa (crecimiento rápido).</p>				
40	CEQCA-V5614	1	<p>Presenta hifas que no sobresalen del agar; crecimiento en forma irregular; borde entero; color blanco en la parte superior; coloración inferior blanca. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 10% de la placa (crecimiento lento).</p>				
				<p>Planta: FM037 Tallo</p>			
41	CEQCA-V5603	1	<p>Presenta hifas que sobresalen del agar de forma plana; crecimiento en forma circular; borde fimbriado; color verde y beige en la parte superior; coloración inferior verde y amarillo. Presenta un porcentaje de crecimiento</p>				
				<p>Planta: FM026 Tallo</p>			

- 42 CEQCA-V5612 1 Presenta hifas que sobresalen del agar de forma plana; crecimiento en forma circular; borde entero; color beige y marrón en la parte superior; coloración inferior beige y marrón. Presenta un porcentaje de crecimiento correspondiente al 40% de la placa (crecimiento lento). Presenta metabolitos difundidos que dan al agar una coloración amarilla.



Planta: FM028

Tallo

¹ La descripción incluye la forma de crecimiento de la colonia, borde, color de la parte superior e inferior, porcentaje de crecimiento y presencia de metabolitos secundarios en caso de haber cambio de coloración del agar (Wei et al., 2007; Hilarino et al., 2011; Portero, 2013).

5.3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS HONGOS ENDÓFITOS

Se extrajo ADN de los 69 aislados obtenidos. Se amplificó exitosamente la región ITS para 48 aislados, que fue enviada para su secuenciación (Tabla 4). Los otros 21 aislados no pudieron ser secuenciados ya sea por la calidad del ADN o la baja concentración en el producto de PCR.

En total se editaron y alinearon 96 secuencias, 48 *forward* y 48 *reverse*, usando el software bioinformático MUSCLE 10.1.8. Se obtuvieron 48 secuencias consenso de la región ITS, las cuales se compararon con la base de datos GenBank (Lacap et al., 2003; de Abreu et al., 2010; Portero, 2013). Se obtuvieron porcentajes de homología para 13 muestras de >99%, 28 con homología >95% y <99%, y 7 con una homología >79% y <95% (Tabla 4). Para varias muestras identificadas como *Xylaria*, el largo de la secuencia fue muy variable, lo que influyó en los porcentajes de cobertura y consecuentemente en los porcentajes de homología (Anexo 5). La identificación en distintas especies en esos casos es tentativa.

Las especies de plantas de las cuales se aislaron el mayor número de hongos endófitos fueron *Virola* sp, con 12 y *Trema* sp. con 4 especies de hongos endófitos; el número de hongos endófitos aislados de cada planta y su identificación taxonómica molecular se presenta en la Tabla 4.

Todos los hongos endófitos identificados fueron Ascomycetes. Siendo los órdenes más abundantes Xylariales con 29 (60.4%) de los 48 aislados, seguido por Diaporthales, Hypocreales y Mucorales con cuatro aislados cada uno, los demás ordenes tuvieron uno o dos representantes (Tabla 4 y Figura 4). El género *Xylaria* fue el género más abundante, tanto en tallo como en hoja. Se determinaron géneros aislados exclusivamente de uno de los dos tejidos, independientemente de la especie vegetal. En hoja, se registraron: *Phomopsis*, *Sporothrix*, *Fusarium*; en tallo: *Talaromyces*, *Penicillium*, *Diaporthe*, *Neonectria*, *Hypoxylon*, *Mucor*, *Colletotrichum*, *Dactylonectria*; mientras que: *Xylaria* y *Mycoleptodiscus*, crecieron en ambos tejidos (Tabla 4). Además, se encontró que el género *Hypoxylon* (Anexo 6) se aisló únicamente en la planta etiolada de la zona del Domo (Figura 1 y Tabla 4).

Xylaria fue el género que se aisló en ambos tejidos y en seis de las siete especies de planta hospedera, seguido por *Mycoleptodiscus* que se encontró en tejidos de tallos y hojas de dos plantas hospederas, los demás géneros fueron aislados de un solo tejido y/u hospedero (Tabla 4).

Tabla 4. Identificación molecular de los 48 hongos endófitos de acuerdo a los resultados obtenidos por homología usando la herramienta BLAST. Se registra el porcentaje de cobertura, máxima Identidad (Max ID) y el valor-e (E value) para la secuencia con mayor similitud. Se indica la planta hospedera, código de morfotipo al que corresponde y tejido del que se aisló.

Planta hospedera	Código CEQCA	Morfo tipo	Tejido	Orden	Familia	Taxón	% cobertura	E value	Max ID
Virola sp.	CEQCA-V5596	33	Tallo	Glomerellales	Glomerellaceae	<i>Colletotrichum</i> sp1.	99%	0	100%
	CEQCA-V5566	22	Tallo	Diaporthales	Diaporthaceae	<i>Diaporthe</i> sp1.	98%	0	97.59%
	CEQCA-V5569	7	Tallo			<i>Diaporthe</i> sp2.	100%	0	98.90%
	CEQCA-V5537	7	Tallo			<i>Diaporthe</i> sp3.	100%	0	98.73%
	CEQCA-V5565	19	Tallo	Mucorales	Mucoraceae	<i>Mucor</i> sp.	100%	0	98.50%
	CEQCA-V5593	28	Hoja	Muyocopronales	Muyocopronaceae	<i>Mycoleptodiscus</i> sp1.	98%	0	100%
	CEQCA-V5599	28	Tallo			<i>Mycoleptodiscus</i> sp1.	98%	0	100%
	CEQCA-V5571	23	Tallo	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i> sp1.	99%	0	97.56%
	CEQCA-V5567	20	Hoja	Diaporthales	Diaporthaceae	<i>Phomopsis</i> sp.	100%	0	99.64%
	CEQCA-V5600	24	Tallo	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Talaromyces</i> sp.	90%	0	89.10%

	CEQCA- V5534	5	Hoja	Xylariales	Xylariaceae	<i>Xylaria</i> sp1.	83%	0	96.94%
	CEQCA- V5595	31	Tallo			<i>Xylaria</i> sp1.	83%	0	97.81%
	CEQCA- V5597	36	Tallo			<i>Xylaria</i> sp1.	83%	0	97.18%
	CEQCA- V5598	32	Tallo			<i>Xylaria</i> sp2.	100%	0	99.64%
	CEQCA- V5579	11	Tallo			<i>Xylaria</i> sp3.	52%	8.00E-46	79.86%
Euterpe precatória	CEQCA- V5533	3	Hoja	Muyocopronales	Muyocopronaceae	<i>Mycoleptodiscus</i> sp1.	99%	0	100%
	CEQCA- V5576	29	Tallo			<i>Mycoleptodiscus</i> sp1.	98%	0	100%
	CEQCA- V5540	11	Hoja	Xylariales	Xylariaceae	<i>Xylaria</i> sp1.	93%	0	97.13%
	CEQCA- V5544	11	Hoja			<i>Xylaria</i> sp1.	96%	0	97.66%
	CEQCA- V5548	10	Hoja			<i>Xylaria</i> sp1.	100%	0	97.70%
	CEQCA- V5561	6	Hoja			<i>Xylaria</i> sp1.	83%	0	97.18%
	CEQCA- V5574	27	Hoja			<i>Xylaria</i> sp1.	89%	0	97.13%
	CEQCA- V5584	6	Hoja			<i>Xylaria</i> sp1.	92%	0	94.01%
	CEQCA- V5608	36	Hoja			<i>Xylaria</i> sp1.	100%	0	98.15%

	CEQCA- V5611	5	Tallo			<i>Xylaria</i> sp1.	92%	0	92.58%
	CEQCA- V5609	38	Hoja			<i>Xylaria</i> sp5.	71%	3.00E- 144	91.52%
Oenocarp us bataua	CEQCA- V5532	2	Tallo	Xylariales	Xylariaceae	<i>Xylaria</i> sp1.	96%	0	97.35%
	CEQCA- V5546	6	Hoja			<i>Xylaria</i> sp1.	100%	0	94.01%
	CEQCA- V5549	13	Hoja			<i>Xylaria</i> sp1.	100%	0	96.55%
	CEQCA- V5563	11	Tallo			<i>Xylaria</i> sp1.	91%	0	93.91%
	CEQCA- V5570	21	Hoja			<i>Xylaria</i> sp4.	100%	0	99.31%
Trema sp.	CEQCA- V5585	25	Tallo	Glomerellales	Glomerellaceae	<i>Colletotrichum</i> sp2.	100%	0	99.76%
	CEQCA- V5538	8	Tallo	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Dactylonectria</i> sp2.	100%	0	99.81%
	CEQCA- V5572	24	Hoja			<i>Fusarium</i> sp.	100%	0	99.81%
	CEQCA- V5541	12	Tallo	Xylariales	Xylariaceae	<i>Xylaria</i> sp1.	84%	0	97.18%
Sp1.	CEQCA- V5613	39	Tallo	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Dactylonectria</i> sp1.	100%	0	99.81%
	CEQCA- V5547	9	Tallo			<i>Neonectria</i> sp.	100%	0	97.79%
	CEQCA- V5543	11	Tallo	Xylariales	Xylariaceae	<i>Xylaria</i> sp1.	99%	0	96.05%

	CEQCA- V5555	11	Tallo			<i>Xylaria</i> sp1.	83%	0	96.71%
	CEQCA- V5575	27	Hoja			<i>Xylaria</i> sp1.	83%	0	96.94%
	CEQCA- V5577	12	Tallo			<i>Xylaria</i> sp1.	99%	0	96.64%
	CEQCA- V5583	11	Tallo			<i>Xylaria</i> sp1.	100%	0	96.28%
Sp2.	CEQCA- V5550	17	Tallo	Xylariales	Hypoxylaceae	<i>Hypoxylon</i> sp1.	100%	0	98.25%
	CEQCA- V5614	40	Tallo			<i>Hypoxylon</i> sp1.	100%	0	98.55%
	CEQCA- V5531	1	Tallo	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i> sp1.	100%	0	98.41%
Sp3.	CEQCA- V5604	35	Hoja	Ophiostomatales	Ophiostomataceae	<i>Sporothrix</i> sp.	100%	0	99.80%
	CEQCA- V5552	5	Hoja	Xylariales	Xylariaceae	<i>Xylaria</i> sp1.	100%	0	97.91%
	CEQCA- V5605	11	Hoja			<i>Xylaria</i> sp1.	99%	0	98.13%

5.4. DIVERSIDAD DE HONGOS ENDÓFITOS

La curva de acumulación de especies no alcanzó un valor asintótico, lo cual indica que el esfuerzo de muestreo no fue suficiente para descubrir el total de endófitos presentes en la cueva y por lo tanto se espera que existan especies de endófitos aún por descubrir (Figura 2).

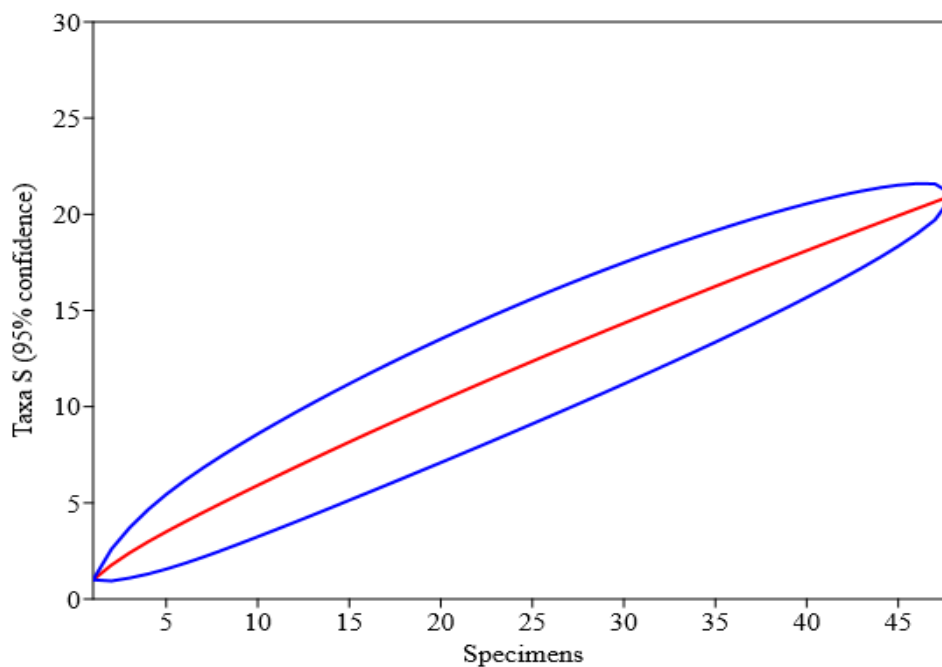


Figura 2. Curva de acumulación de especies basada en la riqueza (S) de especies de endófitos fúngicos (con una confianza > 95%) de la Cueva de Los Tayos (N=48) (Bernardo y Goyes, 2004).

Xylaria fue el género con mayor riqueza con cinco especies, seguido de *Diaporthe* con tres especies, *Dactylonectria* y *Colletotrichum* con dos especies, y el resto de géneros con una especie cada uno (Figura 3).

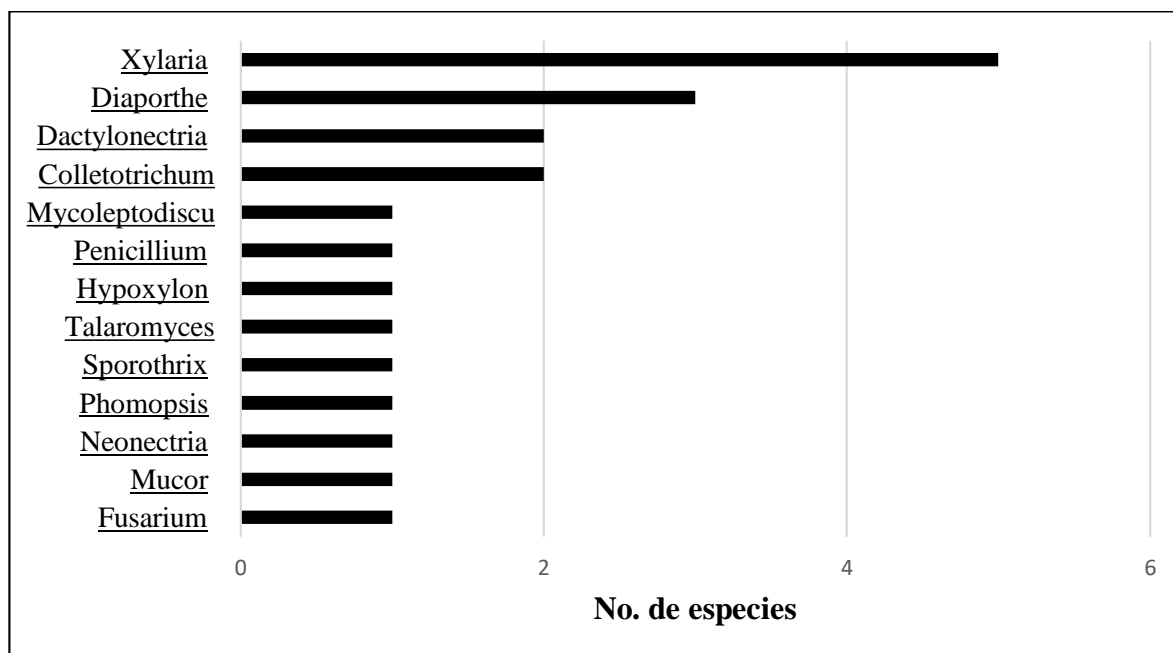


Figura 3. Riqueza total de especies en cada géneros de hongos endófitos aislados de las siete plantas hospederas de la Cueva de Los Tayos.

5.4.1. DIVERSIDAD DE HONGOS ENDÓFITOS EN LOS TEJIDOS DE HOJAS Y TALLOS

De los 69 hongos endófitos aislados de 27 trozos de hojas sanas y 37 fragmentos de tallos, solo se utilizaron los datos de los 48 hongos endófitos identificados molecularmente para los cálculos de riqueza y diversidad; esto, debido a que es necesario trabajar con datos reales y bien respaldados y no con morfotipos que no cuentan con base molecular.

La riqueza de especies (S) indica que existe un mayor número de especies en tejidos de tallo (15) que en hojas (8) (Tabla 5) y existe una mayor dominancia en tejidos de hojas (0,40) que en tejidos de tallos (0.17); estos calculos se obtuvieron usando los datos de las especies identificadas a partir del número de aislados de los tejidos vegetales analizados. Además, el índice de Shannon y Alfa de Fisher reflejan una mayor diversidad de hongos endófitos en los tallos (Tabla 5 y Figura 4).

Tabla 5. Índices de riqueza alfa de hongos endófitos en hojas y tallos con cálculos de riqueza (S), diversidad de Shannon (H) y alfa de Fisher (α F).

	Tallo	Hoja
Riqueza (S)	15	8
Individuos	27	21
Dominancia (D)	0.17	0.40
Índice de Shannon (H)	2.29	1.39
Alfa de Fisher	13.9	4.72

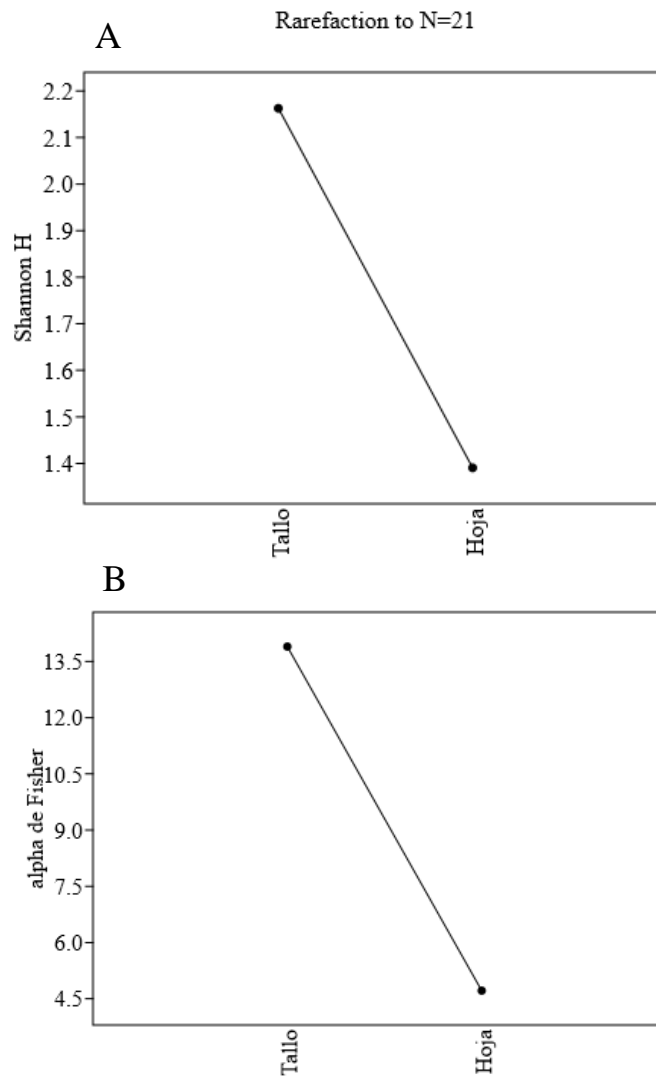


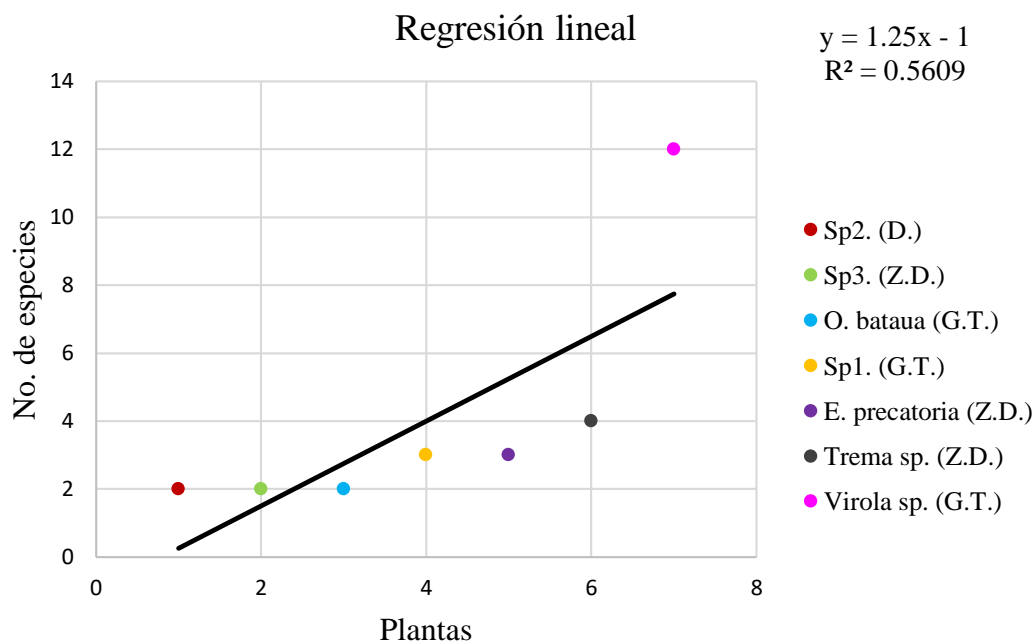
Figura 4. Índices de diversidad alfa de tejidos de tallo y hoja. A, Índice de diversidad de Shannon con rarefacción al tejido con menor número de aislados (Hojas=21); B, gráfica de diversidad entre ambos tejidos a partir de los valores de alfa de Fisher que relacionan el número de individuos (aislados) con el número de géneros presentes.

Los resultados gráficos y numéricos muestran una relativa baja diversidad de especies de endófitos en la cueva. La diversidad alfa de las hojas ($H=1.4$) fue menor que para los tallos ($H=2.3$). Los valores de alfa de Fisher con un 95% de similitud para hojas (23.47) y tallos (43.46) presentaron una variación de patrón similar al encontrado en la riqueza (S) y diversidad (H), siendo mayores en tejidos de tallo

5.4.2. DIVERSIDAD DE HONGOS ENDÓFITOS ENTRE ESPECIES VEGETALES

Al correlacionar el número de especies de endófitos con la especie de la planta hospedera, se obtuvo un valor $R^2=0.56$ (Figura 5) lo que indica que, la especie de planta hospedera no se relaciona con la diversidad de hongos endófitos que alberga cada una. Los datos que alejan del mejor ajuste de la curva son los de *Euterpe precatória* y *Trema* sp., por tener una menor cantidad de especies de hongos endófitos a *Oenocarpus bataua* y sp1. que se acercan más a la diversidad esperada en sus zonas de colecta; por su parte, *Virola* sp. fue la especie con mayor diversidad y junto con sp2. muestran una diversidad alta de géneros de hongos endófitos, con datos atípicos a lo que se esperaría en su zona de colecta (Tabla 2 y Figura 5).

Figura 5. Regresión lineal simple con línea ajustada que muestra la diversidad de



géneros endófitos aisladas de cada especie hospedera (Frost, 2018): D, Domo; G.T., Galería de Los Tayos y Z.D., Zona *Daylight*.

5.4.3. DIVERSIDAD DE HONGOS ENDÓFITOS ENTRE ZONAS DE LA CUEVA DE LOS TAYOS

La distribución de plantas hospederas fue aleatoria dentro de cueva. El número de especies aisladas fue mayor en la Galería de Los Tayos y su diversidad en alfa tiene más parecido con las Zona *Daylight*; el Domo por su parte fue la zona con menor riqueza de especies (Figura 6 y Tabla 6). Los valores del índice de Shannon (H) con rarefacción muestra mayor diversidad en la Galería de Los Tayos (2.14) seguido por la Zona *Daylight* (1.35) y finalmente en el Domo (0.64) (Tabla 6) (Triana et al., 2015).

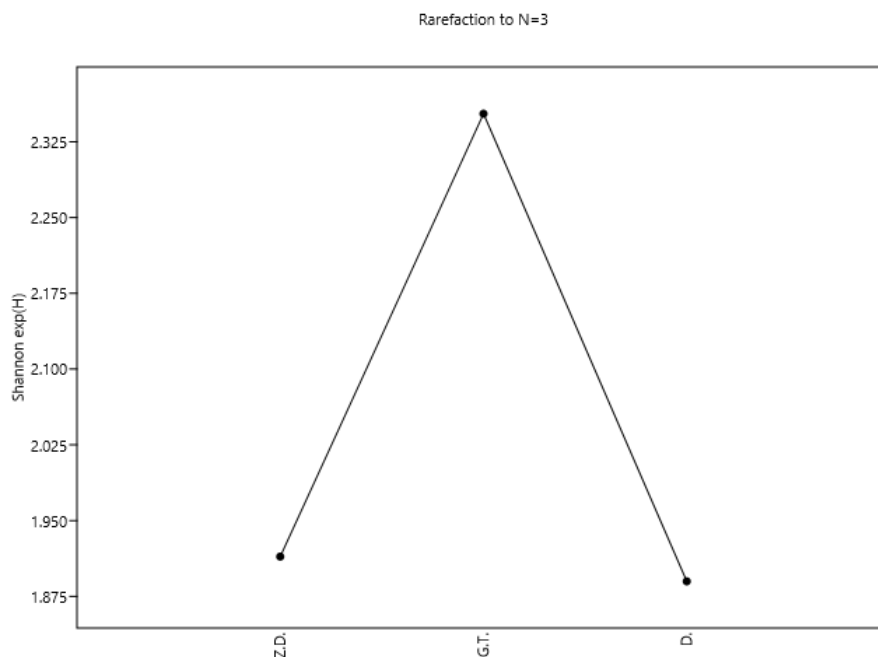


Figura 6. Gráfica del índice de Shannon con rarefacción a la zona con menor número de muestras endófitas fúngicas (N=3, Domo). Z.D., Zona *Daylight*; G.T., Galería de Los Tayos; D., Domo.

Los valores del Índice de Shannon indican una diversidad baja en las tres zonas de la cueva, puesto que valores menores a 3 se consideran bajos a nivel de diversidad de especies. El índice de Simpson (1-D) muestra un valor mayor al 0.5 para Galería de Los Tayos y zona Daylight lo que muestra una mayor diversidad de especies fúngicas en estos dos lugares comparándolos con la zona Domo. La diversidad, medida con el índice alfa de Fisher, incrementó con el número de individuos en las tres zonas de la cueva (Tabla 1 y 6).

Tabla 6. Índices de diversidad alfa de especies presentes en cada zona de la cueva.

Zona (grado de luminosidad)	Riqueza (S)	No. de individuos aislados y secuenciados	Índice de Shannon (H)	Índice de Simpson	Alfa de Fisher
Domo (nula)	3	3	0.64	0.44	2.62

Galería de Tayos (baja)	21	27	2.14	0.78	13.9
Zona <i>Daylight</i> (alta)	14	18	1.35	0.60	4.21

5.4.4. DIVERSIDAD DE HONGOS ENDÓFITOS ENTRE ZONAS DE LA CUEVA DE LOS TAYOS

Se contrastó el número de hongos endófitos encontrados en las dos especies vegetales que presentaron etiolación con el número encontrado en las cinco especies vegetales sin etiolación. Las plantas etioladas albergaron un menor número de hongos endófitos asociados a sus tejidos de hojas y tallos (Tabla 2). La riqueza de hongos endófitos de plantas no etioladas es mayor que el de las plantas etioladas (Figura 7).

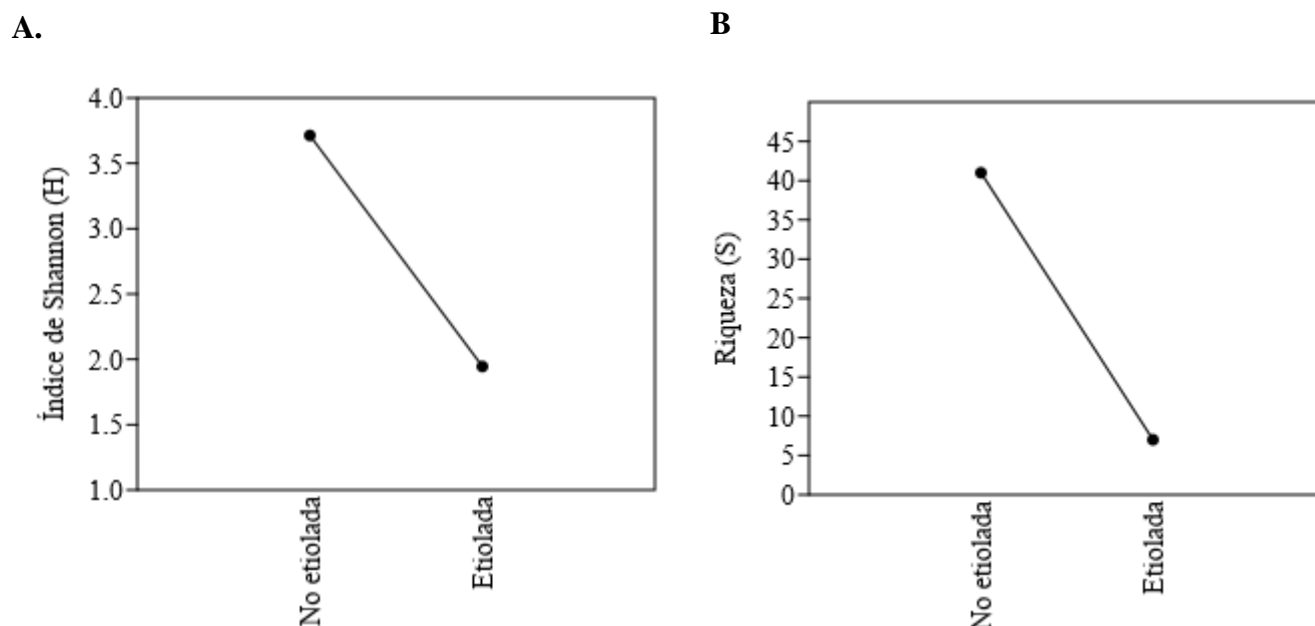


Figura 7. Índices de diversidad alfa entre plantas etioladas y no etioladas. A, Índice de Shannon y B, relación de la riqueza de especies de hongos endófitos presentes en plantas etioladas vs. no etioladas con rarefacción a la muestra con menor número de géneros de hongos endófitos (N=7) (Monro et al., 2018).

6. DISCUSIÓN

Este es el primer reporte de hongos endófitos en tejidos vegetales (hojas y tallos) de plantas creciendo en el interior de la Cueva de Los Tayos. Se determinó que existe asociación de hongos endófitos con todas las especies vegetales dentro de la cueva. El número total de aislados y de especies de endófitos identificadas fue relativamente bajo, aspecto que se discute más adelante.

La primera aproximación a una identificación taxonómica de hongos se da con base en caracteres morfológicos. La clasificación clásica por la morfología de la colonia, sin embargo, no permite distinguir entre posibles especies híbridas, crípticas, con caracteres muy plásticos o con evolución convergente, por lo que las identificaciones taxonómicas de los endófitos se respaldaron con análisis molecular (Lacap et al., 2003; Kusari et al., 2012; Raja et al., 2017). Salgado (2005) y de Abreu et al. (2010) indican que, los endófitos fúngicos de plantas no gramíneas, como es el caso de las encontradas en la cueva, tienen mayor tendencia a mostrar diferencias fisiológicas relacionadas con presiones selectivas bióticas, principalmente la interacción que tienen con su hospedero (Salgado, 2005; de Abreu et al., 2010). Por esta razón, se realizaron los análisis taxonómicos y estadísticos a partir de los 48 hongos endófitos que tuvieron datos moleculares (Tabla 4) y se excluyeron los 21 morfotipos que no tuvieron datos moleculares.

Los 48 productos de PCR que se obtuvieron tras el proceso de aislamiento y purificación fueron secuenciados para obtener la identidad taxonómica de los hongos. Según Schoch et al. (2012), la región ITS (Anexo 2) se encuentra entre los marcadores con mayor probabilidad de identificaciones correctas para un grupo muy amplio de hongos muestreados (Schoch et al., 2012). La región ITS es la parte del cistron del ARNr que presenta tasas de mutación altas y por lo tanto evoluciona rápidamente, y se conoce como el código de barras oficial para la identificación taxonómica de hongos (Raja et al., 2017).

Las identificaciones taxonómicas en base a la comparación de las secuencias obtenidas con los datos públicamente disponibles en GenBank con la herramienta BLAST dieron especies

tentativas de los hongos endófitos secuenciados. Raja et al. (2017) subraya que, para realizar la identificación a nivel de especies para ciertos géneros o linajes de hongos, es necesario amplificar y secuenciar complementariamente la región de la subunidad grande (LSU, por sus siglas en inglés) del ADN ribosómico (utilizando los cebadores LROR y LR6) junto con otros genes codificadores de proteínas de copia única, como RPB1 y RPB2 de la ARN polimerasa; tub2/BenA de la beta-tubulina; CaM de calmodulina parcial; tef1 de elongación del factor de traducción 1-alfa y MCM7 de la proteína de mantenimiento de mini-cromosomas (Sreekanth et al., 2011; Raja et al., 2017; Miguel et al., 2019). Este es un aspecto a considerar en la continuación de este trabajo.

En estudios anteriores ya se ha marcado como un problema el hecho de que las regiones ITS y LSU no funcionan bien en identificación específica de algunos géneros, como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Trichoderma* (Guo et al., 2000; Adeyemi, 2015; Raja et al., 2017) y presentes en las plantas de la Cueva de Los Tayos. Sin embargo, en este estudio las identificaciones hasta nivel de género son confiables por su alta homología con secuencias publicadas del mismo taxón.

Para la búsqueda BLAST, se utilizaron resultados promediales que mostraron una cobertura de consulta (Query cover) $\geq 90\%$ y una similitud de secuencia (Max ID) $\geq 97\%$; de esta manera en la mayoría de casos, las secuencias no divergían más de un 3% de la original; fue así que, los nombres del género y posible especie se basaron en los resultados de la búsqueda BLAST de GenBank y de comparaciones meticulosas de los alineamientos con GENEIOUS R9 (Hyde et al., 2010; Portero, 2013; Raja et al., 2017).

Todos los hongos encontrados en tejidos vegetales de la cueva pertenecen al filum Ascomycota. Este grupo de hongos es muy conocido por incluir taxones productores de metabolitos útiles para el hombre. La mayoría de hongos endófitos aislados de las plantas de la Cueva de Los Tayos producen monoterpenos que son los componentes principales de los aceites vegetales esenciales que contribuyen a la actividad antimicrobiana (Tomscheck et al., 2010; Frisvad, 2015; Chepkirui y Stadler, 2017; Hautbergue et al., 2017; Chang et al., 2018). Los hongos endófitos encontrados en este estudio, pertenecientes a los géneros: *Penicillium*,

Fusarium y *Phomopsis* son conocidos por su producción de metabolitos secundarios, denominados micotoxinas (Halecker et al., 2020). Se cree que estos bio compuestos desempeñan un papel en la eliminación de otros microorganismos competidores en el tejido hospedero colonizado; sin embargo, también pueden ayudar a hongos patógenos a invadir los tejidos (Nesic et al., 2014).

El género *Hypoxylon* presente únicamente en tejidos de tallo en la Sp2. (Domo) cuenta con especies endófitas que poseen un ciclo de vida alterna entre madera muerta y plantas vivas; los hongos endófitos de este género permanecen viables (como hifas vegetativas) durante largos períodos en plantas muertas, estiércol de herbívoros e incluso en muestras de herbario. Por lo general se cultivan fácilmente en laboratorio y sus especies producen metabolitos secundarios que presentan actividad insecticida y antifúngica; lo que puede desempeñar algún papel en la biología del hongo y su supervivencia, además de proporcionar protección a su huésped, inhibiendo el daño de patógenos invasores (Tomscheck et al., 2010; Yuyama et al., 2017; Halecker et al., 2020).

De los tejidos de tallo de las especies hospederas, *Virola* sp. (Galería de Los Tayos) y Sp2. (Domo) se aisló una especie del género *Penicillium*, que es bien conocido por la producción de alcaloides con actividades antimicrobianas, antitumorales, antiinflamatorias, antivirales y citotóxicas (Raja et al., 2017; Bai et al., 2018).

Del tejido tanto de hojas como de tallos de *Virola* sp. (Galería de Los Tayos) y *E. precatória* (Zona Daylight) se aisló una misma especie del género *Mycocleptodiscus*, que se conoce por la producción de compuestos antibióticos. Maria (2019) indica que especies de este género aisladas de tejidos de hojas, tienen un efecto antibacteriano contra patógenos de especies de plantas de la familia Passifloraceae (de Oliveira et al., 2019; Maria, 2019) y posiblemente de otras familias de plantas superiores.

De los tejidos de tallo de Sp1. (Galería de Los Tayos) se aisló el género *Neonectria*, el cual se conoce principalmente por tener varias especies patógenas de plantas. Algunas especies muestran variaciones en su grado de virulencia, argumentándose que puede ser por factores

externos o cambios epigenéticos (Adesemoye et al., 2017; Scheper et al., 2019). El hecho de que las plantas de las que se aislaron estos hongos endófitos en la Cueva de Los Tayos no presentaron signos de enfermedad puede deberse a las interacciones específicas con su huésped.

De los tejidos de hoja de *Sp3*. (*Daylight*) se aisló el género *Sporothrix* que posee compuestos antibacteriales (Shinta et al., 2019), especies de este género producen melanina y se han aislado principalmente de suelos en su estado saprófito. Legarraga (2016) postula que la melanina es un factor de virulencia que dificulta la fagocitosis, otorgando al hongo una mayor capacidad invasora y posiblemente resistencia a sustancias antifúngicas (Legarraga, 2016).

De los tejidos de tallos y hojas de *Virola* sp. (Galería) se aislaron especies del género *Diaporthe* (estado asexual: *Phomopsis*) que comprende especies patógenas, endofíticas y saprobias que colonizan principalmente plantas con semillas. Chepkirui y Stadler (2017) indican que estos endófitos colonizan comúnmente tejido enfermo o muerto, argumento que lleva a pensar que las plantas hospederas en la Cueva de Los Tayos que estaban colonizadas por estas especies, no se encontraban en las mejores condiciones a pesar de que a simple vista parecieran sanas. Por otro lado, Maiquel et al. (2016) confirman que *Diaporthe* sp. tiene actividad herbicida y Yan et al. (2018) señalan las propiedades antifúngicas contra especies de hongos del género *Colletotrichum* y *Fusarium* (Maiquel et al., 2016; Yan et al., 2018), siendo posible que su presencia esté inhibiendo el crecimiento de especies de los géneros mencionados que también se aislaron en este estudio.

De los tejidos de tallo de *Virola* sp. (Galería) se aisló el género *Mucor*, sus especies presentan producción de metabolitos secundarios con actividad antioxidante (Hameed et al., 2017); además, *Mucor* spp. es fuente de compuestos bioactivos antimicrobianos (Konstantopoulou et al., 2006).

De los tejidos de tallo de *Virola* sp. (Galería) se aisló el género *Talaromyces* que produce una amplia gama de metabolitos secundarios, con propiedades antimicrobianas, especialmente nematocida (contra nematodos que parasitan plantas) (Zhai et al., 2016; Vinale et al., 2017) por lo que se esperaría que la planta hospedera esté beneficiándose de esta asociación.

De los tejidos de hoja de *Trema* sp. (*Daylight*) se aisló el género *Fusarium*, este posee especies con compuestos que tienen actividad fitotóxica, antifúngica y antibacteriana (Atanasova-Penichon et al., 2016; Kyekyeku et al., 2017; Beccari et al., 2019). Algunas especies son patógenas oportunistas, pero también pueden crecer como saprófitos. Se sabe que su producción de metabolitos secundarios se relaciona directamente con las condiciones ecológicas y los nichos que ocupan (McCormick et al., 2018; Stępień et al., 2020), por instancia, *Fusarium* spp. (no patógeno) inducen resistencia o proporcionan protección cruzada del huésped contra hongos patógenos (Sieber, 2007; Kuldau y Bacon, 2008).

Se obtuvieron cinco especies tentativas de *Xylaria* (Tabla 4 y Anexo 5) siendo *Xylaria* sp1. la especie generalista dominante, presentándose en tejidos de hojas y tallos de plantas creciendo en la Zona *Daylight* y en Galería. Los metabolitos secundarios producidos por las especies de *Xylaria* incluyen compuestos que poseen actividad herbicida, insecticida, antibacteriana y antifúngica, por lo que son potencialmente agentes de control biológico para planta hospedera (Lin et al., 2016; Macías-Rubalcava y Sánchez-Fernández, 2017; Chen et al., 2018). Se recalca que posiblemente existan más que las cinco especies de *Xylaria*, pero esto no se puede confirmar si no comparamos un mayor número de genes y se obtienen secuencias con un número de bases adecuado para obtener una identificación certera.

Dentro de la cueva se encontraron únicamente plántulas, hecho que puede atribuirse a las condiciones ambientales poco adecuadas para el correcto crecimiento de las plantas y por tanto para el óptimo establecimiento de endófitos en sus tejidos. Existen registros de que algunos hongos endófitos pueden actuar como patógenos secundarios u organismos comensales (Menkis et al., 2005; Frisvad, 2015), así es que, hongos endófitos que en un inicio son mutualistas, pueden tornarse patógenos cuando la planta comienza a sufrir estrés lumínico o falta de nutrientes en el suelo, condiciones presentes en la cueva (Slippers y Wingfield, 2007; Niemiller y Soares, 2015; Yan et al., 2019). Las respuestas de defensa del huésped se producen inicialmente para limitar la colonización del endofítico fúngico, que según Schulz (2007) resulta en un equilibrio de antagonismos entre el huésped y el hongo mostrándose una infección endofítica asintomática (Schulz, 2007).

Según Webb et al. (2008) y Suryanarayanan (2011) las especies de plantas estrechamente relacionadas entre sí, generalmente albergan las mismas especies fúngicas. Es así que encontrar hongos compartiendo un mismo hospedero disminuye en función de la distancia filogenética entre especies vegetales, siendo este patrón descrito para bosques templados (Webb et al., 2008; Suryanarayanan, 2011). Los resultados obtenidos en el presente estudio, donde encontramos los mismos morfotipos y géneros de hongos endófitos en ambos tejidos (hojas y tallos) e incluso entre especies de plantas hospederas distintas (Tabla 2, 3 y 4) se respaldan con registros de varios autores (Kumar y Hyde, 2004; Haider, 2011; Rull, 2012; Swanson y Pilla, 2012), los cuales señalan que las interacciones hongo-planta de bosques tropicales no siguen el patrón de la vegetación en zonas templadas. En zonas tropicales se han encontrado múltiples hospederos para una misma especie de hongo, lo que hace notorio su potencial de colonización a árboles de diferentes linajes (Sieber, 2007; Singh et al., 2011; Suryanarayanan, 2011).

En el bosque siempreverde piemontano de la provincia de Morona Santiago se han registrado cuatro de los taxones encontrados dentro de la cueva (Familias: Myristicaceae, Asteraceae y Arecaceae) (Ministerio del Ambiente del Ecuador., 2013). Esta información sumada a registros de flora amazónica, permite hipotetizar que la colonización en este hábitat se da de forma natural desde el banco de semillas del exterior, ya sea por corrientes de agua o animales voladores que se alimentan de los frutos y dispersan las semillas (Hijmans et al., 2005; Neill y Guevara, 2013; EcuareRed, 2018). Este último enunciado se basa en el registro de Rojas-Lizarazo (2016) en la que incluye los oleosos frutos (bayas) de palmas de los géneros *Euterpe* y *Oenocarpus* como alimento de algunas especies de aves como *Steatornis caripensis* (Rojas-Lizarazo, 2016).

Euterpe precatória es una palma nativa que prefiere suelos con fertilidad moderada o baja (Balsley et al., 2013; Isaza et al., 2017) y sus semillas pierden fácilmente viabilidad ante condiciones desfavorables, lo que explica el bajo número de semillas germinadas en el suelo de la cueva. Por su parte Balsley y colaboradores (2013) indican que una vez desarrolladas las plántulas, su supervivencia es baja, especialmente cuando apenas tienen una hoja y antes de

alcanzar 50 cm. de altura (Balsley et al, 2013; Garcés-Ruiz et al., 2017). En esta palma se encontraron 11 hongos endófitos, repartidos en dos géneros: *Xylaria* y *Mycoleptodiscus* (Tabla 2); la baja diversidad de especies podría deberse a las condiciones adversas en la cueva (Figura 5).

Trema sp. está ampliamente distribuida en el neotrópico gracias a la dispersión de sus frutos (drupas) por aves (Dourojeanni, 1987), las especies de este género son pioneras forestales tolerantes a la sombra y de rápido crecimiento entre los árboles maderables amazónicos (Uhl et al., 1988; Sarwar, 2003). Triana y colaboradores (2015) señalan que son colonizadoras eficaces de áreas inundables en época lluviosa, por lo que las semillas podrían haber llegado a la cueva por corrientes de agua (Triana et al., 2015). De esta planta se encontraron cuatro hongos endófitos repartidos en cuatro géneros: *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Xylaria* y *Dactylonectria* (Tabla 4), diversidad baja para el promedio de la zona *Daylight* (Figura 5), posiblemente por el hecho de contar con especies dominantes que no dejan nicho desocupado para más colonizadores fúngicos (Kyekyeku et al., 2017).

Virola sp. fue colectada en la Galería de Los Tayos. Gómez (2011) indica que *Virola* sp. posee patrones de distribución aleatorios en bosques poco intervenidos (Gómez, 2011), las especies de *Virola* son tolerantes a la sombra; además, son árboles con una tasa de supervivencia alta, aunque frente a estrés lumínico bajan sus tasas de crecimiento (Duque et al., 2003; Nogueira et al., 2005; Gómez, 2011). En esta planta se encontraron 15 hongos endófitos repartidos en ocho géneros: *Phomopsis*, *Mucor*, *Xylaria*, *Diaporthe*, *Mycoleptodiscus*, *Colletotrichum*, *Penicillium* y *Talaromyces*, siendo el hospedero con mayor número de especies fúngicas (Figura 5), diversidad que podría estar vinculada con su alta tasa de supervivencia.

Oenocarpus bataua es una de las tres especies identificadas para este género, teniendo puntos de alta distribución en la cordillera de Cutucú en la provincia de Morona Santiago (Rojas-Robles et al.2012). La plántula de *Oenocarpus bataua* que se colectó en la zona Galería presentó etiolación (Tabla 1); que puede deberse a su forma de crecimiento; ya que, Camacho (2015) afirma que las hojas jóvenes se ven etioladas por crecer de forma tubular y van ganando color a medida que crecen. Además, el estudio de Balsley et al. (2013) indica que esta especie

no tolera la exposición directa al sol, por lo cual es muy probable que estas plántulas se desarrollen óptimamente sin mostrar coloración verde durante sus primeros estadios en el suelo de la cueva (Rojas-Robles et al., 2012; Balsley et al, 2013). En esta palma se encontraron cinco hongos endófitos, repartidos en un solo género: *Xylaria*, la dominancia de dos especies del género refleja una especificidad al hospedero, corroborando su presencia en ambas palmas (familia Arecaeae) presentes en la cueva (*E. precatória* y *O. bataua*) (Tabla 4).

Sp1 de la familia Asteraceae fue colectado en la zona Galería (Figura 1); las asteráceas se consideran un clado taxonómicamente complejo, siendo la segunda familia botánica más diversa en Ecuador, actualmente se tiene registro de 21 géneros en la provincia de Morona Santiago (Barriga, Toasa, Montúfar y Tye, 2017). En esta planta se encontraron siete hongos endófitos repartidos en tres géneros dominantes que colonizan eficazmente los tejidos: *Dactylonectria*, *Xylaria* y *Neonectria* (Figura 5). Los tres géneros registran un alto número de especies patógenas de plantas, por lo que su presencia en un mismo hospedero debe ser tema de estudio (Adesemoye et al., 2017; Ávalos et al., 2018; Scheper et al., 2019).

Sp2 fue la segunda plantula que mostró etiolación por estar creciendo en el Domo, que es la única zona de oscuridad absoluta con plantas vivas. Esta zona se encuentra justo después de varias pendientes en las cuales se generan fuertes corrientes al inundarse, presumiéndose que las semillas fueron cargadas por el agua como sedimentos suspendidos durante alguna inundación (fenómeno común en cuevas, sobre todo en temporada de lluvias) (Gabrovšek y Dreybrodt, 2001; Bonacci et al., 2006; Gázquez et al., 2016). En esta planta se encontraron tres hongos endófitos repartidos en dos géneros: *Penicillium* e *Hypoxyton*. La baja diversidad en la zona del Domo (Tabla 4), probablemente se relacione al escaso número de hongos endófitos aislados de esta zona (Arnold et al., 2001, 2007). Sp3 fue colectada en la zona *Daylight* y en esta planta se encontraron tres hongos endófitos repartidos en dos géneros: *Sporothrix* y *Xylaria*.

La identificaciones taxonómicas de las plantas se basaron únicamente en individuos en estadio de plántulas, que fueron los únicos que se encontraron en la cueva. Swanson y Pilla (2012) advierten que los rasgos vegetativos son muy variables entre individuos juveniles y adultos, lo que hace los trabajos de identificación a partir de plántulas mucho más difíciles

(Swanson y Pilla, 2012). Por su lado, Haider (2011) recalca el valor de las características florales para identificación de especies y marca como un limitante la cantidad de material vegetal disponible (Haider, 2011). Finalmente, López y colaboradores (2010) indican que, la plasticidad foliar en respuesta a la ontogenia y los cambios ambientales complican el uso de estrategias tradicionales para identificación botánica. Para este estudio, la identificación botánica con ayuda de un experto fue suficiente para obtener información de las plantas hospedadas en la Cueva de Los Tayos; sin embargo, en estudios posteriores que incluyan plántulas que no se puedan identificar morfológicamente, se podrían llevar a cabo identificaciones en base a análisis moleculares (Saikkonen, 2007; López et al., 2010; Hernández-Verdugo et al., 2015).

Carroll (1988) confirma tras estudios moleculares y estadísticos que el tejido de los tallos de plantas superiores poseen una mayor riqueza y diversidad que los tejidos de hojas, argumento que coincide con los resultados aquí obtenidos. Por su parte, Harrison y Griffin (2020) recopila información de endófitos fúngicos en la cual revela que los tallos son los tejidos con mayor riqueza de endófitos fúngicos en plantas superiores; además, indica que las hojas de mayor edad poseen una mayor riqueza y muestran variaciones dentro de sí mismas dependiendo en dónde se realice el corte (según la cercanía a la parte adaxial, abaxial, a la vena central, a la base o a la parte apical; el ensamblaje de hongos endófitos, difiere entre sí) (Arnold y Lutzoni, 2007; Li et al., 2012; Harrison y Griffin, 2020). Relacionando los resultados con los de Kumar y Hyde (2004) se puede afirmar que la composición general de las comunidades endofíticas de tallos y hojas es significativamente diferente (Kumar y Hyde, 2004), registrándose una mayor cantidad de hongos endófitos colonizando tejidos de tallos. Ese fue el caso en los endófitos encontrados en la cueva.

La ausencia de relaciones significativas entre las características del hábitat y la diversidad de hongos (Figura 7) puede deberse a los limitados datos de riqueza de especies y falta de registro climatológico que posiblemente alteran la adaptación y diversidad de hongos endófitos dentro de la cueva (Kuldau y Bacon, 2008; Wang et al., 2018; Wolfgang, 2003). Los factores, riqueza y abundancia variarán con el número de muestras vegetales (Fröhlich et al., 2000) y tiempo transcurrido hasta su procesamiento, puesto que mientras más rápido se

procesen (no más de 24 horas), aumenta el éxito de aislamiento de especies endófitas (Pandey et al., 2003; Lizarazo-Medina et al., 2014). Por otro lado, un análisis que incluya a todos los aislados obtenidos de un mismo espécimen vegetal, no solamente un aislado por morfotipo como se hizo en este estudio debido a las dificultades de obtener secuencias de ADN para todas las muestras, otorgaría datos para estadísticos sólidos tanto de riqueza como de abundancia de especies (Guo et al., 2003; Unterseher y Schnittler, 2010; Ávalos et al., 2018). Esto último sumado al secuenciamiento de un mayor número de genes y repeticiones (más de una secuencia por aislado) completarían a este estudio para tener datos más reales de la diversidad de hongos endófitos de la Cueva de Los Tayos (Saikkonen, 2007; Suryanarayanan, 2011).

El estudio sobre la composición de las especies de hongos endófitos de Abreu et al. (2010) afirma que factores ambientales específicos (época del año en que se lleva a cabo la recolección) y el tipo de tejido vegetal colonizado, influencia la riqueza de especies (de Abreu et al., 2010); por lo que la diversidad vegetal y fúngica posiblemente sería distinta en la Cueva de Los Tayos en un mismo año, esto queda como hipótesis para estudios futuros.

La diversidad de endófitos este estudio fue baja, esto puede relacionarse con el tiempo transcurrido desde la colecta de las especies vegetales y su procesamiento para aislar los hongos. Estudios sugieren que las muestras vegetales sean procesadas con un tiempo máximo de 24 horas debido a que el desarrollo de algunos hongos endófitos y su crecimiento *in vitro* pueden verse alterados ante el proceso de colecta y tiempo de espera hasta su aislamiento (Sreekanth et al., 2011; Raja et al., 2017; Miguel et al., 2019).

Aparte de los índices de diversidad calculados en este estudio, para un siguiente análisis biológico de la Cueva de Los Tayos, se propone realizar un muestreo más completo y medir la diversidad utilizando los índices desarrollados para definir parámetros exclusivos de cuevas, señalados por Rabelo et al. (2018): índice de prioridad de conservación de cuevas (CCPi), índice de Conservación de Cuevas (CCI) y el índice de Endemicidad (IE) (Rabelo et al., 2018).

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con este primer reporte microbiológico de la Cueva de Los Tayos se determinó que todas las especies vegetales presentes en esta cueva poseen asociaciones con hongos endófitos. Este estudio pionero tanto en esta como en otras cuevas kársticas del Ecuador, tiene gran importancia al brindar datos botánicos y registros fotográficos de las plantas y colonias endófitas fúngicas aisladas *in vitro*.

A pesar que algunos estudios sugieren que existe una estrecha relación entre el número de morfotipos y el número de especies, en este estudio se niega este enunciado con base a los resultados de la clasificación morfotípica y molecular, en los que se muestran varios morfotipos para una misma especie y viceversa. Sin embargo, esto se debe corroborar con identificaciones más certeras de las especies endofíticas.

Se registra una mayor frecuencia de colonización y diversidad de hongos endófitos en tejidos de tallo que en los de hojas y entre zonas con mayores gradientes de luminosidad; esto demuestra una heterogeneidad espacial. Así es que los ensamblajes endófitos fúngicos colonizan preferentemente tejidos de tallos y son más numerosos en hospederos que reciben energía lumínica (luz solar).

La clasificación taxonómica de hongos endófitos es prioritaria para la investigación microbiológica tanto por su rol en la planta hospedera como por la producción de metabolitos secundarios de utilidad.

El filo Ascomycota fue el grupo con dominancia de especies endófitas fúngicas, representando más del 90% de los aislados registrados a nivel mundial, seguido por los Basidiomycotas y Zygomycotas; así es que, nuestros resultados constatan este enunciado (100% de los hongos endófitos encontrados pertenecen filo Ascomycota).

Se recomienda repetir la colecta de muestras vegetales en la cueva a diferentes épocas

del año para abarcar la posible diversidad de plantas y endófitos asociados que puedan deberse a cambios climáticos. Así mismo, se sugiere realizar los aislamientos de los hongos en el tiempo más corto posible luego de la colección del material vegetal y realizar el secuenciamiento de todos los aislados obtenidos, con al menos una repetición y con más loci a la par con la región ITS. Estas acciones favorecerían una mejor representatividad de los organismos presentes en la cueva y una identificación taxonómica más certera de los hongos endófitos, por tanto unos análisis de diversidad más confiables.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adesemoye, A., Mayorquin, J., Peacock, B., Moreno, K., Hajeri, S., Yokomi, R. y Eskalen, A. (2017). Association of *Neonectria macrodidyma* with Dry Root Rot of Citrus in California. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 08(01). <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000391>
- Adeyemi, P. (2015). Isolation and screening of endophytic fungi from three plants used in traditional medicine in Nigeria for antimicrobial activity. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*, 9(1), 58–62. <https://doi.org/10.22377/IJGP.V9I1.439>
- Albrechtsen, B., Björkén, L., Varad, A., Hagner, Å., Wedin, M., Karlsson, J. y Jansson, S. (2010). Endophytic fungi in European aspen (*Populus tremula*) leaves—diversity, detection, and a suggested correlation with herbivory resistance. *Fungal Diversity*, 41(1), 17-28.
- Aly, A., Debbab, A., Kjer, J. y Proksch, P. (2010). Fungal endophytes from higher plants: A prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. In *Fungal Diversity* (Vol. 41, pp. 1–16). <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0034-4>
- Arnold, A. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, 21(2–3), 51–66. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.003>
- Arnold, A., Henk, D., Eells, R., Lutzoni, F. y Vilgalys, R. (2007). Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. *Mycologia*, 99(2), 185–206.
- Arnold, A. y Lutzoni, F. (2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*, 88(3), 541–549. <https://doi.org/10.1890/05-1459>
- Arnold, A., Mejía, L., Kyllö, D., Rojas, E., Maynard, Z., Robbins, N. y Herre, E. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 15649–15654. <https://doi.org/10.1073/pnas.2533483100>

- Arnold, A., Zuleyka, M. y Gilbert, G. (2001). Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: Patterns of abundance and diversity. *Mycological Research*, 105(12), 1502–1507. <https://doi.org/10.1017/S0953756201004956>
- Atanasova-Penichon, V., Barreau, C., y Richard-Forget, F. (2016). Antioxidant secondary metabolites in cereals: potential involvement in resistance to *Fusarium* and mycotoxin accumulation. *Frontiers in microbiology*, 7, 566.
- Ávalos, A., Gil, J., Cappello, S. y Villarruel, J. (2018). Ascomycetes (Fungi: Ascomycota) del Parque Estatal Agua Blanca, Macuspana, Tabasco, México. *Acta botánica mexicana*, (122), 141-154.
- Barriga, P., Toasa, G., Montúfar, R. y Tye, A. (2017). Floraweb Ecuador. Asteraceae. <https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/ListaEspeciesPorFamilia/500047>
- Bayu, E., Putra, D., Haryono, E. y Nurjani, E. (2017). Biostratigraphy and Karst Morphology of Satun Aspiring Geopark" 13 th-14 th.
- Beccari, G., Arellano, C., Covarelli, L., Tini, F., Sulyok, M. y Cowger, C. (2019). Effect of wheat infection timing on *Fusarium* head blight causal agents and secondary metabolites in grain. *International journal of food microbiology*, 290, 214-225.
- Bernardo, R. y Goyes, R. (2004). Botánica: generalidades, morfología y anatomía de las plantas superiores (Universidad del Cauca (ed.)).
- Bonacci, O., Ljubenkovic, I. y Roje-Bonacci, T. (2006). Karst flash floods: An example from the Dinaric karst (Croatia). In *Natural Hazards and Earth System Science*. <https://doi.org/10.5194/nhess-6-195-2006>
- Bucheli, E., Gautschi, B. y Shykoff, J. (2000). Host-specific differentiation in the anther smut fungus *Microbotryum violaceum* as revealed by microsatellites. *Journal of Evolutionary Biology*, 13(2), 188-198.
- Camacho, R. (2015). Evaluación de la actividad antioxidante e irritabilidad dérmica del aceite de unguirahui *Oenocarpus bataua* para uso cosmético. Repositorio de Tesis - UNMSM.
- Camacho, F., Gernandt, D., Liston, A., Stone, J. y Klein, A. (1997). Endophytic fungal DNA, the source of contamination in spruce needle DNA. *Molecular Ecology*, 6(10), 983–987. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1997.00266.x>
- Cardoso, D., Särkinen, T., Alexander, S., Amorim, A., Bittrich, V., Celis, M., Daly, D., Fiaschi, P., Funk, V., Giacomin, L., Goldenberg, R., Heiden, G., Iganci, J., Kelloff, C., Knapp,

- S., De Lima, H., Machado, A., Dos Santos, R., Mello-Silva, R. y Forzza, R. (2017). Amazon plant diversity revealed by a taxonomically verified species list. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(40), 10695–10700. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706756114>
- Carroll, G. (1988). Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, 69(1), 2–9. <https://doi.org/10.2307/1943154>
- Chang, H., Chen, Y., Cheng, M., Wu, H., Chan, H., Hsieh, S., Yang, S., Chen, I. y Chen, J. (2018). Chemical Constituents of the Fungus *Mycoleptodiscus* sp. 09F0149. *Chemistry of Natural Compounds*, 54(2), 396–398. <https://doi.org/10.1007/s10600-018-2360-9>
- Cavalier-Smith, T. (2001). What are fungi? In *Systematics and Evolution*. Springer, Berlin, Heidelberg. 1(1), 3–37.
- Chen, R., Tang, J., Li, X., Liu, M., Ding, W., Zhou, Y. y Puno, P. (2018). Secondary metabolites from the endophytic fungus *Xylaria* sp. Hg1009. *Natural products and bioprospecting*, 8(2), 121-129.
- Chepkirui, C. y Stadler, M. (2017). The genus *Diaporthe*: a rich source of diverse and bioactive metabolites. In *Mycological Progress* (Vol. 16, Issue 5, pp. 477–494). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s11557-017-1288-y>
- Colwell, R., Chao, A., Gotelli, N., Lin, S., Mao, C., Chazdon, R. y Longino, J. (2012). Models and estimators linking individual-based and sample-based rarefaction, extrapolation and comparison of assemblages. *Journal of Plant Ecology*, 5(1), 3–21. <https://doi.org/10.1093/JPE/RTR044>
- Colwell, R., Mao, C. y Chang, J. (2004). Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. *Ecology*, 85(10), 2717–2727. <https://doi.org/10.1890/03-0557>
- Constantin, S., Toulkeridis, T., Moldovan, O., Villacís, M. y Addison, A. (2019). Caves and karst of Ecuador—state-of-the-art and research perspectives. *Physical Geography*, 40(1), 28–51. <https://doi.org/10.1080/02723646.2018.1461496>
- Dai, C., Gao, F. y Liu, X. (2010). A review of allelopathic researches on phenolic acids View project NSFC NO. 31370507 View project Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, 4(13), 1346–1351. <https://www.researchgate.net/publication/228651503>

- Davis, R. (2011). Wild Plants: Identification, uses and conservation. Wild Plants: Identification, Uses and Conservation (pp. 1–319). Nova Science Publishers, Inc.
- Abreu, L., Almeida, A., Salgado, M. y Pfenning, L. (2010). Fungal endophytes associated with the mistletoe *Phoradendron perrottettii* and its host tree *Tapirira guianensis*. *Mycological Progress*, 9(4), 559–566. <https://doi.org/10.1007/s11557-010-0663-8>
- de Oliveira, L., Ishida, A., da Silva, C., Carvalho, J., de Feitosa, A., Marinho, P. y do Marinho, A. (2019). Antibacterial activity of austdiol isolated from *mycoleptodiscus indicus* against *xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae*. *Revista Virtual de Quimica*, 11(3), 596–604. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20190045>
- Dourojeanni, M. (1987). Aprovechamiento del barbecho forestal en áreas de agricultura migratoria en la amazonía peruana. *Revista Forestal del Perú*, 33. <http://190.119.243.75/index.php/rfp/article/view/136/134>
- Duque, Á., Cárdenas, D. y Rodríguez, N. (2003). Dominancia florística y variabilidad estructural en bosques de tierra firme en el noroccidente de la amazonía colombiana / Floristic dominance and structural variability in Tierra Firme forests in Colombian Amazonia. In *Caldasia* (Vol. 25, pp. 139–152). Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. <https://doi.org/10.2307/23641716>
- EcuRed. (2018). Provincia de Morona Santiago (Ecuador) - EcuRed. EcuRed.
- Finlay, R. y Clay, K. (2007). Fungal endophytes in forests, woody plants and grassland ecosystems: diversity, functional ecology and evolution. In *Fungal Biology Reviews* (Vol. 21, Issues 2–3, pp. 49–50). <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.001>
- Frisvad, J. (2015). Taxonomy, chemodiversity, and chemoconsistency of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species. *Frontiers in Microbiology*, 5, 773.
- Fröhlich, J., Hyde, K. y Petrini, O. (2000). Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research*, 104(10), 1202–1212. <https://doi.org/10.1017/S095375620000263X>
- Frost, J. (2018). Cómo interpretar un modelo de regresión con bajo coeficiente de determinación R-cuadrado y bajos valores P. *Cómo Interpretar Un Modelo de Regresión Con Bajo Coeficiente de Determinación R-Cuadrado y Bajos Valores P.* <https://doi.org/https://www.addlink.es/noticias/minitab/2736-como-interpretar-un->

modelo-de-regresion-con-bajo-coeficiente-de-determinacion-r-cuadrado-y-bajos-valores-p

- Gabrovšek, F. y Dreybrodt, W. (2001). A model of the early evolution of karst aquifers in limestone in the dimensions of length and depth. *Journal of Hydrology*. [https://doi.org/10.1016/S0022-1694\(00\)00323-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1694(00)00323-1)
- Gagne-Bourque, F. (2011). The Isolation, Identification and Characterization of Endophytes of *Sw m virgatum* L.), itchgrass (Panicu a Bioenergy Crop.
- Gamboa-Gaitán, M. (2006). Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. *Tropical Endophytic Fungi: Current Knowledge and Perspectives*.
- Garcés-Ruiz, M., Senés-Guerrero, C., Declerck, S. y Cranenbrouck, S. (2017). Arbuscular Mycorrhizal Fungal Community Composition in *Carludovica palmata*, *Costus scaber* and *Euterpe precatoria* from Weathered Oil Ponds in the Ecuadorian Amazon. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), 2134. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02134>
- Gázquez, F., Calaforra, J. y Fernández-Cortés, Á. (2016). Flash flood events recorded by air temperature changes in caves: A case study in Covadura Cave (SE Spain). *Journal of Hydrology*. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2015.10.059>
- Ginés, J. (2003). El modelado kárstico. Introducción a la Geografía Física de Menorca. Guía de Campo de las XVIII Jornadas de Geografía Física. Asociación de Geógrafos Españoles-Universitat de València-Mon. Soc. Hist Nat. Balears, 10, 65-70.
- Gómez, J. (2011). Regeneración natural de nueve especies maderables en un bosque intervenido de la Amazonia Boliviana. *Acta Amazonica*, 41(1), 135–142. <https://doi.org/10.1590/s0044-59672011000100016>
- Gond, S., Mishra, A., Sharma, V., Verma, S., Kumar, J., Kharwar, R. y Kumar, A. (2012). Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Nyctanthes arbor-tristis*, a well-known medicinal plant of India. *Mycoscience*, 53(2), 113–121. <https://doi.org/10.1007/s10267-011-0146-z>
- Guo, L., Hyde, K. y Liew, E. (2000). Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New Phytologist*, 147(3), 617–630. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00716.x>

- Gupta, S., Chaturvedi, P., Kulkarni, M. y Van, J. (2020). A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi. In *Biotechnology Advances* (p. 107462). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107462>
- Haider, N. (2011). Identification of plant species using traditional and molecular-based methods. *Wild Plants: Identification, Uses and Conservation* (Ed. RE Davis), Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, 1-62.
- Halecker, S., Wennrich, J., Rodrigo, S., Andrée, N., Rabsch, L., Baschien, C. y Schulz, B. (2020). Fungal endophytes for biocontrol of ash dieback: The antagonistic potential of *Hypoxyylon rubiginosum*. *Fungal Ecology*, 45, 100918.
- Hameed, A., Hussain, S., Yang, J., Ijaz, M., Liu, Q., Suleria, H. y Song, Y. (2017). Antioxidants Potential of the Filamentous Fungi (*Mucor circinelloides*). *Nutrients*, 9(10), 1101. <https://doi.org/10.3390/nu9101101>
- Harrison, J. y Griffin, E. (2020). The diversity and distribution of endophytes across biomes, plant phylogeny and host tissues: how far have we come and where do we go from here? *Environmental Microbiology*, 22(6), 2107–2123. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14968>
- Hautbergue, T., Puel, O., Tadrist, S., Meneghetti, L., Péan, M., Delaforge, M., Debrauwer, L., Oswald, I. y Jamin, E. (2017). Evidencing 98 secondary metabolites of *Penicillium verrucosum* using substrate isotopic labeling and high-resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1071, 29–43. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.03.011>
- He, F., y Hu, X. (2005). Hubbell's fundamental biodiversity parameter and the Simpson diversity index. *Ecology Letters*, 8(4), 386–390.
- Heredia-Acuna, C. (2014). Diversidad, ecología e importancia potencial de los hongos endófitos septados oscuros en México. *Diversity, Ecology and Potential Importance of Dark Septate Endophytes in Mexico*. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-42982014000300001&script=sci_abstract&tlng=en
- Hernández-Restrepo, M., Bezerra, J., Tan, Y., Wiederhold, N., Crous, P., Guarro, J. y Gené, J. (2019). Re-evaluation of *Mycocleptodiscus* species and morphologically similar fungi. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 42, 205.

- Hernández-Verdugo, S., González-Sánchez, R. A., Porras, F., Parra-Terraza, S., Valdez-Ortiz, A., Pacheco-Olvera, A. y López-España, R. (2015). Plasticidad fenotípica de poblaciones de chile silvestre (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) en respuesta a disponibilidad de luz. *Botanical Sciences*, 93(2), 231-240.
- Higginbotham, S., Arnold, A., Ibañez, A., Spadafora, C., Coley, P. y Kursar, T. (2013). Bioactivity of Fungal Endophytes as a Function of Endophyte Taxonomy and the Taxonomy and Distribution of Their Host Plants. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073192>
- Hijmans, R., Cameron, S., Parra, J., Jones, P. y Jarvis, A. (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 25(15), 1965–1978. <https://doi.org/10.1002/joc.1276>
- Hilarino, M., Silveira, F., Rodrigues, L., Santos, J., Junior, A. y Rosa, G. (2011). Distribuição da comunidade de fungos endofíticos em folhas de *Bauhinia brevipes* (Fabaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 25(4), 815–821. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062011000400008>
- Huang, Z., Cai, X., Shao, C., She, Z., Xia, X., Chen, Y., Yang, J., Zhou, S. y Lin, Y. (2008). Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H76. *Phytochemistry*, 69(7), 1604–1608. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.02.002>
- Isaza, C., Bernal, R., Galeano, G. y Martorell, C. (2017). Demography of *Euterpe precatória* and *Mauritia flexuosa* in the Amazon: application of integral projection models for their harvest. *Biotropica*. <https://doi.org/10.1111/btp.12424>
- Joppa, L., Roberts, D. y Pimm, S. (2011). How many species of flowering plants are there? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1705), 554–559. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1004>
- Koilraj, A., Marimuthu, G., Natarajan, K., Saravanan, S., Maran, P. y Hsu, M. (2000). Fungal diversity inside caves of Southern India. In *Current Science* (Vol. 77, pp. 1081–1084). Current Science Association. <https://doi.org/10.2307/24103582>
- Konstantopoulou, M., Milonas, P. y Mazomenos, B. (2006). Partial purification and insecticidal activity of toxic metabolites secreted by a *Mucor hiemalis* strain (SMU-21) against

- adults of *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 99(5), 1657–1664. <https://doi.org/10.1093/jee/99.5.1657>
- Kuldau, G. y Bacon, C. (2008). Clavicipitaceous endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses. *Biological Control*, 46(1), 57–71. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.023>
- Kumar, D. y Hyde, K. (2004). Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Diversity*, 17, 69–90.
- Kusari, S. y Spiteller, M. (2012). Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: progress, challenges and opportunities. *Metabolomics*, 241–266.
- Kusari, S., Zühlke, S. y Spiteller, M. (2009). An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. *Journal of Natural Products*, 72(1), 2–7. <https://doi.org/10.1021/np800455b>
- Kyekenye, J., Kusari, S., Adosraku, R., Bullach, A., Golz, C., Strohmann, C. y Spiteller, M. (2017). Antibacterial secondary metabolites from an endophytic fungus, *Fusarium solani* JK10. *Fitoterapia*, 119, 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.04.007>
- Lacap, D., Hyde, K. y Liew, E. (2003). An evaluation of the fungal “morphotype” concept based on ribosomal DNA sequences.
- Legarraga, P. (2016). *Sporothrix schenckii*. In *Revista Chilena de Infectología* (Vol. 33, Issue 5, pp. 563–564). Sociedad Chilena de Infectología. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000500012>
- Li, H., Li, D., He, C., Zhou, Z., Mei, T. y Xu, H. (2012). Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from six dominant plant species in a Pb–Zn mine wasteland in China. *Fungal Ecology*, 5(3), 309–315.
- López, W. y Duque, Á. (2010). Patrones de diversidad alfa en tres fragmentos de bosques montanos en la región norte de los Andes, Colombia. *Revista de Biología Tropical*, 58(1), 483–498. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442010000100034
- Lorea, L., Brassiolo, M. y Gomez, C. (2008). Abundancia y diversidad de lianas en un bosque del Chaco húmedo argentino. *Quebracho-Revista de Ciencias Forestales*, 1(16), 41–50.
- Macías-Rubalcava, M. y Sánchez-Fernández, R. (2017). Secondary metabolites of endophytic *Xylaria* species with potential applications in medicine and agriculture. In *World Journal*

- of Microbiology and Biotechnology (Vol. 33, Issue 1, pp. 1–22). Springer Netherlands.
<https://doi.org/10.1007/s11274-016-2174-5>
- Maiquel, P., Marcio, A., Thiago, C., Luis, E., Adriano, A., Jerson, V. y Raquel, C. (2016). Bioherbicide based on *Diaporthe* sp. secondary metabolites in the control of three tough weeds. *African Journal of Agricultural Research*, 11(42), 4242–4249.
<https://doi.org/10.5897/ajar2016.11639>
- Maria, S. (2019). Universidade Federal de Santa Maria centro de ciências naturais e exatas curso de química bacharelado trabalho de conclusão de curso obtenção do extrato etanólico do fungo endofítico *Mycocleptodiscus indicus* e avaliação de sua atividade antimicrobiana Letícia Laís Piaia. Universidade Federal de Santa Maria.
<http://repositorio.ufsm.br/handle/1/19299>
- Marín, F., Navarrete, H. y Narvaez-Trujillo, A. (2018). Total Petroleum Hydrocarbon Degradation by Endophytic Fungi from the Ecuadorian Amazon. *Advances in Microbiology*, 08(12), 1029–1053. <https://doi.org/10.4236/aim.2018.812070>
- McCormick, M., Whigham, D. y Canchani-Viruet, A. (2018). Mycorrhizal fungi affect orchid distribution and population dynamics. *New Phytologist*, 219(4), 1207-1215.
- McGuire, K., Fierer, N., Bateman, C., Treseder, K. y Turner, B. (2012). Fungal Community Composition in Neotropical Rain Forests: The Influence of Tree Diversity and Precipitation. *Microbial Ecology*, 63(4), 804–812. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9973-x>
- Michelle, M. (2017). Plants That Live in Caves. In *Science-Plants and Mushrooms*.
<https://sciencing.com/plants-live-caves-6559648.html>
- Mejía, L., Rojas, E., Maynard, Z., Van Bael, S., Arnold, A., Hebbbar, P. y Herre, E. A. (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*, 46(1), 4-14.
- Menkis, A., Vasilias, R., Taylor, A. F., Stenlid, J. y Finlay, R. (2005). Fungal communities in mycorrhizal roots of conifer seedlings in forest nurseries under different cultivation systems, assessed by morphotyping, direct sequencing and mycelial isolation. *Mycorrhiza*, 16(1), 33-41.
- Miguel, P., Miguel, F., Moreira, B., de Oliveira, M., Delvaux, J., de Souza, F., Borges, A., y Costa, M. (2019). Diversity of the endophytic filamentous fungal leaf community at

- different development stages of eucalyptus. *Journal of Forestry Research*, 30(3), 1093–1103. <https://doi.org/10.1007/s11676-018-0610-0>
- Ministerio del Ambiente del Ecuador. (2013). MAE. http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PDOT/NIVEL_NACIONAL/MAE/ECOSISTEMAS/DOCUMENTOS/Sistema.pdf
- Miranda, V., Sede, S., Aranda-Rickert, A., Rothen, C., Scervino, J., Barros, J. y Fracchia, S. (2020). Taxonomy, life cycle and endophytism of coprophilous fungi from an underground desert rodent. *Fungal Ecology*, 43, 100872.
- Mohamed, G., Ibrahim, S. y Asfour, H. (2020). Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus versicolor*. *Phytochemistry Letters*, 35, 152–155. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.12.003>
- Monro, A., Bystriakova, N., Fu, L., Wen, F. y Wei, Y. (2018). Discovery of a diverse cave flora in China. *PLoS ONE*, 13(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190801>
- Moreno, C., Barragan, F., Pineda, E. y Pavon, N. (2011). Reanálisis de la diversidad alfa: alternativas para interpretar y comparar información sobre comunidades ecológicas. *Reanalyzing Alpha Diversity: Alternatives to Understand and Compare Information about Ecological Communities*, 82(4), 1249–1261. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532011000400019
- Morris, E., Caruso, T., Buscot, F., Fischer, M., Hancock, C., Maier, T. y Rillig, M. (2014). Choosing and using diversity indices: Insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories. *Ecology and Evolution*, 4(18), 3514–3524.
- Mulec, J. (2018). *Phototrophs in Caves* (pp. 91–106). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98852-8_6
- Mulec, J. y Kubešová, S. (2010). Diversity of bryophytes in show caves in slovenia and relation to light intensities. *Acta Carsologica*, 39(3), 587–596. <https://doi.org/10.3986/ac.v39i3.86>
- Neill, D. y Guevara, J. (2013). Ministerio del Ambiente del Ecuador 2012. Sistema de Clasificación de los Ecosistemas del Ecuador Continental. http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PDOT/NIVEL_NACIONAL/MAE/ECOSISTEMAS/DOCUMENTOS/Sistema.pdf

- Nesic, K., Ivanovic, S. y Nesic, V. (2014). Fusarial Toxins: Secondary Metabolites of Fusarium Fungi. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 228, 101–120. https://doi.org/10.1007/978-3-319-01619-1_5
- Niemiller, M. y Soares, D. (2015). Cave environments. In *Extremophile Fishes: Ecology, Evolution, and Physiology of Teleosts in Extreme Environments* (pp. 161–191). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13362-1_8
- Nizam, M., Rohani, S. y Wan, J. (2012). Floristic Variation of Tree Communities in Two Distinct Habitats within a Forest Park in Pahang, Peninsular Malaysia (Variasi Flora bagi Komuniti Pokok di Dua Habitat Berbeza dalam Suatu Taman Rimba di Pahang, Semenanjung Malaysia). *Sains Malaysiana* (Vol. 41, Issue 1).
- Nogueira, E., Nelson, B. y Fearnside, P. (2005). Wood density in dense forest in central Amazonia, Brazil. *Forest Ecology and Management*, 208(1-3), 261-286.
- Oliveira, I., Pereira, J., Lino-Neto, T., Bento, A. y Baptista, P. (2012). Fungal Diversity Associated to the Olive Moth, Prays Oleae Bernard: A Survey for Potential Entomopathogenic Fungi. *Microbial Ecology*, 63(4), 964–974. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9955-z>
- Oreja, J., Fuente-Díaz-Ordaz, A., Hernández-Santín, L., Buzo-Franco, D. y Bonache-Regidor, C. (2010). Evaluación de estimadores no paramétricos de la riqueza de especies. Un ejemplo con aves en áreas verdes de la ciudad de Puebla, México. *Animal Biodiversity and Conservation*, 31–45. <https://doi.org/195834>
- Ott, S., Kühbacher, T., Musfeldt, M., Rosenstiel, P., Hellmig, S., Rehman, A., Drews, O., Weichert, W., Timmis, K. y Schreiber, S. (2008). Fungi and inflammatory bowel diseases: Alterations of composition and diversity. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 43(7), 831–841. <https://doi.org/10.1080/00365520801935434>
- Pazmiño, J., Oña, R., Villacis, G. y Pineda, N. (2017). El impacto del turismo comunitario e investigativo de lugares ancestrales en la Amazonía del Ecuador. Caso: Cueva de los Tayos de Coangos. *El Impacto Del Turismo Comunitario e Investigativo de Lugares Ancestrales En La Amazonía Del Ecuador. Caso: Cueva de Los Tayos de Coangos.*, 4(10), 591–612. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7055521>
- Pelaez, F., Collado, J., Arenal, F., Basilio, A., Cabello, A., Diez Matas, M., Garcia, J., Gonzalez Del Val, A., Gonzalez, V., Gorrochategui, J., Hernández, P., Martin, I., Platas, G., y

- Vicente, F. (1998). Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. *Mycological Research*, 102(6), 755–761. <https://doi.org/10.1017/S0953756297005662>
- Photita, W., Taylor, P., Ford, R., Hyde, K. y Lumyong, S. (2005). Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Diversity*.
- Pla, C., Galiana-Merino, J., Cuevas-González, J., Andreu, J., Cañaveras, J., Cuezva, S., Fernández-Cortés, A., García-Antón, E., Sánchez-Moral, S. y Benavente, D. (2015). Definition of microclimatic conditions in a Karst cavity: Rull cave (Alicante, Spain). *Environmental Earth Sciences*, 1, 497–503. https://doi.org/10.1007/978-3-642-17435-3_56
- Pla, L. (2006). Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Biodiversidad: inferencia basada en el índice de shannon y la riqueza*, 31(8), 583-590. <https://doi.org/https://www.redalyc.org/pdf/339/33911906.pdf>
- Porras, P. (1978). *Arqueología de la Cueva de Los Tayos*. In Quito.
- Portero, C. (2013). Diversidad de hongos endófitos asociados al género *Polylepis* en el ecosistema del Páramo Andino en los Andes del Norte.
- Pyron, M. (2010) Characterizing Communities. *Nature Education Knowledge* 3(10):39.
- Rabelo, L., Souza-Silva, M. y Ferreira, R. (2018). Priority caves for biodiversity conservation in a key karst area of Brazil: comparing the applicability of cave conservation indices. In *Biodiversity and Conservation* (Vol. 27, Issue 9, pp. 2097–2129). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10531-018-1554-6>
- Raja, H., Miller, A., Pearce, C. y Oberlies, N. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. In *Journal of Natural Products* (Vol. 80, Issue 3, pp. 756–770). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Ramalho, A., Zappi, D., Nunes, G., Watanabe, M., Vasconcelos, S., Dias, M., Jaffé, R., Prous, X., Giannini, T., Oliveira, G. y Giulietti, A. (2018). Blind Testing: DNA Barcoding Sheds Light Upon the Identity of Plant Fragments as a Subsidy for Cave Conservation. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1052. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01052>

- Reiher, A. (2011). Leaf-inhabiting endophytic fungi in the canopy of the Leipzig oodplain forest. https://www.leipzigerauwald.de/cms/upload/Downloadordner/Dokumente/Reiher2011_Dissertation.pdf
- Rodriguez, R., White, J., Arnold, A. y Redman, R. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2), 314–330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
- Rojas-Jimenez, K., Hernandez, M., Blanco, J., Vargas, L., Acosta-Vargas, L. y Tamayo, G. (2016). Richness of cultivable endophytic fungi along an altitudinal gradient in wet forests of Costa Rica. *Fungal Ecology*, 20, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.12.006>
- Rojas-Lizarazo, G. (2016). Dieta y reproducción en una colonia de guácharos (*steatornis caripensis*) de alta montaña en Colombia. *Ornitología colombiana*.
- Rojas-Robles, R., Gary, F. y Muñoz-Saba, Y. (2012). Frugivoría y dispersión de semillas de la palma *Oenocarpus bataua* (Arecaceae) en un bosque de los Andes colombianos. *Revista de Biología Tropical*. <https://doi.org/10.15517/rbt.v60i4.2054>
- Rull, A. (2012). Los Principios de botánica (1767) de Miguel Barnades i Mainader y la creación de léxico botánico en español. *Quaderns de Filologia - Estudis Lingüístics*, 17(17), 225–242. <https://doi.org/10.7203/qfilologia.17.3436>
- Saikkonen, K. (2007). Forest structure and fungal endophytes. In *Fungal Biology Reviews* (Vol. 21, Issues 2–3, pp. 67–74). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.001>
- Salgado, C. (2005). Hongos Endófitos en *Rosa hybrida*: Aislamiento, identificación y evaluación in vitro de la capacidad antagónica contra hongos fitopatógenos. [Universidad de Los Andes]. <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/10842/u263348.pdf?sequence=1>
- Sánchez-Márquez, S., Bills, G. F., Herrero, N. y Zabalgoeazcoa, Í. (2012). Non-systemic fungal endophytes of grasses. *Fungal Ecology*, 5(3), 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2010.12.001>
- Sarwar Jahan, S. (2003). Characterization of Nalita Wood (*Trema orientalis*) as a Source of Fiber for Papermaking (Part I): Anatomical, morphological and chemical properties. *Characterization of Nalita Wood (Trema Orientalis) as a Source of Fiber for*

- Papermaking (Part I): Anatomical, Morphological and Chemical Properties.
<http://www.dbpia.co.kr/Journal/articleDetail?nodeId=NODE00495597>
- Scheper, R., Fisher, B., Bowen, J., Amponsah, N. y Hedderley, D. (2019). Successive passaging through an apple host of six low-virulent *Neovectria ditissima* isolates increased virulence in one of them. *New Zealand Plant Protection*, 72, 103–116.
<https://doi.org/10.30843/nzpp.2019.72.300>
- Schoch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J., Levesque, C., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P., Miller, A., Wingfield, M., Aime, M., An, K., Bai, F., Barreto, R., Begerow, D., Bergeron, M., Blackwell, M., Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Singh, L., Gill, S. y Tuteja, N. (2011). Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. *Plant signaling and behavior*, 6(2), 175-191.
- Schulz, B. (2007). Mutualistic Interactions with Fungal Root Endophytes. In *Microbial Root Endophytes* (pp. 261–279). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9_15
- Segaran, G. y Sathiavelu, M. (2019). Fungal endophytes: A potent biocontrol agent and a bioactive metabolites reservoir. In *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (Vol. 21). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101284>
- Sieber, T. (2007). Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? In *Fungal Biology Reviews* (Vol. 21, Issues 2–3, pp. 75–89). <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.004>
- Silvera, K., Skillman, J. y Dalling, J. (2003). Seed germination, seedling growth and habitat partitioning in two morphotypes of the tropical pioneer tree *Trema micrantha* in a seasonal forest in Panama. *Journal of Tropical Ecology*, 19(1), 27–34.
<https://doi.org/10.1017/S0266467403003043>
- Soteras, M., Cofré, M., Bartoloni, J., Cabello, M. y Becerra, A. (2013). Hongos arbusculares (Glomeromycota) en la rizosfera de *Atriplex lampa* en dos ambientes salinos de Córdoba: influencia de la profundidad en la colonización radical y presencia de morfoespecies. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/10569>

- Sreekanth, D., Sushim, G., Syed, A., Khan, B. y Ahmad, A. (2011). Molecular and morphological characterization of a taxol-producing endophytic fungus, *Gliocladium* sp., from *Taxus baccata*. *Mycobiology*, 39(3), 151–157. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2011.39.3.151>
- Stępień, Ł., Lalak-Kańczugowska, J., Witaszak, N. y Urbaniak, M. (2020). *Fusarium Secondary Metabolism Biosynthetic Pathways: So Close but So Far Away* (pp. 211–247). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96397-6_28
- Strobel, G. (2003). Endophytes as sources of bioactive products. In *Microbes and Infection* (Vol. 5, Issue 6, pp. 535–544). Elsevier Masson SAS. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00073-X](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00073-X)
- Summy, K., Lieman, J., Gandy, Y., Mamachen, A., Mamachen, A., Goolsby, J. y Moran, P. (2011). Effects of Leaf Excision and Sample Storage Methods on Spectral Reflectance by Foliage of Giant Reed, *Arundo donax*. In *Subtropical Plant Science* (Vol. 63).
- Suryanarayanan, T. (2011). Diversity of Fungal Endophytes in Tropical Trees (pp. 67–80). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1599-8_4
- Swanson, B. y Pilla, J. (2012). Plant nomenclature and classification. *International Code of Nomenclature*. pp. 1-3. Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-2134-7_6
- The Plant List. (2011). Choice Reviews Online. <https://doi.org/10.5860/choice.48-6278>
- Tian, H., Shafi, J., Ji, M., Bi, Y. y Yu, Z. (2017). Antimicrobial Metabolites from *Streptomyces* sp. SN0280. *Journal of Natural Products*, 80(4), 1015–1019. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01016>
- Tomscheck, A., Strobel, G., Booth, E., Geary, B., Spakowicz, D., Knighton, B., Floerchinger, C., Sears, J., Liarzi, O. y Ezra, D. (2010). *Hypoxylon* sp., an endophyte of *Persea indica*, producing 1,8-Cineole and Other Bioactive Volatiles with Fuel Potential. *Microbial Ecology*, 60(4), 903–914. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9759-6>
- Tóth, B. y Feest, A. (2007). A simple method to assess macrofungal sporocarp biomass for investigating ecological change. *Canadian Journal of Botany*, 85(7), 652–658. <https://doi.org/10.1139/B07-068>
- Toulkeridis, T., Addison, A., Constantin, S., Winkler, E., Toomey III, R., Osburn, R. y Addison, A. (2015). Espeleología en Tena, Napo. Un breve inventario geológico y cartográfico.

- https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/43559540/Memorias_de_las_VIII_Jornadas_de_Patrimonio_yTurismo._ESPAM_MFL_Final_opt.pdf?response-content-disposition=inline%3Bfilename%3DDESCUBRIENDO_EL_GEOTURISMO_EN_MANABI_DIS.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC
- Truyens, S., Weyens, N., Cuypers, A. y Vangronsveld, J. (2015). Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environmental Microbiology Reports*, 7(1), 40–50. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12181>
- Uhl, C., Buschbacher, R. y Serrao, E. A. S. (1988). Abandoned Pastures in Eastern Amazonia. I. Patterns of Plant Succession. In Source: *Journal of Ecology* (Vol. 76, Issue 3). <https://about.jstor.org/terms>
- Unterseher, M. y Schnittler, M. (2010). Species richness analysis and ITS rDNA phylogeny revealed the majority of cultivable foliar endophytes from beech (*Fagus sylvatica*). *Fungal Ecology*, 3(4), 366–378. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2010.03.001>
- Upadhyaya, H., Gowda, C. y Sastry, D. (2008). Plant genetic resources management: collection, characterization, conservation and utilization. *Journal of SAT Agricultural Research*, 6, 16pp.
- Valencia, R. y Montúfar, R. (2013). Capítulo I: Diversidad y Endemismo. In *Palmas Ecuatorianas: Biología y Uso sostenible*.
- Vasundhara, M., Reddy, M. y Kumar, A. (2019). Secondary Metabolites from Endophytic Fungi and Their Biological Activities. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 237–258). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63504-4.00018-9>
- Vinale, F., Nicoletti, R., Lacatena, F., Marra, R., Sacco, A., Lombardi, N., d’Errico, G., Digilio, M. C., Lorito, M. y Woo, S. L. (2017). Secondary metabolites from the endophytic fungus *Talaromyces pinophilus*. *Natural Product Research*, 31(15), 1778–1785. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1290624>
- Whalley, R. y Hardy, M. (2000). Measuring botanical composition of grasslands. In *Field and Laboratory Methods for Grassland and Animal Production Research*. (Eds L ‘t Mannetje, RM Jones) pp. 67–102.

- Wang, Y., Liu, S., Tian, X., Fu, Y., Jiang, X., Li, Y. y Wang, G. (2018). Influence of light intensity on chloroplast development and pigment accumulation in the wild-type and etiolated mutant plants of *Anthurium andraeanum* 'Sonate.' *Plant Signaling and Behavior*, 13(8), 1–5. <https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1482174>
- Webb, C., Ackerly, D. y Kembel, S. (2008). Phylcom: software for the analysis of phylogenetic community structure and trait evolution. *Bioinformatics*, 24(18).
- Wei, Y., Xu, H. y Ren, A. (2007). Distribution and diversity of Epichloë/Neotyphodium fungal endophytes from different populations of *Achnatherum sibiricum* (Poaceae) in the Inner Mongolia <https://www.researchgate.net/publication/228501566>
- Yan, D.-H., Song, X., Li, H., Luo, T., Dou, G. y Strobel, G. (2018). Antifungal Activities of Volatile Secondary Metabolites of Four Diaporthe Strains Isolated from *Catharanthus roseus*. *Journal of Fungi*, 4(2), 65. <https://doi.org/10.3390/jof4020065>
- Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., Sun, P. y Qin, L. (2010). Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. In *Microbiological Research* (Vol. 165, Issue 6, pp. 437–449). <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.11.009>
- Shinta, D., Sonata, H. y Yuda Teruna, H. (2019). Bioactivity of Pure Antibacterial Compounds from Endophytic Fungus of *Sporothrix* sp Against Bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. <https://doi.org/10.4108/eai.13-11-2018.2283533>
- Yuyama, K. T., Chepkirui, C., Wendt, L., Fortkamp, D., Stadler, M. y Abraham, W. R. (2017). Bioactive compounds produced by *Hypoxylon fragiforme* against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Microorganisms*, 5(4), 80.
- Zhai, M., Li, J., Jiang, C., Shi, Y., Di, D., Crews, P. y Wu, Q. (2016). The bioactive secondary metabolites from *Talaromyces* species. *Natural products and bioprospecting*, 6(1), 1-24.
- Zimmerman, N. y Vitousek, P. (2012). Fungal endophyte communities reflect environmental structuring across a Hawaiian landscape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(32), 13022–13027. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209872109>

9. ANEXOS

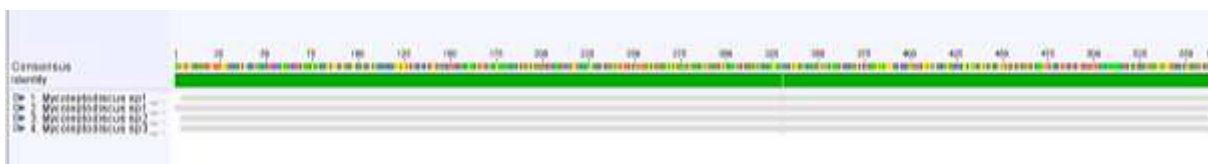
Anexo 1. Variables Bioclimáticas del bosque siempreverde piemontano que se encuentra fuera a la Cueva de Los Tayos (Hijmans et al., 2005; WorldClim–Global Climate, 2014).

Variable	Valor
Temperatura media anual	22.9
Rango promedio de temperatura mensual	10.2
Temporalidad de temperatura (Desv.Std * 100)	62.3
Máxima temperatura del mes más cálido	29.6
Mínima temperatura del mes más frío	17.2
Rango anual de temperatura (5-6)	12.4
Temperatura promedio del trimestre más húmedo	22.7
Temperatura promedio del trimestre más seco	23.3
Temperatura promedio del trimestre más cálido	23.8
Temperatura promedio del trimestre más frío	22.2
Precipitación anual	2559
Precipitación del mes más húmedo	296
Precipitación del mes más seco	153
Precipitación del trimestre más húmedo	830
Precipitación del trimestre más seco	483
Precipitación del trimestre más cálido	557
Precipitación del trimestre más frío	718

Anexo 2. Secuencia nucleotídica (cebadores) usados para la identificación molecular de hongos endófitos de la Cueva de Los Tayos (White, 1990).

CEBADORES	SECUENCIA (5'-3')	REGIÓN AMPLIFICADA
ITS-1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCCGG-3'	Espaciador interno transcrito del ADN ribosomal (ITS)
ITS-4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	

Anexo 3. Tabla de Geneious 9.0.5 con el alineamiento de las cuatro secuencias de ADN de *Mycocleptodiscus*.



Anexo 4. Tabla de Geneious 9.0.5 con el alineamiento de las secuencias de ADN de las tres especies de *Diaporthe* alineadas con secuencias de la base de datos de BLAST.



Anexo 5. Tabla de Geneious 9.0.5 con el alineamiento de las dos secuencias de ADN de *Xylaria* alineadas con secuencias de la base de datos de BLAST.



Anexo 6. Tabla de Geneious 9.0.5 con el alineamiento de las dos secuencias de ADN de *Hypoxyton* alineadas con secuencias de la base de datos de BLAST.

