

**Universidad Andina Simón Bolívar**

**Sede Ecuador**

**Área de Ambiente y Sustentabilidad**

Maestría en Cambio Climático, Sustentabilidad y Desarrollo

**Diversidad de hongos endófitos asociados al frailejón (*Espeletia hartwegiana*) en un marco de cambio climático, páramo de Romerales, Quindío, Colombia**

Cristhian Aristizabal Ortiz

Tutor: Jhon Alexander Osorio Romero

Quito, 2021





## Cláusula de cesión de derecho de publicación

Yo, Cristhian Aristizabal Ortiz, autor del trabajo intitulado “Diversidad de hongos endófitos asociados al frailejón (*Espeletia hartwegiana*) en un marco de cambio climático, en el páramo de Romerales, Quindío, Colombia”, mediante el presente documento dejo constancia de que la obra es de mi exclusiva autoría y producción, que la he elaborado para cumplir con uno de los requisitos previos para la obtención del título de Magíster en Cambio Climático Sustentabilidad y Desarrollo en la Universidad Andina Simón Bolívar, Sede Ecuador.

1. Cedo a la Universidad Andina Simón Bolívar, Sede Ecuador, los derechos exclusivos de reproducción, comunicación pública, distribución y divulgación, durante 36 meses a partir de mi graduación, pudiendo por lo tanto la Universidad, utilizar y usar esta obra por cualquier medio conocido o por conocer, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico. Esta autorización incluye la reproducción total o parcial en los formatos virtual, electrónico, digital, óptico, como usos en red local y en internet.
2. Declaro que en caso de presentarse cualquier reclamación de parte de terceros respecto de los derechos de autor/a de la obra antes referida, yo asumiré toda responsabilidad frente a terceros y a la Universidad.
3. En esta fecha entrego a la Secretaría General, el ejemplar respectivo y sus anexos en formato impreso y digital o electrónico.

Firma: 23/07/2021.



Cristhian Aristizabal Ortiz.



## Resumen

Debido al aumento global de las temperaturas impulsado por el cambio climático de origen antropogénico, y a la poca información que se tiene sobre hongos endófitos en especies de los páramos, esta investigación buscó identificar y caracterizar la diversidad de hongos endófitos del frailejón *Espeletia hartwegiana*. Esta especie habita en los páramos desde 3000 a 5000 metros de lo que la hace una especie más vulnerable a los aumentos de temperatura que se pronostican para el año 2100 de hasta 2.5°C. La identificación y caracterización de los hongos endófitos se realizó por medio de técnicas filogenia molecular basado en datos de secuencias de genes múltiples de las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS), en donde se encontraron un total de 15 géneros de endófitos como *Nigrospora*, *Trichoderma* y *Diaporthe* con un total de 35 especies. Los hongos endófitos encontrados podrían tener un rol vital en la supervivencia de esta especie de frailejón mediando la forma en cómo responde al estrés abiótico producido por el cambio climático como aumento de la temperatura, cambio en las precipitaciones y sequías, además del estrés biótico como virus, bacterias, insectos y hongos fitopatógenos.

**Palabras clave:** Cambio Climático, Filogenia Molecular, Hongos Endófitos, Páramos.



Con amor para mis padres Fernando Iván Aristizabal y mi madre María Ligia  
Ortiz.

A Norberto Aristizabal, y Natalia Aristizabal por creer en mí.

A mi hijo José David Aristizabal., por representar las nuevas generaciones.

A mi tutor Jhon Alexander Osorio., por tenerme paciencia en este proceso de  
aprendizaje y compartirme sus conocimientos.

A Tatiana Tapias., por darme su amor y llevarme por el camino de la virtud  
siempre centrado.

A la maestría en Cambio Climático Sustentabilidad y Desarrollo, por siempre  
estar disponibles para mí.

A la Universidad Andina Simón Bolívar., por apoyar mi tesis de investigación.

A la República del Ecuador., por abrirme sus puertas y darme un mejor futuro.



## **Agradecimientos**

Estos agradecimientos van dedicados para Ecuador que me brindó la oportunidad poder estudiar una maestría, a mi tutor por aceptarme y acompañarme en este proceso, a mi familia por creer en mí y en los sacrificios que hice para irme a vivir a otro país solo y sin dinero para poder "salir adelante" como decimos en Colombia, a mi compañera sentimental por siempre guiarme hacia el camino correcto, disciplina, compromiso y entrega, a la universidad Andina Simón Bolívar por aceptarme en sus aulas de clase, y por ultimo a la Universidad del Quindío por abrirle la puerta a uno de sus egresados y acogerlo de buena forma con sus instalaciones de laboratorio.

Gracias y mil gracias a todos de corazón, sin duda esta experiencia cambio mi vida en todos los sentidos.

*Desde hoy, hasta el final que podría llamarse infinito.*



## Tabla de contenidos

Figuras mapas y tablas.....	13
Introducción.....	15
Capítulo primero: Cambio Climático, Frailejones y Hongos Endófitos.....	21
1. Antecedentes.....	21
2. Justificación.....	25
3. Hipótesis.....	26
4. Objetivos.....	27
4.1 Objetivo general.....	27
4.2 Objetivos específicos.....	27
Capítulo segundo: Materiales, Métodos y Resultados.....	29
1. Área de Estudio.....	29
2. Colecta de material biológico.....	29
3. Aislamientos fúngicos a partir de muestras vegetales.....	30
4. Crecimiento de cultivos microbiológicos (Hongos endófitos).....	32
5. Extracción de ADN.....	33
6. Bioinformática-Metagenómica Fúngica.....	34
7. Secuenciamiento.....	35
8. Análisis Filogenético.....	35
Capítulo Tercero: Discusión sobre los hongos endófitos encontrados y sus implicaciones ecológicas.....	39
1. Cambio Climático y Biodiversidad.....	39
2. Identificación y Filogenia de Hongos Endófitos en el Marco del Cambio Climático.....	42
Conclusiones.....	57
Obras citadas.....	59
Anexos.....	73

Anexo 1: Tesista Cristhian Aristizabal junto al Frailejón <i>Espeletia hartwegiana</i> , Páramo Romerales, Quindío, Colombia.....	73
Anexo 2: Tesista Cristhian Aristizabal Colectando Hojas del Frailejón <i>Espeletia hartwegiana</i> , Páramo Romerales, Quindío, Colombia.....	73
Anexo 3: Coordenadas geográficas tomadas de cada punto de colecta de las hojas del frailejón <i>Espeletia hartwegiana</i> , ubicadas en el páramo de romerales, Quindío, Colombia.....	74
Anexo 4: Hoja del Frailejón <i>Espeletia hartwegiana</i> .....	75
Anexo 5: Hifas observadas a través de un estereoscopio.....	75
Anexo 6: Backups o copias de cultivos axénicos de los hongos endófitos encontrados .....	76
Anexo 7: Caja de laboratorio con las muestras de ADN extraídas, listas para ser empacadas y enviadas.....	76
Anexo 8: Campana de flujo laminar "BIOBASE" en donde se trabajó con los cultivos microbiológicos.....	75
Anexo 9: Muestras de ADN extraídos de los Hongos endófitos encontrados en las hojas de frailejón, enviadas a Alemania a la Universidad Ruhr de Bochum.....	77
Anexo 10: Estadísticos resultantes del programa PAUP, producto del árbol de parsimonia.....	78
Anexo 11: Alineamiento de las secuencias ITS en el programa MEGA-X.....	78
Anexo 12: Estadísticos generados por el programa JmoldeITest.....	79
Anexo 13: Estadísticos generados a partir de correr los 88 modelos para los datos en el programa jModelTest, corriendo el criterio de información AKAIKE (AIC).....	81

## Figuras mapas y tablas

Figura 1. Tipos de vegetación en los páramos.....	16
Figura 2. Fotografía de la especie <i>Espeletia hartwegiana</i> , Páramo Romerales, Quindío, Colombia.....	18
Figura 3. Distribución muestral por individuo recolectado. Y, hojas jóvenes; M, hojas maduras; N, necromasa; R, raíces; EP, epífita; DE, endófito.....	23
Figura 4. La colonización endófitica modula las defensas de las plantas contra el estrés biótico y abiótico.....	24
Figura 5. Cortes de las hojas de frailejón <i>Espeletia hartwegiana</i> esterilizadas y sembradas en medio de cultivo Agar papa Dextrosa, primera semana de crecimiento micelial.....	30
Figura 6. Hifa única observada desde el estereoscopio lista para ser cortada por medio de la técnica de corte de hifa única. ....	31
Figura 7. Ejemplos de las diferencias morfológicas en micelios generados por los medios de cultivo Axénicos (Puros) de hongos endófitos en agar PDA (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12), aislados de las hojas de la especie de frailejón <i>Espeletia hartwegiana</i> .....	31-32
Figura 8. Pasos esenciales de un proyecto metagenómico.....	34
Figura 9. ADN extraído de cultivos puros de hongos endófitos, aislados de hojas de la especie de frailejón <i>Espeletia hartwegiana</i> .....	34
Figura 10. Filograma obtenido a partir del análisis ML y MP del conjunto de datos ITS, Aislados de las hojas de frailejón.....	37
Figura 11. Cladograma de las relaciones filogenéticas del genero <i>Nigrospora</i> y <i>Collectotrichum</i> . ....	43
Figura 12. Cladograma de las relaciones filogenéticas del genero <i>Trichoderma</i> e <i>Hypocrea</i> .....	46
Figura 13. Cladograma de las relaciones filogenéticas del genero <i>Annulohyphoxylon</i> .....	48
Figura 14. Cladograma de las relaciones filogenéticas del genero <i>Daldinia</i> , <i>Hypoxylon</i> , <i>Biscogniauxia</i> , <i>Nemania</i> y <i>Humicola</i> .....	49

Figura 15. Cladogramas de las relaciones filogenéticas del genero <i>Diaporthe</i> , <i>Crassiparies</i> , <i>Massarina</i> , <i>Cryptocoryneum</i> , <i>Cyphellophora</i> y los grupos externos.....	52
Mapa 1. Parque Nacional Natural los Nevados, ubicación páramo Romerales zona muestreada.....	16
Tabla 1. Coordenadas geográficas tomadas de cada punto de colecta de las hojas del frailejón <i>Espeletia hartwegiana</i> , ubicadas en el páramo de romerales, Quindío, Colombia.....	29-30
Tabla 2. Géneros y especies encontrados en los aislamientos e identificaciones de hongos endófitos en la especie <i>Espeletia hartwegiana</i> .....	36
Tabla 3. Géneros de hongos encontrados en otras especies de frailejón. X = presencia del genero de hongo dentro de la especie de frailejón.....	42-43

## Introducción

Hay un libro abierto siempre para  
todos los ojos: la naturaleza.  
(Jean-Jacques Rousseau, 1712-1778)

El cambio climático corresponde a un fenómeno que afecta el planeta de manera natural permitiendo mantener las condiciones climáticas como la temperatura, la precipitación, entre otras, en un rango aceptable para la vida (Jiménez 2010). Sin embargo, dado el aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), principalmente asociado a las actividades humanas y el alto consumo de combustibles fósiles, los cambios en dichas condiciones han sido alterados dando paso a un acelerado aumento de temperatura anual en las últimas décadas, con precipitaciones y sequías más frecuentes e intensas (IPCC 2020, 5; Jiménez 2010).

Acorde con el Panel Intergubernamental de Expertos en Cambio Climático (IPCC) para fin de siglo el Cambio Climático se acrecentará, pronosticando un aumento de temperatura de 2.5 a 4.5 °C para el año 2100, que tan solo para Colombia en los últimos 30 años fue de 0,8°C, generando impactos notorios en las zonas de alta montaña, como los páramos (Moreno y Palma, 2016).

El cambio climático es un fenómeno cuyos efectos alcanzarán los páramos, los cuales son ecosistemas de alta montaña presente en elevaciones entre 3100 y 4700 m ubicados en el norte de los Andes de América del Sur y el sur de América Central adyacente (Berdugo *et al*, 2016). Estas áreas se caracterizan por una vegetación principalmente endémica compuesta por frailejones, matorrales y pastos (véase figura 1), (García *et al*, 2010).

Los ecosistemas de alta montaña como los páramos ofrecen diversos servicios ambientales como la biodiversidad única que albergan, los paisajes, los suelos, y su capacidad de retener y almacenar agua (Morales *et al*, 2019). Las formaciones vegetales juegan un papel diferenciado en el mantenimiento de la humedad y las fuentes de agua en el ecosistema, presentando la capacidad de interceptar, almacenar y regular los flujos hídricos superficiales y

subterráneos, aportando los servicios de abastecimiento de agua para el 70% de la población de Colombia (Vásquez y Buitrago 2017).

Además, dada la característica de permanente humedad de su suelo, la materia orgánica se descompone a menor velocidad, logrando un efecto de retención y almacenamiento de carbono (Anderson *et al*, 2012). En Colombia se han realizado diferentes estudios sobre la distribución y extensión del ecosistema paramuno. Rangel (2002, 4), determinó que los páramos colombianos abarcaban aproximadamente el 2.6% de la superficie del país.

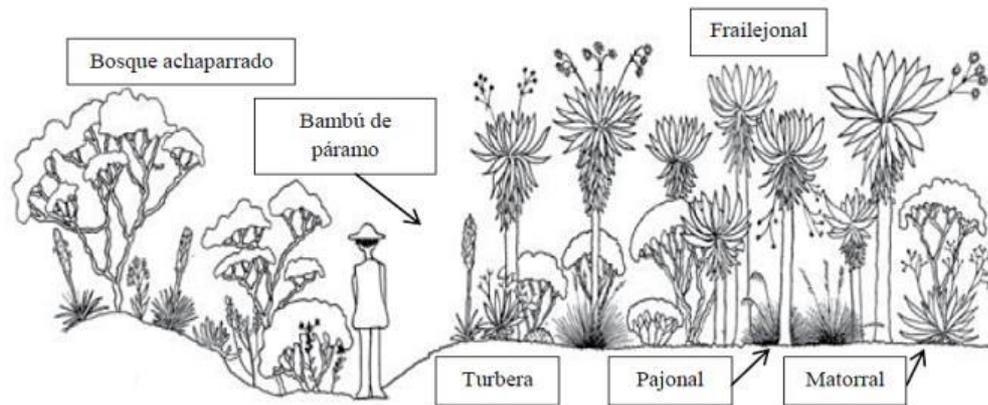
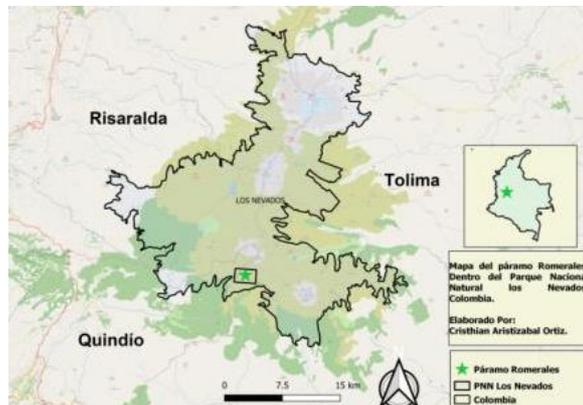


Figura 1. Tipos de vegetación en los páramos, por Pedraza-Peñalosa, Betancur y Franco-Rosselli, (2005).

En particular el páramo Romerales, se encuentra dentro del territorio adscrito a los Parques Nacionales Naturales (PNN), específicamente el PNN de los Nevados, en la cordillera central colombiana, hacia la zona norte del Departamento del Quindío, con límites fronterizos entre los departamentos de Risaralda y Tolima. Este páramo es el hogar del frailejón *Espeletia hartwegiana*, el cual está afrontando los efectos del cambio climático (véase mapa 1).



Mapa 1. Parque Nacional Natural los Nevados, ubicación páramo Romerales zona muestreada.

Existe evidencia científica concreta del aumento de temperatura en los Andes Tropicales, también cambios significativos en los patrones de precipitación, sumado a la disminución en la incidencia del clima nublado, lo que conduce a las plantas a mayor cantidad de horas expuestas a la radiación solar (Ruiz *et al*, 2009). Otro efecto grave que trae consigo el cambio climático es el desplazamiento de especies en el gradiente altitudinal. Con un aumento de 3°C, se espera que las especies se muevan ~600 m en búsqueda de su óptimo térmico, esto afectaría gravemente las especies de páramo como los frailejones Cuesta Camacho (2007).

Los frailejones son emblemáticas plantas de páramo y ecosistemas de alta montaña (MINAMBIENTE, 2019). Pertenecen a la familia Asteraceae, contiene cerca de 142 especies agrupadas en ocho géneros: *Carramboa*, *Coespeletia*, *Espeletia*, *Espeletiopsis*, *Libanothamnus*, *Paramiflos*, *Ruilopezia* y *Tamania*, de estos los más importantes y con mayor diversidad de especies son: *Espeletia*, *Espeletiopsis* y *Libanothamnus* (Rivera y Torres 2001).

Poseen adaptaciones que les permite captar y retener grandes cantidades de agua de su entorno, permitiendo un balance ecosistémico (Farias, 2013). La morfología singular del género *Espeletia*, le permite acumular las hojas antiguas en forma de “abrigo”, brindando protección contra las bajas temperaturas nocturnas de hasta 0°C. Los fuertes vientos y la radiación solar, los cuales serán cada vez más intensos y frecuentes por causa del cambio climático (Cortes y Sarmiento, 2013, 34) (véase figura 2).

Estas plantas son especies claves para la conservación de los páramos y la lucha contra el cambio climático, debido a que ofrecen una gran variedad de servicios ecosistémicos (Díaz *et al*, 2007). El páramo es referente sin igual de fuente hídrica, ciudades como Bogotá y Quito obtienen aproximadamente el 80% de su agua dulce de los páramos (Buytaert *et al*, 2006). Los frailejones, en su mayoría endémicos, se han visto afectados por actividades humanas como la ganadería extensiva, agricultura (cultivos de papa y cebolla), minería de oro y carbón, turismo no controlado, y quemadas intencionales (Hofstede 2000). Esta situación podría comprometer a mediano y largo plazo la función de captación, regulación y suministro del agua para el consumo

en las ciudades colombianas ubicadas en las regiones de influencia de estos ecosistemas (Varela 2015).



Figura 2. Fotografía de la especie *Espeletia hartwegiana*, Páramo Romerales, Quindío, Colombia.

No obstante, en asociación con especies como el frailejón de los Andes Tropicales, encontramos a los hongos, cuyos roles en las interacciones biológicas son de vital importancia. Los hongos pueden ser endófitos, simbios, mutualistas, parásitos y comensales, y son capaces de responder a las amenazas que plantea el cambio climático en cuanto a perturbaciones ambientales, aumento de temperatura y estrés hídrico, adaptándose a la disponibilidad de recursos modificando sus actividades enzimáticas e incluso su genoma a lo largo del tiempo (Moreno *et al*, 2013).

Los hongos son clasificados según su forma de reproducción, sea sexual o asexual, en donde se observan las diferencias estructurales internas entre los diferentes grupos tales como; sus esporas e hifas, como lo indican Blackwell y Spatafora (2004), estos organismos están divididos en cuatro grandes grupos los cuales son, Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Zygomycota, es justo en el grupo de los Ascomycota donde se encuentra gran diversidad de hongos conocidos como “hongos endófitos”, en donde su nombre “endófito” significa “dentro de la planta” (*endon*: dentro, *phyton*: planta).

Estos microorganismos fúngicos tienen la facilidad de pasar gran parte o todo su ciclo de vida invadiendo los tejidos de su hospedero (planta), sin tener un efecto negativo evidente (Léveillé 1846, 3; de Bary 1866, 8). Por lo tanto, el concepto de endófito indica una asociación de costo-beneficio, pero de una forma mutualista entre el hongo y la planta hospedera, permitiendo la estadía en sus tejidos vivos (Clay 1998, 8). Los hongos endófitos se han encontrado en todas las plantas (algas, musgos, pastos, plantas y vasculares), desde los bosques templados hasta los bosques tropicales, hallándose una gran diversidad de plantas y en asociación gran diversidad de hongos endófitos (Sánchez *et al*, 2010).

Se espera que los hongos endófitos jueguen un papel cada vez más importante potenciado por el cambio climático en las enfermedades producidas en plantas como: pudrición radicular, mal blanco, entre otras, con los aumentos pronosticados de la temperatura y el estrés por sequía asociados al cambio climático (Desprez-Loustau *et al*, 2006; Slippers y Wingfield 2007, 6). Los cambios en la cantidad de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), y la disponibilidad de nitrógeno en el suelo afectan de forma similar tanto a las plantas como a los hongos, por ende, las alteraciones generadas por parte del cambio climático pueden causar desbalances en sus relaciones (Ies *et al*, 2013).

Algunos estudios realizados en el año 1898 donde se registraron los primeros hongos endófitos, como el de Bary (1866), brindo la iniciativa de investigaciones que lograron explicar los cuadros toxicológicos observados en animales, los cuales se daban por el consumo de semillas o en áreas de pastos (Poaceae) que posiblemente albergaban hongos Clavicipitáceos (familia del ergot), los cuales poseían actividades enzimáticas con micotoxinas.

Por diversas situaciones no trascendió la investigación hasta que Bacon (1977), hizo relación del hongo endófito *Neotyphodium coenophialum* debido a una intoxicación del ganado llamado “síndrome de verano” cuando estos animales consumían pastos de la especie *Festuca arundinacea* (Poaceae). Funk en el año 80 caracterizó la resistencia de las Poaceae que albergaban hongos endófitos que frecuentemente eran atacados por insectos (protección contra herbívoros) (Sánchez *et al*, 2010).

Compant y colaboradores (2010) mencionaron que, tras experimentar en el laboratorio con una gama de temperaturas en los hongos endófitos aislados, obtuvieron resultados variables respecto al crecimiento, es decir, positivos y neutrales, llegando a la conclusión de que los microorganismos asociados a las plantas son un factor importante que influye en la respuesta de

las plantas acorde a los cambios de temperatura, lo que compromete las respuestas del frailejón y los hongos endófitos frente al calentamiento global causado por el cambio climático.

Con relación a los estudios realizados sobre hongos endófitos en frailejones se han encontrado al menos 100 especies con capacidades de inhibir hongos fitopatógenos o herbivoría (Cabezas *et al*, 2012).

Los géneros de hongos endófitos encontrados en anteriores estudios son *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Gliocadium*, *Nigrospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Trichothecium*, *Trichoderma* y *Sordaria* (Pineda 2000; Programa Nacional para la Evaluación del Estado y Afectación de los Frailejones en los Páramos de Andes del Norte, 2009).

Teniendo en cuenta que para Colombia hay poca información sobre hongos endófitos en ecosistemas paramunos, se hace fundamental la ampliación de más información referente al tema debido a que solo existen estudios significativos en café, leguminosas y rosas los cuales más allá de la identificación de géneros de hongos endófitos no incluyen el cambio climático y sus posibles consecuencias (Salgado y Cepero 2005; Vega *et al*, 2010; Parsa *et al*, 2016). En términos filogenéticos los hongos son el reino de la naturaleza más cercano a los animales (Hibbett *et al*, 2018).

Las relaciones que posean las diferentes especies de endófitos dentro de la especie de frailejón es de importancia conocerla mediante el uso de la filogenia molecular (Judd *et al*, 2007), mediante secuencias de ADN, ARN o proteínas (Cooke *et al*, 2000). Dependiendo de la presencia de especies agresivas de endófitos, como *Nigrospora*, se puede tener un mejor conocimiento sobre las consecuencias que trae consigo los impactos del cambio climático sobre estas plantas de los Andes Tropicales (Foden *et al*, 2009).

## Capítulo primero

### Cambio Climático, Frailejones y Hongos Endófitos

#### 1. Antecedentes

Desde los estudios realizados por Lévillé (1846) y Bary (1866) sobre hongos Endófitos en pastos de zonas templadas, se ha logrado identificar que estos hongos son capaces de inducir respuestas adaptativas a sus hospederos (Micotoxinas contra herbívora, adaptación a heladas o climas extremos, fijación de nutrientes) a cambio de alimento y hospedaje, formando una relación mutualista en la cual las dos especies involucradas son beneficiadas. No obstante, se ha reportado que los hongos endófitos además de tener relaciones mutualistas con diferentes especies vegetales se pueden tornar en especies patógenas para su hospedero, una vez la planta se encuentra en condiciones desventajosas, tornándose así el hongo endófito, en un hongo fitopatógeno (Herrera y Ulloa 1990, 550).

Como se mencionó anteriormente los hongos endófitos pueden pasar de un estado mutualista a un estado de patogénesis, dada esta relación entre ambos organismos se producen metabolitos secundarios potencialmente tóxicos, facilitando factores de virulencia dados por el hongo endófito, como exoenzimas y metabolitos fitotóxicos, a su vez la planta presenta defensas tanto mecánicas como bioquímicas (Sánchez *et al*, 2013, 5).

Hasta la fecha los principales estudios de hongos endófitos se han fijado en especies de interés económico y comercial tales como, palma de aceite, café, leguminosas, pastos de forrajeo y diferentes tipos de rosas (Salgado y Cepero 2005; Vega *et al*, 2010; Parsa *et al*, 2016).

Las especies modelo para el estudio de los hongos endófitos han sido las gramíneas forrajeras, en donde se han reportado especies de endófitos asociados a los géneros *Lolium*, *Festuca* y *Brachiaria* (Siegel *et al*, 1987), no obstante Otero y Bayman (2009) han reportado un creciente número de estudios en orquídeas epifitas tropicales, relaciones con hongos micorrizicos.

Actualmente existen escasos reportes de hongos endófitos asociados a ecosistemas con climas extremos (temperaturas extremas), como árticos, desiertos páramos, y zonas alpinas, especialmente para zonas de temperaturas frías como lo son los páramos (Lopera *et al*, 2008; Leung *et al*, 2011; Cabezas *et al*, 2012; Miles *et al*, 2012, Zhang y Yao 2015).

Investigadores como Lopera, Leung y colaboradores (2011) han llegado a la conclusión de que los hongos endófitos juegan un papel importante en las plantas a la hora de adaptarse a ecosistemas de clima templado (Kivlin *et al*, 2013; Zhang y Yao 2015).

En Colombia, los trabajos con hongos endófitos son pocos, por ende, trabajos como el de Lopera y colaboradores (2008) con especies del genero *Espeletia* de los páramos Colombianos son pioneros, además del trabajo de Cabezas y colaboradores (2012, 4), en el cual aislaron y caracterizaron celulasas (enzimas descomponedores de la celulosa) extraídas de hongos endófitos que se hallaban en especies de *Espeletia*, posteriormente Lopera y Miles (2012), unieron esfuerzos para continuar caracterizando la diversidad de hongos endófitos en los páramos andinos colombianos, enfocados en *Espeletia*, con el objetivo de encontrar especies con potencial biocontrolador.

Existen trabajos tesis en los repositorios de diversas universidades de los años 2014 y 2015, en los cuales se aborda el tema de los hongos endófitos, páramos y especies de *Espeletia* (frailejones) y de la familia Poaceae, en donde se caracterizan las diversas especies de hongos endófitos por medio taxonomía y biología molecular, además de buscar metabolitos secundarios con fines medicinales o de biocontrol.

Los trabajos en filogenia molecular de hongos endófitos realizados en frailejones se han visto enfocados más hacia la búsqueda de la diversidad funcional en comunidades microbiológicas, como por ejemplo el estudio realizado por Ruiz y colaboradores (2015), en donde buscaron mediante el análisis molecular de raíces, necromasa, hojas maduras y jóvenes de diferentes especies de *Espeletia* (véase figura 3), ubicada en los Andes neotrópicales colombianos, secuencias genéticas de las regiones V5-V6 de la unidad 16S del rARN.

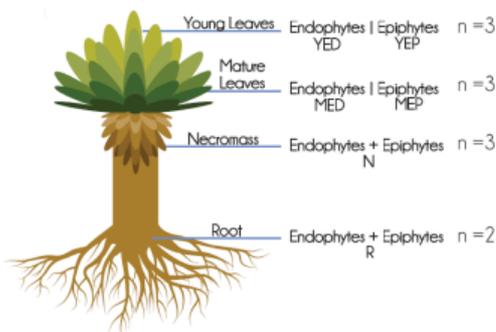


Figura 3. Distribución muestral por individuo recolectado. Y, hojas jóvenes; M, hojas maduras; N, necromasa; R, raíces; EP, epífita; DE, endófito. Tomado de Ruiz y colaboradores, (2015).

Este estudio analizó la composición de comunidades microbioanas y su diversidad funcional en un ecosistema de alta montaña, en donde las temperaturas, los rayos U.V y la altura juegan papeles determinantes como filtros ecológicos severos, en donde solo pueden existir especies que han desarrollado capacidades para adaptarse, sobrevivir y colonizar dichas áreas, por ende, cuando se analizaron las comunidades existentes dentro de estas especies de *Espeletia*.

Encontraron que algunas especies halladas podrían tener roles importantes como productores de metabolitos secundarios, enzimas, o incluso como bioremediadores, y que las comunidades microbianas eran diferentes tanto en sus hojas, como en sus raíces y en la necromasa.

A medida que las décadas avanzan y la evidencia sobre el cambio climático se hace más robusta y evidente, los estudios en los hongos endófitos han tomado vital importancia al estar asociados con cultivos de especies comestibles, escases de agua y de tierras productivas, sumado a los efectos negativos que trae consigo el cambio climático para las diferentes plantaciones y cosechas a nivel global.

Es por eso que Lu Yan y colaboradores (2019), analizaron los efectos positivos que tenían la colonización de hongos endófitos en las plantas, en donde ratificaron que los hongos endófitos dentro la planta generan metabolitos antimicrobianos, estimulan las respuestas inmunológicas y compiten por espacio dentro de la planta con diferentes patógenos, incrementando así la resistencia contra herbívoros y la resistencia al estrés salino (factores bióticos).

Además de ayudar a la planta contra el estrés abiótico, causado principalmente por factores climáticos, como la falta de agua (estrés hídrico), las temperaturas extremas, la intensidad de los rayos U.V y los metales pesados como la muestra la figura 4, debido a esto se

concluyó que las fitohormonas cumplen un papel importante en la colonización de hongos endófitos dentro de la planta.

Aun que se ha reportado que los hongos endófitos se pueden usar como biocontroladores, diferentes estudios reportan que el uso de hongos endófitos puede tener efectos adversos, como un retraso significativo en el crecimiento de la planta con el uso de la especie *Cryptosporiopsis* sp. (Terhonen *et al*, 2016). Otro reporte indica la fecundidad y supervivencia de enemigos naturales como parásitos, esto es debido a que los hongos endófitos transfieren sus toxinas y alcaloides cuando son ingeridos por parásitos u otros enemigos naturales de las plantas (Lopez y Sword, 2015).

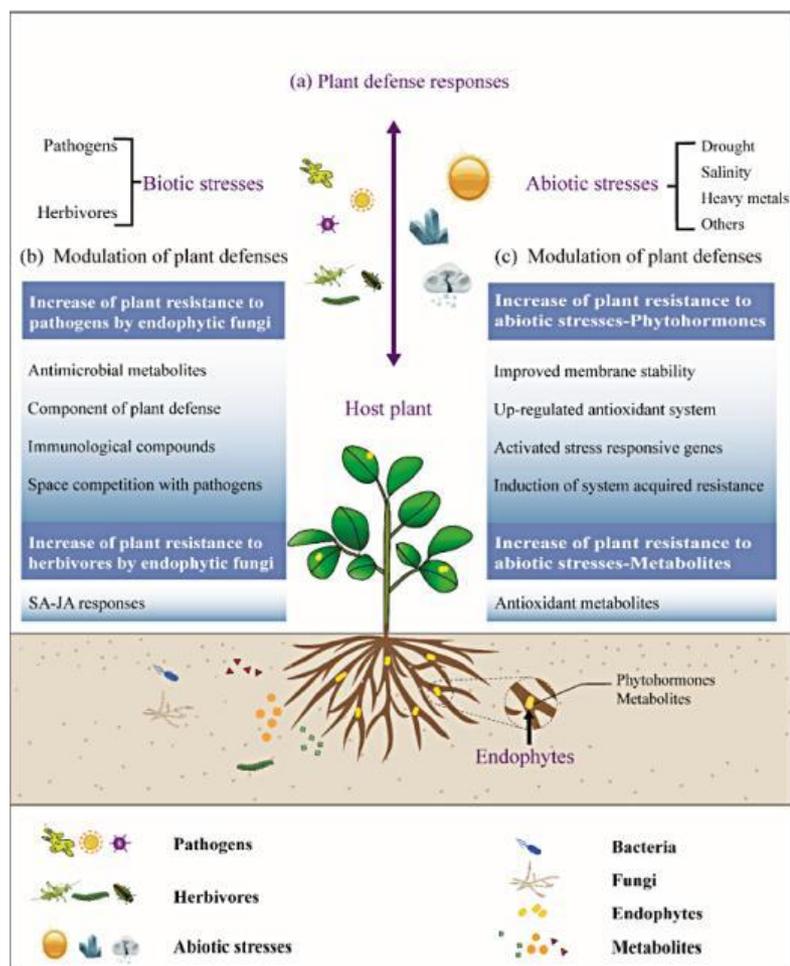


Figura 4. La colonización endófitica modula las defensas de las plantas contra el estrés biótico y abiótico. Bajo estrés biótico (herbívoros y patógenos) y abiótico (sequía, salinidad, metales pesados y otros) (a), se inducen respuestas de defensa de las plantas (b), los endófitos producen metabolitos protectores y modulan la vía de las fitohormonas para mejorar la inmunidad de las plantas (c); tomada de Lu yan y colaboradores, (2019, 7).

## 2. Justificación

La presente investigación pretende identificar y caracterizar que especies de hongos endófitos están asociadas al frailejón *Espeletia hartwegiana* y que posibles implicaciones podría tener que estas especies se encuentren dentro de esta especie de alta montaña. La importancia de conocer esta información reside en que los hongos endófitos pueden beneficiar o perjudicar a la adaptación y resistencia de especies vegetales en los distintos escenarios climáticos propuestos por la ciencia (IPCC 2020).

El calentamiento global podría afectar el equilibrio de los hongos endófitos en especies vegetales, generando desbalances en la planta o la pérdida de especies endófitas de importancia biotecnológica. Por ejemplo, se podrían perder especies endófitas con potencial para control biológico de plagas y enfermedades de plantas, como productores de enzimas y metabolitos secundarios, degradación de plásticos, o biorremediación, entre otros (Schulz *et al*, 2002). Por ello se hace fundamental estudiar los hongos endófitos en ecosistemas de páramo ya que en Colombia y en los páramos en general han sido poco estudiados, y su efecto sobre las plantas de alta montaña podría ser clave en el mantenimiento de sus poblaciones.

### 3. Hipótesis

H<sup>1</sup>: La identificación y caracterización molecular de los hongos endófitos encontrados en la especie de frailejón *Espeletia hartwegiana*, ubicada en el páramo romerales, Quindío, Colombia, será diferente en géneros y especies de otras identificaciones de hongos endófitos realizadas en especies de frailejón, siendo diferentes los géneros y especies encontrados en *Espeletia hartwegiana* las consecuencias del cambio climático sobre el frailejón también sería modificada.

H<sup>0</sup>: La identificación y caracterización molecular de los hongos endófitos encontrados en la especie de frailejón *Espeletia hartwegiana*, ubicada en el páramo romerales, Quindío, Colombia, será similar en géneros y especies de otras identificaciones de hongos endófitos realizadas en especies de frailejón, siendo similares los géneros y especies encontrados en *Espeletia hartwegiana* las consecuencias del cambio climático sobre el frailejón continuarían como se ha registrado con anterioridad.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo general

- Caracterizar la diversidad de hongos endófitos presentes en los frailejones de la especie *Espeletia hartwegiana* en el páramo de Romerales, tomando en cuenta su relación con el cambio climático.

### 4.2 Objetivos específicos

- Identificar los hongos endófitos asociados en *Espeletia hartwegiana* del páramo de Romerales.
- Hallar relaciones filogenéticas entre las diferentes especies de hongos Endófitos encontradas en *Espeletia hartwegiana*.
- Advertir las repercusiones del cambio climático sobre *Espeletia hartwegiana* en base a su diversidad de hongos endófitos.



## Capítulo segundo

### Materiales, Métodos y Resultados

#### 1. Área de Estudio

El trabajo se realizó en el páramo de Romerales ubicado en la zona alta del municipio de Salento, Quindío (4°39'20.2"N 75°25'50.6"W) con una extensión aproximada de 6.794 ha (Cano *et al*, 2015).

#### 2. Colecta de material biológico

La colecta del material biológico se realizó mediante muestreos aleatorios lo largo del páramo, tomando coordenadas de cada punto de colecta (véase anexo 3), las hojas se colectaron por medio de tijeras podadoras, siendo empacadas cada una en bolsas Ziploc diferentes, se colectó un total de 15 hojas, cada una correspondiente a una planta de frailejón, para un total de 15 plantas muestreadas de *E. hartwegiana*.

Adicionalmente, las bolsas Ziploc fueron marcadas con los datos de colecta en campo y transportadas a los laboratorios del Programa de Biología de la Universidad del Quindío para su procesamiento.

Tabla 1. Coordenadas geográficas tomadas de cada punto de colecta de las hojas del frailejón *Espeletia hartwegiana*, ubicadas en el páramo de romerales, Quindío, Colombia.

#### 3. Aislamientos fúngicos a partir de muestras vegetales

Las muestras obtenidas fueron lavadas con agua para eliminar el exceso de residuos, se cortaron 4 trozos de cada hoja con un tamaño aproximado de 0.5 a 1.0 cm (véase figura 5), luego cada trozo de hoja se sometió a una esterilización la cual se completó con algunas modificaciones acorde al procedimiento descrito por (Osorio *et al*, 2017), específico para el aislamiento de

hongos endófitos, que consiste en sumergir periódicamente el material vegetal en etanol al 90% durante un minuto, seguido de hipoclorito de sodio (NaClO) al 4% por un minuto, continuando con etanol al 70% durante un minuto y por último se lavarán con agua destilada, todo dentro de la campana de flujo.

Las cuatro secciones de hoja se transfirieron a una caja de Petri para un total de 15 cajas de Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA) (una caja de Petri por cada 4 cortes de hoja). Posteriormente las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente (25°C aproximadamente).



Figura 5. Cortes de las hojas de frailejón *Espeletia hartwegiana* esterilizadas y sembradas en medio de cultivo Agar papa Dextrosa, primera semana de crecimiento micelial, caja de Petri de 20ml de capacidad.

Pasadas 3 semanas se revisaron los cultivos fúngicos con el fin de revisar el crecimiento del micelio y hacer un repique a un cultivo puro, una vez maduros se procedió a utilizar la técnica de corte de hifa única (Osorio *et al*, 2017), esta técnica consistió en tomar la punta de la hifa con ayuda de un estereoscopio y un bisturí de grado quirúrgico, agua destilada, alcohol al 70% y un mechero para mantener el bisturí esterilizado, una vez identificada la hifa ideal para cultivar de forma pura (véase figura 6), con el bisturí se procedió a cortar el agar PDA en forma de cuadro con una medida aproximada de 3 milímetros cuadrados.

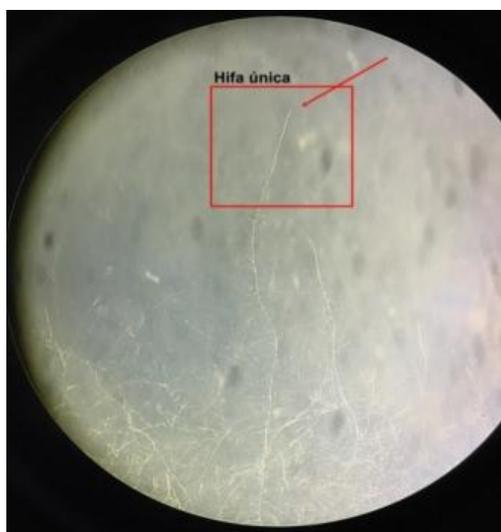
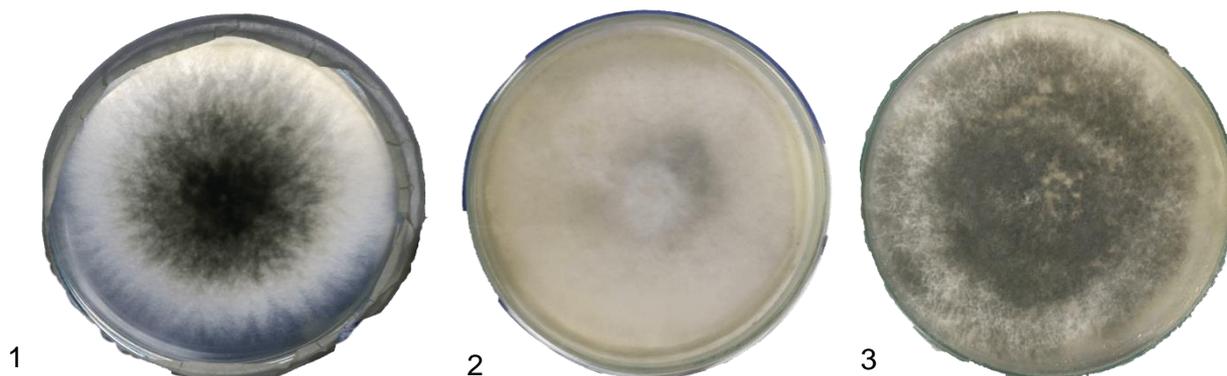


Figura 6. Hifa única observada desde el estereoscopio lista para ser cortada por medio de la técnica de corte de hifa única.

Se esperó entre 3 a 5 semanas a que crecieran los cultivos puros aislados de las hifas únicas en nuevas cajas de Petri con agar PDA.

#### 4. Crecimiento de cultivos microbiológicos (Hongos endófitos)

Los hongos cultivados de forma pura, consiguieron un crecimiento micelial significativo a partir de los 15 días a temperatura ambiente como lo demuestra la figura 7, que contiene doce de los cultivos más representativos con su respectivos micelios aéreos desarrollados, donde varían sus colores, formas y consistencias esto indicando que pertenecen a diferentes especies.



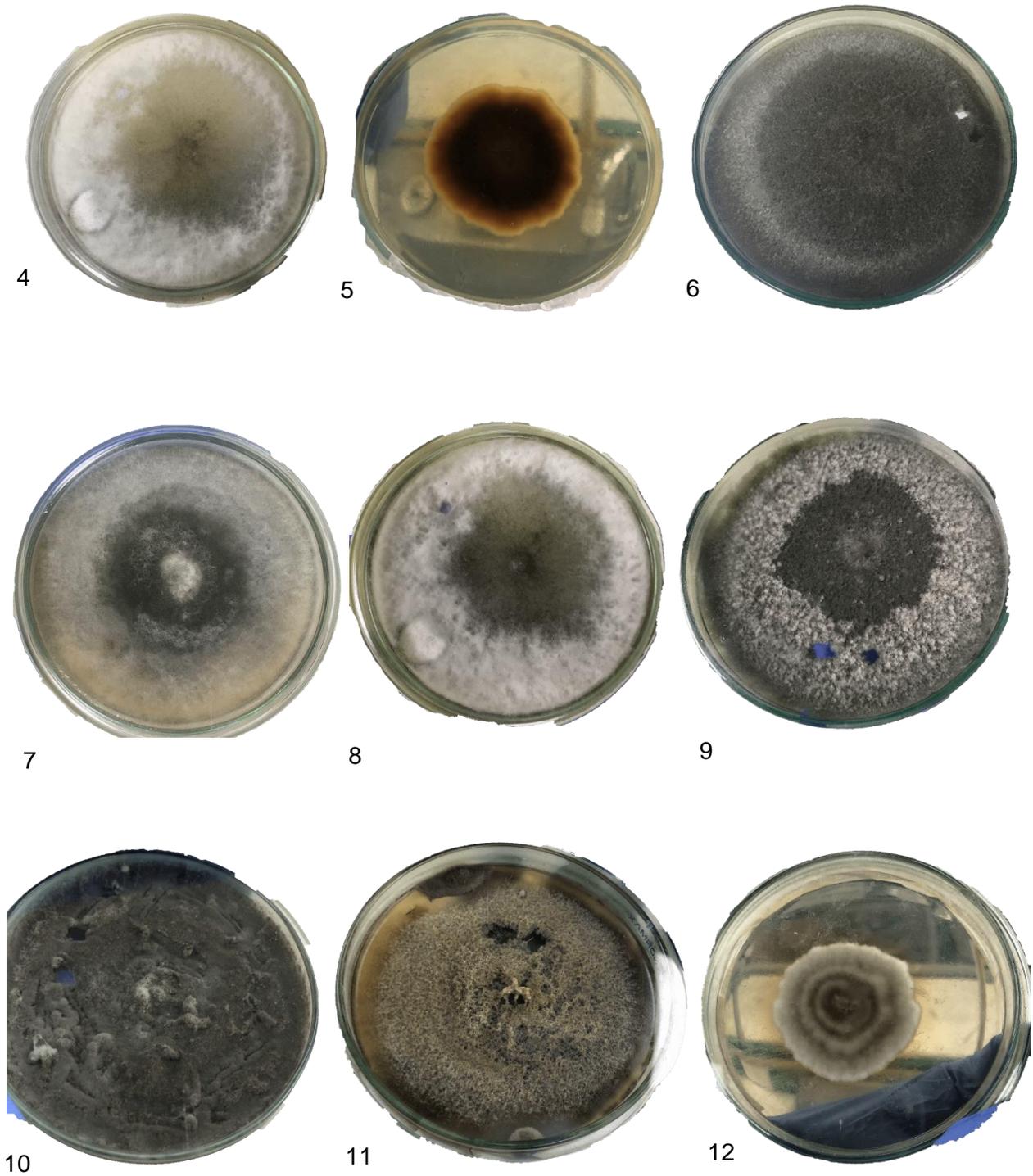


Figura 7. Ejemplos de las diferencias morfológicas en micelios generados por los medios de cultivo Axénicos (Puros) de hongos endófitos en agar PDA (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12), aislados de las hojas de la especie de frailejón *Espeletia hartwegiana*.

## 5. Extracción de ADN

Una vez el micelio de los hongos se encontraba desarrollado en la cantidad necesaria se procedió a extraer el ADN genómico siguiendo el protocolo de extracción de Raeder y Broda (1985), por medio de un barrido superficial del micelio evitando tomar el agar, este micelio posteriormente se colocó en tubos Eppendorf estériles de 2 ml y se pulverizó mediante el uso de un asa microbiológica y 1ml de buffer de extracción compuesto de Tris-HCL 1 M, pH 7.8, EDTA 0.5 M, Ph 8, SDS 10% w/v, NaCL y agua destilada, para cada tubo, a continuación se agregó 800 ul de etanol al 70%, 500 ul de fenol y se mezcló.

Se adicionó 300 ul de cloroformo y se mezcló de nuevo, de allí se llevó a la centrifuga a 10.000 rpm por 60 minutos, luego de centrifugar se forma un sobrenadante el cual es transferido en su totalidad a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml en el cual se agregaron 400 ul de cloroformo y se llevó a la centrifuga a 10.000 rpm por 10 minutos, en donde nuevamente se forma un sobrenadante, aunque, esta vez solo se toman 500 ul del tubo para ser transferidos otro tubo Eppendorf de 1.5 ml, ya en el nuevo tubo se adicionaron 50 ul de NaAC y se invirtió varias veces para homogenizar la mezcla, a continuación se guardó en el refrigerador a 4°C toda la noche.

Al día siguiente se tomaron las muestras en los tubos Eppendorf y se centrifugaron a 10.000 rpm por 30 minutos (Formación del Pellet de ADN), cuando la centrifuga terminó se procedió a remover el etanol, ya sin etanol se agregó de nuevo 1 ml de etanol al 70% a cada tubo y se centrifugó a 10.000 rpm por 5 minutos, en este paso se removió el etanol y se dejó secar el pellet de ADN, una vez el etanol se evaporó, se re suspendió el pellet en 100 ul de agua grado molecular o Sabax con 5 ul de RNAsa con el fin de evitar la presencia de moléculas de ARN, posteriormente se incubaron a 37°C por 30 minutos y se guardaron para su envío a -20°C (Raeder y Broda 1985).

## **6. Bioinformática-Metagenómica Fúngica**

Una vez se secuenciaron las muestras de ADN enviadas a la Universidad Ruhr de Bochum, Alemania, se hizo el ensamblaje de las secuencias en contigs y scaffolds, en el programa CLC Main Workbench 8 (Nicola *et al*, 2013). Como lo muestra la figura 8, donde se muestran los pasos esenciales de una técnica de Metagenómica, donde posteriormente se analizaron con más detalle mediante técnicas filogenéticas.

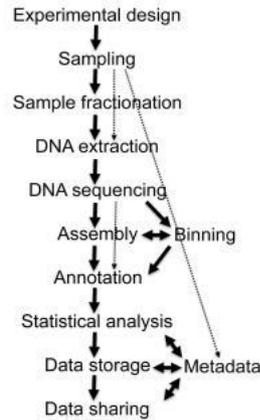


Figura 8. Pasos esenciales de un proyecto metagenómico. Fuente; Thomas y colaboradores, (2012).

## 7. Secuenciamiento

Se extrajo con éxito un total de 35 muestras de hongos endófitos encontrados en las hojas de *Espeletia hartwegiana* (véase figura 9) que posteriormente fueron secuenciadas por la Universidad Ruhr de Bochum (Alemania), logrando un total de 70 secuencias incluyendo aquellas obtenidas en Genk Bank.

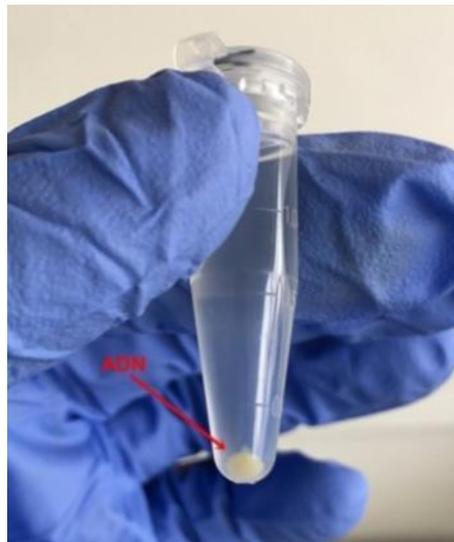


Figura 9. ADN extraído de cultivos puros de hongos endófitos, aislados de hojas de la especie de frailejón *Espeletia hartwegiana*.

## 8. Análisis Filogenético

Se aislaron 35 secuencias basadas en la especie *Espeletia hartwegiana*, fueron comparadas posteriormente con 35 secuencias de especies publicados en GenBank (<http://blast.ncbi.nih.gov/blast.cgi>), se obtuvo un total de 70 secuencias. Las secuencias de consenso ITS 5.8S DNA obtenidas se usaron para realizar búsquedas BLAST en GenBank usando BLASTn (Altschul *et al*, 1990), con el fin de identificar mediante las secuencias aisladas los géneros o las especies más cercanas. La matriz de datos fue alineada en MAFFT v.7 (Kato y Standley, 2013). Se utilizaron las especies *Coprinellus xanthothrix* y *Coprinellus domesticus* como grupos externos.

Los análisis de las secuencias para construir los árboles filogenéticos de Máxima Parsimonia (MP) fueron realizados usando PAUP v.4.0b10 (Swofford 2003). Para el análisis de Máxima Verosimilitud o ML por sus siglas en inglés (Maximum Likelihood), se utilizó JmodelTest (Darriba *et al*, 2012), con el cual se infirieron los criterios del modelo de sustitución apropiado utilizando los criterios de información de Akaike (AIC) (Akaike 1974).

Los análisis de ML se realizaron con el programa PhyML v. 3.0 (Guindon y Gascuel 2003), teniendo en cuenta la proporción de sitios invariables. Los valores de soporte de confianza para los nodos se estimaron mediante 1000 análisis de arranque de replicación. La alineación de los datos de las secuencias de ITS para 70 aislamientos determinó quince géneros, siendo los siguientes; *Annulohypoxylon*, *Biscogniauxia*, *Colletotrichum*, *Crassiparies*, *Cryptocoryneum*, *Cyphellophora*, *Diaporthe*, *Daldinia*, *Humícola*, *Hypoxylon*, *Hypocrea*, *Nemania*, *Nigrospora*, *Massarina* y *Trichoderma*, de los cuales se obtuvieron 11 clados principales (véase figura 10). Con base en estos resultados, todos los aislamientos se analizaron más a fondo dentro de los géneros, hasta llegar a especie (véase tabla 1).

Géneros	Especie	Especie	Especie	Especie	Especie	Especie	Especie
<b>Annulohyphoxylon</b>	<i>A. nitens</i>	<i>A. bahnphadengense</i>					
<b>Biscogniauxia</b>	<i>B. petrensis</i>						
<b>Colletotrichum</b>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. gigasporum</i>					
<b>Cyphellophora</b>	<i>C. reptans</i>						
<b>Crassiparies</b>	<i>C. quadrisporus</i>						
<b>Cryptocoryneum</b>	<i>C. longicondensatum</i>						
<b>Daldinia</b>	<i>D. dennisii</i>	<i>D. eschscholtzi</i>	<i>D. concentrica</i>				
<b>Diaporthe</b>	<i>D. longicolla</i>	<i>D. foeniculina</i>	<i>D. anacardi</i>	<i>D. macadamiae</i>			
<b>Humícola</b>	<i>H. fuscoatra</i>						
<b>Hypoxyton</b>	<i>H. trugodes</i>	<i>H. pulicicidum</i>					
<b>Hypocrea</b>	<i>H. koningii</i>						
<b>Massarina</b>	<i>M. albocarnis</i>						
<b>Nemania</b>	<i>N. primolutea</i>						
<b>Nigrospora</b>	<i>N. sacchari</i>	<i>N. rubi</i>	<i>N. sphaerica</i>	<i>N. hainanensis</i>	<i>N. oryzae</i>	<i>N. gorlenkoana</i>	<i>N. aurantiaca</i>
<b>Trichoderma</b>	<i>T. trixiae</i>	<i>T. olivascens</i>	<i>T. paraviridescens</i>	<i>T. viridescens</i>	<i>T. samuelsii</i>	<i>T. viride</i>	
<b>Grupo Externo</b>	<i>Coprinellus</i>	<i>C. domesticus</i>	<i>C. xanthothrix</i>				

Tabla 1. Géneros y especies encontrados en los aislamientos e identificaciones de hongos endófitos en la especie *Espeletia hartwegiana*.

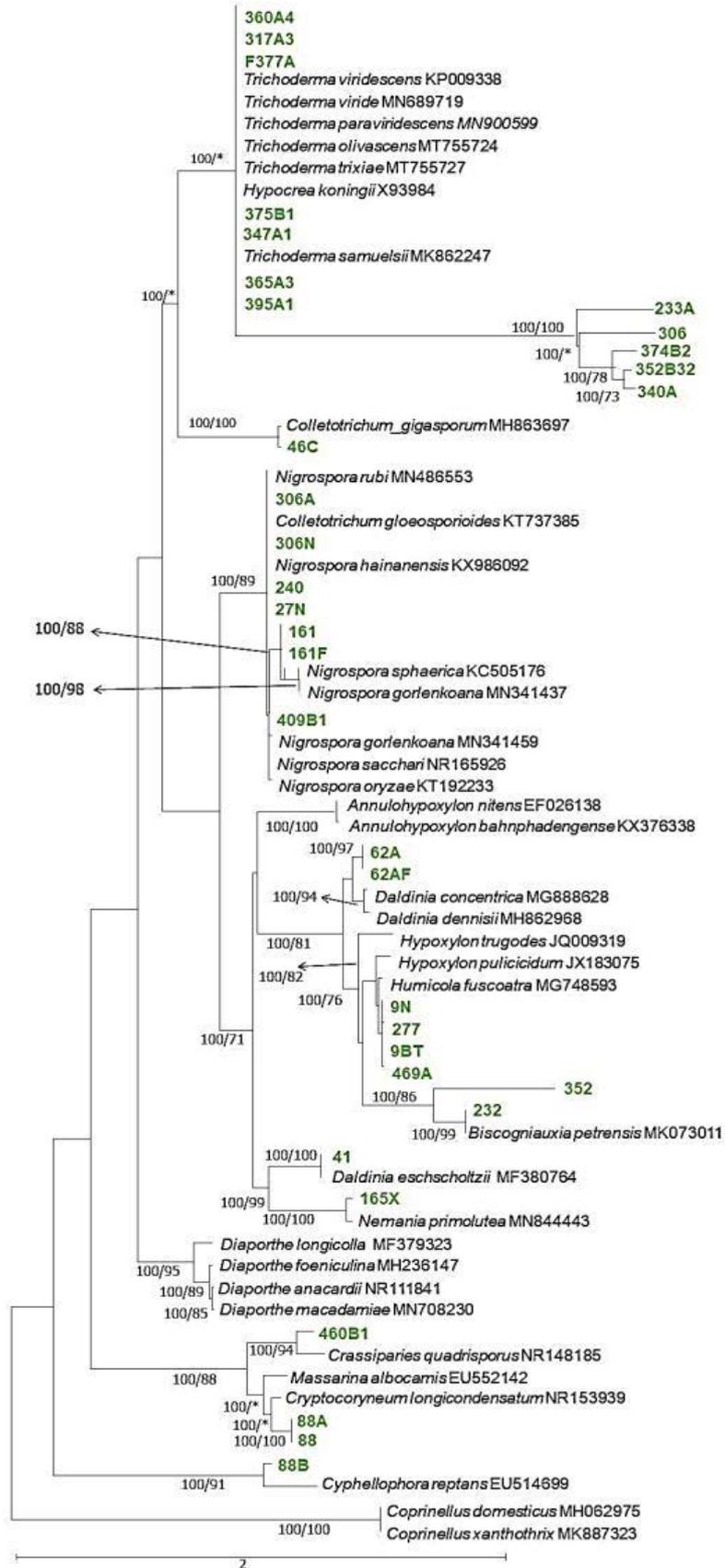


Figura 10. Filograma consenso obtenido con el programa MEGA –X a partir del análisis ML y MP del conjunto de datos ITS, Aislados de las hojas de frailejón. Los códigos en **Verde** son las secuencias que se aislaron (aislados) en este estudio, los códigos y nombres en **Negro**, son las secuencias encontradas por identidad en GenBank. Los valores de soporte de bootstrap > 70% se indican cerca de los nodos como MP / ML. \* = valores de soporte de bootstrap <70%.

El número de caracteres, los modelos de sustitución usada, así como otros resultados estadísticos de las pruebas de Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud generados a partir de los análisis filogenéticos de los conjuntos de datos se muestran en los anexos.

## Capítulo Tercero

### Discusión sobre los hongos endófitos encontrados y sus implicaciones ecológicas

#### 1. Cambio Climático y Biodiversidad de Endófitos

Tanto la temperatura, la estacionalidad y los tipos de precipitación son factores de vital importancia para la composición de las diferentes comunidades y la arquitectura vegetal. Estos factores limitan muchos de los procesos ecosistémicos, ya que existe una estrecha relación entre las variaciones climáticas y las variaciones dentro de los ecosistemas. Por lo tanto, se espera que el cambio climático transforme los ecosistemas Andinos tal como los conocemos hoy (Colwell *et al*, 2008), modificando las relaciones mutualistas entre plantas y hospederos.

Posiblemente la resiliencia y resistencia de muchos ecosistemas como el páramo sean superadas en este siglo por una combinación sin precedentes de disturbios tales como el cambio climático, perturbaciones asociadas a este (sequías, fuegos, invasión de especies exóticas, inundaciones) y otros factores como organismos oportunistas (hongos endófitos), cambios en el uso del suelo, contaminación y sobreexplotación de recursos (IPCC 2020).

Considerando que el frailejón *Espeletia hartwegiana* es una especie de alta montaña (páramos) endémica de la cordillera Central de los Andes (Schultz y Carl 1856), se encuentra dentro de los ecosistemas andinos en donde a su vez se ha comprobado la existencia de los hongos endófitos, es de tener en cuenta el papel de estos organismos endófitos ya que, los páramos son ecosistemas particularmente sensibles a los efectos adversos del cambio climático, en especial al calentamiento global al estar ubicados en los trópicos, generando así ventanas de

oportunidades para que los hongos endófitos alteren su estado mutualista y pasen a ser patogénicos (Colwell *et al*, 2008, 7).

No obstante, existe consenso en que las temperaturas aumentarán, específicamente a grandes alturas, y que la precipitación posiblemente se incrementará en algunas zonas, disminuirá en otras y se producirá en patrones estacionales alterados, con mayor intensidad y frecuencia (Marengo *et al*, 2009).

Los frailejones se ven en constante estrés por el uso del suelo dado en los páramos, como es el caso del páramo Romerales, un páramo que se ha visto afectado por las quemadas y la ganadería (Molinillo y Monasterio 2001). Esto aumenta así las condiciones de estrés intrínsecas a las que están expuestas estas plantas de páramo, las cuales suministran valiosos bienes y servicios ecosistémicos como el abastecimiento continuo de agua para usos domésticos, agrícolas e industriales (Buytaert *et al*, 2006, 4), servicios que se podrían ver en decrecimiento si las ventanas de oportunidades se abren con más frecuencia dando pie al cambio de estado de los hongos endófitos que existen dentro de los frailejones de la zona.

En los páramos de Chingaza, Rabanal, Guerrero, Iguaque Merchán y Sumapaz, se han realizado estudios de aislamientos de hongos en especies de frailejón diferentes a la especie de frailejón *Espeletia hartwegiana*, tales como; *Espeletia argentea*, *Espeletia arbelaezii*, *Espeletia boyacensis*, *Espeletia grandiflora*, *Espeletia miradorensis*, y *Espeletia uribei* por ende, se ha reportado la presencia de hongos endófitos y fitopatógenos (Tabla 2). (Gaitan, 2018, 17).

<i>Frailejones</i>	<i>Espeletia argentea</i>	<i>Espeletia arbelaezii</i>	<i>Espeletia boyacensis</i>	<i>Espeletia grandiflora</i>	<i>Espeletia miradorensis</i>	<i>Espeletia uribei</i>
<i>Aspergillus</i>	X		X		X	X
<i>Annulohyphoxylon</i>		X		X	X	
<i>Curvularia</i>	X		X			X
<i>Epicoccum</i>			X	X	X	
<i>Fusarium</i>	X	X				X

<i>Nigrospora</i>	X	X	X	X	X	
<i>Penicillium</i>	X		X		X	
<i>Pleospora</i>	X	X		X		X
<i>Trichoderma</i>	X		X	X		X

Tabla 2. Géneros de hongos encontrados en otras especies de frailejón. X = a presencia del genero de hongo dentro de la especie de frailejón.

Los géneros de hongos en **rojo**, son los géneros que se encontraron en común con los géneros hallados en la especie de frailejón *Espeletia hartwegiana*, de un total de 15 géneros, 3 han sido reportados anteriormente en estudios similares ( 20% de géneros identificados).

Dentro de un marco de cambio climático es importante la metodología de muestreo, como lo fue el formato de muestreo en puntos aleatorios realizado en el presente estudio, se llevó acabo principalmente por la homogeneidad de los frailejones en el páramo, como lo indica el manual de métodos básicos de muestreo y análisis de ecología vegetal (BOLFOR 2000, 9), donde se menciona que el muestreo aleatorio se utiliza cuando se dispone de poca información previa de las características de las poblaciones a medirse, en este caso la población a identificarse fueron los hongos endófitos, que se hallaban dentro de las formaciones homogéneas de los frailejones.

No obstante el muestreo aleatorio también presenta limitaciones a la hora de comparar los hongos endófitos a lo largo del gradiente altitudinal (muestreo aleatorio estratificado), dejando de percibir información proveniente de los distintos microclimas que se encuentran y de las incidencias que podrían causar a la hora de identificar los géneros y especies de hongos endófitos dentro de la especie de frailejón, además de posibles micro efectos del cambio climático a lo largo del gradiente altitudinal (Cámara *et al*, 2008).

## 2. Identificación y Filogenia de Hongos Endófitos en el Marco del Cambio Climático

Las técnicas empleadas en este estudio para lograr aislar e identificar los hongos endófitos dentro de la especie de frailejón *Espeletia hartwegiana* se hacen importantes dentro del cambio climático debido a que el margen de error en la identificación molecular es reducido (Bakermans *et al*, 2014). Al ser reducido el margen de error, se pudo conocer con mayor certeza que especies y géneros de hongos endófitos se encuentra dentro de la planta.

Al conocer sus identidades es posible conocer las capacidades que tienen cada una de estas especies de hongos endófitos de producir metabolitos secundarios, de infiltrarse y proteger los tejidos de la planta de condiciones bióticas y abióticas, competir contra herbívoros y fitopatógenos (Schulz *et al*, 2002). Con sus capacidades reconocidas es posible vincular los efectos del cambio climático, como estrés hídrico, aumento de la temperatura, migraciones tempranas, enfermedades emergentes, aumentos de la precipitación y heladas severas con las reacciones por parte de los hongos endófitos. Estas reacciones podrían desencadenar aumentos de la patogenicidad en las poblaciones de frailejones, debido a los constantes disturbios y estrés al que se ve sometido la planta, generando así notables declives poblacionales (Mendoza, 2010).

Las relaciones filogenéticas entre las especies halladas toman relevancia debido a las sinergias positivas o negativas que se pueden presentar dependiendo de las especies que se encuentren asociadas dentro de la planta (Lamichhane y Venturi 2015), como por ejemplo, *Nigrospora* y *Colletotrichum* pueden activar una sinergia negativa aumentando la virulencia y afectando la especie *Espeletia hartwegiana*

Las especies de hongos endófitos se identificaron por medio de secuencias obtenidas de las regiones ITS (región de espaciadores internos transcritos), las cuales son regiones altamente conservadas con tasas de evolución muy lentas en el tiempo, permitiendo hacer inferencias filogenéticas (Baldwin *et al*, 1995; Hamby y Zimmer 1992), es por ello que se usaron para generar las diferentes identificaciones de los hongos endófitos, logrando así identificar al género *Nigrospora* con un total de 7 especies; *N. sacchari*, *N. rubi*, *N. sphaerica*, *N. hainanensis*, *N. gorlenkoana*, *N. oryzae* y *N. aurantiaca* pertenecientes a la familia Apiosporaceae, orden Xylariales, División Ascomycota (véase figura 11), (Wang *et al*, 2017).

Dentro del marco del cambio climático, *Nigrospora* se caracteriza por poseer una distribución cosmopolita y una amplia gama de huéspedes, como lo es en este caso la especie *E. hartwegiana*, que habita en los Andes Tropicales que se verán alterados por los efectos del cambio climático, este género se ha logrado aislar en su forma endófito en tallos y hojas de

diversas plantas, también como saprofitos en detritos, hojarasca y larvas muertas (Uzor *et al*, 2015, 1).

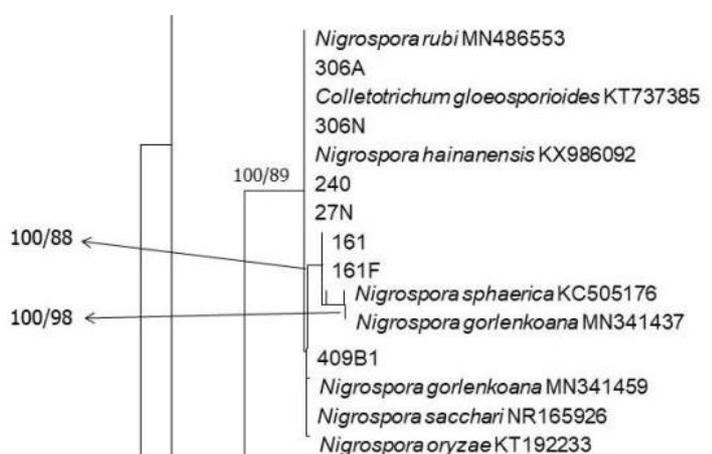


Figura 11. Cladograma de las relaciones filogenéticas del género *Nigrospora* y *Collectotrichum*.

Los hongos endófitos hallados en esta investigación se encontraron dentro de la especie de frailejón *E. hartwegiana*, la cual pertenece a los Andes Tropicales ubicados más específicamente en los páramos. Estos ecosistemas son sensibles a los efectos del cambio climático, por su altura, su alto endemismo, y su sensibilidad al efecto de borde. Cuando las especies leñosas empiecen a migrar a lo largo del gradiente altitudinal, es posible que los frailejones se encuentren con suelos agrestes en donde sus semillas no podrán fijarse y los efectos adversos de hongos como *Nigrospora*, *N. oryzae* y *N. sphaerica* serán más notables aprovechando las ventanas de oportunidad que generen los desbalances climáticos (Sharma *et al*, 2013).

Los cambios en los patrones climáticos potenciarán la especie *N. sphaerica* dentro del frailejón, la cual tiene la capacidad de causar tizón foliar en la especie *Camellia sinensis* siendo una planta de té perteneciente a la división de las magnolifiotas como el género *Espeletia* (Liu *et al*, 2015). *Nigrospora* fue el género más ampliamente aislado en las identificaciones generadas a partir de las hojas de frailejón, esto se vería explicado debido a que *N. sphaerica* tiene un mecanismo de descarga de esporas efectivo, que puede proyectar a la fuerza sus esporas a una distancia de hasta 2 cm en vertical y 6,8 cm en horizontal, como lo demostró Webster (1952), además el estudio de Wu y colaboradores (2004) también evidenció que las esporas de

*Nigrospora* son uno de los grupos más dominantes en la atmósfera, y están asociadas con tormentas de polvo.

La gran capacidad colonizadora del género *Nigrospora* le permite adaptarse a las condiciones climáticas cambiantes, con la estrategia de dispersión de sus esporas logrando distanciarse del frailejón hospedero para encontrar nuevos hospederos producto de las migraciones tempranas a lo largo del gradiente altitudinal (Riveros, 2010).

Este cladograma se encuentra soportado por valores estadísticos de Máxima Verosimilitud por encima del 80%, lo que indica que entre más verosímil (más cercano a 100) existen menos mutaciones en los nodos internos del árbol, basados en la distribución de probabilidad asignadas a los posibles arboles resultantes, dando lugar a una hipótesis evolutiva más confiable (Schmidt y Haeseler, 2009) y con una parsimonia del 100%, es decir, el cladograma obtenido es el árbol más corto (menos cambios) y el cual se ajusta mejor a los datos (Swofford 1997).

Teniendo así una inferencia filogenéticamente robusta, los géneros *Collectotrichum* y *Nigrospora* pertenecen a la División Ascomycota, ambos géneros son particularmente agresivos con las plantas, en especial la especie *Collectotrichum gloeosporioides*, la cual es la fase asexual de *Glomerella cingulata* (Raj *et al*, 2013). Se caracteriza por tener un amplio rango de hospederos entre ellos el frailejón a los cuales les causa una enfermedad conocida pudrición amarga, antracnosis o chancros, siendo esta la necrosis de frutos, flores nervios y tallos (González *et al*, 2006, 4).

Uno de los primeros reportes de afectaciones a especies de frailejón se obtuvo en el 2009; en el Parque Natural Nacional Chingaza, Colombia, en donde encontraron las especies de frailejón *Espeletia grandiflora* y *Espeletia uribei* afectadas debido a insectos y una especie de hongo del genero *Collectotrichum* (Medina 2009- 9; Hartung y Burton, 1981).

Por ende, que estos dos géneros de hongos se encuentren juntos podría tener implicaciones en el aumento de virulencia potenciado a su vez por los desbalances abióticos causados por el cambio climático como lo han mencionado Belisario y colaboradores (2002), es posible que las afectaciones no sean producidas por un único hongo, si no por un complejo de varios, generando sinergismos entre diferentes especies que solas no harían daño a la planta pero juntas podrían ser causantes de enfermedad (Lamichhane y Venturi 2015, 4), aun mas en un

marco de cambio climático que gradualmente aumenta sus efectos nocivos sobre los páramos, aumentando la temperatura, cambios en la precipitación, heladas intensas, cambios en la nubosidad, mayor exposición a la radiación solar, teniendo por resultado un índice de estrés mayor en las plantas de páramo, generando ventanas de oportunidades para que los hongos endófitos modifiquen sus roles de protector a patógeno.

En frailejones también se ha reportado la presencia de *Nigrospora* y *Trichoderma* por Bonilla y Argenis (2005), más específicamente en la especie *Espeletia grandiflora* la cual es una especie que habita en los páramos de Colombia, Ecuador y Venezuela, en conjunto con *Espeletia hartwegiana* (Luteyn 1999, 3). El hecho que existan estos dos géneros presentes en los frailejones advierte de un equilibrio entre hongos endófitos que se puede romper bajo las tensiones del cambiante clima, más aun en los sensibles páramos alto andinos.

En cuanto a *N. sacchari*, se tiene reporte que es un productor de metabolitos con una notable actividad herbicida, demostrado en plantas cultivadas en invernadero (Fukushima *et al*, 1998, 2), debido a que existe evidencia que sugiere que los hongos endófitos han evolucionado directamente de hongos patógenos (Schulz *et al*, 1999, 4) sumado al estrés del cambio climático, en cualquier momento de extrema tensión hídrica, calórica, o heladas en estos ecosistemas de alta montaña. Estos anomalías ambientales podría disparar mecanismos de acción fitopatógenos dentro de los frailejones generando un declive notable en sus poblaciones, y por ende, un declive de la cantidad recurso hídrico aguas abajo y su regulación (Díaz *et al*, 2002, 5).

Como se mencionó anteriormente los medios de propagación de estos hongos endófitos pueden ser por medio de esporas que están en el ambiente, aunque también los vectores que juegan un rol clave en su dispersión son los insectos, ya que estos pueden transportar esporas o partes del hongo en su cuerpo, patas o aparato bucal (Eigenbrode *et al*, 2018, 5).

Considerando la dispersión homogénea de los frailejones dentro del páramo, la carga esporas en el ambiente y la herbivoría de insectos es probable que se puedan ver infectados la mayoría de individuos (Varela 2016), es por ello que en el futuro puede que las afectaciones en frailejones no sean producidas por hongos fitopatógenos, si no por hongos endófitos que tuvieron la ventana de oportunidad gracias al cambio climático, aumento de la temperatura, aumento en las concentraciones de CO<sub>2</sub> y alteraciones de precipitación que pueden hacer susceptible la planta al ataque de estos hongos (Chakraborty 2011; Elad y Pertot 2014).

Para que se genere la enfermedad, esta depende de la interacción de tres o cuatro factores: 1) hospedero susceptible, 2) agente causal (virulento), 3) condiciones ambientales favorables y 4) tiempo (Francl 2001, 2), la falta de alguno de ellos no permite que el patógeno produzca la enfermedad en la planta; debido a ello algunas especies de frailejón pueden tener una o dos cepas que puedan actuar como fitopatógenos, pero no están activas si no está completa su asociación con otro patógeno u otro factor.

Además, existe un estudio que evaluó el efecto de la temperatura sobre la capacidad de *Fusarium verticillioides* para generar infección en plantas de maíz, se probaron bajo 3 escenarios de temperatura, como resultados obtuvieron que la enfermedad de este hongo se veía potenciada por el aumento de temperatura en temperaturas por encima de 35°C (Murillo *et al*, 2008), este estudio da soporte a la hipótesis de que existen factores que influyen significativamente a la infección en la planta, tal vez el páramo difícilmente alcance 35°C, no obstante, la mayoría de especies son sensibles a cambios de temperatura de hasta de 1°C, en donde modifican su comportamiento, rutas metabólicas, interacciones ecológicas y por ende, sus defensas se ven alteradas.

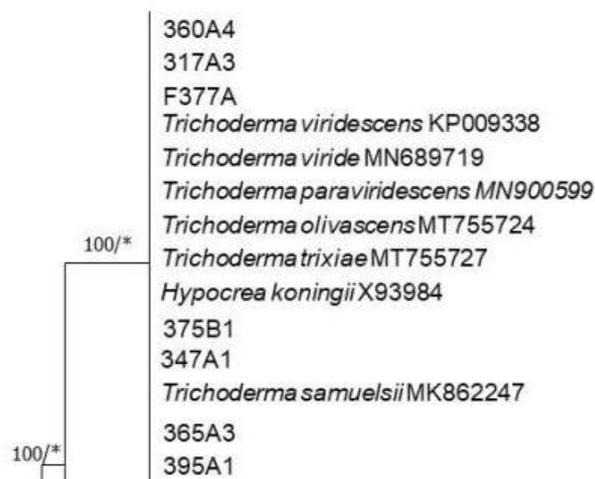


Figura 12. Cladograma de las relaciones filogenéticas del género *Trichoderma* e *Hypocrea*.

El género *Trichoderma* con seis especies diferentes (véase figura 12), fue el segundo género más numeroso después de *Nigrospora* que contó con siete especies, aunque las primeras especies que se analizaron fueron especies que principalmente actuaban generando enfermedades en las plantas en las que se encontraban ante disturbios, el género *Trichoderma* pertenece a la

familia Hypocreaceae y se caracteriza por tener una gran capacidad biocontroladora sobre fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*, los cuales podrían llegar masivamente con las migraciones tempranas de insectos y plantas leñosas (Miles *et al*, 2012, 7).

No solo actúan repeliendo patógenos internos si no también patógenos externos como insectos que desean consumir u aprovechar la planta, ya que estos pueden secretar diferentes metabolitos secundarios y enzimas que actúan inhibiendo su desarrollo (Boughalleb-M *et al*, 2018, 8).

Es bien conocido que el género *Trichoderma*, produce amplio rango de sustancias antibióticas, además de poseer la característica de parasitar otros hongos (Howell 2002, 6). Debido a la competencia que generan las especies del genero *Trichoderma* por espacio y nutrientes, inhiben o degradan pectinasas y otras enzimas que son esenciales para que los hongos fitopatógenos, como *Botrytis cinerea*, penetre en la superficie de las hojas, logrando proteger de esta forma al frailejón, que se verá expuesto a nuevas amenazas microbiológicas auspiciadas por los cambios en los patrones climático (Zimand *et al*, 1996).

Además de la capacidad del *Trichoderma* sp, para atacar o inhibir el crecimiento de patógenos de plantas directamente, descubrimientos recientes indican que también pueden inducir resistencia sistémica y localizada a una variedad de patógenos de plantas tales como, el frijol es protegido por *Trichoderma harzianum* de especies fitopatógenas como *Colletotrichum lindemuthianum*, *Botrytis cinérea*, las cuales producen lesiones en las hojas de la planta (Harman y Howell, 2004). Incluso se descubrió que ciertas especies de *Trichoderma* tienen una influencia sustancial en el buen crecimiento y desarrollo de las plantas sin y con condiciones de estrés climático (Lorito 1998).

Como lo demostraron Bonilla y Argenis (2005), en su estudio llevado a cabo en el frailejón *Espeletia grandiflora*, diferentes cepas pertenecientes a *Trichoderma* pueden proteger esta especie de páramo de organismos fitopatógenos emergentes por el cambio climático, por ende, si puede proteger a *E. grandiflora*, también puede proteger la especie *E. hartwegiana*, lo que le permitirá sobrellevar diferentes ataques fortuitos de patógenos e insectos que nunca han logrado alcanzar las altitudes de páramo (3200 - 5000 m).

Cuando el cambio climático aumente la temperatura en 1°C o 2°C, traerá consigo sus efectos de modificación en cuanto a la estructura y composición de las especies de plantas que

existen en zonas altas, para este escenario basado en los cálculos de Thuiller (2007), las especies se habrían desplazado en el gradiente altitudinal aproximadamente 450 metros para el año 2070.

Las consecuencias de este desplazamiento serían únicas, debido a que gran cantidad de insectos y patógenos tendrían migraciones tempranas en el gradiente altitudinal en búsqueda de su óptimo térmico, llevando a cabo un proceso conocido como Termofilización (Cuesta *et al*, 2019), es ahí donde entra en juego la protección que le pueden brindar especies endófitas como las que pertenecen al género *Trichoderma* en el marco de cambio climático.

En concordancia con las cepas de *Trichoderma* y el género *Hypocrea* que también pertenece a la familia Hypocreaceae, se conocen más de 700 secuencias de peptaiboles (péptidos biológicamente activos) de ambos géneros; donde algunos de éstos son ecológica y comercialmente relevantes debido a su potencial antimicrobiano, actividad enzimática útil para competir por espacio y alimento de los nuevos patógenos emergentes procedentes de las alteraciones climáticas y las migraciones tempranas (Degenkolb *et al*, 2008, 6).

En cuanto al género *Hypocrea* también se ha reportado actividad antimicrobiana y antifúngica contra *Staphylococcus aureus* y *Fusarium oxysporum* (Gogoi *et al*, 2008, 2), habitando los géneros *Trichoderma* e *Hypocrea* dentro de especies de frailejón como *E. hartwegiana*, se espera que puedan generar sinergias de protección que las ayude a combatir los fuertes y extremos eventos climáticos.

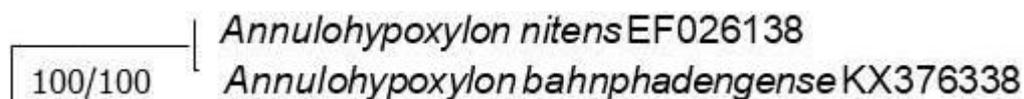


Figura 13. Cladograma de las relaciones filogenéticas del género *Annulohypoxyton*.

Este cladograma se encuentra soportado por valores estadísticos de Máxima Verosimilitud del 100% (véase figura 13), lo que indica que entre más verosímil (más cercano a 100) existen menos mutaciones en los nodos internos del árbol, por ende, este árbol contiene la menor cantidad de mutaciones o cambios dentro sus nodos internos, teniendo como resultado una hipótesis evolutiva confiable (Schmidt y Haeseler 2009) y con una parsimonia del 100%, que indica que el cladograma obtenido es el árbol más corto (menos cambios) y el cual se ajusta mejor a los datos (Swofford 1997).

El género *Annulohyphoxylon* es de importancia dentro del marco del cambio climático, ya que pertenece a la familia *Xylariaceae* y se caracteriza por poseer metabolitos secundarios antitumorales-citotóxicos como la anuloescumulina, que ayudan a combatir el estrés abiótico (Cheng *et al*, 2012), estas cepas de hongos son principalmente saprofitos y oportunistas, han sido reportadas en hojas sanas y afectadas de frailejones en otros estudios (González 2012; Nonsoque 2012), siendo un género resiliente a las perturbaciones ambientales como los cambios en los patrones climáticos, su relación como mutualista dentro del frailejón se mantendrá, hasta que el frailejón se adapte o colapse ante el estrés abiótico.

Aunque no se conocen como fitopatógenos, al contrario pueden actuar como mutualistas, no se descarta que puedan estar involucrados en el desarrollo de diferentes enfermedades en plantas cuando las condiciones ecosistemicas se alteran a puntos extremos (Gonzalez *et al*, 2017).

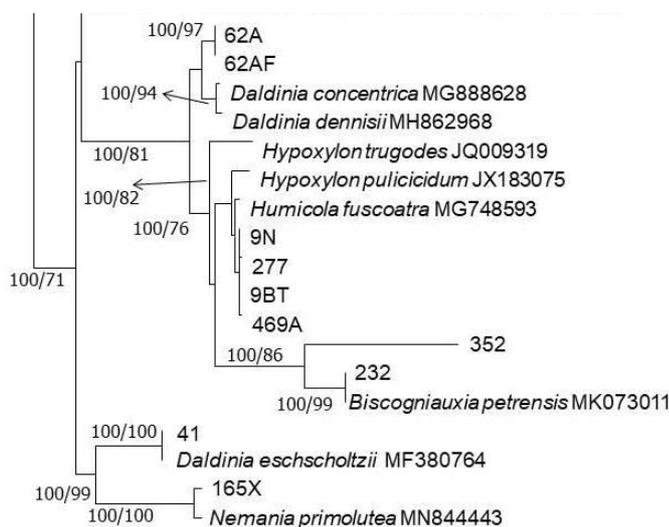


Figura 14. Cladograma de las relaciones filogenéticas del género *Daldinia*, *Hypoxylon*, *Biscogniauxia*, *Nemanía* y *Humícola*.

El género *Daldinia* posee unos valores de MP/ML correspondientes a 100/94, con lo cual se encuentra bien soportado estadísticamente, el género *Daldinia* se encuentra ubicado en la familia *Xylariaceae* al igual que el género *Hypoxylon*, *Biscogniauxia* y *Nemanía* que en su respectivo orden contienen un soporte estadístico MP/ML de 100/82, 100/99 y 100/100 (véase figura 14), los cuales pertenecen a la división *Ascomycota*, las cepas de *Daldinia* se caracterizan principalmente por ser especies endófitas, teniendo la capacidad de estar dentro de su huésped mucho tiempo sin causarle daño o al menos un daño evidente por medio de su estado asexual.

No obstante su estado se puede modificar cuando las condiciones externas se modifican abruptamente en poco tiempo, como es el caso de las alteraciones en la temperatura, precipitación, y concentraciones de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) auspiciados por el cambio climático (Sánchez *et al*, 2013).

Un estudio realizado por Prieto (2017) en la especie de frailejón *E. grandiflora* encontró que la especie *Daldinia eschscholtzii* estaba asociado en el síntoma de clorosis (falta de clorofila en las hojas). También se reportó que especies de *Daldinia* como *Daldinia concéntrica* tienen la capacidad de controlar nematodos fitopatógenos (Silva *et al*, 2020, 104) los cuales pueden invadir y romper los tejidos de la planta dañando sus estructuras, los nematodos también serán sujetos a migraciones tempranas por el cambio climático que trae consigo presiones de selección, por ende, nuevas amenazas para los frailejones (Nakashima *et al*, 2007).

Como hemos visto hasta este punto, las especies de hongos endófitos se muestran en muchos casos como benefactores y protectores de las diferentes plantas en las que habitan, incluyendo diferentes especies de frailejones.

Los hongos endófitos protegen tanto de factores bióticos como virus, hongos fitopatógenos, bacterias, insectos y factores abióticos como las intemperancias del clima, no obstante, en su relación endófitas géneros como *Hypoxylon* que pertenece igual que *Daldinia* a la familia Xylariaceae, pueden tener roles amenazadores en conjunto con el cambio climático, según Gonzales y colaboradores (2019), inocularon cepas pertenecientes al género *Hypoxylon* en hojas de *Theobroma cacao* y encontraron que en 48 horas se comenzó a notar las marcas de clorosis y deshidratación foliar, esto demuestra que cepas de este género pueden tener efectos fitopatógenos, ocasionando muerte descendente, pudrición del tronco negro y resinosidad de ramas de mezquite (De la Torre-Almaráz *et al*, 2003; De la Torre-Almaráz *et al*, 2009).

La presencia de este género dentro del frailejón en un marco del cambio climático lo convierte en una amenaza latente, ya que las condiciones serán cada vez más agrestes en los páramos de los Andes Tropicales. Puede favorecer el desarrollo de este género que tiene las enzimas necesarias para producir la pudrición del tronco negro, entre otras enfermedades relevantes.

También las especies del género *Hypoxylon* se han reportado como endófitos en tejidos de plantas leñosas o herbáceas (Petrini y Petrini, 1985, 3), así como saprofitos o fitopatógenos débiles en madera de árboles de zonas templadas o tropicales (Miller, 1961), como lo menciona Miller (1961).

Los géneros *Biscogniauxia*, *Nemania* también están dentro de la familia Xylariaceae y División Ascomycota, un aspecto interesante de las especies de *Biscogniauxia* es que son parásitos exclusivos de las angiospermas dicotiledóneas en donde concluyeron que todas las especies pertenecientes a este género son patógenos "leves", que se aprovechan de situaciones de sequía y estrés hídrico para aumentar su patogenicidad (Ju *et al*, 1998).

La especie de frailejón *E. hartwegiana* es una Dicotiledónea, eso explica porque podemos encontrar esta especie de hongo endófito en el frailejón del presente estudio, siendo de vital importancia denotar que las especies de *Biscogniauxia* se aprovechan especialmente de las situación de sequía y estrés hídrico, difícilmente las especies de este género podrían afectar a los frailejones debido a que se caracterizan por ser reguladores de los ciclos hídricos, el agua es el recurso que más tiende a existir en un páramo por la estructura de sus suelos compuesta por andosoles porosos y necromasa acumulada, teniendo así un alto índice de retención hídrica (Hernandez y Muñoz, 2015), de modo que, el cambio climático no favorece al género *Biscogniauxia* en su estado patogénico dentro del ecosistema de páramo.

En cuanto al género *Nemania*, Da Silva y colaboradores (2018) llevaron a cabo una investigación en la cual identificaron cepas pertenecientes a los géneros *Colletotrichum*, *Phyllosticta*, *Xylaria*, *Nemania* y *Alternaria*, en la especie ornamental *Pachystachys lutea*, en donde las mismas cepas fueron ensayadas para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos como *Colletotrichum* sp, en donde encontraron que *Nemania* era capaz de inhibir por medio de la secreción de distintas enzimas el crecimiento de dichas especies, gracias a su actividad enzimática el género *Nemania* puede compensar los desequilibrios causados por el cambio climático en términos de hongos fitopatógenos.

Hay que tener en cuenta que los elementos que dan forma a las interacciones planta-endófito incluyen el modo de transmisión, el patrón de infección, la edad de la planta, las condiciones ambientales potenciadas por el cambio climático y los antecedentes genéticos (Aly *et al*, 2011, 6). Los frailejones de la especie *E. hartwegiana* que se muestrearon para el estudio, se

tomó las hojas sanas, lo que indica que poseían estas cepas de endófitos en equilibrio, siendo este uno de los pocos reportes de este género en especies de alta montaña, en los Andes Tropicales.

El género *Humícola* se encuentra soportado por un MP/ML de 100/76, siendo una hipótesis evolutiva considerable, es el único de la figura 14 que no está dentro de la familia Xylariaceae, ya que pertenece a la familia Chaetomiaceae, aunque se halla en la división Ascomycota, se podría considerar a la especie *Humícola fuscoatra* como una de las especies de endófitos más “inofensivas”, debido a trabajos de investigación reportados como el de Menzies y colaboradores (1998) y el de Naik y colaboradores (2009).

*Humícola fuscoatra* no se considera un peligro latente para la especie *E. hartwegiana*, ya que existe en equilibrio con su entorno. Está comprobado por medio de caracterizaciones químicas que *Humícola fuscoatra* es un importante productor de moléculas de estimación medica como el resorcíclico y lactonas ácidas (Mejia *et al*, 2014), Por lo tanto, es una especie prometedora con un reservorio de metabolitos secundarios de importancia medicinal e industrial, que de seguir los efectos nocivos del cambio climático en los Andes Tropicales más específicamente en los páramos, esta especie podría desaparecer.

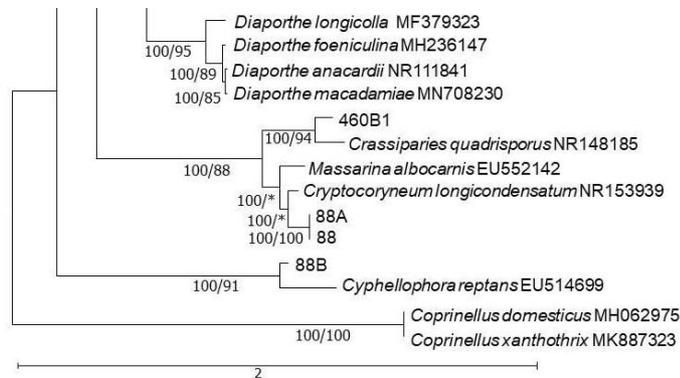


Figura 15. Cladogramas de las relaciones filogenéticas del genero *Diaporthe*, *Crassiparies*, *Massarina*, *Cryptocoryneum*, *Cyphellophora* y los grupos externos.

Uno de los grupos mejores soportados en este cladograma es el grupo de *Diaporthe*, en el cual se encontraron cuatro especies siendo uno con más abundancia de especies del estudio y que posee un MP/ML de 100/85, 100/89 y 100/95 acorde a sus 3 nodos (véase figura 15), teniendo así una hipótesis evolutiva confiable de estas relaciones, las especies de *Diaporthe* pertenecen a la familia Diaporthaceae, de la división Ascomycota y son especies de endófitos que se distinguen por inhibir el crecimiento de hongos patógenos en el hospedero que se encuentren. El estudio de

Da Silva y colaboradores (2018), mostró que cepas de *Diaporthe* sp. Inhibieron el crecimiento de *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum* sp, hongos fitopatógenos que aumentarían su presencia aprovechando las alteraciones producidas por el cambio climático en los páramos.

Las especies de este género están en continuo cambio entre endófitos y patógenos funcionando en la mayoría de los casos en una relación mutualista en donde le brindan a la planta mayor tolerancia a las sequías, protección de patógenos y plagas, característica útil frente a los retos ecológicos que plantea el cambio climático en los Andes Tropicales (Hubbard *et al*, 2014), se conocen cerca de 800 especies de este género asociadas a una amplia gama de plantas vasculares a nivel mundial (Rossman *et al*, 2015).

Esto explica porque las especies de *Diaporthe* fueron una de las más numerosas encontradas en la especie de alta montaña *E. hartwegiana*, teniendo en cuenta que esta especie pasa rápidamente de un estado endófito a un estado patogénico y dada su fácil y alta distribución, representa un peligro en conjunto con el cambio climático para las especies de alta montaña como los frailejones y supone una amenaza para el balance hídrico y ecosistémico en el futuro.

El género *Crassiparies* de la familia Neohendersoniaceae y el género *Massarina* de la familia Massarinaceae, pertenecen al orden Pleosporales, aunque se discute debido a las similitudes morfológicas y genómicas con *Massarina* si *Crassiparies* debería estar en la familia Massarinaceae (Hyde *et al*, 2013, 4). Se tiene poca información sobre la especie *Crassiparies quadrisporus*, por ende, este puede ser uno de los primeros reportes de esta especie en una especie de alta montaña como lo es el frailejón, específicamente en la especie *E. hartwegiana*, en un marco de cambio climático el género *Crassiparies* necesita mayores estudios a nivel ecológico y microbiológico para entender su papel dentro de esta crisis climática.

Mientras tanto el género *Massarina* ha logrado ser aislado de agua dulce con el fin de obtener fuentes de productos naturales biológicamente activos, por medio de las investigaciones químicas de Shearer (1999, 2001) en una especie de *Massarina* obtuvieron como resultado el aislamiento de tres nuevos sesquiterpenoides y dos lactonas derivadas de policétidos con nuevos sistemas de anillos, lo que indica que esta especie también puede tener un rol importante mediante la producción de enzimas y metabolitos secundarios en el marco de las invasiones biológicas impulsadas por el cambio climático.

El género *Cryptocoryneum* de la familia Cryptocoryneaceae, existe poca información de sus mecanismos de acción como endófito o patógeno, más aun en especies de los Andes Tropicales, este podría ser uno de los primeros reportes sobre esta especie de hongo en una especie de frailejón, específicamente *E. hartwegiana*, en el 2015 se reportó en Brasil el descubrimiento de una nueva especie del genero *Cryptocoryneum*, tratándose de *Cryptocoryneum parvulum* hallada en las hojas de la especie *Araucaria angustifolia* (Gimnosperma) (Silva *et al*, 2015, 1), la información sobre el género *Cryptocoryneum* en relación al cambio climático y sus efectos dentro de especies de alta montaña como el frailejón aún son poco conocidas.

Uno de los géneros más cercanos a los grupos externos del cladograma es *Cyphellophora*, perteneciente a la familia Cyphellophoraceae, el cual posee un MP/ML de 100/91, logrando una hipótesis evolutiva confiable. Diversas especies de *Cyphellophora* han logrado ser aisladas de infecciones superficiales de la piel o las uñas en humanos, y de materiales vegetales (Decock *et al*, 2003; Cheewangkoon *et al*, 2009). Esto indica su amplia distribución y su capacidad para ser patogénica tanto en plantas como en animales, más aun en condiciones desfavorables para la planta como son las condiciones de cambio climático.

De la especie *Cyphellophora reptans*, se tiene reporte que su morfología es muy similar a la de una levadura, por lo que es fácilmente confundida con una (Réblová *et al*, 2013). Es posible que este sea el único reporte de *Cyphellophora reptans* en las hojas de un frailejón o especie de alta montaña que habite en los trópicos como *E. hartwegiana*, debido a ello, sus mecanismos de acción en especies de paramo dentro de un marco de cambio climático es poco conocido. Se necesitan mayores estudios enfocados en esta especie para entender su ecología y dinamismo ecológico respecto a los cambios en las variables ambientales.

Se eligieron las especies *Coprinellus domesticus* y *Coprinellus xanthothrix* como grupos externos con el fin de enraizar el árbol, debido a que pertenecen a la División Basidiomycota, la cual difiere en grado de la división Ascomycota, aunque conserva semejanzas conocidos como caracteres ancestrales o plesiomorficos que avanzan a medida la filogenia se construye con los datos de las diferentes secuencias de especies evidenciando novedades evolutivas conocidas como apomorfias, que cuando se dan en un grupo en particular pasan a ser sinapomorfias es decir novedades evolutivas dentro de un grupo particular (Lehtonen 2020). Se optó por enraizar con

estas dos especies con el objetivo de dar robustez al árbol filogenético (Barriel y 1998), lo cual se consiguió como se nota en los estadísticos del árbol filogenético.



## Conclusiones

Se rechaza la hipótesis nula ( $H^0$ ) y se concluye que la identificación y caracterización molecular de los hongos endófitos encontrados en la especie de frailejón *Espeletia hartwegiana*, ubicada en el páramo romerales, Quindío, Colombia, es diferente en 80% de sus géneros y especies de otras identificaciones de hongos endófitos realizadas en especies de frailejón.

Por lo tanto los nuevos géneros y especies de hongos endófitos encontrados en el frailejón plantean nuevos desafíos respecto al cambio climático, ya que tienen un rol vital en la supervivencia de estas especies de alta montaña como los frailejones debido a su relación mutualista o patógena, más aun en los páramos que son altamente sensibles a los efectos del cambio climático, incluso tan sensibles como las zonas polares (Bradley et al, 2006).

La mayoría de especies encontradas en el presente estudio tienen potencial para ayudar a combatir el estrés abiótico producido por el cambio climático en los Andes Tropicales. Específicamente, pueden ayudar a combatir el estrés biótico producido por virus, hongos, bacterias e insectos en un marco de cambio climático, aumentos de temperatura, cambios en la concentración de  $CO_2$ , cambios en la precipitación, migraciones tempranas, cambios en la nubosidad, disponibilidad hídrica, alteraciones en la estructura y composición de las especies endémicas del páramo.



## Obras citadas

- Anderson, E.P., Marengo, J.A., Villalba, R., Halloy, S.R., Young, B., Cordero, D., Gast, F., Jaimes, E., y Ruiz, D. 2012. Consecuencias del cambio climático en los ecosistemas y servicios ecosistémicos de los Andes Tropicales. *Cambio climático y Biodiversidad en los Andes Tropicales*.
- Akaike H, 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19: 716–723.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ, 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403–410.
- Aly AH, Debbab A, Proksch P. 2011. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Appl Microbiol Biotechnol* 90(6):1829–1845. 12 de noviembre. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3270-y>.
- Barriel, V. and Tassy, P. 1998, Rooting with Multiple Outgroups: Consensus Versus Parsimony. *Cladistics*, 14: 193-200. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.1998.tb00332.x>
- Baldwin B.G., Sanderson M.J., Poner JM, Wojciechowski M.F., Campbell C.S. y Donoghue M.J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82, 247-277.
- Bakermans C, Skidmore ML, Douglas S, McKay CP. 2014. Molecular characterization of bacteria from permafrost of the Taylor Valley, Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology* 89: 331–346.
- Belisario A, Maccaroni M, Corazza L, Balmas V, Valier A. 2002. Occurrence and Etiology of Brown Apical Necrosis on Persian Walnut Fruit. *Plant Disease*. 86(6):599-602. 12 de noviembre. [10.1094/pdis.2002.86.6.599](https://doi.org/10.1094/pdis.2002.86.6.599).
- Berdugo-Lattke, M. L., González, F., Rangel-Ch, J. O., & Gómez, F. 2016. P-type based dimensionality reduction for open contours of Colombian Páramo plant species. *Ecological informatics*, 36, 1-7.
- Bonilla Gómez, MA. 2005. Estrategias adaptativas de plantas del páramo y del bosque altoandino en la cordillera oriental de Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología.

- Boughalleb-M'Hamdi N, Salem I, M'Hamdi M. 2018. Evaluation of the efficiency of *Trichoderma*, *Penicillium*, and *Aspergillus* species as biological control agents against four soil-borne fungi of melon and watermelon. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. ;28(1). 12 de noviembre. 10.1186/s41938-017-0010-3.
- BOLFOR; Mostacedo, Bonifacio; Fredericksen, Todd S. 2000. *Manual de Métodos Básicos de Muestreo y Análisis en Ecología Vegetal*. Santa Cruz, Bolivia.
- Buytaert, W., R. Célleri, B. De Bièvre, F. Cisneros, G. Wyseure, J. Deckers y R. Hofstede. 2006. Human impact on the hydrology of the Andean páramos. *Earth–Science Reviews* 79, 53–72.
- Blackwell, M. y J.W. Spatafora, 2004. “Fungi and their allies”. En *Biodiversity of Fungi, Inventory and Monitoring Methods*, editado por Mueller, G. M., Bills, G. F. & Foster, M.S, 7-2. Elsevier Academic Press.
- Bradley, R. S., M. Vuille, H. F. Díaz y W. Vergara. 2006. Threats to water supplies in the tropical Andes. *Science* 312:1755–1756.col
- Cabezas, L; Calderon, C; Medina, LM; Bahamon, I; Cardenas, M; Bernal, AJ; Gonzalez, A; Restrepo, S. 2012. Characterization of cellulases of fungal endophytes isolated from *Espeletia* spp. *Journal of Microbiology* 50 (6): 1009-1013.
- Cano Botero, G. D., Maya, L. C., Hernández, A. M., & Agudelo Quintana, D. 2015. Estudio Técnico Económico Social Ambiental (ET-ESA) del Complejo de Páramos Los Nevados en jurisdicción de la Corporación Autónoma Regional del Quindío (CRQ).
- Catalogo Virtual de Alta Montaña. 2020. Fotografía de la especie *Espeletia hartwegiana*. Universidad EIA. 17 de julio. <https://catalogofloraaltamontana.eia.edu.co/species/13>
- Colwell, R. K., G. Brehm, C. L. Cardelús, A. C. Gilman y J. T. Longino. 2008. Global warming, elevational range shifts, and lowland biotic attrition in the wet tropics. *Science* 322, 258–261.
- Compant S, Clément C & Sessitsch A. 2010. Colonization of plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: importance, mechanisms involved and future prospects. *Soil Biol Biochem* 42: 669–678.

- Cooke D, Drenth A, Duncan J M, Wagels G, Brasier, CM. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genet Biol.* 30, 17-32.
- Cortes, J., y Sarmiento, E. 2013. Visión socioecosistémica de los páramos y la alta montaña colombiana: memorias del proceso de definición de criterios para la delimitación del páramo. Bogotá: Instituto Humbolt. Ministerio de Medio Ambiente.
- Cuesta, F., Llambi, L., Huggel, C., Drenkhan, F., Cosling, W., Muriel, P., Tovar, C. 2019. New land in the Neotropics: a review of biotic community, ecosystem, and landscape transformations in the face of climate and glacier change.
- Cuesta Camacho, F. 2007. Efectos del cambio climático en el rango de distribución de especies en los Andes del Norte. La Paz: Curso GLORIA, Bolivia.
- Chakraborty S. Climate change and plant diseases. *Plant Pathology.* 2011. 60(1):1-1. 11 de noviembre. 10.1111/j.1365-3059.2010.02415.
- Cheewangkoon R, Groenewald JZ, Summerell BA, Hyde KD, To- Anun C, Crous PW. 2009. Myrtaceae, a cache of fungal biodiversity. *Persoonia* 23:55–85.
- Clay K. 1998. Fungal Endophytes of Grasses: A Defensive Mutualism Between Plants and Fungi. *Ecology.* 69:1016.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9 (8): 772.
- Da Silva Ribeiro, A., Polonio, J.C., Costa, A.T. 2018. Bioprospection of Culturable Endophytic Fungi Associated with the Ornamental Plant *Pachystachys lutea*. *Curr Microbiol* 75, 588–596. 15 de noviembre. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1421-9>.
- David S. Hibbett, Meredith Blackwell, Timothy Y. James, Joseph W. Spatafora, John W. Taylor et Rytas Vilgalys. 2018. «Phylogenetic taxon definitions for Fungi, Dikarya, Ascomycota and Basidiomycota». *IMA Fungus* 9 (5): 291-298. 14 de noviembre. 10.5598/imafungus.2018.09.02.05.
- De Bary A. 1866. *Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten.* Engelann, Leipzig, Alemania.
- Decock C, Delgado-Rodriguez G, Buchet S, Seng JM .2003. A new species and three new combinations in *Cyphellophora*, with a note on the taxonomic affinities of the genus, and

its relation to Kumbhamaya and Pseudomicrodochium. *Antonie Van Leeuwenhoek* 84:209–216

- Degenkolb, T., H. von Dohren, K.F. Nielsen, G.J. Samuels y H. Bruckner. 2008. Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Chemical Biodiversity* 5: 671-680.
- De La Torre, A. R.; Cota, T. F. M. and San, M. F. 2003. First report of *Hypoxyylon diatrypeoides* inducing Dieback and Black Trunk Rot on Mesquite (*Prosopis laevigata*) in Mexico. *Plant Dis.* 87(4):447-453.
- , A. R.; Cota, T. F. M.; García, R. J. L.; Campos, J. E. y San, M. F. 2009. Etiología de la muerte descendente del mezquite (*Prosopis laevigata* L.) en la reserva de la biosfera del Valle de Zapotitlán, México. *Agrociencia.* 43(2):197-208.
- Díaz MA, Navarrete JD, Suárez T. 2002. Páramos: Hidrosistemas Sensibles. *Revista de Ingeniería Universidad de Los Andes.* 1; (22): 66–73.
- Díaz, S., Lavorel, S., de Bello, F., Quétier, F., Grigulis, K. y Matthew Robson, T. 2007. Incorporating plant functional diversity effects in ecosystem service assessments. 14, 20684–20689.
- Eigenbrode S, Forest-Perez N, Davis T. 2018. Insect-Borne Plant Pathogens and Their Vectors: Ecology, Evolution, and Complex Interactions. 63 (1): 169-191. 15 de noviembre. 10.1146/annurev-ento-020117-043119.
- Elad Y, Pertot I. Climate Change Impacts on Plant Pathogens and Plant Diseases. 2014. *Journal of Crop Improvement.* 28(1):99-139. 11 de noviembre. 10.1080/15427528.2014.865412.
- Fadrique, Belen & Baez, Selene & Duque, Alvaro & Malizia, Agustina & Blundo, Cecilia & Carilla, Julieta & Osinaga, Oriana & Malizia, Lucio & Silman, Miles & Farfan-Rios, William & Malhi, Yadvinder & Young, Kenneth & Cuesta, Francisco & Homeier, Juergen & Peralvo, Manuel & Pinto, Esteban & Jadán, Oswaldo & Aguirre, Nikolay & Aguirre, Zhofre & Feeley, Kenneth. 2018. Widespread but heterogeneous responses of Andean forests to climate change. *Nature.* 564. 16 de noviembre. 10.1038/s41586-018-0715-9.
- Farias Chiquillo, A. d. 2013. Elementos para una propuesta de educación ambiental desde el enfoque crítico social, como alternativa para el acercamiento de población escolar urbana, al ecosistema de páramo.

- Font Quer, P. (comp.) 1953. Diccionario de Botánica. Labor, Barcelona.
- Fukushima T, Tanaka M, Gohbara M, et al. 1998. Phytotoxicity of three lactones from *Nigrospora sacchari*. *Phytochemistry* 48, 625–630.
- Francl L. 2001. The Disease Triangle: A Plant Pathological Paradigm Revisited. *The Plant Health Instructor*. 51(1):1-5. 12 de noviembre. 10.1094/phi-t-2001-0517-01.
- Foden, W. B., G. M. Mace, J.-C. Vie, A. Angulo, S. H. M. Butchart, L. DeVantier, H. T. Dublin, A. Gutsche, S. Stuart y E. Turak. 2009. Species susceptibility to climate change impacts. Pp. 77–88 en *Wildlife in a changing world an analysis of the 2008 IUCN Red List of threatened*.
- Gaitán Naranjo, P. 2018. Identificación de hongos asociados a lesiones de frailejones (*Espeletia* spp.) en paramos de Cundinamarca. Pontificia Universidad Javeriana; 17.
- García V.L., Rios Q. A& Molina L.J. 2010. Structure, Plant Composition And Leaf Litter Decomposition In Soil, At Two Sites Of An Andean Cloud Forest (Reforested And In Spontaneous Succession), In Peñas Blancas, Calarcá (Quindío), Colombia. *ActualidadesBiologicas*,32, (93), 147-164
- Gogoi, D.K., S. Mazumder, R. Saikia y T.C. Bora. 2008. Impact of submerged culture conditions on growth and bioactive metabolite produced by endophyte *Hypocrea* spp. NSF-08 isolated from *Dillenia indica* Linn. in North-East India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 79-87.
- González D. 2012. Estudio preliminar de la composición de hongos endófitos en *Espeletia argentea* en la cuenca de la quebrada Calostros (PNN Chingaza). Pontificia Universidad Javeriana; 26.
- González E, Sutton TB, Correll JC.2006. Clarification of the etiology of *Glomerella* leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular and pathogenicity tests. *Phytopathology* 96: 982–992.
- Gonzalez V, Martin J, Siles J, Gonzalez-Tejero M, Reyes F, Platas G. 2017. Biodiversity and chemotaxonomy of *Preussia* isolates from the Iberian Peninsula. *Mycological Progress*. ;16(7):713-728. 12 de noviembre. 10.1007/s11557-017-1305-1.
- Guindon S y Gascuel O .2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood". *Systematic Biology* 52, 696-704

- Cheng MJ, Wu MD, Yuan GF, Chen YL, SU YS, Hsieh MT, Chen ES. 2012. Metabolitos secundarios y actividades citotóxicas del hongo endofítico *Squam Annulohyphoxylon*. *Phytochem Lett.* 5 (1): 219-223.
- Hamby R.K. y Zimmer E.A. 1992. Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. En: Soltis P.S., Soltis D.E. and Doyle JJ Eds. *Molecular systematics of plants*. New York: Chapman & Hall, 50-91.
- Hernandez, M., & Muñoz, J. 2015. Influencia de las curvas de retención de humedad en la estimación de la evaporación de acuíferos someros. Departamento de Ingeniería Hidráulica y Ambiental. Escuela de Ingeniería Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Herrera T, Ulloa, M. 1990. El reino de los hongos, micología básica y aplicada. México D.F: Universidad Nacional Autónoma de México; p. 550.
- Hofstede, R. 2000. Aspectos técnicos ambientales de la forestación en los páramos. En *La forestación en los páramos Serie Páramo 6*, editado por G. Medina, C. Josse y P. Mena, 41-66. Quito.
- Howell, C. R. 2002. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 92, 177–180.
- Hubbard M, Germida J, Vujanovic V, 2014. Fungal endophytes enhance wheat heat and drought tolerance in terms of grain yield and second-generation seed viability. *Journal of applied microbiology* 116, 109-122.
- Hyde KD, Jones EBG, Liu JK, Ariyawansa H, Boehm E, Boonmee S, Braun U, Chomnunti P, Crous PW, Dai DQ, Diederich P, Dissanayake A, Doilom M, Doveri F, Hongsanan S, Jayawardena R, Lawrey JD, Li YM, Liu Y-X, Lücking R, Monkai J, Muggia L, Nelsen MP, Pang KL, Phookamsak R, Senanayake IC, Shearer CA, Suetrong S, Tanaka K, Thambugala KM, Wijayawardene NN, Wikee S, Wu HX, Zhang Y, Aguirre-Hudson B, Alias SA, Aptroot A, Bahkali AH, Bezerra JL, Bhat DJ, Camporesi E, Chukeatirote E, Gueidan C, Hawksworth DL, Hirayama K, De Hoog S, Kang JC, Knudsen K, Li WJ, Li XH, Liu ZY, Mapook A, McKenzie EHC, Miller AN, Mortimer PE, Phillips AJL, Raja HA, Scheuer C, Schumm F, Taylor JE, Tian Q, Tibpromma S, Wanasinghe DN, Wang Y, Xu JC, Yacharoen S, Yan JY, Zhang M .2013. Families of Dothideomycetes. *Fungal Divers* 63, 1–313.

- Ies, J.M.; James, T.Y.; Mcmunn, M. & I. Ibañez. 2013. Predicting species-specific responses of fungi to climatic variation using historical records. *Global Change Biology* 19: 3145-3154.
- Intergovernmental Panel on Climate Change. 2000. "Land use, Land-use Change and Forestry". Cambridge, U. K.: Cambridge University, Press. 12 de noviembre. [http://www.ipcc.ch/ipccreports/sres/land\\_use/index.php?idp=0](http://www.ipcc.ch/ipccreports/sres/land_use/index.php?idp=0).
- IPCC. 2020. Cambio Climático: Resumen para responsables de políticas, editado por: Valérie Masson-Delmotte, Hans-Otto Pörtner, Jim Skea, Panmao Zhai, Debra Roberts, Priyadarshi R. Shukla. Cambridge: Cambridge University Press.
- Jaramillo CA. Congreso Mundial de Páramos. Bogotá: Ministerio del Medio Ambiente; 2003.
- Jiménez, M., A. Chain y B. Locatelli. 2010. "Efectos del cambio climático en la distribución de zonas de vida en Centroamérica". *Comunicación Técnica en Recursos Naturales y Ambiente* 59, 32-40.
- Ju, Y.-M, Rogers, J.D., San Martin Gonzales, F. & Granmo, A. 1998. The genus *Biscogniauxia*. *Mycotaxon* 66: 1-98.
- Judd, W. S.; C. S. Campbell, E. A. Kellogg, P. F. Stevens, M. J. Donoghue. 2007. *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*, 3rd edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. ISBN 0-87893-407-3 ISBN 978-0-87893-407-2.
- Katoh K, Standley DM, 2013. MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780.
- Kivlin, SN; Emery, SM; Rudgers, JA. 2013. Fungal symbionts alter plant responses to global change. *American Journal of Botany* 100 (7): 1445-1457.
- Lamichhane J, Venturi V. 2015. Synergisms between microbial pathogens in plant disease complexes: a growing trend. *Frontiers in Plant Science*. 11 de noviembre. [10.3389/fpls.2015.00385](https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00385).
- Lehtonen, S. 2020. Phenotypic characters of static homology increase phylogenetic stability under direct optimization of otherwise dynamic homology characters. *Cladistics*. <https://doi.org/10.1111/cla.12438>.

- Leung, G; Robson, GD; Robinson, CH. 2011. Characterisation of cold-tolerant fungi from a decomposing High Arctic moss. *Soil Biology and Biochemistry* 43(9).
- Léveillé JH. 1846. *Considérations mycologiques suivis d'une nouvelle classification des champignons*. Paris.
- Liu YJ, Tang Q, Fang L. 2015. First report of *Nigrospora sphaerica* causing leaf blight on *Camellia sinensis* in China. *Plant Disease* 100, 221.
- Lopera, C; Avila, L; Rojas, A; Franco-Molano, AE; Cepero, MC; Restrepo, S. 2008. Fungal endophytes from the Colombian Andean Páramo ecosystem inhibit the growth of plant pathogens in vitro. *Phytopathology* 98 (6): 94.
- Lopez DC, Sword GA .2015. The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). *Biol Control* 89:53–60. 11 de noviembre. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.03.010>
- Lorito, M. 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95, 7860–7865.
- Marengo, J. A., R. Jones, L. Alves y M. Valverde. 2009. Future change of temperature and precipitation extremes in South America as derived from the PRECIS regional climate modeling system. *International Journal of Climatology* 29:2241–2255.
- Marie-Laure Desprez-Loustau, Benoit Marçais, Louis-Michel Nageleisen, Dominique Piou, Andrea Vannini. 2006. Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Annals of Forest Science*, Springer Verlag/EDP Sciences. 63 (6), pp.597-612.
- Mejia EJ, Loveridge ST, Stepan G, Tsai A, Jones GS, Barnes T, White KN, Dras̃kovic' M, Tenney K, Tsiang M, Geleziunas R, Cihlar T, Pagratis N, Tian Y, Yu H, Crews P (2014) Study of marine natural products including resorcylic acid lactones from *Humicola fuscoatra* that reactivate latent HIV-1 expression in an in vitro model of central memory CD4 T cells. *J Nat Prod* 77:618–624.
- Mendoza, S. 2010. Aspectos ecológicos de los patógenos asociados a *Espeletia grandiflora* en el Parque Nacional Natural Chingaza. Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, Colombia.

- Menzies, James & Ehret, David & Koch, Carol & Bogdanoff, Carl. 1998. *Humicola fuscoatra* infects tomato roots, but is not pathogenic. *European Journal of Plant Pathology* 104, 769-775. 15 de noviembre. 10.1023/A:1008680018677.
- Miller, J. H. 1961. A monograph of the world species of *Hypoxylon*. University of Georgia Press. USA. 158.
- Miles, LA; Lopera, C; González, S; de García, MCC; Franco, AE; Restrepo, S. 2012. Exploring the biocontrol potential of fungal endophytes from an Andean Colombian Páramo ecosystem. *BioControl* 57 (5): 697-710. 11 de noviembre. <https://doi.org/10.1007/s10526-012-9442-6>.
- MINAMBIENTE. 2019. Ecosistemas de Alta Montaña y Páramo. Obtenido de Ecosistemas de Alta Montaña y Páramo: <http://www.minambiente.gov.co/index.php/bosques-biodiversidad-y-servicios-ecosistematicos/ecosistemas-estrategicos/paramos>
- Mohali, S., Slippers, B. and Wingfield, M.J. 2007. Identification of Botryosphaeriaceae from Eucalyptus, Acacia and Pinus in Venezuela. *Fungal Diversity* 25: 103-125.
- Molinillo, m. Y m. Monasterio. 2001. Uso del espacio en sistemas pastorales andinos: una comparación mediante sistemas de información geográfica y evaluación multicriterio. IV Simposio Internacional de Desarrollo Sustentable en Los Andes.
- Morales-Rivas, M., Otero Garcia, J., Hammen, T. V. D., Torres Perdigón, A., Cadena Vargas, C. E., Pedraza Peñaloza, C. A., & Posada Gilede, E. 2019. Atlas de páramos de Colombia.
- Moreno, C. D., y Palma, J. D. 2016. Vulnerabilidad Ecológica Del Complejo De Páramos Chilí-Barragán A Los Incrementos De Temperatura En Un Escenario De Cambio Climático. Obtenido de Vulnerabilidad Ecológica Del Complejo De Páramos Chilí-Barragán A Los Incrementos De Temperatura En Un Escenario De Cambio Climático.
- Moreno, G.; Manjon, J.L. y J. Álvarez-Jimenez. 2013. Los hongos y el cambio climático. En: KAGAN-ZUR, V.; SITRIT, Y.; ROTH-BEJERANO; N.A, MORTE (eds.). Desert truffle. Springer Verlag, Berlín, 129-135.
- Murillo A, Munkvold G. 2008. Systemic Infection by *Fusarium verticillioides* in Maize Plants Grown Under Three Temperature Regimes. *Plant Disease*. 92(12):1695-1700. 15 de noviembre. 10.1094/phi-t-2001-0517-01.

- Naik BS, Shashikala J, Krishnamurthy Y. 2009. Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities in vitro. *Microbiol.*
- Nakashima, K., Tran, L.-S. P., Van Nguyen, D., Fujita, M., Maruyama, K., Todaka, D., Yamaguchi-Shinozaki, K. 2007. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *The Plant Journal*, 51(4), 617-630. 15 de noviembre. 10.1111/j.1365-3113.2007.03168.
- Nicola, Segata; Daniela Boernigen; Timothy L Tickle; Xochitl C Morgan; Wendy S Garrett; Curtis Huttenhower. 2013. "Computational meta'omics for microbial community studies". *Molecular Systems Biology* 9 (666): 666. 11 de noviembre . 10.1038/msb.2013.22.
- Nonsoque Y. 2012. Comparación de hongos endófitos en individuos sanos y enfermos de *Espeletia grandiflora* (microcuenca de la quebrada Calostros – Parque Nacional Natural Chingaza). Pontificia Universidad Javeriana. 26.
- Oh, H.; Shearer, C. A.; Gloer, J. B. J. 1999. *Nat. Prod.* 62, 497-501.
- Olave, L. F. C. 2011. Characterization of Cellulases and Antagonistic Activities in Fungal Endophytes Isolated from *Espeletia* Spp (Doctoral dissertation, Uniandes).
- Osorio JA, Crous CJ, de Beer ZW, Roux J. 2017. Endophytic Botryosphaeriaceae, including five new species, associated with mangrove trees in South Africa. *Fungal Biol.* 121, 361–393.
- Otero, J. T. y Bayman, P. 2009. Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epífitas. *Acta Agronómica* 58 (4): 270-276.
- Parsa S, García-Lemos AM, Castillo K, Ortiz V, López-Lavalle LAB, Braun J, Vega FE. 2016. "Fungal endophytes in germinated seeds of the common bean, *Phaseolus vulgaris*". *Fungal biology.* 120(5): 783-790.
- Pedraza-Peñalosa, P., Betancur, J., y Franco-Rosselli, P. 2005. Chisacá, un recorrido por los páramos andinos. Segunda edición. Instituto de ciencias Naturales e Instituto de Investigación de recursos Biológicos Alexander von Humbolt. Bogotá, Colombia.
- Petrini, L. E. and Petrini, O. 1985. Xylariaceous fungi as endophytes. *Sydowia.* 38: 216-234.

- Pontificia Universidad Javeriana, Universidad Jorge Tadeo Lozano, Universidad de la Amazonía, Parques Nacionales Naturales, Instituto Alexander von Humboldt, Sociedad Colombiana de Entomología. 2009. Programa Nacional para la Evaluación del Estado y Afectación de los Frailejones en los Páramos de Andes del Norte. Bogotá. Colombia 1-9.
- Prieto, M. 2017. Lesiones de frailejones (*Espeletia* sp.) y potenciales hongos fitopatógenos asociados, en los páramos de Chingaza y Cruz Verde. Pontificia Universidad Javeriana.
- Raeder, U. and Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1: 17-20. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479.x>.
- Raj, Mithun; Hegde, Vinayaka; Jeeva, M. L.; Senthil, M.; Nath, Vishnu S.; Vidyadharan, Pravi; Archana, P. V. 2013. "Molecular diagnosis of *Colletotrichum gloeosporioides* causing Anthracnose/Dieback disease in Greater Yam (*Dioscorea alata* L.)". *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 46 (8): 927–936. 15 de noviembre. 10.1080/03235408.2012.755336.
- . 2002. Colombia, diversidad biótica III. La región de vida paramuna. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Réblová M, Untereiner WA, Réblová K (2013) Novel Evolutionary Lineages Revealed in the Chaetothyriales (Fungi) Based on Multigene Phylogenetic Analyses and Comparison of ITS Secondary Structure. *PLOS ONE* 8(5): e63547. 15 de noviembre. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063547>.
- Rivera OD, Torres RD. 2001. Páramos de Colombia. Bogotá D.C: Banco de Occidente, 233.
- Riveros, A. 2010. Inducción de resistencia en plantas Interacción: Planta-Patógeno. Instituto interamericano de cooperación para la Agricultura (IICA). 155p.
- Rossmann AY, Adams GC, Cannon PF, Castlebury LA, Crous PW, Gryzenhout M, Jaklitsch WM, Mejia LC, Stoykov D, Udayanga D, 2015. Recommendations of generic names in Diaporthales competing for protection or use. *IMA Fungus* 6, 145-154.
- Ruiz-Pérez CA, Restrepo S, Zambrano MM. 2016. Microbial and functional diversity within the phyllosphere of *Espeletia* species in an Andean high-mountain ecosystem. *Appl Environ Microbiol* 82, 1807–1817. 12 de noviembre. 10.1128/AEM.02781-15.

- Ruiz, D., M. P. Arroyave, A. M. Molina, J. F. Barros, M. E. Gutiérrez y P. A. Zapata. 2009. Signals of climate variability/change in surface water supply of high-mountain watersheds – case study: Claro River high mountain basin, Los Nevados Natural Park, Andean Central Mountain Range, Colombia. World Bank Group, 207 pp.
- Salgado-Salazar C, Caridad Cepero. 2005. "Endophytic fungi in rose (*Rosa hybrida*) in Bogotá, Colombia". *Revista iberoamericana de micología*. 22, 99-101.
- Sánchez, R., Sánchez, B., Monserrat, Y., Ulloa, A., Armendáriz, B., García, M., Macías, M. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16 (2):132-146. 15 de noviembre. 10.1016/s1405-888x(13)72084-9
- Siegel, M.R., G.C.M. Latch y M.C. Johnson. 1987. Fungal endophytes of grasses. *Ann. Rev. Phytopath.* 25, 293-315.
- Silva-Valenzuela, M., R. I. Rojas-Martínez, R. H. Manzanilla-López, M. L. Macías-Ruvalcaba, S. ArandaOcampo, y E. Zavaleta-Mejía. 2020. Hongos endófitos: Una alternativa biológica para el manejo de nematodos fitoparásitos. *Nematropica* 50:101-117.
- Silva, S; Gusmão, LF; Castañeda, RF. 2015. *Cryptocoryneum parvulum*, a new species on *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine). *Mycotaxon*, Volume 130 (2), April-June 2015, pp. 465-469(5). 15 de noviembre. <https://doi.org/10.5248/130.465>.
- Schmidt HA. von Haeseler A. 2009. Phylogenetic inference using maximum likelihood methods. En: *The phylogenetic handbook: a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing*, Lemey P, Slemi M, Vandamme AM (eds.). Published by Cambridge University Press.
- Schultz, Carl. 1856. "*Espeletia hartwegiana*"; Hugh Algernon Weddell (ed.) *Chloris Andina* 1, 62.
- Schulz B, Römmert A, Dammann U, Aust H, Strack D. 1999. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism. *Mycological Research*; 103 (10):1275-1283. 15 de noviembre. 10.1017/s0953756299008540.
- Sharma P, Meena PD, Chauhan JS. 2013. First report of *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch causing stem blight on *Brassica juncea* in India. *Journal of Phytopathology* 161, 439–441.

- Swofford, D. L. 1997. Phylogenetic analysis using parsimony. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Swofford, D. L. 2003. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Terhonen E, Sipari N, Asiegbu FO. 2016. Inhibition of phytopathogens by fungal root endophytes of Norway spruce. Biol Control 99, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.04.006>
- Thomas, T.; Gilbert, J.; Meyer, F. 2012. «Metagenomics - a guide from sampling to data analysis». Microbial Informatics and Experimentation 2 (1): 3. 15 de noviembre. 10.1186/2042-5783-2-3.
- Thuiller, Wilfried. 2007. Biodiversity: climate change and the ecologist. Nature. 448. 550-552. 12 de noviembre. 10.1038/448550a.
- Uzor PF, Ebrahim W, Osadebe PO. 2015. Metabolites from *Combretum dolichopetalum* and its associated endophytic fungus *Nigrospora oryzae* –evidence for a metabolic partnership. Fitoterapia 105, 147–150.
- Varela, A. 2015. “Análisis de la relación hongos patógenos – afectación de frailejones en el Parque Nacional Natural Chingaza”, Informe final actividades proyecto, Bogotá, D.C., Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- . 2016. Aunar esfuerzos técnicos y científicos para desarrollar una investigación participativa sobre el efecto de la transformación antrópica del páramo en las interacciones planta- insecto-hongo en los *E. argentea* y *E. grandiflora*).
- Vásquez Cerón, A. Buitrago Castro, A. C. 2017. El gran libro de los páramos. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos. Alexander von Humboldt.
- Vega FE, Simpkins A, Aime CM, Posada F, Peterson SW, Rehner SA, Infante F, Castillo A, Arnold E. 2010. “Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai’i, Mexico and Puerto Rico”. Fungal Ecology. 3 (3): 122-138.

- Wang, M. y Liu, Fang y Crous, Pedro y Cai, Lei. 2017. Phylogenetic reassessment of *Nigrospora*: Ubiquitous endophytes, plant and human pathogens. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. 39. 11 de noviembre. 10.3767/persoonia.2017.39.06.
- Webster J. 1952. Spore projection in the hyphomycete *Nigrospora sphaerica*. *New Phytologist* 51, 229–235.
- Wood, S. N. 2001. "mgcv: GAMs and generalized ridge regression for R. *R news*". 1 (2): 20-25.
- Wu PC, Tsai JC, Li FC. 2004. Increased levels of ambient fungal spores in Taiwan are associated with dust events from China. *Atmospheric Environment* 38, 4879–4886.
- Yan L, Zhu J, Zhao X, Shi J, Jiang C, Shao D. 2019. Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. *Appl Microbiol Biotechnol*. 103 (8): 3327-3340. 12 de noviembre. 10.1007/s00253-019-09713-2.
- Zimand, G., Elad, Y. & Chet, I. 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology* 86, 1255–1260.
- Zhang, T; Yao, YF. 2015. Endophytic Fungal Communities Associated with Vascular Plants in the High Arctic Zone Are Highly Diverse and Host-Plant Specific. *Plos One*. 10 (6).

## Anexos

**Anexo 1: Tesista Cristhian Aristizabal junto al Frailejón *Espeletia hartwegiana*, Páramo Romerales, Quindío, Colombia.**



**Anexo 2: Tesista Cristhian Aristizabal Colectando Hojas del Frailejón *Espeletia hartwegiana*, Páramo Romerales, Quindío, Colombia.**



**Anexo 3: Coordenadas geográficas tomadas de cada punto de colecta de las hojas del frailejón *Espeletia hartwegiana*, ubicadas en el páramo de romerales, Quindío, Colombia.**

Coordenadas Geográficas (Latitud)	De la Colecta del Material Biológico total de 15 muestras. (Longitud)
LAT. N 4° 37' 58.71717"	LONG W 75° 25' 32.92611"
LAT. N 4° 37' 58.85220"	LONG W 75° 25' 32.71217"
LAT. N 4° 37' 58.84485"	LONG W 75° 25' 33.12103"
LAT. N 4° 36' 59.95487"	LONG W 75° 27' 30.45854"
LAT. N 4° 37' 61.95784"	LONG W 75° 30' 32.92611"
LAT. N 4° 40' 15.9171"	LONG W 75° 26' 38.0142"
LAT. N 4° 40' 36.3762"	LONG W 75° 26' 20.9072"
LAT. N 4° 40' 39.9832"	LONG W 75° 27' 17.3554"
LAT. N 4° 40' 38.3965"	LONG W 75° 27' 46.4325"
LAT. N 4° 39' 48.6438"	LONG W 75° 27' 17.3559"
LAT. N 4° 40' 5.6894"	LONG W 75° 26' 56.8287"
LAT. N 4° 40' 15.9174"	LONG W 75° 27' 19.0654"
LAT. N 4° 40' 12.5083"	LONG W 75° 26' 34.5912"
LAT. N 4° 40' 11.6691"	LONG W 75° 27' 20.8264"
LAT. N 4° 40' 31.4698"	LONG W 75° 27' 14.0791"

**Anexo 4: Hoja del Frailejón *Espeletia hartwegiana*.**



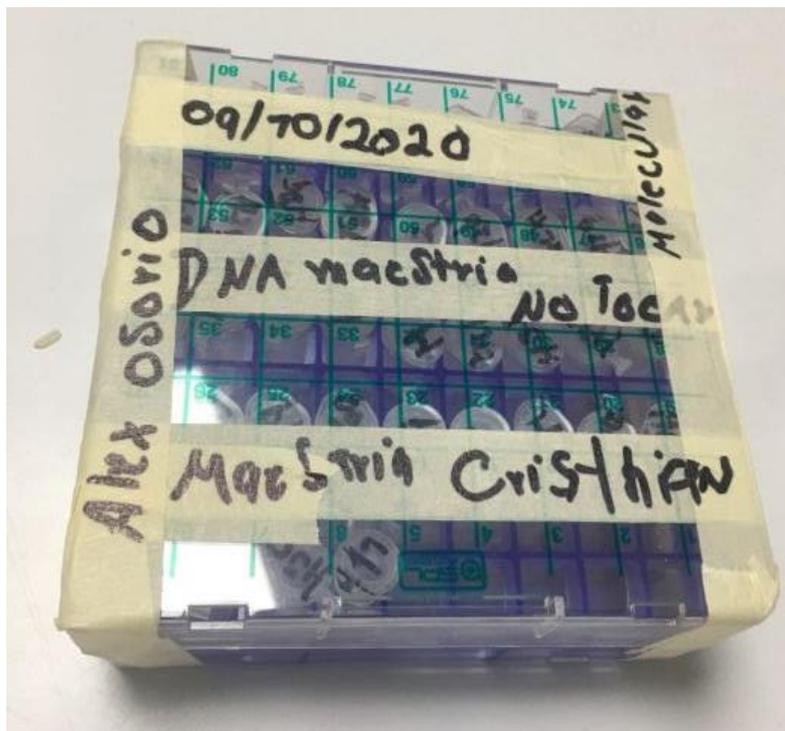
**Anexo 5: Hifas observadas a través de un estereoscopio, con el propósito de seleccionar la más indicada y luego sembrar un cultivo puro a partir de ese micelio.**



Anexo 6: Backups o copias de cultivos axénicos de los hongos endófitos encontrados, las copias se conservaron con glicerol a  $-80^{\circ}\text{C}$  en un ultra congelador de Thermo Scientific™.



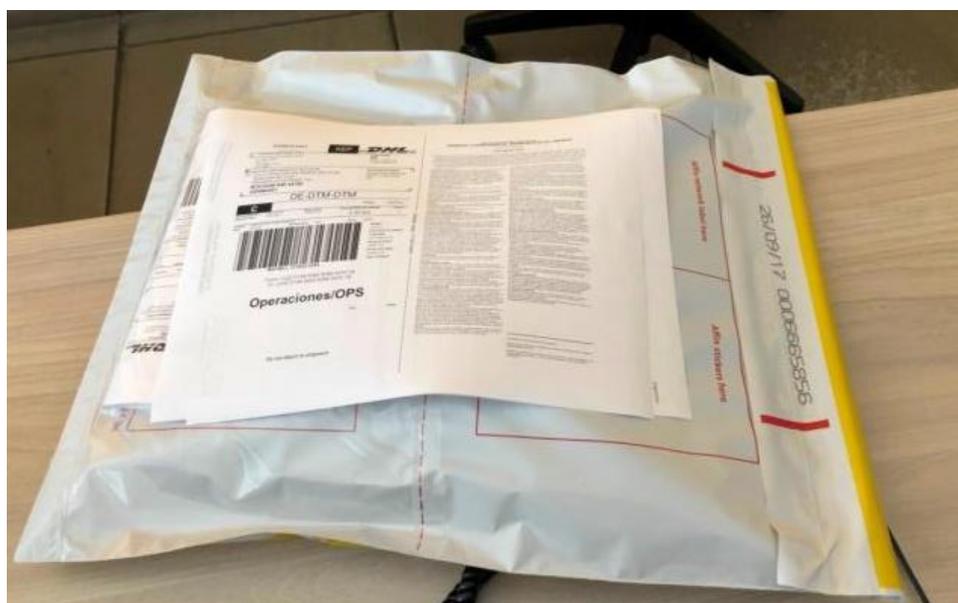
Anexo 7: Caja de laboratorio con las muestras de ADN extraídas, listas para ser empacadas y enviadas.



**Anexo 8: Campana de flujo laminar "BIOBASE" en donde se trabajó con los cultivos microbiológicos de forma segura y estéril, propiedad de la Universidad del Quindío.**



**Anexo 9: Muestras de ADN extraídos de los Hongos endófitos encontrados en las hojas de frailejón, enviadas a la Universidad Ruhr de Bochum (Alemania).**



### Anexo 10: Estadísticos resultantes del programa PAUP, producto del árbol de parsimonia.

Sum of min. possible lengths = 1433  
Sum of max. possible lengths = 9583

Tree # 1  
Length 2821  
CI 0.508  
RI 0.830  
RC 0.421  
HI 0.492

Anexo 11: Alineamiento de las secuencias ITS en el programa MEGA-X, en donde se observa en amarillo la secuencia "TCATTA" la cual es una secuencia altamente conservada que se usa para marcar el inicio de la misma en hongos endófitos.

35. MN689719_Trichoderma_viride_Aislado_347A1	TCATTA	CCGAGTTTACA	-----	ACTCCC	AAA	CCCAATG	
36. MK862247_Trichoderma_samuelsii_Aislado_F377A	TCATTA	CCGAGTTTACA	-----	ACTCCC	AAA	CCCAATG	
37. KP009338_Trichoderma_viridescens_Aislado_395A1	TCATTA	CCGAGTTTACA	-----	ACTCCC	AAA	CCCAATG	
38. MN900599_Trichoderma_paraviridescens_Aislado_317A3	TCATTA	CCGAGTTTACA	-----	ACTCCC	AAA	CCCAATG	
39. MT755724_Trichoderma_olivascens_Aislado_365A3	TCATTA	CCGAGTTTACA	-----	ACTCCC	AAA	CCCAATG	
40. MT755727_Trichoderma_trixiae_Aislado_375B1	TCATTA	CCGAGTTTACA	-----	ACTCCC	AAA	CCCAATG	
41. NR_153939_Cryptocoryneum_longicondensatum_Aislado_88	TCATTA	CTGAGGGGCTTC	-----	-----	GGCCCC	GATCA	
42. EF026138_Annulohyphoxylon_nitens_Aislado_469A	TCATTA	CTGAGTTTCTAACCA	-----	ACTTCC	-----	AACTTTG	
43. X93984_Hypocrea_koningii_Aislado_360A4	TCATTA	CCGAGTTTACA	-----	ACTCCC	AAA	CCCAATG	
44. NR_165926_Nigrospora_sacchari_Aislado_240.	TCATTA	CAGAGTTATCCA	-----	ACTCCC	AAA	CCCAATG	
45. EU552142_Massarina_albobocarnis_Aislado_88A	TCATTA	CTGTTGGGGCTCC	-----	-----	GGCCCC	GATCA	
46. JQ009319_Hyphoxylon_trugodes_Aislado_277	TCATTA	-----	ATTATACC	-----	CTGGGGTGC	TACCCGTG	
47. NR_148185_Crassiparies_quadrisporus_Aislado_460B1	TCATTA	CTGTGGGGCTTCTT	-----	-----	CGGAA	GCCCGCA	
48. MN486553_Nigrospora_rubi_Aislado_306NIGROSPORA	TCATTA	CAGAGTTATCCA	-----	ACTCCC	AAA	CCCAATG	
49. KC505176_Nigrospora_sphaerica_Aislado_161FUSARIUMNIGROSPOR	TCATTA	CAGAGTTATCCA	-----	ACTCCC	AAA	CCCAATG	
50. NR_111841_Diaporthe_anacardi_Aislado_352	TCATTA	CTGGAACGCGCCCC	TGGC	GC	ACCCAGAAA	CCCTTTG	
51. KX376338_Annulohyphoxylon_bahnphadengense_Aislado_233a	TCATTA	CTGAGTTTCTAACCA	-----	ACTTCC	-----	AACTTTG	
52. KX986092_Nigrospora_hainanensis_Aislado_306	TCATTA	CAGAGTTATCCA	-----	ACTCCC	AAA	CCCAATG	
53. MH236147_Diaporthe_foeniculina_Aislado_340A	TCATTA	GCTGGAACGCGCCCC	TGGC	GC	ACCCAGAAA	CCCTTTG	
54. MN708230_Diaporthe_macadamiae_Aislado_352B32	TCATTA	GCTGGAACGCGCCCC	TGGC	GC	ACCCAGAAA	CCCTTTG	
55. MF379323_Diaporthe_longicolla_Aislado_374B2	TCATTA	GCTGGAACGCGCCCC	AGGC	GC	ACCCAGAAA	CCCTTTG	
56. KT192233_Nigrospora_oryzae_Aislado_409B1	TCATTA	CAGAGTTATCCA	-----	ACTCCC	AAA	CCCAATG	
57. MF380764_Daldinia_eschscholtzii_Aislado_414A1	TCATTA	CTGAGTTATCTAA	-----	ACTTCC	-----	AACTATG	
58. MN844443_Nemania_primolutea_Aislado_165XYLARIAC	TCATTA	AAGAGTTTTTACA	-----	ACTCCC	AAA	CCCAATG	
59. MG748593_Humicola_fuscoatra_Aislado_9Nodulisporium	TCATTA	C-----	ATTACAT	-----	-----	TACATTA	
60. KT737385_Colletotrichum_gloeosporioides_Aislado_27NIGROSPORACF	TCATTA	CAGAGTTATCCA	-----	ACTCCC	AAA	CCCAATG	
61. MG888628_Daldinia_concentrica_Aislado_62Afordianadulisporium	TCATTA	-----	ATTACATT	-----	ACAT	-----	TACATTA
62. JX183075_Hyphoxylon_pulvicidum_Aislado_9BT	TCATTA	CTGTAGTA	GTTGTCTG	-----	CTAAG	AGTTATCCTA	
63. MH863697_Colletotrichum_gigasporum_Aislado_46	TCATTA	CTGAGTTACCG	-----	-----	CTCTA	TAACTTTG	
64. MH862968_Daldinia_dennisii_Aislado_62A	TCATTA	-----	ATTACATT	-----	ACAT	-----	TACATTA
65. EU514699_Cyphellophora_reptans_Aislado_88BPhialophora	TCATTA	CCAAACCCTT	TGTCTACCT	-----	GACCTTATGTT	GCTTCGG	
66. MN341459_Nigrospora_gorlenkoana_Aislado_306A1	TCATTA	CAGAGTTATCCA	-----	ACTCCC	AAA	CCCAATG	
67. MN341437_Nigrospora_aurantiaca_Aislado_161	TCATTA	CAGAGTTATCCA	-----	ACTCCC	AAA	CCCAATG	
68. MK073011_Biscogniauxia_petrensis_Aislado_232	TCATTA	TTGCCCTAGAGTGGAGT	-----	CTAAC	-----	TTCACCCTA	
69. OUTGROUP_MH062975_Coprinellus_domesticus_15AZE134	TCATTA	CTGGCTCCTCGAGCAATGTGC	ACGCC	GCC	CA	TTTTTA	
70. OUTGROUP_MK887323_Coprinellus_xanthothrix_LL_Y_1	TCATTA	CTGGCTCCTCGAGCAATGTGC	ACGCC	GCC	CA	TTTTTA	

**Anexo 12: Estadísticos generados por el programa JmodelTest, usados para generar el árbol de relaciones filogenéticas, a partir de la región ITS de los hongos endófitos aislados, total de modelos evaluados 88.**

ID	Nombre	Partición	lnL	P	AIC	detaAIC	Peso	Cumpeso	Udelta
1	JC	0	10082.0157	138	20440.0314	1341.348	0	1	-
2	JC+I	0	9891.2511	139	20060.5022	961.8188	0	1	-
3	JC+G	0	9547.0113	139	19372.0225	273.3392	0	1	-
4	JC+I+G	0	9546.7507	140	19373.5014	274.818	0	1	-
5	F81	0	10065.8095	141	20413.6189	1314.9356	0	1	-
6	F81+I	0	9876.1481	142	20036.2962	937.6128	0	1	-
7	F81+G	0	9531.4814	142	19346.9628	248.2794	0	1	-
8	F81+I+G	0	9532.4364	143	19350.8729	252.1895	0	1	-
9	K80	10010	9973.4495	139	20224.899	1126.2157	0	1	-
10	K80+I	10010	9783.5191	140	19847.0382	748.3549	0	1	-
11	K80+G	10010	9422.7821	140	19125.5643	26.8809	0	1	-
12	K80+I+G	10010	9420.9963	141	19123.9926	25.3092	0	1	-
13	HKY	10010	9964.8091	142	20213.6181	1114.9348	0	1	-
14	HKY+I	10010	9776.1512	143	19838.3024	739.6191	0	1	-
15	HKY+G	10010	9417.0799	143	19120.1599	21.4765	0	1	-
16	HKY+I+G	10010	9411.8678	144	19111.7357	13.0523	6.00E-04	0.999	-
17	TrNef	10020	9956.4653	140	20192.9306	1094.2472	0	1	-
18	TrNef+I	10020	9771.2623	141	19824.5245	725.8412	0	1	-
19	TrNef+G	10020	9415.0977	141	19112.1955	13.5121	4.00E-04	0.9994	-
20	TrNef+I+G	10020	9413.2131	142	19110.4263	11.7429	0.0011	0.9959	-
21	TrN	10020	9956.3809	143	20198.7618	1100.0784	0	1	-
22	TrN+I	10020	9770.2964	144	19828.5929	729.9095	0	1	-
23	TrN+G	10020	9409.4235	144	19106.8469	8.1635	0.0065	0.9719	-
24	TrN+I+G	10020	9410.1378	145	19110.2757	11.5923	0.0012	0.9948	-
25	TPM1	12210	9971.3879	140	20222.7759	1124.0925	0	1	-
26	TPM1+I	12210	9782.6641	141	19847.3282	748.6449	0	1	-
27	TPM1+G	12210	9424.9837	141	19131.9674	33.284	0	1	-
28	TPM1+I+G	12210	9420.22	142	19124.44	25.7566	0	1	-
29	TPM1uf	12210	9966.3473	143	20218.6945	1120.0112	0	1	-
30	TPM1uf+I	12210	9787.9458	144	19863.8917	765.2083	0	1	-
31	TPM1uf+G	12210	9413.7349	144	19115.4699	16.7865	1.00E-04	0.9999	-
32	TPM1uf+I+G	12210	9414.1897	145	19118.3794	19.6961	0	1	-

33	TPM2	10212	9972.2544	140	20224.5087	1125.8254	0	1	-
34	TPM2+I	10212	9782.8213	141	19847.6426	748.9592	0	1	-
35	TPM2+G	10212	9418.5859	141	19119.1718	20.4885	0	1	-
36	TPM2+I+G	10212	9415.3667	142	19114.7335	16.0501	1.00E-04	0.9998	-
37	TPM2uf	10212	9964.8091	143	20215.6182	1116.9348	0	1	-
38	TPM2uf+I	10212	9775.7018	144	19839.4035	740.7202	0	1	-
39	TPM2uf+G	10212	9410.52	144	19109.04	10.3566	0.0022	0.9904	-
40	TPM2uf+I+G	10212	9408.801	145	19107.602	8.9187	0.0044	0.982	-
41	TPM3	12012	9976.8005	140	20233.601	1134.9176	0	1	-
42	TPM3+I	12012	9795.8099	141	19873.6198	774.9364	0	1	-
43	TPM3+G	12012	9422.7963	141	19127.5926	28.9093	0	1	-
44	TPM3+I+G	12012	9432.3885	142	19148.7769	50.0936	0	1	-
45	TPM3uf	12012	9962.5421	143	20211.0843	1112.4009	0	1	-
46	TPM3uf+I	12012	9777.0469	144	19842.0939	743.4105	0	1	-
47	TPM3uf+G	12012	9416.5576	144	19121.1152	22.4319	0	1	-
48	TPM3uf+I+G	12012	9415.0861	145	19120.1721	21.4888	0	1	-
49	TIM1ef	12230	9959.2239	141	20200.4478	1101.7644	0	1	-
50	TIM1ef+I	12230	9782.2787	142	19848.5574	749.874	0	1	-
51	TIM1ef+G	12230	9412.1043	142	19108.2087	9.5253	0.0033	0.9853	-
52	TIM1ef+I+G	12230	9412.2386	143	19110.4772	11.7939	0.0011	0.9969	-
53	TIM1	12230	9951.8653	144	20191.7306	1093.0473	0	1	-
54	TIM1+I	12230	9781.156	145	19852.312	753.6286	0	1	-
55	TIM1+G	12230	9410.5198	145	19111.0396	12.3562	8.00E-04	0.9977	-
56	TIM1+I+G	12230	9408.7158	146	19109.4317	10.7483	0.0018	0.9922	-
57	TIM2ef	10232	9955.0617	141	20192.1233	1093.44	0	1	-
58	TIM2ef+I	10232	9770.4602	142	19824.9204	726.237	0	1	-
59	TIM2ef+G	10232	9409.3484	142	19102.6968	4.0135	0.0516	0.852	-
60	TIM2ef+I+G	10232	9407.3864	143	19100.7729	2.0895	0.135	0.7169	-
61	TIM2	10232	9953.0022	144	20194.0044	1095.321	0	1	-
62	TIM2+I	10232	9782.0158	145	19854.0315	755.3482	0	1	-
63	TIM2+G	10232	9405.8678	145	19101.7356	3.0523	0.0834	0.8004	-
64	TIM2+I+G	10232	9406.0837	146	19104.1674	5.4841	0.0247	0.9248	-
65	TIM3ef	12032	9954.6286	141	20191.2572	1092.5739	0	1	-
66	TIM3ef+I	12032	9771.3931	142	19826.7862	728.1028	0	1	-
67	TIM3ef+G	12032	9412.9376	142	19109.8753	11.1919	0.0014	0.9936	-
68	TIM3ef+I+G	12032	9411.2005	143	19108.4009	9.7176	0.003	0.9883	-
69	TIM3	12032	9951.4376	144	20190.8751	1092.1918	0	1	-
70	TIM3+I	12032	9770.0023	145	19830.0047	731.3213	0	1	-
71	TIM3+G	12032	9411.5323	145	19113.0646	14.3812	3.00E-04	0.9997	-
72	TIM3+I+G	12032	9409.6941	146	19111.3882	12.7048	7.00E-04	0.9984	-
73	TVMef	12314	9970.418	142	20224.836	1126.1526	0	1	-
74	TVMef+I	12314	9794.0598	143	19874.1196	775.4363	0	1	-

75	TVMef+G	12314	9415.9829	143	19117.9657	19.2824	0	0.9999	-
76	TVMef+I+G	12314	9416.0993	144	19120.1987	21.5153	0	1	-
77	TVM	12314	9961.5991	145	20213.1982	1114.5148	0	1	-
78	TVM+I	12314	9774.6676	146	19841.3353	742.6519	0	1	-
79	TVM+G	12314	9407.5503	146	19107.1005	8.4171	0.0057	0.9776	-
80	TVM+I+G	12314	9405.2588	147	19104.5176	5.8342	0.0208	0.9456	-
81	SYM	12345	9954.3166	143	20194.6331	1095.9498	0	1	-
82	SYM+I	12345	9775.7103	144	19839.4207	740.7373	0	1	-
83	SYM+G	12345	9408.3056	144	19104.6112	5.9278	0.0198	0.9654	-
84	SYM+I+G	12345	9405.0035	145	19100.007	1.3236	0.198	0.5819	-
85	GTR	12345	9952.9525	146	20197.905	1099.2217	0	1	-
86	GTR+I	12345	9768.6178	147	19831.2356	732.5522	0	1	-
87	GTR+G	12345	9404.4194	147	19102.8387	4.1553	0.0481	0.9001	-
88	GTR+I+G	12345	9401.3417	148	19098.6834	0	0.3839	0.3839	-

**Anexo 13: Estadísticos generados a partir de correr los 88 modelos para los datos en el programa jModelTest, corriendo el criterio de información AKAIKE (AIC).**

```

-----
*                                     *
*           AKAIKE INFORMATION CRITERION (AIC)           *
*                                     *
-----

```

```

Model selected:
Model = GTR+I+G
partition = 012345
-lnL = 9401.3417
K = 148
freqA = 0.2253
freqC = 0.2638
freqG = 0.2518
freqT = 0.2592
R(a) [AC] = 1.4114
R(b) [AG] = 2.7971
R(c) [AT] = 1.6835
R(d) [CG] = 1.1228
R(e) [CT] = 3.6204
R(f) [GT] = 1.0000
p-inv = 0.0470
gamma shape = 0.7460

```