



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Fecha: 21 de octubre de 2020

**Comisión de Seguimiento Académico  
Maestría en Biología Integrativa de la  
Biodiversidad y la Conservación  
Presente**

Como integrante del jurado y después de haber evaluado la tesis titulada “**Aspectos ecológicos de la interacción entre hongos endófitos con la planta carnívora *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae)**” del alumno **Jesús Eduiw Rueda Almazán**, con número de matrícula **10022640**, aspirante al grado de Maestro(a) en Biología Integrativa de la Biodiversidad y la Conservación, considero que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida en el examen de grado. Por lo tanto emito mi **VOTO APROBATORIO**.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente

---

**Dr. José Augusto Ramírez Trujillo**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2020-10-21 09:17:57 | Firmante

n1kTXI+Cig0xj2hxXuwpIR9DfPLf9Vuo4M0kS4bnOr2tSEH7K1TQMg6AVQD06WoqX2DIVend9oTzYVqlkOU3bmgW/ZzAfMTGyavEX96BD5eCWM3hpZS4jJPKpi5Lq3IzcCw51v1fhmfDE1K0lhLzThWmJO1cSh7lUgtvulR3uDqBwgHsxdS4Ng1Ga7ZmwM2vEoOmnlxvlfiz0X0bakEQLBiHnOa5+GYVeLraEDsNNdiAlrKVQRSI2EdKaxImT+OEhtvsZiirzfGJw4cWmuHdSWM4x0FikETuSDmVdQHGwi+YEwN73/GzgDE2cDIOatu2st+F1zaQRXI87heFGXGdQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



**McHV0R**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/A1Hh3sgFIUCQJ01AXuWxUZm3EDn78Z3a>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos a 14 de octubre del 2020

**Comisión de Seguimiento Académico  
Maestría en Biología Integrativa de la  
Biodiversidad y la Conservación  
Presente**

Como integrante del jurado y después de haber evaluado la tesis titulada “**Aspectos ecológicos de la interacción entre hongos endófitos con la planta carnívora *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae)**” del alumno **Jesus Eduiw Rueda Almazán**, con número de matrícula **10022640**, aspirante al grado de Maestro(a) en Biología Integrativa de la Biodiversidad y la Conservación, considero que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida en el examen de grado. Por lo tanto emito mi **VOTO APROBATORIO**.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente  
***Por una humanidad culta***  
*Una universidad de excelencia*

**Dra. Alejandra Vázquez Lobo Yurén**  
Profesor-Investigador de Tiempo Completo  
CIByC, UAEM



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**ALEJANDRA VAZQUEZ LOBO YUREN | Fecha:2020-12-03 15:12:58 | Firmante**

mOWscmUT5zMuM3ZjJoYBgmjBcrKY1qYqklnNzsXXzTkZPFLk0IiHXJjPSTI5wOloV0D3F6Jq5DG/XwPGguFNdA628QXn+DlsauQgyafoEiPYp17UslxjnhajBWP1AeKf61CyinKwMNQYvaPoAGEgP/x4YXMfFT/b9eBdt7u28zM7DLV892QpRljFJ6xo70qpQ3bQghxOIQUgvRwooSMIk7vz0RQkx/V7fO1kZ+KtHHTr/+x08vsoKxJvH9UrbviSZxOqcO05ywUw68Hsvg6jL02bWQwYYFGCY9FJoVDfrAXIW6O/uliRF89OUFVXmb1pu0fqVNL41VRcT3T11IU6og==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[RShj2L](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/7IAC1ZvcPg1L9kvWngLQkaP5JZ7pwMph>



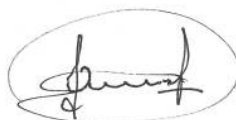
Cuernavaca, Morelos a 3 de diciembre de 2020

**Comisión de Seguimiento Académico  
Maestría en Biología Integrativa de la  
Biodiversidad y la Conservación  
Presente**

Como integrante del jurado y después de haber evaluado la tesis titulada “**Aspectos ecológicos de la interacción entre hongos endófitos con la planta carnívora *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae)**” del alumno **Jesús Eduiw Rueda Almazán**, con número de matrícula **10022640**, aspirante al grado de Maestro(a) en Biología Integrativa de la Biodiversidad y la Conservación, considero que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente



---

**Dr. Iván Arenas Sosa**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**IVÁN ARENAS SOSA | Fecha:2020-12-03 15:24:31 | Firmante**

fVqmFPuvUnLlOXf7k1/iasbMC7WLQaBdJinzmvGSJwEoWpMHxp0aes3lvtl9cuUj5+jY425YOvJ44rYsT8t98flGQzTTH6jPUvKnXfjew3+Vyi/sB+BIjYjBDEFUcCM1Mt93dre/FtH7DmM82fkAxWzGrkfMm9DDeR3VO6cYw8jukkRhn1PxMYiJ4pmRMD/2LIMp1fPmz1dGImEBK8os0AxpGoaTfEHvHvLu7BgolXQ4ee16qAnA/ibOwrCUxeURQSBz9PavKbLIE+vvhekyluEhHo/ZWLIpnyGxoaqwmCKOoxJsSQnmXN88JvfiZiiUpJGHUNK+hW6M0vGHNgw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



YK7PCq

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/lxcXsKcdzjpgmSaULycrq0xrDGFqL0l>



3 de diciembre, 2020

**Comisión de Seguimiento Académico  
Maestría en Biología Integrativa de la  
Biodiversidad y la Conservación  
Presente**

Como integrante del jurado y después de haber evaluado la tesis titulada “**Aspectos ecológicos de la interacción entre hongos endófitos con la planta carnívora *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae)**” del alumno **Jesús Eduiw Rueda Almazán**, con número de matrícula **10022640**, aspirante al grado de Maestro(a) en Biología Integrativa de la Biodiversidad y la Conservación, considero que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida en el examen de grado. Por lo tanto emito mi **VOTO APROBATORIO**.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente



---

**Dra. Patricia Vélez Aguilar**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**PATRICIA VÉLEZ AGUILAR** | Fecha:2020-12-03 15:22:05 | Firmante

n5cuROPgNx8ca1mEwozOzu3Yq0h6s6cM81TteNi9t0RzRRoT0a0VnaTizGCX6WztWe4OVZgo4vEW+bzaSsNpWQxQ5EFYtobrUPI+3RwEGoXD8d+RCxTVhlz2nzDxlSL/bsOjd8YuKQUR2Gr8JEGmfq5HtZJgkcB21XykmLzASvjOqBaDPlof/TbbFDqIHZD24lsgCwl3fn/m4ksQmXrSuEdiQEryNhuPra3DXq8DJFhyBO1H/rJcNT0EuPZC0j8RyPbLHi36RpAgMBIgf8mz47Vh6FFa9whBGPCxLoOlel7em9lLdfu1X7YMNvJJv5qRqDSsE58vaGllngd8cgoOg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



**XQIBJL**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/urXuekBXMUTgBBZfULYLcV2Uo1yzBopa>







**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN**  
**Maestría en Biología Integrativa de la Biodiversidad y la Conservación**

---

Fecha: \_\_\_ Diciembre 03 de 2020.

**Comisión de Seguimiento Académico**  
**Maestría en Biología Integrativa de la**  
**Biodiversidad y la Conservación**  
**Presente**

Como integrante del jurado y después de haber evaluado la tesis titulada “**Aspectos ecológicos de la interacción entre hongos endófitos con la planta carnívora *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae)**” del alumno **Jesús Eduiw Rueda Almazán**, con número de matrícula **10022640**, aspirante al grado de Maestro(a) en Biología Integrativa de la Biodiversidad y la Conservación, considero que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida en el examen de grado. Por lo tanto emito mi **VOTO APROBATORIO**.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente

---

**Dr. Raúl Ernesto Alcalá Martínez**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**RAUL ERNESTO ALCALA MARTINEZ | Fecha:2020-12-03 09:54:51 | Firmante**

OO2jJi4m74/JSmG3kyUdCiv9h+JCbHXNHtAHKTAGjqx7kJtrZR8qHiY0YXpPUAhgMLQwXMnwEx9z3Egyvwsn8KyDoZWC3smCA+x16inmEDJrSXdLPqZDAQcKelvHJJBVzPb28LEPjt26ZqAf00/W9cuduVev21U5/SsxJeuFN2jFxFxNexwl/sdCUy/36GT+8IT7Oa1scNBcwDLQc7h4DBWCB+gaqNb5AMavl7v1cl3l1sYvC49e4A439yNi5ejptNHLVooeKBsFdMN8TyJ76CaDcUD7EK1w2OAtAuLybj6h5X1A7bG8hk71iAgrt7cTGBHYf1zmWWrRCytOJr/Y0IGw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[XWidBc](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/r4JEcpMmNqByrjliKTpc3QyLe9LQHqo>





# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

---

---

## CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN

Aspectos ecológicos de la interacción entre hongos endófitos con la  
planta carnívora *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae)

### TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN BIOLOGÍA INTEGRATIVA DE  
LA BIODIVERSIDAD Y LA CONSERVACIÓN**

PRESENTA:

**Biól. Jesús Eduiw Rueda Almazán**

**DIRECTOR**

Dr. Raúl Ernesto Alcalá Martínez (CIByC)

**CODIRECTOR**

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (CEIB)



CUERNAVACA, MORELOS.

DICIEMBRE, 2020

## **Dedicatoria**

A mis padres y hermanos, gracias por motivarme constantemente para alcanzar mis anhelos, y por estar presentes en cada momento.

## **Agradecimientos**

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Raúl E. Alcalá Martínez por cada una de sus correcciones y aportaciones que me ha permitido crecer en mi formación académica, gracias por su paciencia y siempre estar ahí, dispuesto a platicar de nuevos planteamientos o soluciones ante obstáculos que iban surgiendo. Muchas gracias, Raúl.

Al Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez por haberme brindado esta grandiosa oportunidad de forma parte de su equipo de trabajo, por creer en este proyecto. Le agradezco mucho sus aportaciones, confiar en mí y que siempre me hablará con esa sinceridad que lo caracteriza.

Sin lugar a duda, le agradezco mucho al comité evaluador a la Dra. Alejandra Vázquez, Dra. Patricia Vélez, Dr. Iván Arenas y al Dr. Augusto Ramírez, por haber aceptado participar en este comité y por cada una de sus contribuciones tan acertadas. Gracias por su apoyo.

Les agradezco a cada uno de los integrantes del Laboratorio de Parasitología Vegetal y del Laboratorio de Control Biológico. Más que un equipo de trabajo son una gran familia. Muchas gracias a cada uno de ustedes.

A la Mtra. Laura Lina le agradezco por ser ese gran pilar para mi formación académica, ya que siempre ha estado dispuesta a apoyarnos. Muchísimas gracias, Mtra. Lau.

Al laboratorio de Biología Molecular de Hongos particularmente al Dr. Jorge Luis Folch por permitirme trabajar en su laboratorio y al Mtro. Ricardo Sánchez por su asesoramiento en el transcurso de este proyecto.

Gracias al laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas en especial al Dr. Ramón Suárez, Dr. Augusto Ramírez y a la M. C. Nancy Hernández, por permitirme ocupar algunos de sus equipos, por sus consejos y esas pláticas tan amenas. En verdad gracias.

A mis amigos Chinos, Sughey, Jean, Amau, Julio y Jasiel, les estoy infinitamente agradecidos por su apoyo incondicional. A Jos por ser parte de esta motivación.

Gracias a los chicos de estancia que participaron en este proyecto en particular a Mariana, Andrea y Jaffed por su gran dedicación y compromiso.

A la contadora Claudia por irme guiando y asesorando en todo lo administrativo. Gracias Clau.

Al Biól. Jorge René Alcalá Martínez y al M. en C. Arturo Huitzilihuitl Atilano por la asesoría técnica brindada al momento de realizar los análisis físicos del suelo y por la interpretación de los resultados.

Finalmente, gracias al CONACYT por haberme brindado este apoyo económico para poder continuar con mi formación académica y al CIByC por permitirme formar parte de este posgrado.

## CONTENIDO

1. Introducción .....	1
2. Marco teórico .....	4
2.1. Heterogeneidad ambiental .....	4
2.2. Efecto de la heterogeneidad ambiental en la estructura de la comunidad de hongos endófitos .....	5
2.3. Efecto de la variación del órgano vegetal en la colonización por hongos endófitos .....	7
2.4. Plantas carnívoras.....	10
2.5. Interacción hongos endófitos-plantas carnívoras.....	11
3. Justificación .....	15
4. Hipótesis.....	16
5. Objetivos.....	16
5.1 Objetivo general .....	16
5.2 Objetivos particulares .....	16
6. Materiales y métodos.....	17
6.1. Estrategia experimental.....	17
6.2. Especie de estudio .....	18
6.3. Sitio de estudio y colecta de plantas.....	20
6.4. Determinación de las propiedades físicas del suelo .....	21
6.5. Aislamiento de hongos endófitos.....	22
6.7.1. Extracción de ADN fúngico .....	24
6.6. Secuencias de consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas (ERIC-PCR) .....	25
6.7. Identificación molecular de los hongos endófitos.....	26
6.7.1. Amplificación por PCR .....	26
6.7.2. Secuenciación y ensamble de secuencias .....	27
6.8. Análisis Filogenéticos .....	27
6.8.1. Análisis de delimitación de especies y distancias genéticas .....	28
6.9 Análisis estadísticos .....	28
7. Resultados.....	30
7.1. Aislamiento de hongos endófitos y clasificación .....	30
7.2. Tasa de infección de hongos endófitos .....	30
7.3. Composición de la comunidad de hongos endófitos en el espacio y en el tiempo, además entre tipo de órganos.....	32
7.4. Perfiles electroforéticos generados por ERIC-PCR .....	33

7.5. Análisis filogenéticos .....	36
7.6. Análisis de las variables del suelo .....	42
8. Discusión .....	44
8.1. Taxonomía .....	44
8.2. Heterogeneidad ambiental .....	45
8.3. Diferencias entre órganos .....	47
8.4. Posible papel de los hongos endófitos en <i>P. moranensis</i> .....	47
9. Conclusiones .....	50
9. Literatura citada .....	51



## Resumen

Los hongos endófitos han sido objeto de estudio principalmente en su interacción con el hospedero. A pesar de su enorme diversidad, poco se sabe sobre su interacción con plantas carnívoras y los determinantes involucrados en la diversidad endofítica fúngica. En este estudio se compararon tres localidades en las que se encuentran presentes poblaciones de *P. moranensis* caracterizando la comunidad de hongos endófitos en dos momentos diferentes, durante la presencia de las roseta de verano y la roseta de invierno y en separando además entre hojas y raíz en cada planta evaluada. Este estudio, mostró que las raíces y hojas de la planta carnívora *P. moranensis* albergan al menos 13 géneros de hongos endófitos. Además de documentar cinco diferentes géneros de hongos endófitos (*Neomollisia* sp., *Coniochaeta* sp., *Ijuhya* sp., *Cercospora* sp. y *Ochroconis* sp.) por primera vez en plantas carnívoras. A través de los resultados obtenidos se observó que la heterogeneidad temporal está asociada con las diferencias en la comunidad de hongos endófitos y en la tasa de infección. Además, la tasa de infección de los hongos endófitos aislados de raíz fue mayor con relación a la hoja. Este es el primer estudio de la comunidad de hongos endófitos en una planta carnívora que permiten apreciar el efecto que la heterogeneidad espacial y temporal tiene en la interacción entre hongos endófitos y plantas carnívoras.

## **1.Introducción**

Las plantas carnívoras se han considerado como un ejemplo de evolución adaptativa ya que han desarrollado diversos mecanismos de atracción, captura de presas y sistemas enzimáticos que están asociados con la capacidad de capturar, digerir y asimilar presas, a través de modificaciones en las estructuras foliares (Alcalá y Domínguez, 1997; Mithöfer, 2017). Con cada una de estas diferentes modificaciones, las plantas carnívoras han adquirido la habilidad de utilizar a sus presas como una fuente alternativa de recursos minerales, lo que les ha permitido colonizar hábitats, con suelos típicamente pobres en nutrientes (Benzing, 1987).

A diferencia de la interacción entre las plantas y herbívoros, cuyas primeras evidencias se sitúan en el periodo Carbonífero (Horn et al., 2011), y de las angiospermas con los polinizadores que inicia a finales del Cretácico (Ollerton, 1999; Peris et al., 2017), existe una tercera interacción todavía más antigua. A través del registro fósil, se ha mostrado que las plantas se han asociado con microorganismos endófitos desde hace más de 400 millones de años (Krings et al., 2007). La existencia generalizada de endófitos en las plantas sugiere que la gran mayoría de las aproximadamente 300,000 especies de plantas terrestres, alberga a una o más especies de endófitos manteniendo una estrecha relación simbiótica (Smith et al., 2008; Pérez et al., 2009).

En 1866, De Bary definió como endófito a “cualquier organismo que ocurre dentro de los tejidos vegetales”. Actualmente se consideran como endófitos, aquellos microorganismos capaces de colonizar momentáneamente tejidos internos (inter e intracelular) de las plantas, particularmente en la raíz y en las hojas sin causar un daño aparente a su hospedero (Schulz y Boyle, 2006; Mane y Vedamurthy, 2018; Ramalashmi et al., 2018). Como resultado de la colonización de los órganos de las plantas por microorganismos endófitos se genera una serie de beneficios en la fisiología del hospedero, como la promoción del crecimiento a través de la producción de fitohormonas (auxinas y giberelinas) (Bootkotr y Mongkolthanaruk, 2012), contribución en la aceleración del rejuvenecimiento del sistema radicular (Bonfim et al., 2016), mayor rendimiento de frutos, estimulación del sistema de defensa, mejor

absorción de nutrientes y se sugiere, que las plantas infectadas con endófitos a menudo obtienen una ventaja competitiva en ambientes de estrés. A su vez, los endófitos obtienen un nicho adecuado y un suministro, casi constante de nutrientes (Hardoim et al., 2008; Rodríguez et al., 2009; Li et al., 2015).

A pesar de que son diversas las implicaciones que tienen los microorganismos endófitos en las plantas, se ha llegado a pensar que las plantas carnívoras no desarrollan asociaciones con endófitos, debido a su modo de obtención de nutrientes derivado de las presas capturadas y al limitado desarrollo de sus raíces (Albino et al., 2006; Quilliam y Jones, 2010). Sin embargo, evidencia reciente muestra la presencia de hongos endófitos en especies de plantas carnívoras, los cuales aparentemente facilitan la adquisición de nutrientes (Lee et al., 2014) y les brindan una ventaja competitiva, particularmente en ambientes abióticamente estresantes (Glenn y Bodri, 2012; Quilliam y Jones, 2012).

Los hongos endófitos son un grupo polifilético que cuentan con múltiples estilos de vida. Se conoce que son descomponedores de detritos orgánicos, patógenos de plantas o patógenos de insectos, y pueden vivir asintóticamente dentro de tejidos vegetales sanos (Arnold, 2007). La comunidad de hongos endófitos en plantas no suele integrarse de manera aleatoria (Glynou et al., 2016), puesto que se ven influenciados por la variación de los factores bióticos y abióticos (Santamaría y Bayman, 2005; Wu et al., 2013; Higgins et al., 2014; Tedersoo et al., 2014), los cuales promueven cambios en la dinámica de las poblaciones y en la estructura de las comunidades de hongos endófitos (Tedersoo et al., 2014; Glynou et al., 2016). Sin embargo, a pesar de que en las últimas décadas los estudios en hongos endófitos han recibido mucha atención, poco se sabe de su ecología y de los patrones de su biodiversidad a escala local y global (Harrison y Griffin, 2020).

Bajo este panorama, considerando que la mayoría de los estudios realizados en plantas carnívoras con organismos que no sean sus presas, se han enfocado en entender aspectos como la polinización y la herbivoría, el presente trabajo explora la interacción entre hongos endófitos y plantas carnívoras, considerando la influencia de la heterogeneidad del hábitat. Este referente es relevante porque contribuye a explicar

el efecto de la variación espacial o temporal en variables que describen el hábitat de las plantas y por lo tanto, que puede afectar en sus interacciones ecológicas. En específico este trabajo es el primero en evaluar las diferencias inter poblacionales, así como las diferencias temporales (roseta de verano vs roseta de invernal) con relación a la comunidad de hongos endófitos, presentes en las hojas y raíces, tomando como sistema de estudio a la planta carnívora *Pinguicula moranensis* Kunth (Lentibulariaceae).

## **2. Marco teórico**

### **2.1. Heterogeneidad ambiental**

Los organismos deben completar todas las etapas de su historia de vida, haciendo frente a los cambios espaciales y temporales producto de la heterogeneidad en su ambiente (Hutchings et al., 1999). En términos generales, la heterogeneidad ambiental se asocia con una mayor diversidad de especies (Lundholm, 2009), eventos de especiación (Rosenzweig, 1995; Hughes y Eastwood, 2006; Antonelli y Sanmartín, 2011) y mantiene el polimorfismo genético intraespecífico (Pamilo, 1988).

Los componentes temporales y espaciales de la heterogeneidad ambiental se han introducido en modelos teóricos de la ecología, generando nuevas predicciones para ser probadas tanto en campo como en el laboratorio (Hutchings et al., 1999). La identificación de las escalas espaciales y temporales es relevante para abordar la cuestión ecológica de interés, incluidos los tiempos de generación de los organismos de estudio, la frecuencia de las perturbaciones y el período de las oscilaciones climáticas, que en su conjunto permiten ubicar el estudio en la parte relevante de estos ciclos (Wolkovich et al., 2014). En términos del componente espacial, un aspecto relevante es la escala a la que ocurre la variación, ya que la heterogeneidad espacial puede ser de grano fino o de grano grueso. Con respecto al componente temporal, se sabe que algunas características del entorno están sujetas a variación en el tiempo, ya sea dentro o entre generaciones (Pigliucci, 2001). Los efectos de la heterogeneidad ambiental dependen de la capacidad de respuesta de cada especie con respecto a la variación en la cantidad de recursos y de sus interacciones ecológicas (Thompson 2005, Medel et al., 2009).

En el caso de las especies de plantas, la heterogeneidad ambiental explica las variaciones en factores abióticos, como las propiedades físicas y químicas del suelo, la microtopografía y el microclima, o en componentes bióticos que imponen efectos intra (es decir, competencia) o interespecíficos (antagónicos o interacciones mutualistas) (Hutchings et al., 1999). La heterogeneidad ambiental puede llegar a causar diferenciación morfológica, fisiológica, fenológica y genética (Linhart y Grant,

1996). Se cree que la heterogeneidad ambiental promueve cambios en la dinámica de la población y en la estructura de las comunidades a través de un aumento en los gradientes ambientales y en la cantidad de tipos de hábitat, recursos y complejidad estructural (Currie, 1991). La heterogeneidad ambiental también puede condicionar el resultado de interacciones entre organismos (Bronstein, 1994), afectando, por ejemplo, la distribución y abundancia de insectos polinizadores (Herrera, 1995, 1997), la intensidad de la herbivoría foliar (Suárez-Piña et al., 2016) o la depredación de semillas (Russell y Schupp, 1998); y las infecciones patógenas (Chanthorn et al., 2013). Particularmente, a una escala de resolución temporal (entre estaciones), se ha mostrado que la interacción entre plantas y hongos endofíticos está determinada por la heterogeneidad ambiental, produciendo variaciones en grupos taxonómicos y rasgos funcionales bajo ciertos gradientes ambientales (Quilliam y Jones, 2010; Devi et al., 2012)

## **2.2. Efecto de la heterogeneidad ambiental en la estructura de la comunidad de hongos endofitos**

Los estudios han mostrado que cada uno de los factores climáticos, el entorno local al que se sometan las plantas, la estrategia de historia de vida del hongo, la compatibilidad genética entre el hongo y el hospedero, seguido por los patrones edáficos y espaciales (Göre y Bucagk, 2007; Win et al., 2018) tienen una fuerte implicación en la distribución, abundancia y composición de las comunidades de plantas y hongos endofitos, al menos en el corto plazo (Tedersoo et al., 2014; Glynou et al., 2016; Tabla 1).

**Tabla 1.** Variables involucradas en la estructuración de las comunidades de hongos.

<b>Variable</b>	<b>Escala</b>	<b>Efecto</b>	<b>Referencia</b>
Latitud	Regional	Efecto de la latitud en la composición de la comunidad de hongos endófitos, debido al conjunto de gradientes históricos, abióticos y bióticos covariables que tienen una fuerte influencia en la distribución de los hongos endófitos.	1 y 2
Concentración de nutrientes (P, N, C, y Ca)	Local y regional	Efecto de los nutrientes en la diversidad y riqueza de hongos, por su implicación en el desarrollo del hongo y en la infección de sus plantas hospedantes.	3 y 4
Herbivoría	Local	Resultado de la herbivoría se crea un atajo significativo de nutrientes a través del material vegetal hasta el suelo, en donde los hongos descomponen la hojarasca y permiten la liberación de nutrientes, teniendo un efecto en la abundancia de la comunidad de hongos.	5
Exudados radiculares	Local	El efecto antifúngico de los exudados radiculares establece una regulación de la comunidad fúngica, determinando la estructura de la comunidad de hongos.	6 y 7
Precipitación	Local	Efecto de la precipitación en las frecuencias de aislamiento de hongos endófitos debido a su implicación en la germinación y dispersión de las esporas.	2 y 8
Temperatura		Efecto de la temperatura en la riqueza de hongos, debido a la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas y en la desnaturalización de proteínas.	9 y 10
Humedad	Local	Implicación de la humedad en la distribución y composición de la comunidad de hongos endófitos, por su efecto en la germinación de las esporas y en la protección a la desecación de los tubos germinativos.	11 y 12
Luz UV	Local	Efecto de la luz UV en la abundancia y distribución de hongos, debido a la estimulación en la producción de conidios, síntesis de pigmentos fotoprotectores y reducción en la viabilidad de germinación.	13 y 14
pH	Local	Efecto del pH en la riqueza de hongos y en la estructuración de la comunidad endofítica, por su efecto en el desarrollo del hongo.	15 y 3

1. Glynou et al., 2016; 2. U' Ren et al., 2012; 3. Tederso et al., 2014; 4. Kameoka et al., 2019; 5. Saikkonen et al., 2015a; 6. Haroim et al., 2015; 7. Broeckling et al., 2008; 8. Göre y Bucak, 2007; 9. Tang et al., 2015; 10. Koske, 1987; 11. Modibb et al., 2017; 12. Bissett y Parkinson, 1979; 13. Braga, et al., 2015; 14. Newsham et al., 1997; 15. García et al., 2002.

La variación de los factores bióticos y abióticos, son determinantes claves en la configuración de la interacción endófito-planta (Santamaría y Bayman, 2005; Wu et al., 2013; Higgins et al., 2014; Tedersoo et al., 2014) y en las diferencias en los grupos taxonómicos y funcionales (Herrera et al., 2010). Por ejemplo, las variables climáticas como la precipitación, muestran ser buenos predictores para estimar la riqueza de hongos particularmente en grupos como *Mortierellomycotina* y en las clases *Dothideomycetes*, *Lecanoromycetes*, *Leotiomycetes*, *Orbiliomycetas* y *Sordariomycetas* (Göre y Bucak, 2007; Tedersoo et al., 2014). Por otro lado, las concentraciones de los nutrientes del suelo como nitrógeno (N), fósforo (P), calcio (Ca) y carbono (C), influyen sobre la riqueza de los hongos (Reich et al., 2005). En taxones como *Rozellomycota* el nivel de N tienen un efecto positivo en la riqueza de hongos, mientras que en los *Geoglossomycetes* y *Mucoromycotina*, la relación N=P y N=C respectivamente, tiende a tener un efecto positivo en la riqueza de hongos, sin embargo, las concentraciones de P tienen un efecto negativo en la riqueza de los hongos de la clase *Wallemiomycetes* (Tedersoo et al., 2014).

A pesar de que las variables climáticas y edafológicas, explican una gran proporción de la riqueza y la composición de la comunidad de grupos de hongos (Tedersoo et al., 2014), por ahora se desconoce si este ciclo dinámico de cambio poblacional es impulsado solo por los factores abióticos (Wu et al., 2013). Los estudios que consideren la abundancia de endófitos, la diversidad y la heterogeneidad espacial y temporal son de gran valor, puesto que permiten estimar la diversidad de hongos endófitos bajo diferentes escenarios, teniendo una implicación en el entendimiento de la interacción hongos endófitos-hospedero.

### **2.3. Efecto de la variación del órgano vegetal en la colonización por hongos endófitos**

A fin de comprender la integración de la comunidad de hongos endófitos en la interacción con plantas, es necesario analizar la estructura de la asociación endófito-planta, tomando en cuenta aspectos como el efecto de los órganos de las plantas en la colonización fúngica (Tabla 2). Ya que los componentes de cada uno de los órganos pueden influir en la colonización de los hongos e inhibir su crecimiento. Esto puede resultar en, diferencias en la composición y diversidad de hongos endófitos, siendo un



reflejo de su capacidad para utilizar o sobrevivir dentro de un receptor específico (Fang et al., 2013; Wu et al., 2013).

**Tabla 2.** Órganos de plantas involucrados en la colonización de

Órgano	Factores que influyen en los endófitos	Observación	Referencia
Raíz	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Exudados radiculares</li> <li>• Edad de la planta</li> <li>• Disponibilidad de nutrientes</li> <li>• Morfología</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• En la mayoría de las plantas, las raíces tienen un mayor número de endófitos en comparación con los tejidos por encima del suelo.</li> <li>• Diferenciación en la composición endofítica presentes en raíz con relación a la edad de la plantas y otros órganos.</li> </ul>	1, 2, 3 y 4
Hoja	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Variación en las propiedades nutricionales</li> <li>• Metabolitos secundarios implicados en la señalización, defensa y regulación quimiotáctica</li> <li>• Concentración de agua</li> <li>• Concentración de pigmentos</li> <li>• Morfología</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hojas jóvenes están generalmente más protegidas químicamente contra los enemigos naturales que las hojas maduras, y tales defensas pueden limitar la colonización endofítica.</li> <li>• Las hojas jóvenes muestran una tasa de infección más baja que las hojas viejas.</li> <li>• La riqueza y la abundancia de endófitos está relacionada con la edad de las hojas.</li> <li>• Plantas perennes y tejidos más externos están expuestos durante más tiempo a esporas aéreas de endófitos.</li> </ul>	5 y 6
Tallo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Paredes lignificadas del tejido funcionan como una barrera estructural para la colonización por hongos endófitos</li> <li>• Corteza rica en azúcares</li> <li>• Exposición a la luz ultravioleta</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La corteza presenta una alta tasa de infección y riqueza de especies de hongos endófitos.</li> <li>• La diversidad de la comunidad de endófitos es influenciada por la corteza.</li> <li>• La edad de la corteza es un impulsor de cambios en la estructura global de las comunidades de hongos.</li> <li>• La superficie de la corteza vieja es más rugosa y rica en cavidades que la corteza joven propiciando la capacidad de retención de agua y protegiendo células microbianas de condiciones ambientales adversas.</li> </ul>	6, 7 y 8

1. Mocali et al., 2003; 2. Rosenblueth y Romero, 2004; 3. Broeckling et al., 2008; 4. Gaiero et al., 2013; 5. Sánchez-Azofeifa et al., 2012; 6. Win et al., 2018; 7. Yadeta y Thomma, 2013; 8. Arrigoni et al., 2018

Los hongos endófitos pueden exhibir colonización preferencial dentro de sus hospederos. Ya que las raíces, tallos y hojas de una sola planta pueden diferir en las comunidades endófitas que albergan (Behie et al., 2015). Cada uno de los componentes presentes en los órganos, tales como el contenido de pigmentos, metabolitos secundarios, funciones específicas de cada uno de los órganos, las características como la forma, el grosor y el tamaño, en su conjunto están involucrados en la distribución de la interacción endófito-planta (Sanchez-Azofeifa et al., 2012; Win et al., 2018). Los metabolitos secundarios como los flavonoides o pigmentos como las antocianinas, pueden funcionar como defensas antifúngica la cual varía de acuerdo a la edad de la planta (Coley y Barone, 1996; Tan y Zou, 2001; Sanchez-Azofeifa et al., 2012). Sin embargo, las variaciones específicas en la comunidad de hongos endófitos no siempre suelen diferenciarse entre órganos. Por ejemplo, Bayman y colaboradores (1997) mostraron que la epífita *Lepanthes*, no presenta una diferencia en la comunidad de hongos endófitos aislados de cada uno de los órganos vegetales.

#### **2.4. Plantas carnívoras**

Los hongos endófitos han sido objeto de estudio principalmente en su interacción con el hospedero. A pesar de su enorme diversidad, poco se sabe sobre su interacción con plantas carnívoras y los determinantes involucrados en la diversidad endofítica fúngica. Evidencia reciente, ha mostrado la presencia de hongos endófitos en plantas carnívoras aún cuando, la posibilidad de ocurrencia de esta interacción ha sido ignorada por décadas (Quilliam y Jones, 2010). Hasta el momento, las investigaciones desarrolladas han caracterizado parte de la diversidad de hongos endófitos presentes en este tipo de plantas y se hipotetiza que la interacción entre hongos endófitos y plantas que han desarrollado el hábito carnívoro pueden tener un papel importante, no solo a nivel específico sino también sobre la comunidad de plantas carnívoras (Lee et al., 2014).

Existen alrededor de 800 especies de plantas carnívoras, las cuales son un ejemplo de evolución convergente, ya que la carnivoría ha aparecido varias veces independientemente de las angiospermas (Ellison y Adamec, 2018). Cada especie presenta un conjunto de rasgos que involucran la acción de capturar, y digerir presas

lo que permite, la absorción de nutrientes y la obtención de beneficios para la planta (Mithöfer, 2017; Horner et al., 2018). La carnivoría en plantas se interpreta como una adaptación a la limitada disponibilidad de nutrientes (Mithöfer, 2017), y a la alta heterogeneidad de los factores abióticos que caracterizan su hábitat (Benzing, 1987; Givnish, 1989; Zamora et al., 1998; Wu et al., 2013). Ya que, dado que las plantas obtienen el carbono a partir de la fotosíntesis, su desempeño también está determinado por la disponibilidad de otros recursos como agua y luz (Givnish, 1989; Zamora et al., 1998; Alcalá y Domínguez, 2003).

Las diferencias espaciales en la disponibilidad de presas, luz y agua determinan que haya sitios óptimos para el desarrollo del hábito carnívoro (sitios con sustratos pobres en nutrientes, pero con buena disponibilidad de agua y luz). En contraste, existen sitios con alta fertilidad del suelo, baja disponibilidad de agua y luz en donde no se favorece su mantenimiento (Alcalá y Domínguez, 2005). La dependencia de al menos estos tres recursos genera un escenario complejo debido a la elevada heterogeneidad ambiental que enfrenta las poblaciones de plantas carnívoras (Alcalá y Domínguez, 2003).

## **2.5. Interacción hongos endófitos-plantas carnívoras**

Recientemente se ha planteado la idea de que la colonización por parte de los hongos endófitos es esencial o al menos confiere una ventaja para las plantas carnívoras, proporcionándoles una mejora significativa en el crecimiento, rendimiento y absorción de nutrientes (Quilliam y Jones, 2010; Glenn y Bodri, 2012). Aunque las plantas carnívoras tienen la capacidad de reutilizar eficientemente los nutrientes obtenidos de las presas y de estimular la absorción de nutrientes en la raíz (Adamec, 2002), no es de sorprenderse que este efecto también sea el resultado de una mayor actividad fúngica en la raíz y de las enzimas extracelulares de los hongos (Quilliam y Jones, 2010; Lee et al., 2014).

Se sugiere que la interacción entre hongos endófitos y plantas carnívoras es posiblemente el resultado de una evolución conjunta. (Boyandin et al., 2013). En las plantas carnívoras como *Drosera rotundifolia*, durante la temporada de crecimiento cuando los carbohidratos de la fotosíntesis se ven limitados y la disponibilidad de

presas es baja, las raíces de la planta suelen ser colonizadas por el hongo endófito *Trichoderma viride*, el cual aparentemente está involucrado en la obtención de nutrientes a partir del suelo (Kirk et al., 2004) y en suprimir la colonización por otras especies de hongos endófitos presentes en la rizosfera (Lee et al., 2014), quienes pueden demandar cantidades significativas de carbono. a consecuencia del bajo nivel de nutrientes y pH. Esto provoca que algunos endófitos eviten este tipo de estrés a través de la colonización de la planta (Mignard y Flandrois, 2006; Fang, 2013).

De las cerca de 800 especies de plantas carnívoras registradas en la actualidad, solamente unas cuantas especies se han considerado para el estudio de la interacción con hongos endófitos (Hedrich, 2015). En algunos casos se han mostrado variaciones relacionadas con las estaciones del año (primavera y verano) (Quilliam y Jones, 2010) y asociaciones a diferentes condiciones del suelo como es la humedad, pH y la temperatura, favoreciendo el crecimiento de algunos grupos de hongos endófitos sobre tejidos específicos de las plantas carnívoras (Naseem y Kayang, 2018; Tabla 3).

**Tabla 3.** Estudios realizados en relación con la interacción entre microorganismos endófitos y plantas carnívoras.

<b>Especie</b>	<b>País</b>	<b>Observación</b>	<b>Riqueza de endófitos</b>	<b>Órganos</b>	<b>Identificación</b>	<b>Referencia</b>
<i>Drosera rotundifolia</i>	Reino Unido	Efecto de las estaciones en la comunidad de hongos endófitos (primavera y verano).	Ocho morfotipos fueron distinguidos (5 en primavera y 4 en verano)	Raíz	ITS1F y ITS4	1
<i>Nepenthes</i> cuatro especies		Actividad enzimática				2
<i>Nepenthes hybrida</i>		Aislamientos y caracterización de nuevas lipasas.				3
<i>Sarracenia minor</i> , <i>S. oreophila</i> , <i>S. purpurea</i> y <i>S. psittacina</i>	E. U.A.	Diferencias inter-específicas en la composición de comunidades de hongos endófitos.		Jarra	ITS5 y ITS4	4
<i>Pinguicula vulgaris</i>	Reino Unido	Especificidad de hongos endófitos entre diferentes hospederos.	Cinco especies	Raíz	ITS1F y ITS4	5
<i>Nepenthes ampullaria</i> y <i>N. mirabilis</i>	Malasia	Actividad enzimática y actividad antifúngica de hongos endófitos.		Jarra y hoja	ITS1F y ITS4	6
<i>Nepenthes khasiana</i>	India	Efecto del mes y del tipo de tejido con respecto a la diversidad de endófitos.	Shannon-Wiener index (H'): Hoja 2.43, tallo 2.42, raíz 2.38 y jarra 2.42	Raíz, hoja, jarra y tallo	Morfológica	7

**Tabla 3.** Continuación.

Especie	País	Observación	Riqueza de endófitos	Órganos	Identificación	Referencia
<i>Nepenthes ampullaria</i>	Malasia	Absorción de cobre (Cu) por un hongo endófito.	Once aislados de hongos. Géneros: <i>Nigrospora</i> , <i>Diaporthe</i> y <i>Xylaria</i>	Hoja, jarra y raíz	(ITS4+5; ITS1+NL4; Región $\beta$ – tubulina	8

1. Quilliam y Jones, 2010; 2. Morohoshi et al., 2011; 3. Takeuchi et al. 2011; 4. Glenn y Brodi, 2012; 5. Quilliam y Jones, 2012; 6. Lee et al., 2014; 7. Nasseem y Kayang, 2018; 8. Wong et al., 2018.

### 3. Justificación

Los endófitos se enfrentan a los cambios espaciales y temporales producto de la heterogeneidad ambiental. En el caso de las plantas la heterogeneidad ambiental promueve cambios en la dinámica de la población y en la interacción con otros organismos. A una escala de resolución espacial muy fina, se ha mostrado que la interacción entre plantas y hongos endofíticos está determinada por la heterogeneidad ambiental, produciendo variaciones en la distribución, abundancia y composición de las comunidades de hongos endófitos. Por ahora se desconoce si la estructura de la comunidad de hongos endófitos es impulsada solo por los factores abióticos o por el efecto de los componentes de cada uno de los órganos de las plantas, los cuales pueden influir en la colonización de los endófitos. A pesar de la enorme diversidad de hongos endófitos, poco se sabe sobre su interacción con plantas carnívoras y los determinantes involucrados en la estructuración de la comunidad endofítica.

El presente estudio busca profundizar en aspectos clave de la comunidad de hongos endófitos presentes en plantas carnívoras. Se utilizó como modelo de estudio la planta carnívora *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae) debido a que habita principalmente en bosques de pino-encino sobre taludes con poca vegetación o paredes rocosas con orientación al norte, pero que pueden variar en cuando a sus condiciones de luz y humedad (Alcalá y Domínguez, 2003). Por otra parte, presenta rosetas dimórficas, con la roseta de captura presente durante los meses del verano (hojas cubiertas de glándulas de captura y glándulas digestivas) y roseta invernal (pequeña, de hojas suculentas y desprovistas de glándulas) que actúa como órgano de resistencia durante los meses sin lluvia. En general, el dimorfismo parece presentarse independientemente de la variación espacial a nivel ambiental (Zamudio, 2001). Esta especie podría enfrentar mayor heterogeneidad ambiental entre temporadas que entre sitios. En este estudio se compararon tres localidades en las que se encuentran presentes poblaciones de *P. moranensis* caracterizando la comunidad de hongos endófitos en dos momentos diferentes, durante la presencia de la roseta de verano y la roseta de invierno y en separando. además entre hojas y raíz en cada planta evaluada.



#### **4. Hipótesis**

La heterogeneidad ambiental temporal será más determinante que la variación espacial sobre la comunidad de hongos endófitos.

El tipo de órgano determinará los hongos endófitos presentes en la planta carnívora *P. moranensis*.

Por lo tanto, se espera una comunidad de endófitos más amplia en la roseta de captura presentes en las hojas y en las raíces.

#### **5. Objetivos**

##### **5.1 Objetivo general**

Determinar si existen diferencias en la comunidad de hongos endófitos presentes en la planta carnívora *Pinguicula moranensis*, asociados con la heterogeneidad ambiental y con la variación en el órgano de la planta.

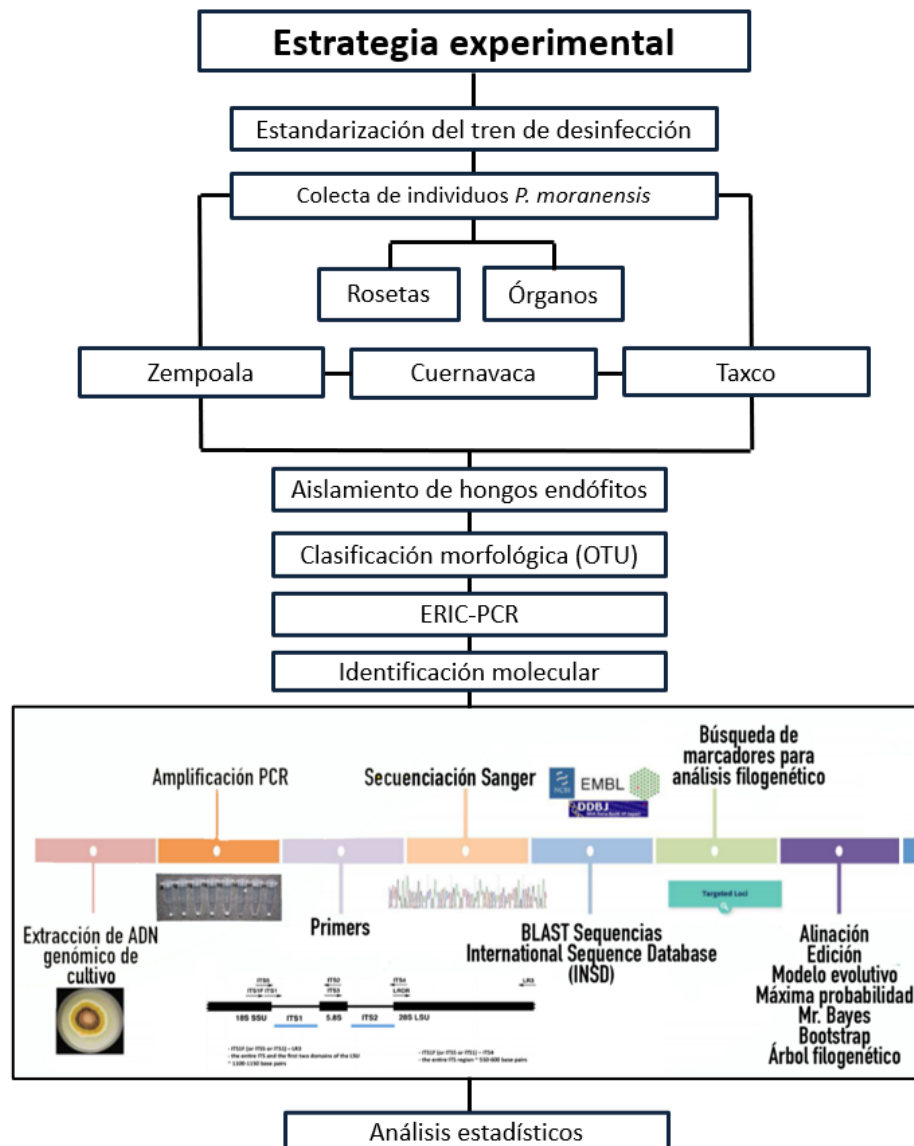
##### **5.2 Objetivos particulares**

- 1.- Precisar si los hongos endófitos varían entre distintas poblaciones de *P. moranensis*.
- 2.- Averiguar si los hongos endófitos varían entre las rosetas de verano e invierno de *P. moranensis*.
- 3.- Determinar si los hongos endófitos presentes en las hojas difieren de los encontrados en las raíces de la planta carnívora *P. moranensis*.

## 6. Materiales y métodos

### 6.1. Estrategia experimental

Para poder llevar a cabo los objetivos planteados a continuación, se detallará la estrategia experimental que permitió dividir el estudio de la interacción de los hongos endófitos con la planta carnívora *P. moranensis* en las etapas de estandarización del tren de desinfección, colecta de plantas, aislamiento, clasificación de hongos endófitos e identificación (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema general de los pasos secuenciales necesarios para el desarrollo del proyecto.

## 6.2. Especie de estudio

El género *Pinguicula* L. (Lentibulariaceae) se distribuye principalmente en el hemisferio norte. Las plantas suelen crecer en taludes o paredes rocosas cubiertas de musgo, en lugares húmedos que en ocasiones se encuentran protegidos de la luz solar directa. En México existen unas 50 especies, lo que representa alrededor de la mitad de las especies reportadas a nivel mundial (Zamudio, 1999).

*Pinguicula moranensis* fue descrita en “*Nova Genera et Species Plantarum*” (Bonpland y Humboldt, 1817), a partir de colectas realizadas por Humboldt y Bonpland. Esta especie de planta carnívora cuenta con una amplia distribución, en México. Se distribuye sobre las montañas del Eje Volcánico Transversal o Eje Neovolcánico, en la Ciudad de México, en los estados de México, Michoacán, Hidalgo, Morelos, Tlaxcala, Puebla, Veracruz, y Guerrero (Zamudio, 1999). Esta planta carnívora suele ubicarse en áreas con vegetación de bosques de encino, pino-encino u oyamel, bosque tropical caducifolio, registrándose entre 1,700 a 3,300 msnm (Zamudio, 1999). *P. moranensis* es una planta perenne con dos tipos de rosetas con hojas dimórficas. Durante la temporada seca (noviembre-mayo), las plantas desarrollan una roseta de resistencia (roseta de invierno) compuesta de hojas glabras, compactas, con forma de bulbo, la forma de las hojas es lanceolada de 10 a 30 mm de largo y de 2 a 6 mm de ancho (Zamudio, 1999; Figura 2).



**Figura 2.** Planta carnívora en roseta de invierno y serie de “hojas de invierno” de la especie *Pinguicula moranensis* (Zamudio, 1999; fotografía por Jesús E. Rueda-Almazán).

En la temporada de lluvias la planta desarrolla una roseta de 60 a 200 mm de diámetro, con 6 a 12 hojas membranosas, extendidas y reclinadas sobre el suelo de una tonalidad verde claro, a veces teñidas de color rojo de 55 a 113 mm de largo (Zamudio, 1999). Este tipo de hojas le permiten capturar pequeñas presas, principalmente pequeños insectos voladores (Alcalá y Domínguez, 2003). La floración ocurre durante los meses de verano a partir de junio hasta septiembre, pudiendo extenderse hasta noviembre. Presenta una corola zigomórfica, aparentemente dividida en un labio superior bilobulado y un labio inferior trilobulado, con una tonalidad violáceo-purpúrea e insertadas individualmente en un pedúnculo erecto de 100 a 200 mm de largo. Esta especie cuenta con un espolón cilíndrico que se extiende desde la corola, a menudo es recto o ligeramente arqueado, de 15 a 30 mm de largo, el cual gradualmente se estrecha hacia la punta (Zamudio, 1999; Shimai y Kondo, 2007; Figura 3).

*Pinguicula moranensis* es una planta carnívora ampliamente estudiada, conociéndose varios aspectos de su ecología. Característicamente sus poblaciones enfrentan una elevada heterogeneidad ambiental en términos del ambiente lumínico y variables correlacionadas como humedad del suelo, disponibilidad de presas, temperatura del aire y fertilidad del sustrato (Alcalá y Domínguez, 2003).



**Figura 3.** Planta carnívora en roseta de verano de la especie *Pinguicula moranensis* (Fotografías por Jesús E. Rueda-Almazán).

### 6.3. Sitio de estudio y colecta de plantas

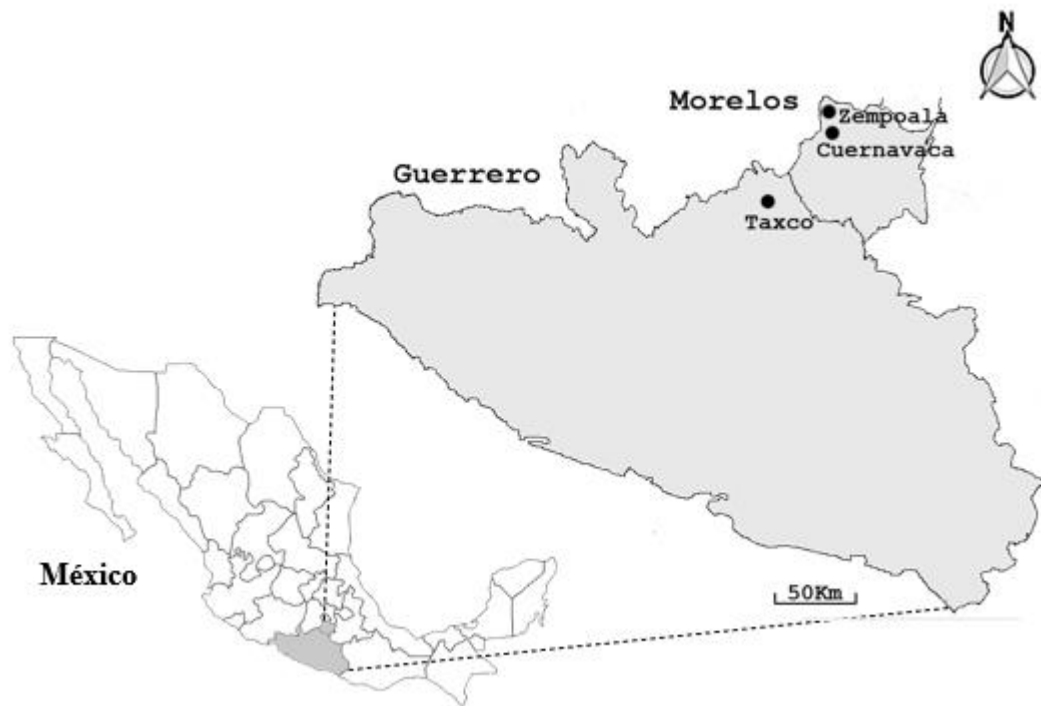
Las plantas fueron colectadas en tres sitios, dos localizados en el estado de Morelos y uno en el estado de Guerrero, México. Los detalles de los tres sitios de muestreo se dan en la tabla 4.

**Tabla 4.** Localización y características de los tres sitios de estudios

Sitio de estudio	Coordenadas geográficas	Altitud (m)	Tipo de clima	Promedio temperatura anual (°C)	Precipitación media anual (mm)
Zempoala	19°03'01.47" N 99°18'53.49" O	2,806	C(W2)(W)	15	1,550.6
Cuernavaca	18°58'2.80" N 99°16'58.41" O	1,948	C(w)	18	1,088
Taxco	18°33'06.89" N 99°38'21.22" O	2,294	(A)C(w2)	23	1,275

C(w2): Templado, subhúmedo; (w) periodo seco en invierno; C(w): Templado, subhúmedo; (A)C(w2): Semicálida subhúmedo.

El primer sitio de estudio ubicado en Morelos corresponde al Parque Nacional Lagunas de Zempoala. Se analizó un parche compuesto por alrededor de trecientos individuos que crecían en una pared rocosa (50 m × 10 m) con condiciones semi sombreadas con una vegetación dominante de bosque de pino, bosque de encino y bosque de pino-encino (Bonilla-Barbosa y Novelo, 1995; Serafin-Castro, 2014). El segundo sitio de estudio en Morelos está localizado en la parte noroeste de la ciudad de Cuernavaca. Este sitio está compuesto por una serie de laderas cubiertas por bosque de pino-encino (Flores-Armillas et al., 2009). En este sitio se encuentran alrededor de 1,500 plantas de *P. moranensis*, creciendo en paredes rocosas a un lado del camino, con condiciones sombreadas y semihúmedas (Alcalá et al., 2010). El tercer sitio se ubica en municipio de Taxco en el estado de Guerrero está localizado en el Parque Recreativo el Huixteco. En el sitio domina el estrato arbóreo del género *Quercus*. Se analizó un parche con alrededor de 700 individuos que crecían en una pared a un costado del camino, bajo una reducida incidencia de luz (Guzmán-Salgado, 2018; Figura 4).



**Figura 4.** Distribución de las tres poblaciones de *P. moranensis* muestreadas en México. La máxima distancia entre poblaciones es de alrededor de 60 Km, entre Zempoala y Taxco.

El primer muestro se llevó a cabo en mayo de 2019 (roseta invernal) y el segundo muestreo se realizó en agosto de 2019, el momento del pico de crecimiento de la roseta de verano. En cada uno de los sitios se realizó un muestreo de diez plantas sanas, repartidas en cada una de las poblaciones que componían un parche colectando individuos con una distancia mínima de un metro. Cada planta fue cuidadosamente separada de la pared de roca seleccionando aquellas sin signos aparentes de daño por patógenos o herbívoros en raíces y hojas. Posteriormente, se colocó cada planta en un recipiente de vidrio esterilizado y se transportaron en una hielera de 12 L a una temperatura de 4°C para su procesamiento en el laboratorio dentro de las 24 horas posteriores a la colecta.

#### **6.4. Determinación de las propiedades físicas del suelo**

En cada una de las tres localidades se consideraron diez subsitios. El suelo de los subsitios fue tamizado individualmente para la determinación del porcentaje del contenido de humedad en el suelo, por lo que se pesaron 5 gr de suelo en charolas de aluminio para posteriormente ser colocados en una estufa a 105 °C por 72 hrs,

posteriormente las muestras fueron nuevamente pesadas para determinar el porcentaje de humedad, siendo calculado con la fórmula:

$$\text{Contenido de humedad\%} = \frac{w1 \times w2}{w2} \times 100$$

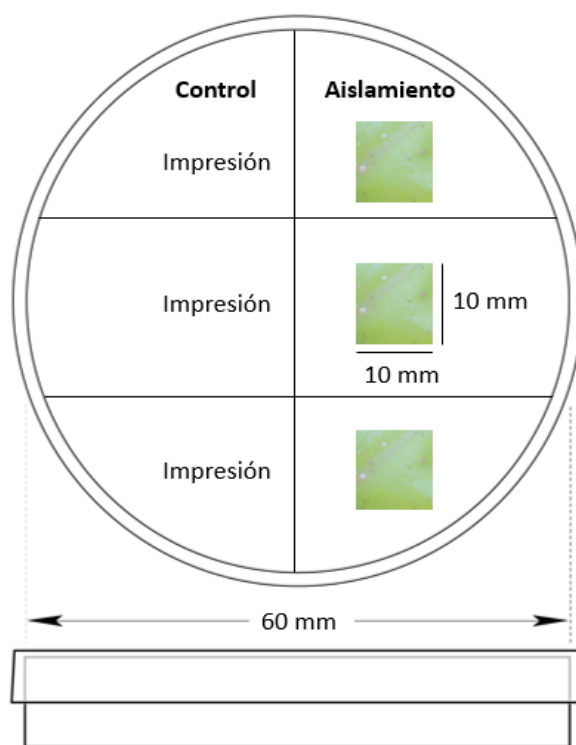
*Donde: w1=peso inicial y w2= peso final después de 72 hrs*

Para determinar el pH se preparó una suspensión de suelo-agua destilada en una proporción de 1:2.5 por duplicado. Fue necesario tomar 10 gr de suelo tamizado en un tubo cónico para centrifuga añadiendo 25 mL de agua destilada, cada una de las muestras se dejaron en agitación durante 18 hrs sobre un agitador magnético, finalmente se determinó el pH con un potenciómetro. Con cada uno de los diez subsitios de las tres localidades se analizaron las propiedades físicas del suelo (densidad aparente, densidad real, porosidad, arenas, limos, arcilla, capacidad de campo, punto de marchitez, capacidad de retención de agua y temperatura), en el Departamento de Ciencias Ambientales y del Suelo del Instituto de Geología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

#### **6.5. Aislamiento de hongos endófitos**

Para garantizar un buen aislamiento de los hongos endófitos de los órganos de hoja y raíz, se optimizó la esterilización de la superficie de las plantas seleccionadas para el estudio (Schulz y Boyle, 2005). Las plantas se lavaron con agua del grifo por 10 min con la finalidad de eliminar el exceso de suelo y detritos. Dentro de una campana de flujo laminar las plantas se pasaron por un tren de desinfección, consistiendo en una esterilización superficial por agitación vigorosa en etanol (95 %, 1 min), seguido de una inmersión en hipoclorito de sodio al (10 %) suplementado con Tween 80® (0.1 % / 100 mL, 10 min) y una segunda inmersión en etanol (95 %, 1 min). Finalmente, las plantas se lavaron en agua destilada estéril por triplicado (ca., 2 min), se desecharon los bordes de cada tejido en donde posibles endófitos podrían haber sido eliminados debido al tren de desinfección y se colocaron sobre sanitas estériles ( Quilliam y Jones, 2010; Glenn y Bodri, 2012; Lee et al., 2014).

Para evaluar la efectividad del tren de desinfección de la superficie de los órganos de la planta, se realizó una “prueba de impresión de hoja y raíz”. La prueba consistió en cortar piezas (10 mm<sup>2</sup>) de los órganos desinfectados bajo condiciones asépticas y se realizó una impresión en una caja de Petri de 60x15 mm con medio agar dextrosa Sabouraud (BDBioxon), la cual estaba marcada por la mitad (lado izquierdo control y lado derecho aislamiento) (Figura 5). Una vez realizada la impresión, las piezas se colocaron en la caja de Petri y fueron selladas con parafilm manteniéndolas a una temperatura de 27 °C ± 2 °C, en condiciones de oscuridad. El nulo crecimiento de microorganismos en el control garantizó la efectividad del tren de desinfección. El monitoreo se llevó a cabo de 15 a 20 días, cada 24 horas y en presencia de algún endófito, éste fue aislado bajo las mismas condiciones, sembrándolo en el centro de una caja de Petri de 60x15mm con medio agar dextrosa Sabouraud (BDBioxon).



**Figura 5.** Representación de las cajas de Petri utilizadas para el control y aislamiento de hongos endófitos.

Una vez aislados los hongos endófitos se clasificaron a través de sus características morfológicas macroscópicas, agrupándolos en unidades taxonómicas operativas

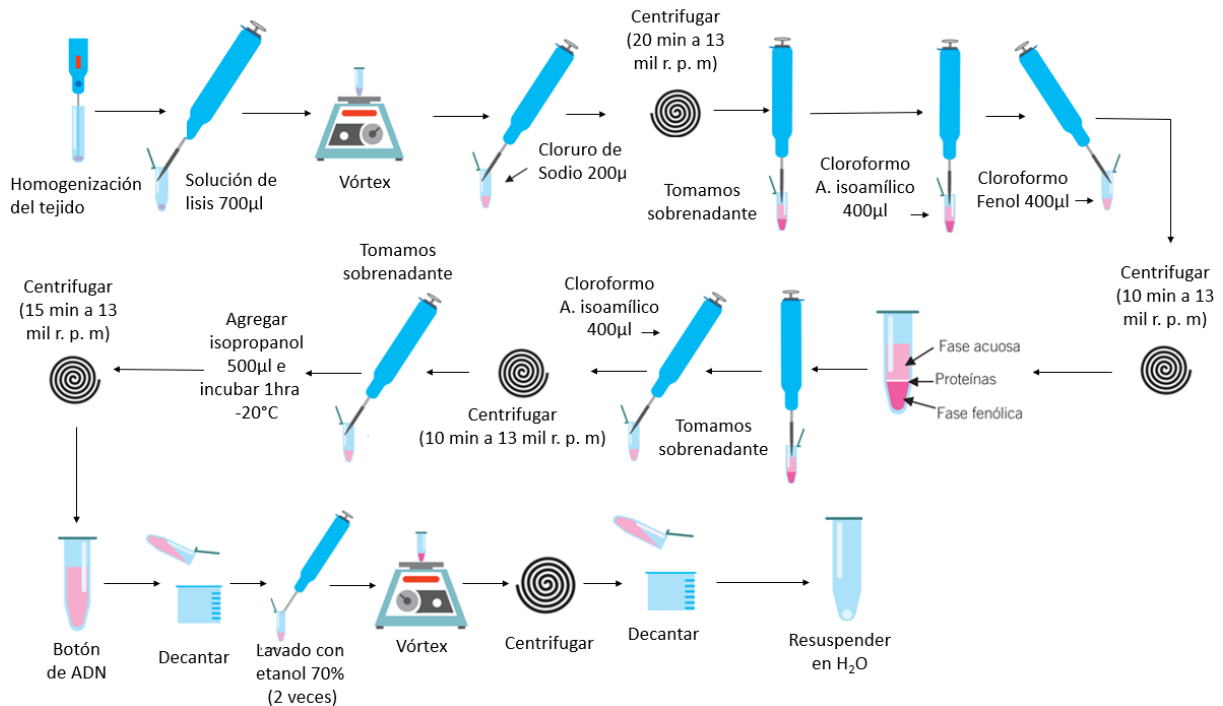


(OTU) (Higgins et al., 2014). El análisis morfológico se llevó a cabo cultivando los aislamientos en agar dextrosa Sabouraud. Cada una de las colonias se clasificaron conforme a su tamaño, color, consistencia, superficie y forma (Mier et al., 2013).

### **6.7.1. Extracción de ADN fúngico**

El ADN fue extraído de micelio cultivado en medio líquido (extracto de malta, peptona de caseína y dextrosa), a una temperatura de 30 °C a 250 rpm por aproximadamente 15 días. Se tomaron 0.75 mg de micelio y se introdujo en nitrógeno líquido, para su maceración con ayuda de pistilos. Una vez macerado se le añadieron 700 µL de solución de lisis (Tris acetato 40 mmol, acetato de sodio 20 mmol, EDTA 1 mmol y SDS 1 %) y 200 µL NaCl 5 M, para ser centrifugado por 20 min a 13,000 rpm. El sobrenadante fue separado en un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, adicionándole 400 µL de cloroformo alcohol isoamílico (24 ml de cloroformo y 1 ml de alcohol isoamílico) y 400 µL cloroformo fenol (25 ml de cloroformo y 25 ml de fenol), se centrifugó por 10 min a 13,000 rpm, con la finalidad de la separación de los ácidos nucleicos se utilizó la fuerte tendencia hidrofílica de los grupos fosfatos para separarlos en medios acuosos, mientras que las proteínas y los lípidos, se separaron en los solventes orgánicos. Al sobrenadante recuperado del paso anterior, en otro tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, se adicionó 400 µL de cloroformo alcohol isoamílico y este fue centrifugado por 10 min a 13,000 rpm. Finalmente, el sobrenadante fue recuperado en otro tubo de microcentrífuga de 1.5 mL (Protocolo tomado y modificado de Velázquez et al., 2014).

Para la precipitación del ADN, se añadieron 500 µL isopropanol y se incubó a -20 °C por 1 hora, lo que permitió que el ADN se plegará y, precipitara. Finalmente se centrifugó 15 min a 13,000 rpm, los restos de isopropanol fueron eliminados con lavados de etanol al 70 % y el remanente se eliminó con un Termo-block a 65 °C por 15 min. Al ADN obtenido se le agregó 40 µL de agua inyectable (Velázquez et al., 2016). La calidad y cantidad de ADN fue verificado por espectrofotometría con un Epoch reader (BioTek instruments Inc, Vermont, EUA) a 280/260 nm, y así mismo, por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, teñido con Bromuro de Etidio (0.1 µg / ml-1), visualizándose bajo luz UV (Figura 6).



**Figura 6.** Extracción de ADN por el método fenol-cloroformo (tradicional).

### 6.6. Secuencias de consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas (ERIC-PCR)

Con el propósito de verificar la clasificación morfológica realizada, se utilizó la técnica de consenso intergénico repetitivo enterobacteriano (ERIC-PCR). La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo con los cebadores ERIC1R (5'- ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C -3') y ERIC2 (5'- AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G -3') (Versalovic et al., 1991). La reacción de PCR fue ajustada a un volumen final de 20 µl conteniendo 1 µL de ADN genómico (50 ng/µl), 1 µL de cada cebador (10 pmol/µl), 10 µL Taq DNA Polimerasa *Master Mix 2X* (ThermoFisher) y 7 µL de agua esterilizada ultrapura. Se utilizó el siguiente programa de amplificación por PCR: una desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min seguido de 35 ciclos por 94 °C por 1 min, 46 °C por 1.30 min, 72 °C por 2 min y una extensión final de 72 °C por 8 min.

Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis a 100 V por 40 min en gel de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio (0.1 µg/ml<sup>-1</sup>) con buffer TAE al 1x para su visualización en luz UV en el foto documentador y comparadas con un marcador de 1 kb (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder) para la estimación del tamaño. El patrón de bandeo por cada aislado fue transformado en una matriz binaria basada en

la presencia (1) o ausencia (0) de cada fragmento amplificado con el programa PyElph versión 1.4, y se compararon según su perfil, basado en el coeficiente de disimilitud de Jaccard y el método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) para la construcción de un dendrograma para los datos concatenados.

## 6.7. Identificación molecular de los hongos endófitos

### 6.7.1. Amplificación por PCR

Los hongos endófitos fueron identificados a través de los marcadores moleculares de los dominios D1/D2 de la subunidad grande ribosomal (LSU 28S) rADN (Figura 7).



**Figura 7.** Representación esquemática de las regiones 28S D1/D2 de rADN (Raja et al., 2017).

La amplificación del ADN de los aislados se realizó a través de PCR mediante un termociclador (Bio-rad, T100™). Los dominios D1/D2 de la subunidad grande ribosomal 28S fueron amplificados usando los cebadores D1/D2R (TTGGTCCGTGTTTCAAGACG) y D1/D2U (GCATATCAATAAGCGGAGGA) (Boyandin et al., 2013; Raja et al., 2017). La reacción de PCR fue ajustada a un volumen final de 20 µl conteniendo 1 µL de ADN genómico (50 ng/µl), 1 µL de cada cebador (10 pmol/µl), 10 µL Taq DNA Polimerasa *Master Mix* 2X (ThermoFisher) y 7 µL de agua esterilizada ultrapura. El programa de amplificación incluye una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min seguida de 30 ciclos de 94 °C por 30 seg, 55 °C por 45 seg, 72 °C por 1min y una extensión final por 72 °C por 10 min. La calidad y cantidad del producto de PCR fue verificado por espectrofotometría con un Epoch reader (BioTek instruments Inc, Vermont, EUA) a 280/260 nm, y así mismo, por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, teñido con Bromuro de Etidio (0.1 µg/ml-1), visualizándose bajo luz UV.

### **6.7.2. Secuenciación y ensamble de secuencias**

Los productos de PCR fueron secuenciados por el método de Sanger por Macrogen Inc. (Seul, Corea del Sur). Las secuencias de ADN obtenidas con cada cebador se inspeccionaron individualmente con el programa Bioedit v6.0.6. Las secuencias se editaron y ensamblaron, para obtener una secuencia de consenso para cada aislado con el programa Bioedit v6.0.6. Las secuencias se registraron en el *Genbank* del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica), para posteriormente proceder a su alineación con las bases de datos del *Genbank* mediante un Blastn, para poder comparar las secuencias de los hongos endófitos aislados con las secuencias de la base de datos. Se seleccionaron secuencias del NCBI con valores de cobertura e identidad mayores al 99 % y 92 % respectivamente, las cuales fueron utilizadas para los análisis filogenéticos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

### **6.8. Análisis Filogenéticos**

Para la hipótesis filogenética las secuencias se alinearon y editaron a través de método MUSCLE implementado en el programa Unipro UGENE v.34.0 en el portal CIPRES. La elección del modelo evolutivo que mejor se ajusta a las secuencias se realizó usando IQ-TREE en XSEDE v. 1.6.10, considerando un criterio de información Bayesiano (BIC) y un número de réplicas de Bootstrap de 1,000.

Para la inferencia filogenética de Máxima Verosimilitud se utilizó IQ-TREE en XSEDE v. 1.6.10, se estimaron los soportes de las ramas mediante un Bootstrap (1,000 réplicas) y se establecieron los valores de gamma y sitios invariables. El análisis de inferencia Bayesiana se llevó a cabo en Mr.Bayes en XSEDE v. 3. 2. 7a. mediante ocho cadenas de Monte Carlo Markov (MCMC), con una búsqueda aleatoria y 10 millones de generaciones, con un muestreo a partir de una frecuencia de 1,000 árboles. Todos los puntos de muestreo (25 mil) antes de llegar a la fase estacionaria se descartaron como “burnin” y con los árboles restantes, dentro de la fase estacionaria se realizó un consenso (samplefreq=1,000) y se calculó, la probabilidad posterior (PP) de la filogenia. Se evaluaron las cadenas de MCMC en el programa Tracer v.1.7.1, para garantizar que el número de generaciones fueran suficientes para

alcanzar la fase de estacionalidad. Los clados de máxima verosimilitud con un soporte de Bootstrap igual o mayor a 70 % y valores de PP mayores de 0.90, fueron considerados con un fuerte valor de soporte. Los árboles filogenéticos obtenidos se editaron en el portal “*Interactive Tree of Life*” (ITOL) (<https://itol.embl.de/>).

### **6.8.1. Análisis de delimitación de especies y distancias genéticas**

Se realizó un análisis de un solo locus, “multi-rate Poisson Tree Processes” (mPTP), que asume una tasa de especiación constante con diferentes tasas coalescentes intraespecíficas y se realizó el muestreo de las cadenas de MCMC, para obtener los valores de soporte (Kapli et al., 2017). El análisis se desarrolló con un árbol filogenético de inferencia Bayesiana y máxima verosimilitud, enraizado como entrada en el servidor web (<https://cme.h-its.org/exelixis/software.html>). Se asumió una delimitación de modelos nulos, una longitud mínima de las ramas de 0.0001 y para las cadenas de MCMC se determinó eliminar de la fase de “burnin” dentro de los primeros 1,000 árboles y se muestreó cada 1,000 árboles una vez alcanzado la fase estacionaria, de un total de 100 mil generaciones.

### **6.9 Análisis estadísticos**

Para determinar la tasa de infección (TI) de los hongos endófitos aislados en cada una de las poblaciones (Zempoala, Cuernavaca y Taxco) de plantas carnívoras, órganos (raíz y hoja) y roseta de verano e invierno (Fang, 2013; Win et al., 2018), se realizó la siguiente ecuación:

$$TI = \frac{\text{Número de segmentos colonizados por hongos}}{\text{Número total de segmentos utilizados}} \times 100$$

Con el programa STATISTICA v. 7, se analizó mediante un modelo lineal generalizado el efecto de las poblaciones (Zempoala, Cuernavaca y Taxco), órganos (raíz y hoja) y rosetas (verano e invierno), sobre la tasa de infección de los hongos endófitos aislados de la planta carnívora *P. moranensis*. En este modelo se declaró un error tipo Poisson y una función logarítmica de ligamiento.

Además de evaluar si la tasa de infección varía a nivel espacial, temporalmente y entre tipos de órganos, en este trabajo se realizó una comparación de la comunidad de hongos presentes en las poblaciones, órganos y rosetas. Para ello se utilizó el análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS por sus siglas en inglés) basado en la presencia y ausencia de los aislados a través de las distancias de Manhattan en el programa RStudio ver. 1.2.5019 (RStudio Team (2019). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>) para cada uno de los tres factores. Se implementó un análisis de componentes principales (PCA) para poder describir las propiedades físicas del suelo de cada uno de los sitios de estudio, lo que nos permitió reducir el número original de variables a un conjunto de componentes para ello se utilizó el programa InfoStat ver. 20202 (Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>)

## 7. Resultados

### 7.1. Aislamiento de hongos endófitos y clasificación

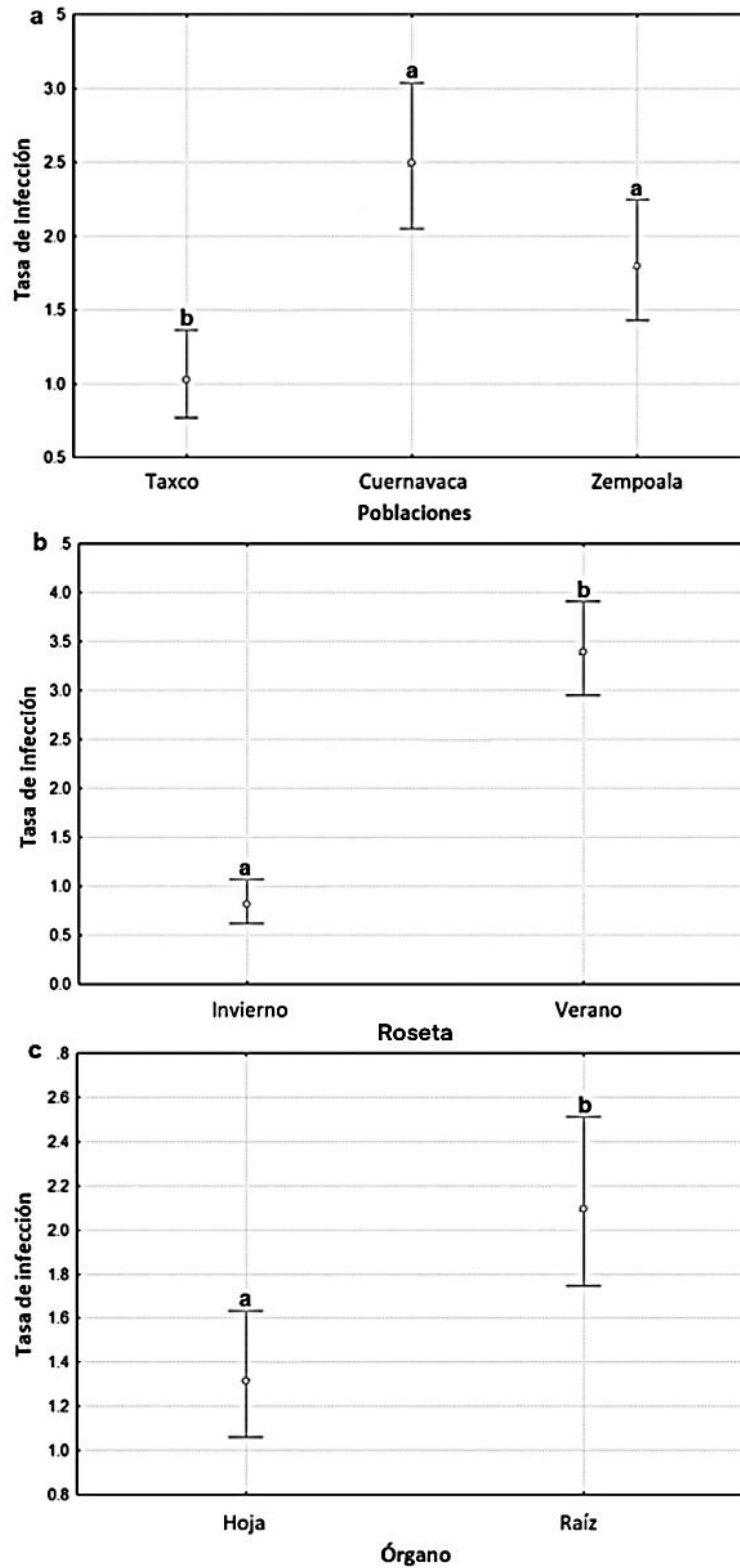
Del total de las 60 plantas de *P. moranensis* colectadas en los tres sitios y en roseta de verano e invierno, un total de 88 hongos endófitos fueron aislados de 360 fragmentos analizados (180 muestras de hoja y 180 muestras de raíz). El número de aislados difirió por roseta y localidades. Los hongos endófitos se clasificaron en 70 OTUs mediante análisis morfológicos, y se lograron crecer en el segundo pase en medio nutritivo 56 de los 70 OTUs (Tabla 5).

**Tabla 5.** Número de hongos aislados en la roseta de verano e invierno en los diferentes órganos (hoja y raíz) de *P. moranensis* en los sitios de estudio Zempoala, Cuernavaca y Taxco.

Variable	Zempoala verano	Cuernavaca verano	Taxco verano	Zempoala invierno	Cuernavaca invierno	Taxco invierno	Total
Total de aislados	22	37	13	6	7	3	88
Total de OTUs	20	24	13	5	5	3	70
Total de OTUs (crecieron)	18	19	9	4	4	2	56

### 7.2. Tasa de infección de hongos endófitos

Alrededor del 40 % de las plantas fueron infectadas por hongos endófitos. El porcentaje promedio de la tasa de infección difirió entre poblaciones ( $X^2_{(2)} = 30.34$ ,  $P < 0.00001$ ). El porcentaje de infección observado en Taxco (13 %), se diferenció significativamente de las poblaciones de Cuernavaca y Zempoala con el 31.66 y 23.33 %, respectivamente (Figura 9a). La tasa de infección de hongos endófitos varió significativamente según el tipo de roseta ( $X^2_{(1)} = 88.29$ ,  $P < 0.00001$ ). La roseta de verano mostró una mayor tasa de infección de hongos endofíticos, en comparación con la roseta de invierno (37.22 % en verano y 8.88 % en invierno) (Figura 9b). Las diferencias entre los órganos fueron significativas ( $X^2_{(1)} = 14.23$ ,  $P = 0.00016$ ). La hoja obtuvo un menor porcentaje en la tasa de infección de 17 %, mientras que la raíz alcanzó un porcentaje de 28.33 % (Figura 9c).

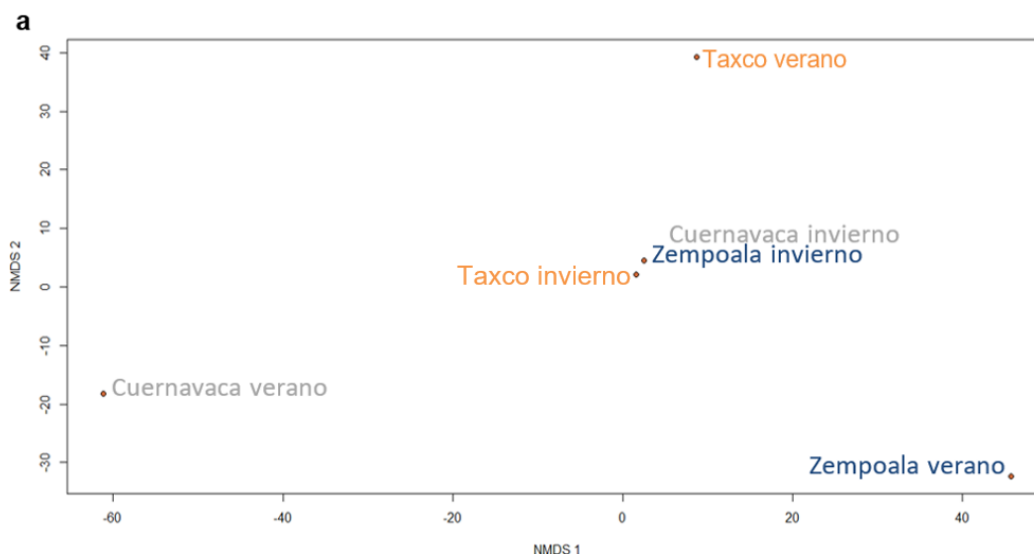


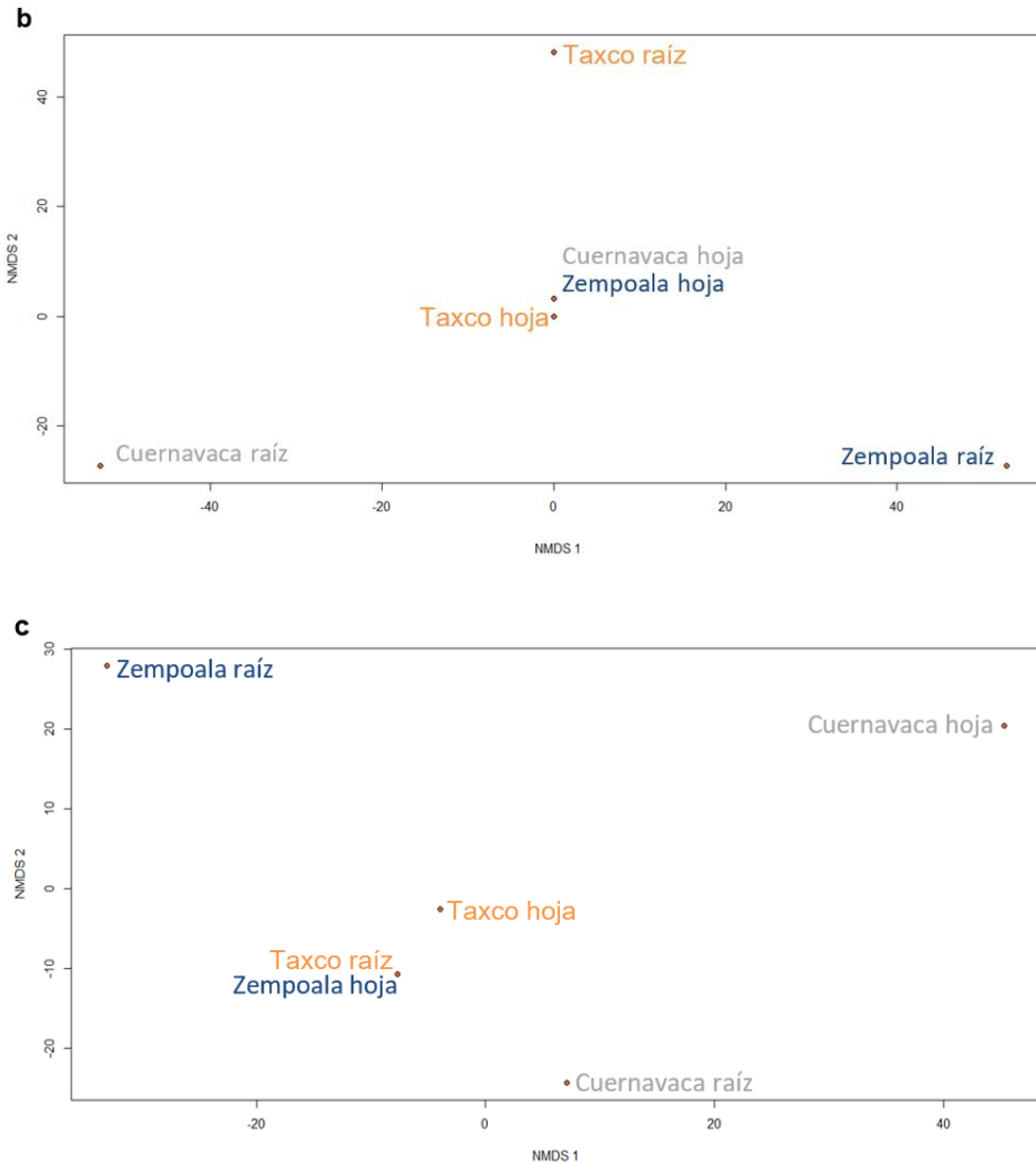
**Figura 8.** Valores medios  $\pm$  1 error estándar para el porcentaje de la tasa de infección por los hongos endófitos aislados de la planta carnívora *P. moranensis*. (a) Porcentaje de tasa de infección de las poblaciones de muestreo Taxco, Cuernavaca y Zempoala, (b) entre la roseta de invierno y verano y (c) de acuerdo con el órgano (hoja y raíz).



### 7.3. Composición de la comunidad de hongos endófitos en el espacio y en el tiempo, además entre tipo de órganos

La ordenación del análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS), a través de las distancias de Manhattan calculadas, reveló una estructura clara de las comunidades endofíticas en cada una de las rosetas, ya que las rosetas de verano mostraron mayor variabilidad a nivel espacial que la observada para las rosetas invernales (Figura 9a). El índice de esfuerzo de 0.0079 (es decir, la representación proporcional de falta de ajuste entre la matriz de distancia y la solución NMDS) mostró valores óptimos para la representación de los datos. En la comparación de las poblaciones, pero a nivel de órganos para la roseta de invierno, se encontró mayor variabilidad a nivel espacial entre las raíces que entre las hojas, mostrando estas últimas mayor similitud (índice de esfuerzo de 0.0092; Figura 9b). Cabe hacer notar que observando las magnitudes de los ejes 1 y 2 de ambas figuras, se observa un mayor efecto de la heterogeneidad temporal sobre la estructuración de los endófitos que la registrada para el efecto del tipo de órgano en la roseta invernal. Finalmente, en contraste, el poder para diagnosticar diferencias para la roseta de verano con respecto a los órganos fue menor, ya que las poblaciones tendieron a diferenciarse independientemente de la presencia de hojas o raíces (índice de esfuerzo de 0.0046; Figura 9c).



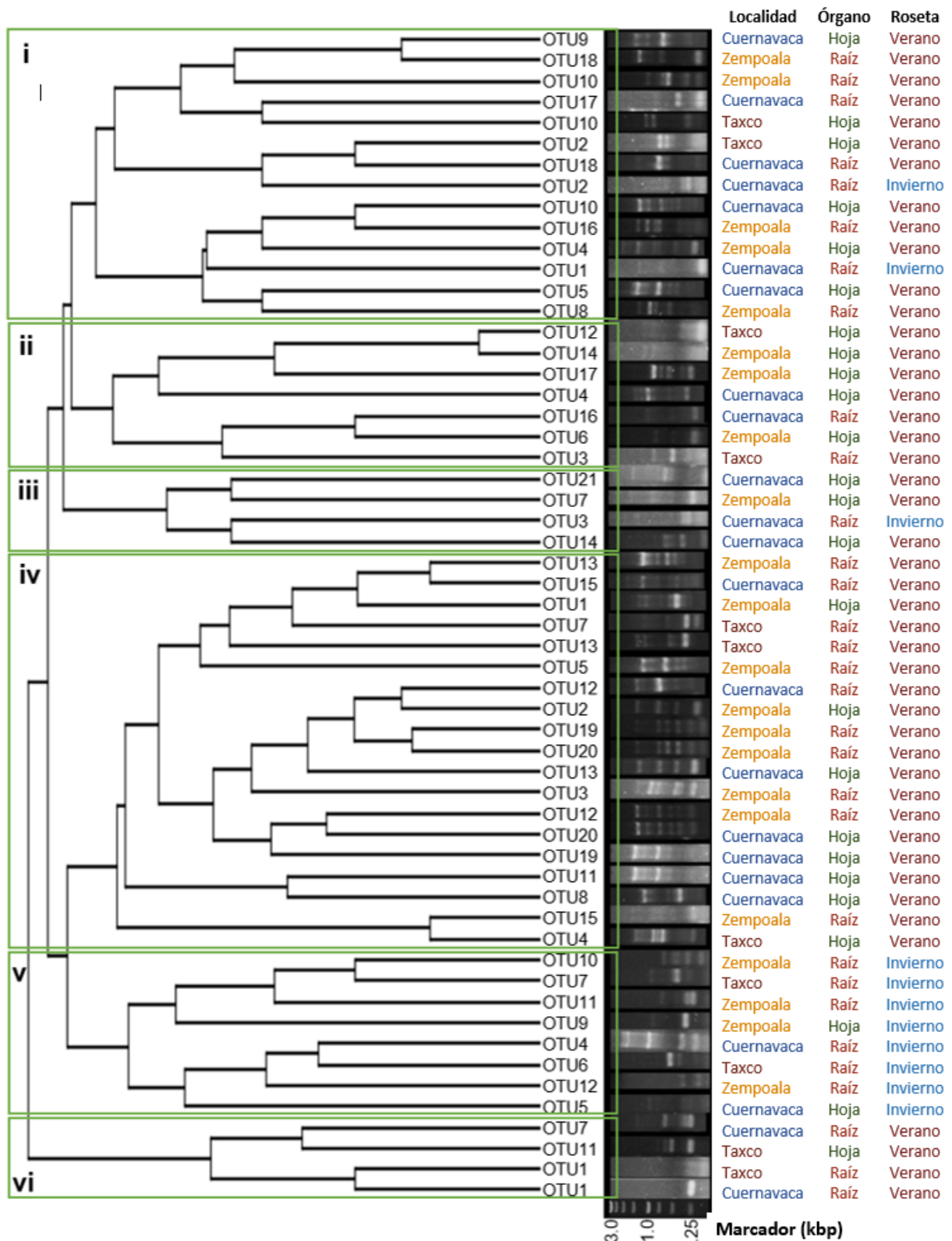


**Figura 9.** Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de los hongos endófitos asociados a la planta carnívora *P. moranensis*, basado en la distancia de Manhattan. La gráfica a) muestra el agrupamiento de los hongos endófitos entre los sitios (Zempoala, Cuernavaca y Huixteco) considerando temporada de invierno y verano. En las gráficas b y c, se muestra el agrupamiento de los hongos endófitos conforme a los órganos hoja y raíz en cada una de las temporadas de invierno y verano, respectivamente.

#### 7.4. Perfiles electroforéticos generados por ERIC-PCR

Encontramos un total de 36 bandas polimórficas producto de la amplificación y se recuperaron seis grupos del análisis de UPGMA. Los grupos i, ii, iii, iv y vi incluyen hongos endófitos aislados de la roseta de verano, de los órganos (hoja y raíz) y de las tres poblaciones. En contraste al grupo v que estuvo conformado únicamente por

aislados de la roseta de invierno obtenidos de hoja y raíz, de las tres poblaciones, a excepción de los aislados OTU2 Cuernavaca raíz, OTU1 Cuernavaca raíz y OTU3 Cuernavaca raíz (Figura 10).



**Figura 10.** Perfiles electroforéticos generados por ERIC-PCR, y dendrograma derivado del agrupamiento UPGMA (C) para los aislamientos de hongos endófitos obtenidos de la planta carnívora *P. moranensis*.

### 7.5. Análisis filogenéticos

Con base en la clasificación de los 56 OTUs obtenido por el ERIC-PCR se eligieron 24 OTUs de los órganos de hoja y raíz, de la rosetas de verano e invierno de *P. moranensis* para su secuenciación. Se logró una amplificación aproximadamente de 580 pb del dominio D1/D2, del ADNr de la subunidad grande ribosomal (LSU-28S). Las secuencias obtenidas se compararon con 58 secuencias correspondientes de taxones fúngicos de referencia de la base de datos del NCBI, seleccionadas considerando los criterios mencionados en materiales y métodos (Tabla 6). El modelo evolutivo que mejor se ajusta a las secuencias de acuerdo con el criterio de información Bayesiano fue TN+F+I+G4, donde el valor de gamma fue 0.588 y la proporción de sitios invariables fue del 0.281. Las frecuencias nucleotídicas fueron: A = 0.2232, C = 0.2592, G = 0.3182 y T = 0.1994. En el análisis de máxima verosimilitud se obtuvo un valor de log de la probabilidad de L-5976.094.

**Tabla 6.** Comparación de las secuencias de hongos endófitos aislados de hoja y raíz de la planta carnívora *P. moranensis* de las tres poblaciones (Zempoala, Cuernavaca y Taxco) con relación a secuencias de la base de datos del NCBI.

OTUs	Órgano	Poblaciones	Roseta	Número de acceso	Identidad más probable	Secuencia NCBI	Cobertura (%)	Identidad (%)
OTU5.1	Hoja	Cuernavaca	Invierno	MW045337	<i>Bipolaris drechsleri</i>	MH877614.2	100	100
OTU5	Hoja	Cuernavaca	Invierno	MW045336	<i>Bipolaris drechsleri</i>	MH877614.1	99	100
OTU7	Raíz	Taxco	Invierno	MW045339	<i>Didymella pedicelae</i>	MH874903.1	99	99.83
OTU6	Raíz	Taxco	Invierno	MW045338	<i>Neomollisia gelatinosa</i>	NG_066452.1	97	98.31
OTU10	Raíz	Zempoala	Invierno	MW045341	<i>Penicillium nothofagi</i>	MH877222.1	100	99.66
OTU12	Raíz	Zempoala	Invierno	MW045343	<i>Penicillium montanense</i>	MH869904.1	99	100
OTU12.1	Raíz	Zempoala	Invierno	MW045344	<i>Penicillium montanense</i>	MH869904.2	99	99.67
OTU9	Hoja	Zempoala	Invierno	MW045340	<i>Aspergillus falconensis</i>	MH873935.1	99	99.66
OTU2	Raíz	Cuernavaca	Invierno	MW045334	<i>Schizothecium carpnicola</i>	MH873758.1	99	99.17
OTU3	Raíz	Cuernavaca	Invierno	MW045335	<i>Astrocystis leucospermi</i>	EU552100.1	100	96.26
OTU11	Raíz	Zempoala	Invierno	MW045342	<i>Coniochaeta canina</i>	NG_042720.1	99	97.07
OTU1	Raíz	Cuernavaca	Invierno	MW045333	<i>Ijuhya vitellina</i>	NG_060350.1	99	95.06
OTU13	Raíz	Zempoala	Verano	MW045349	<i>Cercospora kikuchii</i>	MH866395.1	100	100
OTU12	Hoja	Taxco	Verano	MW045356	<i>Cladosporium scabrellum</i>	MH875394.1	100	92.82
OTU2	Hoja	Zempoala	Verano	MW045351	<i>Stagonosporopsis pini</i>	MK348019.1	100	99.8
OTU4	Hoja	Cuernavaca	Verano	MW045350	<i>Penicillium williamettense</i>	MH877080.1	100	100
OTU8	Raíz	Zempoala	Verano	MW045353	<i>Aspergillus neoglaber</i>	MH868937.1	100	100
OTU21	Hoja	Cuernavaca	Verano	MW045355	<i>Aspergillus neoglaber</i>	MH868937.1	100	100
OTU19	Hoja	Cuernavaca	Verano	MW045354	<i>Aspergillus fumigatus</i>	EF669931.1	100	100
OTU7	Raíz	Cuernavaca	Verano	MW045347	<i>Aspergillus niger</i>	EF661186.1	100	100
OTU18	Raíz	Cuernavaca	Verano	MW045345	<i>Ochroconis gamsii</i>	MH872893.1	99	94.32
OTU12	Hoja	Taxco	Verano	MW045346	<i>Coniochaeta marina</i>	MH017898.1	99	100
OTU7	Raíz	Taxco	Verano	MW045348	<i>Colleotrichum colombiense</i>	MH876878.1	100	98.2
OTU12	Raíz	Zempoala	Verano	MW045352	<i>Ijuhya vitellina</i>	NG_060350.1	100	96.32

El análisis bayesiano coincidió con el de máxima verosimilitud no reveló alguna asociación filogenética clara que permitiera separar los hongos endófitos presentes en la raíz de los observados en las hojas. Los aislamientos de hongos endófitos de *P. moranensis* identificados molecularmente corresponden a las clases *Dothidiomycetes*, *Leotiomycetes*, *Eurotiomycetes* y *Sordariomycetes* (Figura 11 y 12). En el análisis bayesiano los valores de soporte respaldan fuertemente la monofilia de las clases *Leotiomycetes*, *Eurotiomycetes* y *Sordariomycetes*, (PP>0.9). La clase *Dothidiomycetes* presentó un bajo nivel de soporte de las ramas, probablemente la inestabilidad de un solo clado que representa el orden *Venturiales*, podría indicar que no es un grupo monofilético.

Los *Dothidiomycetes* están representados por los órdenes *Capnodiales* (Clado I), *Pleosporales* (Clado II). *Venturiales* (Clado VIII). En el orden *Capnodiales*, el aislado OTU13 Ver\_raíz\_Zempoala se ubicó en el género *Cercospora* y OTU12 Verano (Ver)\_hoja\_Taxco formó un clado con hongos del género *Cladosporium*. En el orden *Pleosporales* el OTU5.1 Invierno (Inv)\_hoja\_Cuernavaca y OTU5 Inv\_hoja\_Cuernavaca formaron un clado soportado con el género *Bipolaris*. Mientras que los aislados OTU7 Inv\_raíz\_Taxco y OTU2 Ver\_hoja\_Zempoala se verificaron a nivel de familia con *Didymellaceae*, debido a que las relaciones con los géneros no están soportadas por los datos. El aislado OTU 18 Ver\_raíz\_Cuernavaca se confirmó que está estrechamente relacionado con el género *Ochroconis* en el orden *Venturiales* (PP=1 y Bootstrap=100). En la clase *Leotiomycetes* se incluyó al orden *Helotiales* (Clado IV), agrupando el aislado OTU6 Inv\_raíz\_Taxco al género *Neomollisia* con valores de soporte de PP=0.96 y Bootstrap de 85 (Figuras 11 y 12).

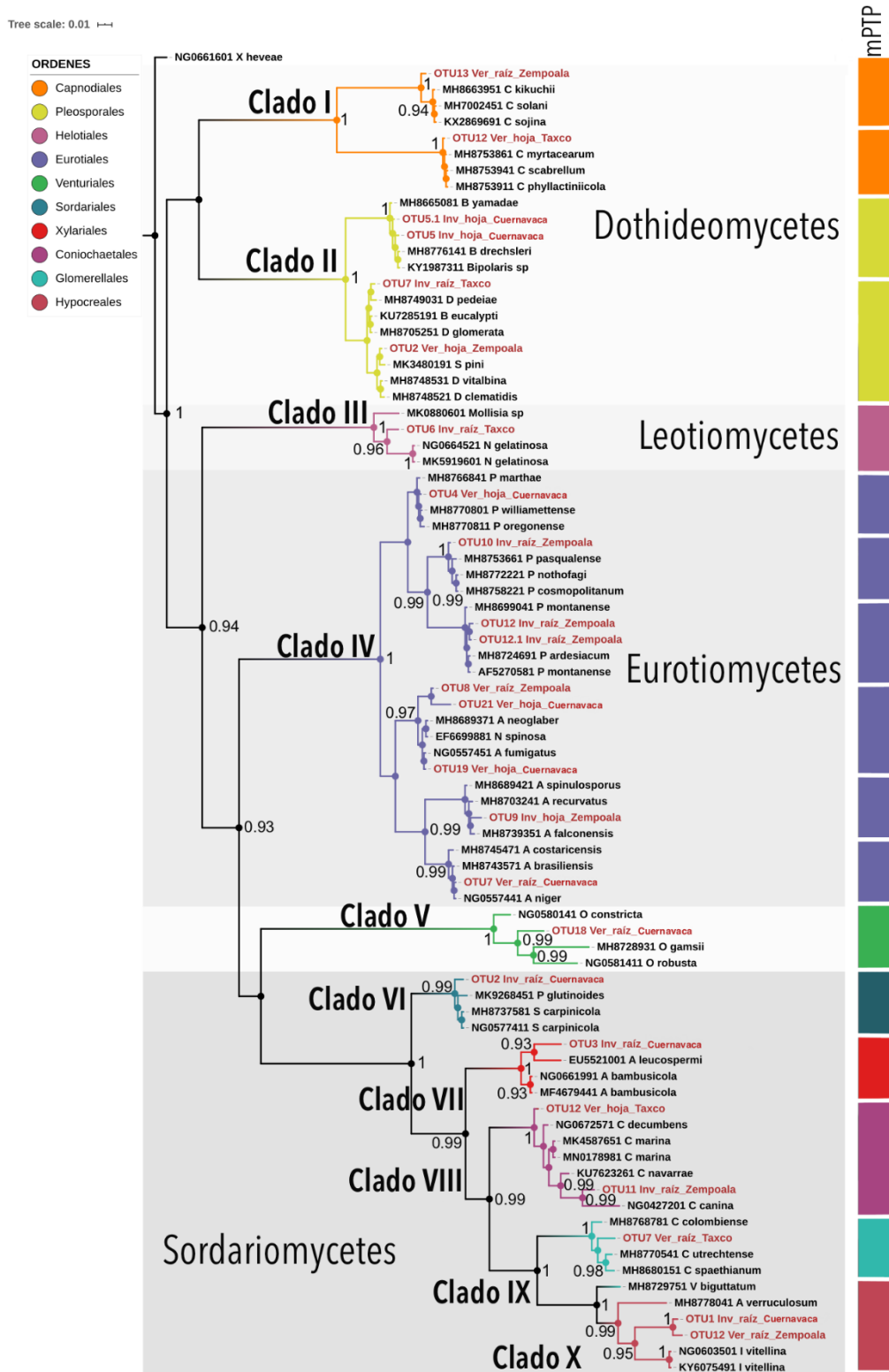
Nueve de los aislados, se agruparon en la clase *Eurotiomycetes* con el orden *Eurotiales* (Clado V) con soporte de Bootstrap de 100 y PP= 1. De los cuales, cuatro aislados (OTU4 Ver\_hoja\_Cuernavaca, OTU10 Inv\_raíz\_Zempoala, OTU12 Inv\_raíz\_Zempoala y OTU12 Inv\_raíz\_Zempoala) obtuvieron un mayor porcentaje de cobertura e identidad con el género *Penicillium*. Los otros cinco aislados (OTU8 Ver\_raíz\_Zempoala, OTU21 Ver\_hoja\_Cuernavaca, OTU19 Ver\_hoja\_Cuernavaca, OTU9 Inv\_hoja\_Zempoala y OTU7 Ver\_raíz\_Cuernavaca) presentaron considerables

porcentajes de cobertura e identidad, con el género *Aspergillus* con valores de soporte mayores a 0.97 y 95, de PP y Bootstrap respectivamente.

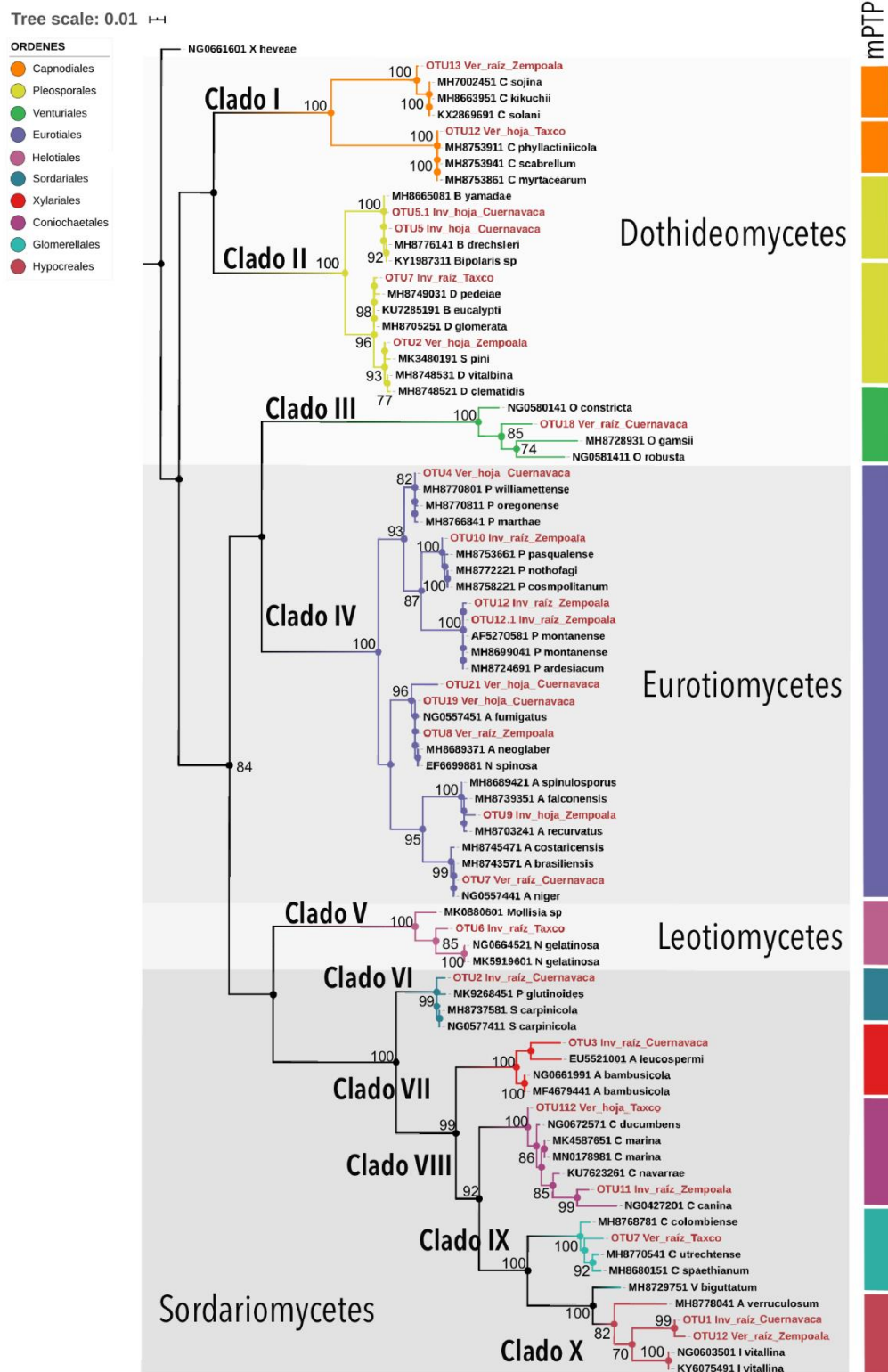
La clase *Sordariomycetes* incluye representantes de los órdenes *Sordariales* (Clado VI), *Xylariales* (Clado VII), *Coniochaetales* (Clado VIII), *Glomerellales* (Clado IX) e *Hypocreales* (Clado X) (PP>0.99 y Bootstrap>90). Dentro del *Sordariales*, el aislado OTU2 Inv\_raíz\_Cuernavaca solo se logró clasificar a nivel de familia (*Lasiosphaeriaceae*), lo mismo sucedió con el aislado OTU7 Ver\_raíz\_Taxco que fue clasificado dentro del orden *Glomerellales* (PP=1 y Bootstrap=100). En el Orden *Xylariales* se obtuvo un aislado (OTU3 Inv\_raíz\_Cuernavaca) ubicado dentro del género *Astrocystis* con valores de PP = 0.93. En el género *Coniochaeta* (orden Coniochaetales), se agruparon los aislados de OTU12 Ver\_hoja\_Taxco y OTU11 Inv\_raíz\_Zempoala (PP=1 y Bootstrap=100). Finalmente, los aislados OTU1 Inv\_raíz\_Cuernavaca y OTU12 Ver\_raíz\_Zempoala fueron básicamente idénticos (PP=1 y Bootstrap=99), estrechamente relacionados con el género *Ijuhya* del orden *Hypocreales*.

El resultado del análisis mPTP con el árbol de inferencia bayesiana delimitó 17 clados monofiléticos, coincidiendo con los análisis de inferencia bayesiana, debido a que cada uno de los linajes está conformado por más de una especie (Figura 11). Respecto al árbol de máxima verosimilitud, se obtuvieron 12 clados monofiléticos (Figura 12). De los 12 clados, 10 fueron reconocidos a nivel de orden mientras que el clado I y II, fueron diferenciados como dos linajes por clado como en los análisis filogenéticos.





**Figura 11.** Filograma de inferencia bayesiana mediante secuencias del dominio D1/D2, del ADNr de la subunidad grande (LSU-28S). El valor de soporte de la probabilidad posterior del análisis superior a 0.90 se muestran arriba de las ramas. La barra de escala hace referencia al número de sustituciones por sitio a la longitud de la rama.



**Figura 12.** Filograma de Máxima Verosimilitud mediante secuencias del dominio D1/D2, del ADNr de la subunidad grande (LSU-28S). El valor de soporte del análisis superior al 70% se muestra en los arriba de las ramas. La barra de escala hace referencia al número de sustituciones por sitio a la longitud de la rama.

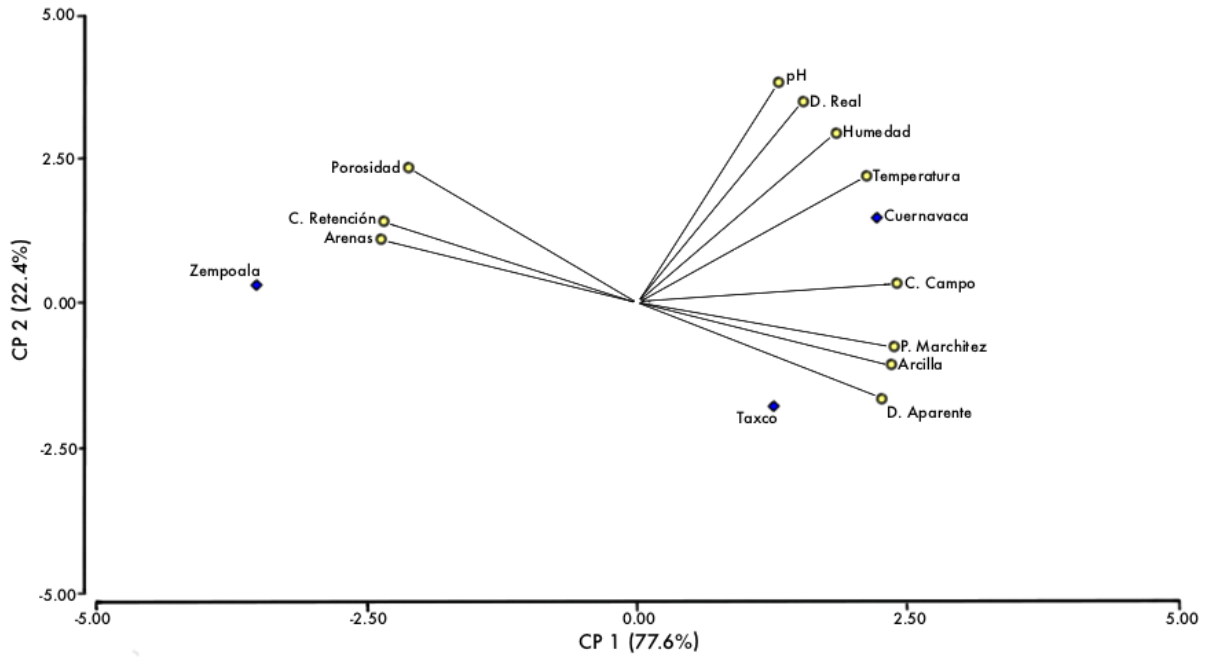
## 7.6. Análisis de las variables del suelo

El PCA de las propiedades físicas del suelo explicó el 100 % de la varianza con solo dos factores, con el 77.6 % explicado por el componente 1 y el 22.4 % por el componente 2. En la Tabla 7 se señalan las correlaciones de los componentes.

**Tabla 7.** Correlación de los componentes principales con cada una de las propiedad físicas del suelo-

<b>Variables</b>	<b>Componente 1</b>	<b>Componente 2</b>
Densidad aparente	0.93	-0.36
Densidad real	0.63	0.78
Porosidad	-0.86	0.51
Arenas	-0.97	0.24
Limos	0.97	-0.24
Arcilla	0.97	-0.24
Capacidad de campo	1.00	0.07
Punto de marchitez	0.98	-0.17
Capacidad de retención de agua	-0.95	0.31
Humedad	0.75	0.66
pH	0.53	0.85
Temperatura	0.87	0.49
Varianza	77.6 %	22.4

Los tres sitios de estudio mostraron diferencias ambientales con base en las variables analizadas en las muestras de suelo. Sobre el componente 1, la relación de Zempoala se diferenció al tener valores negativos para la capacidad de retención de agua, porosidad y porcentaje de arenas. En contraste, Cuernavaca y Taxco se agruparon de una manera más cercana y respondieron mayormente a los valores positivos de la capacidad de campo, seguido del punto de marchitez, porcentaje de arcilla, densidad aparente y temperatura (Figura 13).



**Figura 13.** Análisis de componentes principales para las propiedades físicas del suelo. Los valores de las propiedades físicas representan la contribución a la posición de los sitios de estudio a lo largo de los componentes principales.

## 8. Discusión

La interacción planta-endófitos ha generado nuevos planteamiento sobre la ecología de las plantas, ya que el efecto de los factores (bióticos y abióticos) no actúan simplemente sobre la planta en sí, sino más bien sobre la planta y la comunidad microbiana asociada (Rosenberg et al., 2009). En este estudio se aplicó un enfoque integrativo que permitió evaluar aspectos ecológicos y evolutivos de la interacción entre las plantas carnívoras con sus hongos endófitos. A continuación, se discuten los resultados más relevantes.

### 8.1. Taxonomía

Se obtuvieron setenta OTUs diferentes entre las cepas de hongos endófitos aisladas de *P. moranensis*. De los setenta OTUs se lograron crecer cincuenta y seis, de los cuales se corroboró su clasificación con los perfiles electroforéticos generados por la técnica de ERIC-PCR. Se identificaron representantes de al menos cuatro clases de dicaryomicota (*Eurotiomycetes*, *Leotiomycetes*, *Sordariomycetes* y *Dothideomycetes*) basándose en análisis filogenéticos de solo 24 OTUs. En este estudio, la ubicación filogenética de los endófitos coincidió generalmente con niveles taxonómico más altos (orden, familia) basados en la identificación mediante Blastn de secuencias de la región D1/D2.

Se observó que la clase *Dothideomycetes* fue un clado polifilético debido a la exclusión del género *Ochroconis* (OTU8 Ver\_raíz\_Cuernavaca). Estudios previos han reportarlo la clase *Dothideomycetes* como un grupo monofilético (Spatafora et al., 2006), sin embargo, ha sido inconsistentemente resuelta como un taxón monofilético, por lo que es necesario el aumento considerable en el muestreo de taxones y datos que permitan resolver con mayor claridad las relaciones filogenéticas de este grupo (Spatafora et al., 2006; Lutzoni et al., 2009). No obstante, esto requiere una mayor caracterización molecular, que está más allá del alcance del presente trabajo.

Este estudio, mostró que las raíces y hojas de la planta carnívora *P. moranensis* albergan al menos 13 géneros de hongos endófitos. Si bien, se han reportado especies de hongos endófitos en otras plantas carnívoras como *Drosera rotundifolia* (Quilliam y

Jones, 2010) y *Pinguicula vulgaris* (Quilliam y Jones, 2012) en Europa, *Sarracenia minor*, *S. oreophila*, *S. purpurea* y *S. psittacina* (Glenn y Bodri, 2012) en Nortamérica (EEUU), *Nepenthes mirabilis* (Lee et al., 2014), *N. ampullaria* (Lee et al., 2014; Wong, 2015) y *N. khasiana* (Naseem y Kayang, 2018) en Asia, este es el primer estudio para *P. moranensis* cuya distribución ocurre principalmente en México. Además de documentar cinco diferentes géneros de hongos endófitos (*Neomollisia* sp., *Coniochaeta* sp., *Ijuhya* sp., *Cercospora* sp. y *Ochroconis* sp.) por primera vez en plantas carnívoras.

De los 24 aislados identificados en este estudio, se encontró que los géneros *Bipolaris*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Astrocystis*. y *Cladosporium*, también se recuperaron tanto en raíz y hojas modificadas (jarras) de otras plantas carnívoras. Los resultados del presente trabajo concuerdan con los reportes en plantas carnívoras, quienes han considerado estos hongos como verdaderos endófitos debido a su presencia en diferentes estaciones, individuos, lugares y años (Quilliam y Jones, 2010, 2012; Glenn y Bodri, 2012; Lee et al., 2014; Wong, 2015; Naseem y Kayang, 2018), por lo que es probable que los hongos endófitos aislados también sean endófitos verdadero de *P. moranensis*.

## 8.2. Heterogeneidad ambiental

A través de los resultados obtenidos del análisis de componentes principales, se observó que los sitios de estudio son ambientalmente distintos en cuanto a los factores abióticos del suelo. A pesar de ser sitios más lejanos, Cuernavaca y Taxco mostraron ser más similares en cuanto a las características asociadas con la retención de agua. En particular, Zempoala mostró un porcentaje más alto de arenas y mayor porosidad con menor capacidad de retención de agua. Y aunque los tres sitios están orientados hacia norponiente, la pared de roca en la que crecen las plantas en Zempoala presenta mayor insolación directa entre las 11 y las 14 horas, por lo que el suelo en general es más seco y con mayor temperatura. A pesar de las diferencias estas no influyeron en la estructura de la comunidad de endófitos con relación al sitio reveladas por NMDS. Las variaciones en el suelo tampoco parecen explicar las diferencias entre poblaciones en la tasa de infección. Para esta variable, Taxco mostró el porcentaje más bajo (13

%) y se diferenci6 significativamente de las poblaciones de Cuernavaca y Zempoala con el 31.66 y 23.33 %, respectivamente. Esta falta de relaci6n se explica en general porque las mayores diferencias en la estructura de los hongos end6fitos reveladas por el NMDS, se observaron entre la temporada lluvias y la seca (Fig. 9a). Asimismo, la colonizaci6n por end6fitos en la planta carn6vora *P. moranensis* difiri6 m6s ampliamente entre la roseta de verano e invierno, debido a que la roseta de invierno mostr6 una menor tasa de infecci6n de hongos end6fitos muy baja (8.88 %) en comparaci6n con la registrada en la roseta de verano (37.22 %).

Aunque no se cuenta con un an6lisis de suelo para la 6poca seca, es probable que existan diferencias notables en la humedad del suelo entre los meses del verano y los de invierno. Y estas diferencias podr6an explicar mayormente las diferencias en la comunidad de end6fitos, porque la humedad del suelo en general es una variable asociada fuertemente con la presencia de hongos, tanto en el suelo como en las plantas (Bissett y Parkinson, 1979; Modibb et al., 2017). Estos resultados apoyar6an la hip6tesis de que la heterogeneidad ambiental tiene mayor poder sobre la estructuraci6n de las comunidades de hongos end6fitos en *P. moranensis* que la heterogeneidad espacial. Los resultados podr6an explicarse en funci6n de la disponibilidad de agua, luz y nutrientes, que, a su vez depende del estado metab6lico de la planta (Mocali et al., 2003; Egamberdieva et al., 2017; Wang et al., 2001).

Durante los meses de verano, cuando la fotos6ntesis es m6s activa debido a la presencia de hojas, adem6s de la captura presas, aparecen muchos grupos end6fitos o estuvieron representados con mayor frecuencia, mientras que en la roseta de invierno los aislamientos detectados casi desaparecieron durante los meses de verano, posiblemente debido a la limitaci6n de los carbohidratos obtenidos de la fotos6ntesis, por lo que se sugiere que los hongos presentes en invierno podr6an estar implicados en la obtenci6n de nutrientes a partir del suelo (Kirk *et al.*, 2004). Por otra parte, podr6an conferir tolerancia a factores abi6ticos de estr6s, promoviendo que la planta tenga una respuesta favorable a los factores abi6ticos, lo cual podr6a estar contribuyendo a la supervivencia de la planta (Sherameti *et al.*, 2008). Este hallazgo sugiere una adaptaci6n de la comunidad de end6fitos a las condiciones cambiantes

del hábitat de la planta, aunque esto no se puede dilucidar sobre la base de los datos disponibles.

### **8.3. Diferencias entre órganos**

Con base a la información obtenida del NMDS mostraron que la identidad de los hongos aislados no fue diferenciada por el tipo de órgano, sin embargo, la tasa de infección en raíz (28.33 %) presentó diferencias significativas con relación a la hoja (17%). Estos resultados apoyan parcialmente la hipótesis de que el tipo de órgano determinará los hongos endófitos presentes en la planta carnívora *P. moranensis*.

Aunque la captura de presas en *P. moranensis* se realiza a través de la superficie adhesiva de sus hojas, las diferencias en la tasa de infección con un alto porcentaje en la raíz, posiblemente reflejen la habilidad de *P. moranensis* para absorber nutrientes tanto a través de la captura de presas como mediante el sistema radicular, como ha sido reportado para otras especies de plantas carnívoras (Adamec, 2002). Por lo que no es de sorprenderse que esto también propicie una mayor tasa de infección en la raíz (Quilliam y Jones, 2010). Además de que los componentes de cada uno de los órganos pueden influir en la colonización de los hongos, esto puede resultar en, diferencias en la composición y diversidad de hongos endófitos, siendo un reflejo de su capacidad para utilizar o sobrevivir dentro de un órgano en particular (Fang et al., 2013; Wu et al., 2013).

### **8.4. Posible papel de los hongos endófitos en *P. moranensis***

Se sabe que algunos endófitos confieren distintos beneficios a su hospedero (Yan et al., 2019), particularmente los géneros endófitos encontrados en *P. moranensis*, se han reportado en otras plantas carnívoras con actividades enzimáticas como celulasa, quitinasa y lipasa (Lee et al., 2014). Esto sugiera una posible implicación en la degradación de la cutícula de las presas (Butt et al., 2016) y se sugiere que podrían estar involucradas en la degradación de la hojarasca (Pavlovic et al., 2011). En las hojas de *P. moranensis*, ambas actividades podrían realizarse conjuntamente, ya que además de la digestión de las presas se ha demostrado que las glándulas digestivas



son capaces de la degradación de granos de polen y de algunos restos vegetales que quedan retenidos en la superficie adhesiva.

Por otra parte, es probable que los endófitos puedan cumplir propiedades antimicrobianas implicadas en un posible incremento a la resistencia a patógenos (Lee et al., 2014), similar a lo reportado en otros endófitos con actividad antimicrobiana los cuales suprimen la mitosis de microorganismos patógenos (Soliman et al., 2015; Terhonen et al., 2016). A diferencia de otras especies de plantas en las que es común observar pérdida de tejido área debido al ataque de hongos, bacterias o virus, las hojas de las plantas de esta especie suelen apreciarse libre de daño por herbívoros y por patógenos (R. E. Alcalá, comunicación personal).

No existe información que permita saber si *P. moranensis* tiene la habilidad de obtener nutrientes por ambas vías, por la captura de presas y por el sistema radicular. Algunas especies de plantas carnívoras han evolucionado contundentemente hacia la carnivoría, por lo que su sistema radicular es muy reducido y limitado básicamente a funciones de anclaje. Otras especies, por el contrario, han mantenido la habilidad de obtener nutrientes mediante la raíz, por lo que la carnivoría parece facultativa (Adamec, 2002). En ese sentido, la presencia de hongos en la raíz y de una tasa de infección mayor que la observada en las hojas, resultó sugerente de esta habilidad en *P. moranensis*.

La presencia de hongos endófitos en las rosetas de resistencia quizá representa un reto mayor, dado que se espera que las funciones vitales de las plantas en los meses invernales en los que escasea el agua se vean disminuidas. A pesar de que la interacción entre endófitos y plantas carnívoras ha comenzado a explorarse, el papel que pueden jugar los hongos endófitos en ellas permanece prácticamente desconocido. Los resultados derivados de este trabajo junto con los reportados en la literatura sugieren que la prevalencia de los hongos endófitos en plantas carnívoras es posiblemente el resultado de una evolución conjunta (Rodríguez et al., 2009; Boyandin et al., 2013).

Este es el primer estudio de la comunidad de hongos endófitos en una planta carnívora que permiten apreciar el efecto que la heterogeneidad espacial y temporal tiene en la interacción entre hongos endófitos y plantas carnívoras. Sin embargo, es necesario realizar experimentos que permitan dilucidar más claramente algunos de los aspectos de la interacción entre los hongos endófitos con las plantas carnívoras.

## 9. Conclusiones

1. La heterogeneidad ambiental está asociada con las diferencias en la comunidad de hongos endófitos y en la tasa de infección.
2. La heterogeneidad temporal jugó un papel más importante en la configuración de la estructura de la comunidad de hongos endófitos con respecto de la heterogeneidad espacial.
3. La tasa de infección de los hongos endófitos aislados de raíz fue mayor con relación a la hoja presentando diferencias significativas.
4. La tasa de infección entre poblaciones mostró que Taxco presenta el porcentaje más bajo de infección, diferenciándose significativamente de Cuernavaca y Zempoala.
5. No se observó una diferenciación en la estructura de la comunidad de hongos endófitos por el tipo de órgano, sin embargo, si hay una diferenciación significativa en la tasa de infección entre raíz y hoja.
6. El uso del marcador D1/D2 de la subunidad grande ribosomal (LSU 28S) rADN, permitió la identificación de los hongos endófitos aislados de *P. moranensis* a nivel de género. A pesar de ello, es esencial el uso de datos de secuencias multilocus para poder identificar a un nivel taxonómico inferior los hongos endófitos aislados.

## 9. Literatura citada

- Adamec, L. (2002). Leaf absorption of mineral nutrients in carnivorous plants stimulates root nutrient uptake. *New Phytologist*, 155, 89-100.
- Albino, U., Saridakis, D. P., Ferreira, M. C., Hungria, M., Vinuesa, P., & Andrade, G. (2006). High diversity of diazotrophic bacteria associated with the carnivorous plant *Drosera villosa* var. *villosa* growing in oligotrophic habitats in Brazil. *Plant and Soil*, 287, 199–207.
- Alcalá Raul E, & Domínguez, C. A. (1997). Biología de las plantas carnívoras: aspectos ecológicos y evolutivos. *Boletín de La Sociedad Botánica Mexicana*, 69, 59–71.
- Alcalá, R. E., & Domínguez, C. A. (2003). Patterns of prey capture and prey availability among populations of the carnivorous plant *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae) along an environmental gradient. *American Journal of Botany*, 90, 1341–1348.
- Alcalá, R. E., & Domínguez, C. A. (2005). Differential selection for carnivory traits along an environmental gradient in *Pinguicula moranensis*. *Ecology*, 86, 2652-2660.
- Alcalá, R. E., Mariano, N. A., Osuna, F., & Abarca, C. A. (2010). An experimental test of the defensive role of sticky traps in the carnivorous plant *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae). *Oikos*, 119, 891–895.
- Antonelli, A., & Sanmartín, I. (2011). Why are there so many plant species in the Neotropics? *Taxon*, 60, 403–414.
- Arnold, A. E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal biology reviews*, 21, 51-66.
- Arrigoni, E., Antonielli, L., Pindo, M., Pertot, I., & Perazzolli, M. (2018). Tissue age and plant genotype affect the microbiota of apple and pear bark. *Microbiological Research*, 211, 57–68.
- Bayman, P., Lebrón, L. L., Tremblay, R. L., & Lodge, D. J. (1997). Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). *New Phytologist*, 135, 143–149.
- Behie, S. W., & Bidochka, M. J. (2014). Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: An additional branch of the soil nitrogen cycle. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 1553–1560.
- Behie, S. W., Jones, S. J., & Bidochka, M. J. (2015). Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. *Fungal Ecology*, 13, 112–119.
- Benzinq, D. H. (1987). The origin and rarity of botanical carnivory. *Trends in Ecology and Evolution*, 2, 364–369.
- Bissett, J., & Parkinson, D. (1979). Functional relationships between soil fungi and environment in alpine tundra. *Canadian Journal of Botany*, 57, 1642–1659.
- Bonfim, J. A., Vasconcellos, R. L. F., Baldesin, L. F., Sieber, T. N., & Cardoso, E. J. B. N. (2016). Dark septate endophytic fungi of native plants along an altitudinal gradient in the Brazilian Atlantic forest. *Fungal Ecology*, 20, 202–210.
- Bonilla-Barbosa, J. R., & Novelo, A. (1995). Manual de identificación de plantas acuáticas del Parque Nacional Lagunas de Zempoala, México (Vol. 26). UNAM.
- Bonpland, A., & von Humboldt, A. (1815). *Nova genera et species plantarum* (Vol. 1). J. Cramer.
- Bootkotr, W., & Mongkolthanaruk, W. (2012). Properties of Bacteria Beneficial to the Promotion of Plant Growth. *International Conference on Biological and Life Sciences*, 40, 34–38.

- Boyandin, A. N., Prudnikova, S. V., Karpov, V. A., Ivonin, V. N., Dõ, N. L., Nguyễn, T. H., ... Gitelson, I. I. (2013). Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 83, 77–84.
- Braga, G. U. L., Rangel, D. E. N., Fernandes, É. K. K., Flint, S. D., & Roberts, D. W. (2015). Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. *Current Genetics*, 61, 405–425.
- Broeckling, C. D., Broz, A. K., Bergelson, J., Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2008). Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 738–744.
- Bronstein, J. L. (1994). Conditional outcomes in mutualistic interactions. *Trends in ecology & evolution*, 9, 214–217.
- Butt, T. M., Coates, C. J., Dubovskiy, I. M., & Ratcliffe, N. A. (2016). Entomopathogenic fungi: new insights into host–pathogen interactions. *Advances in genetics*. 94, 307–364.
- Chanthorn, W., Caughlin, T., Dechkla, S., & Brockelman, W. Y. (2013). The relative importance of fungal infection, conspecific density and environmental heterogeneity for seedling survival in a dominant tropical tree. *Biotropica*, 45, 587–593.
- Coley, P. D., & Barone, J. A. (1996). Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27, 305–335.
- Currie, D. J. (1991). Energy and large-scale patterns of animal and plant species richness. *American Naturalist*, 137(1), 27–49.
- Devi, L. S., Khaund, P., Nongkhaw, F. M. W., & Joshi, S. R. (2012). Diversity of culturable soil micro-fungi along altitudinal gradients of eastern Himalayas. *Mycobiology*.
- Egamberdieva, D., Wirth, S. J., Alqarawi, A. A., Abd-Allah, E. F., & Hashem, A. (2017). Phytohormones and beneficial microbes: Essential components for plants to balance stress and fitness. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–14.
- Ellison, A. M., & Adamec, L. (Eds.). (2018). *Carnivorous Plants: physiology, ecology, and evolution*. Oxford University Press.
- Fang, W. (2013). Seasonal and Habitat Dependent Variations in Culturable Endophytes of *Camellia sinensis*. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 04.
- Flores-Armillas V. H., García Lara F., Jaramillo Monrroy F. (2009). Perfil, composición de la vegetación y uso del suelo en una barranca de Cuernavaca, Colonia del Bosque Cuernavaca, Morelos. CRIM-UNAM
- Gaiero, J. R., McCall, C. A., Thompson, K. A., Day, N. J., Best, A. S., & Dunfield, K. E. (2013). Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American journal of botany*, 100, 1738–1750.
- García, A. V., Martínez, G. S., & Torres, A. E. (2002). Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorizógenos. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica*, 73, 1–15.
- Givnish, T. J. (1989). Ecology and evolution of carnivorous plants. *Plant-animal interactions*, 243–290.
- Glenn, A., & Bodri, M. S. (2012). Fungal endophyte diversity in *Sarracenia*. *PLoS ONE*, 7.
- Glynou, K., Ali, T., Buch, A. K., Haghi Kia, S., Ploch, S., Xia, X., ... Maciá-Vicente, J. G. (2016). The local environment determines the assembly of root endophytic fungi at a continental scale. *Environmental Microbiology*, 18, 2418–2434.

- Göre, M. E., & Bucak, C. (2007). Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Laurus nobilis*. *Forest Pathology*, 37, 281-288.
- Guzmán Salgado, L. A., & Torres Espino, G. (2018). Propuesta de gestión para el desarrollo de un área natural protegida en el Parque el Huixteco (Maestría). Universidad Autónoma de Guerrero.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., & Elsas, J. D. van. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16, 463–471.
- Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., ... & Sessitsch, A. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79, 293-320.
- Harrison, J. G., & Griffin, E. A. (2020). The diversity and distribution of endophytes across biomes, plant phylogeny and host tissues: how far have we come and where do we go from here?. *Environmental Microbiology*.
- Hedrich, R. (2015). Carnivorous plants. *Current Biology : CB*, 25(3), R99–R100.
- Herrera, C. M. (1995). This content downloaded from 69.166.47.146 on Sat. Source: *Ecology*, 76(5), 1516–1524.
- Herrera, C. M. (1997). Thermal Biology and Foraging Responses of Insect Pollinators to the Forest Floor Irradiance Mosaic. *Oikos*, 78, 601.
- Herrera, J., Khidir, H. H., Eudy, D. M., Porrás-Alfaro, A., Natvig, D. O., & Sinsabaugh, R. L. (2010). Shifting fungal endophyte communities colonize *Bouteloua gracilis*: Effect of host tissue and geographical distribution. *Mycologia*, 102, 1012–1026.
- Higgins, K. L., Arnold, A. E., Coley, P. D., & Kursar, T. A. (2014). Communities of fungal endophytes in tropical forest grasses: highly diverse host-and habitat generalists characterized by strong spatial structure. *Fungal Ecology*, 8, 1-11.
- Horn, M. Y., Rodrigues, K. A., & Anzótegui, L. M. (2011). Primeras evidencias de interacción insecto-planta en el neógeno del noroeste de la Argentina. *Revista Brasileira de Paleontologia*, 14, 87–92.
- Horner, J., Bartosz, J., Planchon, Bauer, U. and Giusto, B., 2018. Attraction of prey. In: A. Ellison and L. Adamec, ed., *Carnivorous Plants: Physiology, Ecology, and Evolution*, 1st ed. United Kingdom: OXFORD University Press, pp.157-167.
- Hughes, C., & Eastwood, R. (2006). Island radiation on a continental scale: Exceptional rates of plant diversification after uplift of the Andes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 10334–10339.
- Hutchings M.J., John E.A. y Stewart A. J. A. (1999). *The Ecological Consequences of Environmental Heterogeneity*. University of Sussex: Cambridge University
- Kameoka, H., Maeda, T., Okuma, N., & Kawaguchi, M. (2019). Structure-specific regulation of nutrient transport and metabolism in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Cell Physiology*, 60(10), 2272-2281.
- Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglou, P., Klironomos, J. N., Lee, H., & Trevors, J. T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58, 169–188.
- Koske, R. E. (1987). Distribution of VA Mycorrhizal Fungi Along a Latitudinal Temperature Gradient. *Mycologia*, 79, 55–68.

- Krings, M., Taylor, T. N., Hass, H., Kerp, H., Dotzler, N., & Hermsen, E. J. (2007). Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: Infection pathways, spatial distribution, and host responses. *New Phytologist*, 174, 648–657.
- Lee, J. M., Tan, W. S., & Ting, A. S. Y. (2014). Revealing the antimicrobial and enzymatic potentials of culturable fungal endophytes from tropical pitcher plants (*Nepenthes* spp.). *Mycosphere*, 5, 364-377.
- Li, H., Soares, M. A., Torres, M. S., Bergen, M., & White, J. F. (2015). Endophytic bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens*, enhances ornamental hosta resistance to diseases and insect pests. *Journal of Plant Interactions*, 10, 224–229.
- Linhart, Y. B., & Grant, M. C. (1996). Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27, 237–277.
- Lundholm, J. T. (2009). Plant species diversity and environmental heterogeneity: Spatial scale and competing hypotheses. *Journal of Vegetation Science*, 20, 377–391.
- Lutzoni, F., Kauff, F., Cox, C. J., McLaughlin, D., Celio, G., Dentinger, B., ... y Grube, M. (2004). Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American journal of botany*. 91: 1446-1480.
- Mane, R. S., & Vedamurthy, A. B. (2018). The fungal endophytes : Sources and future prospects, 6, 121–126.
- Medel, R., & Zamora, R. (2009). *Ecología y evolución de interacciones planta-animal*. Santiago: Editorial Universitaria.
- Mier, T., Rivera-Becerril, F., Ayala-Zermeño, M. A., Toriello, C., Aguilar Ogarrio, S., & Ulloa, M. (2013). *Métodos Experimentales para el Estudio de Hongos Microscópicos*. México: Instituto de Biología UNAM.
- Mignard, S., & Flandrois, J. P. (2006). 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. *Journal of Microbiological Methods*, 67, 574–581.
- Mignard, S., & Flandrois, J. P. (2006). 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. *Journal of Microbiological Methods*, 67, 574–581.
- Mithöfer, A. (2017). Plant carnivory: Pitching to the same target. *Nature Plants*.
- Mocali, S., Bertelli, E., Di Cello, F., Mengoni, A., Sfalanga, A., Viliani, F., ... & Fani, R. (2003). Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. *Research in Microbiology*, 154, 105-114.
- Modibb, U. D., Chimbekujwo, I. B., Pola, B. B., Channya, F. K., Hayatuddeen, A. M., & Abdullahi, G. (2017). The effects of temperature and relative humidity on the growth of three isolated fungi from rice (*Oryza sativa* L.) seedlings in Dadin Kowa Irrigation Scheme, Dadin Kowa, Gombe. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 10, 223.
- Morohoshi, T., Oikawa, M., Sato, S., Kikuchi, N., Kato, N., & Ikeda, T. (2011). Isolation and characterization of novel lipases from a metagenomic library of the microbial community in the pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes hybrida*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 112, 315-320.
- Naseem, F., & Kayang, H. (2018). Fungal endophytes associated with *Nepenthes khasiana* hook. f., An endemic plant of meghalaya, India. *International Journal of Current Research in Life Sciences*, 7, 1907-1912.
- Newsham, K. K., Low, M. N. R., McLeod, A. R., Greenslade, P. D., & Emmett, B. A. (1997). Ultraviolet-B radiation influences the abundance and distribution of phylloplane fungi on pedunculate oak (*Quercus robur*). *New Phytologist*, 136, 287–297.

- Ollerton, J. (1999). La evolución de las relaciones polinizador-planta en los artrópodos. Boletín de La Sociedad Entomológica Aragonesa.
- Pamilo, P. (1988, January). Genetic variation in heterogeneous environments. In *Annales Zoologici Fennici* (pp. 99-106). Finnish Academy of Sciences, Societas Scientiarum Fennica, Societas pro Fauna et Flora Fennica and Societas Biologica Fennica Vanamo.
- Pavlovič, A., Slováková, L., & Šantrůček, J. (2011). Nutritional benefit from leaf litter utilization in the pitcher plant *Nepenthes ampullaria*. *Plant, cell & environment*, 34, 1865-1873.
- Pérez C., A., Rojas Sierra, J., & Valen, H. (2009). Biología y perspectiva de microorganismos endófitos asociados a plantas. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 1, 286–301.
- Peris, D., Pérez-de la Fuente, R., Peñalver, E., Delclòs, X., Barrón, E., & Labandeira, C. C. (2017). False blister beetles and the expansion of gymnosperm-insect pollination modes before angiosperm dominance. *Current Biology*, 27, 897-904.
- Pigliucci, M. (2001). Environmental Heterogeneity: Temporal and Spatial. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Quilliam, R. S., & Jones, D. L. (2010). Fungal root endophytes of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia*. *Mycorrhiza*, 20, 341–348.
- Quilliam, R. S., & Jones, D. L. (2012). Evidence for host-specificity of culturable fungal root endophytes from the carnivorous plant *Pinguicula vulgaris* (Common Butterwort). *Mycological Progress*, 11, 583–585.
- Ramalashmi, K., K. P. V., Magesh, K., Sanjana, R., & S, S. J. (2018). A potential surface sterilization technique and culture media for the isolation of endophytic bacteria from *Acalypha indica* and its antibacterial activity, 6, 181–184.
- Reich et al., (2005) Linking litter calcium, earthworms and soil properties: A common garden test with 14 tree species. *Ecol. Lett.* 8, 811–818.
- Rodriguez, R J, White, J. F., Arnold, a E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182, 314–330.
- Rodriguez, Rusty J., Henson, J., Van Volkenburgh, E., Hoy, M., Wright, L., Beckwith, F., ... Redman, R. S. (2008). Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *ISME Journal*, 2, 404–416.
- Rosenberg E, Sharon G, Zilber-Rosenberg I. (2009). The hologenome theory of evolution contains Lamarckian aspects within a Darwinian framework. *Environ Microbiol* 11, 2959–2962.
- Rosenblueth, M. y Romero, EM (2004). Poblaciones de maíz *Rhizobium etli* y su competitividad para la colonización de raíces. *Arch Microbiol* 181, 337 - 344.
- Rosenzweig, M.L. 1995. *Species diversity in space and time*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Russell, S. K., & Schupp, E. W. (1998). Effects of Microhabitat Patchiness on Patterns of Seed Dispersal and Seed Predation of *Cercocarpus ledifolius* (Rosaceae). *Oikos*, 81, 434.
- Saikkonen, K., Mikola, J., & Helander, M. (2015). Endophytic phyllosphere fungi and nutrient cycling in terrestrial ecosystems. *Current Science*, 109, 121–126.
- Sanchez-Azofeifa, A., Oki, Y., Fernandes, G. W., Ball, R. A., & Gamon, J. (2012). Relationships between endophyte diversity and leaf optical properties. *Trees Structure and Function*, 26, 291–299.
- Santamaría, J., & Bayman, P. (2005). Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology*, 50, 1–8



- Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109, 661–686
- Schulz, B., & Boyle, C. (2006). What are endophytes?. In *Microbial root endophytes*, 1-13.
- Serafín Castro, A. M., & Salazar Cerda, I. G. (2014). Análisis y propuesta de mejora al Programa de Manejo del Área Natural Protegida "Parque Nacional Lagunas de Zempoala desde la perspectiva de las Ciencias Ambientales" (Licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de México.
- Sherameti, I., Tripathi, S., Varma, A., & Oelmüller, R. (2008). The Root-Colonizing Endophyte *Piriformospora indica* Confers Drought Tolerance in *Arabidopsis* by Stimulating the Expression of Drought Stress–Related Genes in Leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21, 799–807.
- Shimai, H., & Kondo, K. (2007). Phylogenetic analysis of Mexican and Central American. *Sierra*, 67–77.
- Singh, L. P., Gill, S. S., & Tuteja, N. (2011). Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. *Plant Signaling and Behavior*, 6, 175–191. <https://doi.org/10.4161/psb.6.2.14146>
- Smith, S. A., Tank, D. C., Boulanger, L. A., Bascom-Slack, C. A., Eisenman, K., Kingery, D., ... Strobel, S. A. (2008). Bioactive endophytes warrant intensified exploration and conservation. *PLoS ONE*, 3, 1–4.
- Soliman, S. S. M., Greenwood, J. S., Bombarely, A., Mueller, L. A., Tsao, R., Mosser, D. D., & Raizada, M. N. (2015). An endophyte constructs fungicide-containing extracellular barriers for its host plant. *Current Biology*, 25, 2570–2576.
- Spatafora, J. W., Sung, G. H., Johnson, D., Hesse, C., O'Rourke, B., Serdani, M., ... & Reeb, V. (2006). A five-gene phylogeny of Pezizomycotina. *Mycologia*, 98(6), 1018-1028.
- Suárez-Piña, J., Rueda-Almazán, J. E., Ayestarán, L. M., & Alcalá, R. E. (2016). Effect of light environment on intra-specific variation in herbivory in the carnivorous plant *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae). *Journal of Plant Interactions*, 11, 146–151.
- Takeuchi, Y., Salcher, M. M., Ushio, M., Shimizu-Inatsugi, R., Kobayashi, M. J., Diway, B., ... & Shimizu, K. K. (2011). In situ enzyme activity in the dissolved and particulate fraction of the fluid from four pitcher plant species of the genus *Nepenthes*. *PLoS One*, 6.
- Tan, R. X., & Zou, W. X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.*, 18, 448–459.
- Tang, W., Kuehn, T. H., & Simcik, M. F. (2015). Effects of Temperature, Humidity and Air Flow on Fungal Growth Rate on Loaded Ventilation Filters. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 12, 525–537.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N. S., Wijesundera, R., ... & Smith, M. E. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *science*, 346(6213).
- Terhonen, E., Sipari, N., & Asiegbu, F. O. (2016). Inhibition of phytopathogens by fungal root endophytes of Norway spruce. *Biological Control*, 99, 53–63.
- Thompson, J. N. (2005). *The geographic mosaic of coevolution*. University of Chicago Press.
- U'Ren, J. M., Lutzoni, F., Miadlikowska, J., Laetsch, A. D., & Elizabeth Arnold, A. (2012). Host and geographic structure of endophytic and endolichenic fungi at a continental scale. *American Journal of Botany*, 99, 898–914.
- Velázquez, L. P. A., Martínez, M. D. C. A., & Romero, A. C. (2014). Extracción y purificación de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 1.

- Velázquez, A., Aragón, C., Romero, A., & Cornejo, I. (2016). Extracción y purificación de ADN. *Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología*, 1–26.
- Wang, W. X., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A. (2001). Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: Physiological and molecular considerations. *Acta Horticulturae*, 560, 285–292.
- Win, P. M., Matsumura, E., & Fukuda, K. (2018). Diversity of tea endophytic fungi: Cultivar- and tissue preferences. *Applied Ecology and Environmental Research*, 16(1), 677–695.
- Wolkovich, E. M., Cook, B. I., McLauchlan, K. K., & Davies, T. J. (2014). Temporal ecology in the Anthropocene. *Ecology letters*, 17, 1365-1379.
- Wong, C., Tan, L. T., Mujahid, A., Lihan, S., Wee, J. L. S., Ting, L. F., & Müller, M. (2018). Biosorption of copper by endophytic fungi isolated from *Nepenthes ampullaria*. *Letters in applied microbiology*, 67, 384-391.
- Wu, L., Han, T., Li, W., Jia, M., Xue, L., Rahman, K., & Qin, L. (2013). Geographic and tissue influences on endophytic fungal communities of *taxus chinensis* var. *mairei* in China. *Current Microbiology*, 66, 40–48.
- Yadeta, K., & Thomma, B. (2013). The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in plant science*, 4, 97.
- Yan, L., Zhu, J., Zhao, X., Shi, J., Jiang, C., & Shao, D. (2019). Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 3327–3340.
- Zamora, R., Gómez, J. M., & Hódar, J. A. (1998). Fitness responses of a carnivorous plant in contrasting ecological scenarios. *Ecology*, 79, 1630–1644.
- Zamudio, S. (1999). Notas sobre la identidad de *Pinguicula moranensis* HBK, con la descripción de una variedad nueva. *Acta Botánica Mexicana*, 49, 23-34.