



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMEDICA

TÍTULO DE BIÓLOGO

Diversidad de hongos endófitos asociados a la raíz de *Bixa orellana* L.

ARTÍCULO ACADÉMICO

AUTORA: Maza Sarango, Valeria Elizabeth

DIRECTORA: Cueva Agila, Augusta Yadira, Dra.

LOJA – ECUADOR

2019



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2019

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL ARTÍCULO ACADÉMICO

Doctora.
Augusta Yadira Cueva Agila

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente artículo académico: “**Diversidad de hongos endófitos asociados a la raíz de *Bixa orellana* L.**” realizado por Maza Sarango Valeria Elizabeth, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Octubre del 2019

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo **Maza Sarango Valeria Elizabeth** declaro ser autora del presente artículo académico: “Diversidad de hongos endófitos asociados a la raíz de *Bixa orellana* L.”, de la Titulación de Biología, siendo la Dra. Augusta Yadira Cueva Agila directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.

Autora: Maza Sarango Valeria Elizabeth

Cédula: 1104302201

DEDICATORIA

A mis Padres, Luis y Luz quienes me brindan su amor incondicional gracias por su sacrificio y enseñarme a cumplir cada sueño.

A mis hermanas, Fernanda y Gabriela gracias por su cariño y motivación que me han brindado en las diferentes etapas de mi vida.

Este trabajo es para ustedes con todo mi esfuerzo y cariño

Valeria Elizabeth

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a toda mi familia quienes me han brindado su apoyo para cumplir una meta más.

Agradecimientos especiales a la Universidad Técnica Particular de Loja, a su planta docente, de manera especial a Dra. Augusta Cueva gracias por la enseñanza y compartir sus conocimientos conmigo durante esta investigación; al Mgtr. Hernán Lucero y al Dr. Paulo Herrera gracias por guiarme en el transcurso de esta investigación.

Al equipo investigativo de este proyecto quienes hicieron posible el desarrollo y obtención de los presentes datos para el desarrollo de esta investigación.

A mis amigos quienes me han dado su apoyo y motivación para seguir adelante y cumplir con mis sueños.

A mis compañeros gracias por todos los momentos de alegría en estos cinco años de estudio.

Valeria Elizabeth

INDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL ARTÍCULO ACADÉMICO.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
INDICE DE CONTENIDOS	vi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MATERIALES Y MÉTODOS	4
Área de estudio y muestreo.....	4
Análisis moleculares	6
Análisis de Datos	7
RESULTADOS	8
Diversidad global de OTUs de hongos endófitos.....	8
Comparación de la comunidad de hongos endófitos entre localidades	10
DISCUSIÓN.....	14
CONCLUSIONES.....	18
BIBLIOGRAFÍA.....	19
ANEXOS.....	24

RESUMEN

El término endófito hace referencia a microorganismos que habitan dentro de un tejido vegetal aparentemente sin ocasionarle daños. Existen especies fúngicas que han desarrollado dicha relación con sus hospederos, colonizándolos en todos o algunos de sus tejidos. *Bixa orellana* es una de las especies menos estudiadas en cuanto a diversidad endófito fúngica, por lo que el objetivo principal de este proyecto fue determinar la diversidad de hongos endófitos asociados a sus raíces, en cuatro localidades de estudio: Macará, Paltas, Jamboé y Los Encuentros (Provincias de Loja y Zamora Chinchipe, Ecuador). La región ITS2 del ADNrn fúngico fue analizada mediante la tecnología Illumina MiSeq, de la cual se delimitaron 612 OTUs de hongos endófitos. Las muestras de raíces colectadas en la localidad de Macará presentaron el mayor número de OTUs y el menor número se registró en la localidad de Paltas. La Familia dominante de endófitos fúngicos en todas las localidades fue Glomeraceae. Los resultados sugieren que las comunidades de hongos endófitos difieren significativamente entre las localidades, siendo los factores ambientales distintos de cada localidad los que podrían explicar esta diferencia.

PALABRAS CLAVES: Achiote, Glomeromycota, Secuenciación Illumina, OTU.

ABSTRACT

The term endophyte refers to the microorganisms that inhabit a plant tissue without causing apparent damage. Some fungal species have developed this relationship with their hosts colonizing them in all or some of their tissues. *Bixa orellana* is one of the least studied species in fungal endophyte diversity. The main objective of this project was to determine the diversity of endophytic fungi associated with their roots, in four study locations: Macará, Paltas, Jamboé and Los Encuentros (Provinces of Loja and Zamora Chinchipe, Ecuador) The ITS2 region of the fungal ADNr was analyzed by Illumina MiSeq technology, of which, 612 OTUs of endophytic fungi were delimited. The roots collected in Macará has the major OTUs number, while the minor was registered in Paltas. The dominant family of fungal endophytes in all the studied locations was Glomeraceae. The results suggest that the endophytic fungal communities differ significantly between the localities. The environmental factors of each locality could explain this difference.

KEYWORDS: Achiote, Glomeromycota, Illumina sequencing, OTU.

INTRODUCCIÓN

El término endófito es empleado para definir a microorganismos que habitan dentro de un tejido vegetal aparentemente sin ocasionar daños sobre éste (Terhonen, Keriö, Sun, y Asiegbu, 2014). Evolutivamente, las especies vegetales necesitan de ciertas relaciones de asociación con organismos especializados que contribuyen en su desarrollo y adaptación (Heredia, Alarcón, Hernández, Ferrera, y Almaraz, 2014). Dentro del grupo de endófitos, existen especies fúngicas que han desarrollado relaciones simbióticas con sus hospederos habitándolos en todos los tejidos disponibles incluyendo hojas, tallos, corteza, flores, frutos, raíces y semillas (Sunitha, Nirmala Devi, y Srinivas, 2013). Entre el hongo endófito y su huésped, se desarrolla además una interacción metabólica (Schulz, Boyle, Draeger, Römmert, y Krohn, 2002).

Debido a que las especies de hongos endófitos varían en cuanto a requerimientos nutritivos, su presencia puede producir efectos fisiológicos en el huésped, generando agotamiento de algunos productos o acumulación de otros (Gamboa, 2006). Por otra parte, también pueden mejorar los mecanismos de defensa y resistencia de su hospedero mediante la secreción de metabolitos secundarios permitiendo así la sobrevivencia de los dos organismos (Schardl, Leuchtmann, y Spiering, 2004; Sunitha et al., 2013). Dicha relación endofítica se establece cuando los factores de virulencia del hongo y las defensas del hospedero están en equilibrio, por lo contrario, cuando se presenta un envejecimiento de la planta huésped o se encuentra bajo estrés, el hongo puede actuar como patógeno (Sánchez-Fernández et al., 2013).

La diversidad de hongos endófitos varía dentro de los tejidos de la especie hospedera así como también entre los individuos de la misma especie geográficamente separados (Saikkonen, 2007). Esta variación de diversidad fúngica puede estar atribuida a la ubicación, clima o edad del huésped (Uzma, Konappa, y Chowdappa, 2016), creando así una enorme diversidad, sin embargo, pocos de estos microorganismos han sido estudiados, generando una alta expectativa sobre el descubrimiento de nuevas especies de hongos endófitos (Zheng et al., 2015).

Se han realizado estudios de hongos endófitos asociados a muchas especies dentro de las familias: Arecaceae (Rodrigues, 1994), Asteraceae (Gallo et al., 2009 ; Vieira, Johann, Hughes, Rosa, y Rosa, 2014), Rubiaceae (Santamaría y Bayman, 2005), Orchidaceae (Cevallos, Sánchez, Decock, Declerck, y Suárez, 2016; Otero, Ackerman, y Bayman, 2002), entre otros, sin embargo, el número de especies abordado es bajo. Una de las familias menos estudiadas en cuanto a diversidad de hongos endófitos ha sido Bixaceae, pues hasta la fecha solo se ha emitido un primer reporte realizado en tejidos foliares de *Bixa orellana* L. (Kannan, Ashwanandhini, Hemasindhu, Vinithkumar, y Senthamarai, 2017).

La familia Bixaceae posee especies de gran interés entre las cuales destaca *Bixa orellana* L. también conocida como "achiote" , "annatto" o "urucú" (Akshatha, Giridhar, y Ravishankar, 2011). Es originaria de América Central y de América del Sur (Shahid-ul-Islam, Rather, y Mohammad, 2016), aunque es ampliamente cultivada en todos los países tropicales específicamente en Ecuador, Colombia, México, Perú y en países de África y Asia (Raddatz-Mota et al., 2017). *B. orellana* es cultivada principalmente por su alto contenido de carotenoides como la bixina y norbixina que se extraen de sus semillas y constituyen uno de los tintes naturales y no tóxicos más usados en la industria alimentaria, textil, pintura y cosmética a nivel mundial (Louro y Santiago, 2016). Las múltiples propiedades terapéuticas que ofrece esta especie han sido atribuidas precisamente al alto contenido de carotenoides que posee (De Araujo Vilar et al., 2014), además que sus semillas presentan una alta cantidad de tocotrienoles (Araque Espinoza, 2017; Frega, Mozzon, y Bocci, 1998; Rey, 2012), dichos compuestos son los de mayor actividad de la vitamina E y poseen propiedades antioxidantes por lo que han mostrado potencial en tratamientos de enfermedades como osteoporosis (Kuan, Chin, Hj, y Ahmad, 2018), diabetes (Kim et al., 2016), enfermedades neurodegenerativas (Mohamed, Sayeed, Saxena, y Oothuman, 2018), e inclusive se ha reportado una potente propiedad antitumoral (Husain et al., 2019; Tran, Ramalinga, Kedir, Clarke, y Kumar, 2014).

Ante la falta de información y estudios realizados respecto a la diversidad fúngica asociada a esta especie, el principal objetivo del presente proyecto es determinar la diversidad de hongos endófitos asociados a las raíces de *Bixa orellana* L. de cuatro localidades del Sur de Ecuador. Los resultados obtenidos contribuirán al conocimiento de la diversidad de hongos endófitos además que constituirán un aporte a proyectos que se desarrollan con dicha especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y muestreo

Este estudio se desarrolló como complemento de una investigación previa: "Determinación del porcentaje de colonización de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en plantaciones de *Bixa orellana*" (Palacios, 2017), que a su vez fue parte del proyecto "Estudios de colección, conservación y aprovechamiento de especies vegetales de interés medicinal en la región Sur del Ecuador" (Malagón et al., 2015).

Los sitios de estudio fueron cuatro, ubicados en las provincias de Zamora Chinchipe y Loja (Ecuador) (**Figura 1**).

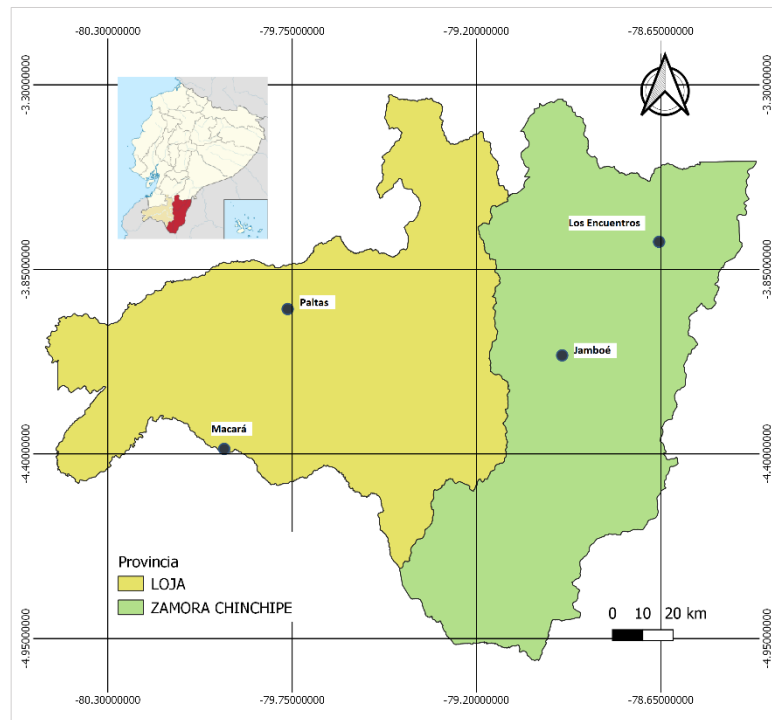


Figura 1. Ubicación de las cuatro localidades de *Bixa orellana* estudiadas.

Fuente y elaboración: Valeria Maza

En la provincia de Zamora Chinchipe, localizada en la región sur del Ecuador, los sitios seleccionados para el estudio fueron: Jamboé ($4^{\circ}6'22''$ S y $78^{\circ}56'40''$ O) y Los Encuentros ($3^{\circ}51'25''$ S y $78^{\circ}41'04''$ O).

Jamboé perteneciente al cantón Zamora, posee una temperatura media anual de $23,7^{\circ}\text{C}$ con 1800–2200 mm de precipitación al año, la cobertura vegetal característica de la zona consta de bosques siempre verdes y una elevación promedio de 1300 m s.n.m (GADP Timbara, 2019).

La segunda localidad fue en la parroquia “Los Encuentros” perteneciente al cantón Yantzaza, tiene un área de 47545 ha, de las cuales más de la mitad (52,6%) corresponden a Bosque Húmedo Tropical (GADP Los Encuentros, 2015). La altitud varía de 820 a 827 m s.n.m, la temperatura media anual es de $21,9^{\circ}\text{C}$, alcanzando temperaturas máximas de hasta 28°C , la precipitación varía entre 2109 a 2537 mm registrando así una alta incidencia de lluvias (Poma, 2015).

Los sitios de estudio en la provincia de Loja fueron Paltas ($3^{\circ}50'$ S y $79^{\circ}45'$ O) y Macará ($4^{\circ}24'0''$ S y $79^{\circ}57'0''$ O). En el cantón Paltas debido a su topografía muy irregular, se evidencia varios pisos climáticos entre los que sobresalen los climas frío, templado y subtropical (Guamán, 2014), siendo su temperatura media anual de $18,6^{\circ}\text{C}$. En las partes altas se

presentan temperaturas de hasta 12 °C y en las partes bajas 24 °C, la precipitación oscila entre 500 a 2000 mm al año, en la zona predomina la formación de Bosque Semidecidual (GADP Lauro Guerrero, 2015).

En Macará, la precipitación media anual varía entre 400 a 600 mm en las partes bajas y en las partes altas incrementa de 800 a 900 mm. La temperatura varía entre los 14,2 °C hasta 35,4 °C, siendo la temperatura promedio en el año de 25,5 °C (Alvarado y Chuquimarca, 2015). El tipo de vegetación que predomina en esta localidad es el bosque seco semidenso aunque también presenta bosques húmedos densos e intervenidos (GAD Macará, 2014).

En cada localidad se seleccionaron al azar entre 15 y 16 individuos de *B. orellana* (**Tabla 1**). Los individuos colectados estuvieron ubicados en distintos huertos familiares, junto a otras especies. En la localidad de Jamboé, uno de los huertos era monoespecífico. En ninguno de los huertos muestreados se utiliza agroquímicos.

Tabla 1. Caracterización de las localidades del estudio.

Localidad	Número de muestras	Número de huertos en los que se colectó muestras	Altitud (m)	Temperatura media anual (°C)	Precipitación (mm)
Jamboé	16	5	984–1360	23,7	1800–2200
Los Encuentros	15	7	791–867	21,9	2109–2537
Paltas	16	2	1360–1774	18,6	500–2000
Macará	16	2	657–815	25,5	400–900

Fuente y elaboración: Valeria Maza

De la raíz de cada uno de los individuos seleccionados se colectó 30 raicillas, de 2 cm de longitud aproximadamente, que se conservaron en etanol al 70% para su posterior uso.

Análisis moleculares

Malagón et al. (2015), con el fin de determinar la diversidad de hongos endófitos asociados a la raíz de *B. orellana* realizó la extracción de ADN de las 63 muestras con el método CTAB (Murray y Thompson, 1980). Una vez efectuada la extracción de ADN de las muestras de raíz se realizó una PCR para la amplificación de la región ITS2 de ADNrn usando los cebadores ITS3/ ITS4 (White, Bruns, Lee, y Taylor, 1990), idóneos en estudios de barcoding especialmente en hongos (Op De Beeck et al., 2014). Para la amplificación de ITS2 se utilizó un volumen final de 20 µL: con 0,5 µL de cada primer (a partir de una concentración

de 10 pMol), 10 μ L de mezcla de la polimerasa Phusion (Thermo scientific, USA), 0,8 μ L de BSA (albúmina de suero bovino, Promega, Madison, WI, USA) y 2 μ L de ADN. Para la amplificación se realizó un ciclo de desnaturalización inicial a 98 °C por 30 s, 35 ciclos de: desnaturalización a 98 °C por 10 s, anillamiento a 60 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 30 s y un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 min. Para evaluar el resultado de la PCR se efectuó una electroforesis en geles de agarosa al 1%. Las condiciones de la electroforesis fueron: 120 V, 300 A por 20 min. Luego de verificar la amplificación, las muestras fueron purificadas con el kit Wizard® SV Gel and Clean-up System (Promega, Madison, WI, USA), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. La concentración del ADN purificado se midió en el Nanodrop 1000c (Thermo scientific, USA) y se enviaron las muestras a secuenciar mediante la tecnología Illumina MiSeq (Illumina Inc.) en los laboratorios IMG, Alemania.

Análisis de Datos

El presente trabajo de fin de titulación contempló el análisis de los datos, lecturas de 250 pares de bases (bp), sin procesar resultantes de la secuenciación de nueva generación.

La reconstrucción de las Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) se realizó con el algoritmo UPARSE implementado en el software USEARCH (Edgar, 2013). Primeramente, las secuencias únicas se obtuvieron ensamblando las lecturas de pares sobrepuestos con el comando 'fastq_mergepairs', luego se aplicó un filtro de calidad a las muestras utilizando el comando 'fastq_filter' con un umbral de error esperado de 0,5. La longitud de las secuencias se estableció a 260 bp. Se aplicó el comando 'derep_fulllength' para remover los "singletons" y finalmente las secuencias con un 97% de homología se agruparon en el mismo OTU con el comando 'cluster_otus'.

La asignación taxonómica de las OTUs se la realizó utilizando el algoritmo BLASTN (Altschup, Gish, Miller, Myers, y Lipman, 1990) en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*), además dicha asignación fue establecida de acuerdo al sistema de clasificación propuesto por Tedersoo et al. (2018).

Para evaluar la riqueza de especies de hongos endófitos frente al esfuerzo de muestreo se construyó una curva de acumulación de especies en base a una matriz de presencia/ausencia de las OTUs encontradas por cada sitio de estudio usando el software EstimateS 9.1.0 (Collwell, 2013) con 100 permutaciones.

La riqueza estimada fue calculada con el índice de Chao 2, este se basa en datos de presencia/ausencia y estima el número de especies esperadas relacionando el número de especies únicas con las duplicadas (Chao, 1987).

La similitud de las distintas localidades en cuanto a la composición de especies endófitas fúngicas fue determinada calculando los índices de Chao-Jaccard y de Chao-Sørensen (Chao, Chazdon, Colwell, y Shen, 2005) en EstimateS 9.1.0 (Collwell, 2013).

Para analizar si las comunidades de hongos endófitos difieren en los sitios de estudio, se realizó un análisis de similitud ANOSIM (Clarke, 1993) con 9999 permutaciones en el software PAST (Hammer, Harper, y Ryan, 2001).

RESULTADOS

Una vez efectuada la reconstrucción de OTUs se obtuvieron un total de 1115 OTUs. Se buscó la asignación taxonómica de las 1115 OTUS y se eligieron aquellos que tuvieron una similitud de secuencia y recubrimiento mayor o igual a 90%. De las 1115 OTUs se obtuvo un total de 923 OTUs sobre dicho umbral ($\geq 90\%$), de las cuales 612 pertenecieron al reino Fungi, 160 a Bacteria, 121 al reino Plantae, 26 a Animalia y finalmente al reino Protista pertenecieron 4 OTUs (**Figura 2**).

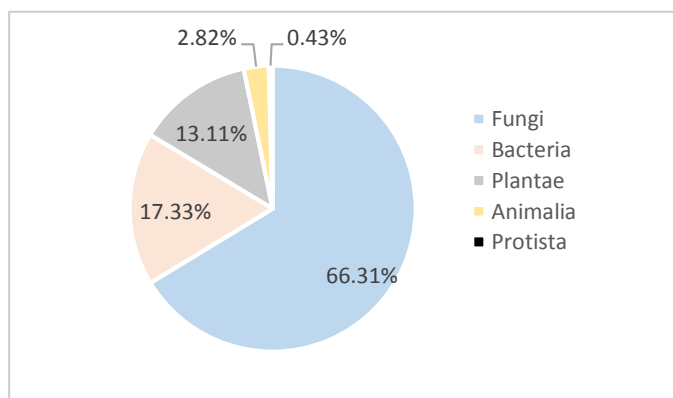


Figura 2. Porcentaje de OTUs detectados en las raíces de *B. orellana* asignados por reino.

Fuente y elaboración: Valeria Maza

Diversidad global de OTUs de hongos endófitos

De las 612 OTUs se logró la asignación taxonómica de 538 OTUs hasta nivel de Filo, 505 OTUs a nivel de Clase, 480 OTUs a Orden y 409 OTUs hasta Familia.

Se identificó un total de siete filos en los que se distribuyen 538 OTUs, la mayoría de ellos pertenecieron a Ascomycota (50,37%), Glomeromycota (30,85%) o Basidiomycota (17,29%), mientras que poco representativos fueron los filos Mortierellomycota (0,74%), Mucoromycota (0,37%), Monoblepharomycota y Entorrhizomycota (0,19% cada uno) (**Figura 3**). Para 74 OTUs no se pudo establecer identificación a este nivel taxonómico.

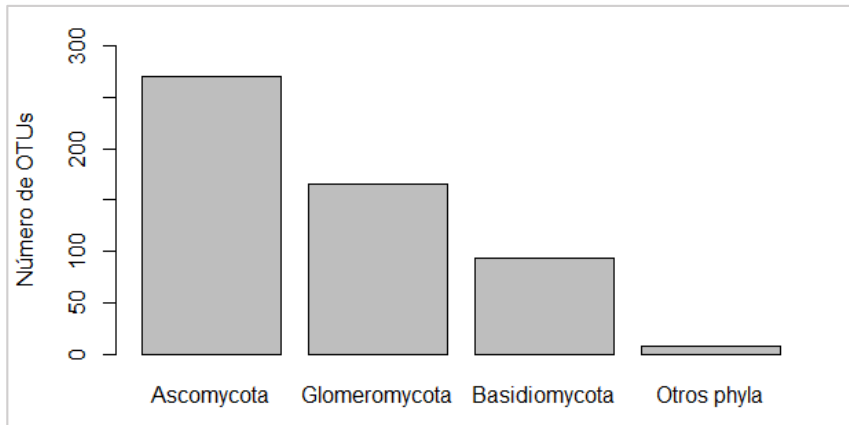


Figura 3. Número de OTUs de hongos endófitos asociados a la raíz de *B. orellana* asignados por filos más representativos.

Fuente y elaboración: Valeria Maza

El filo Ascomycota presentó el mayor número de clases (diez), seguido por Basidiomycota (ocho) y Mucoromycota (dos), mientras que los filos restantes (Entorrhizomycota, Glomeromycota, Monoblepharomycota y Mortierellomycota) presentaron el más bajo número de clases (una clase cada uno), siendo un total de 23 clases en las que se distribuyeron los OTUs identificados (505 OTUs). En 107 OTUs no se determinó su identidad hasta esta categoría taxonómica.

Las clases más representativas fueron Glomeromycetes con 151 OTUs (29,90%), seguida por Dothideomycetes con 93 OTUs (18,42%), Sordariomycetes con 73 OTUs (14,46%) y finalmente la clase Agaricomycetes con 70 OTUs (13,86%) (**Figura 4**).

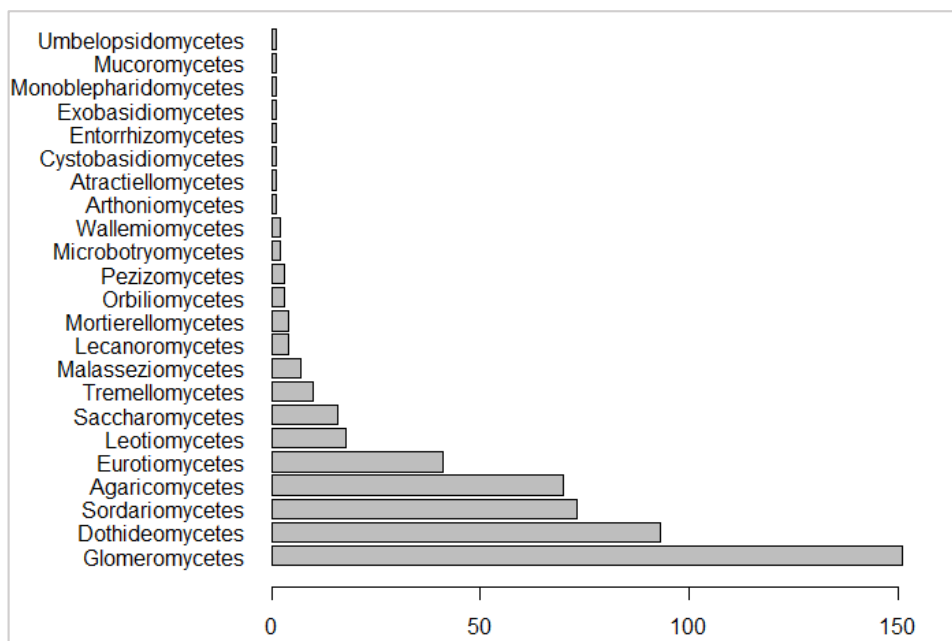


Figura 4. Número de OTUs de hongos endófitos asociados a la raíz de *B. orellana* distribuidos en cada una de las clases identificadas

Fuente y elaboración: Valeria Maza

A nivel de Orden, se identificó 480 OTUs, de estos 134 pertenecieron al orden Glomerales perteneciente a la clase Glomeromycetes la cual a pesar de contar con solamente dos órdenes es la más predominante, seguida por la clase Dothideomycetes con siete órdenes incluyendo al segundo orden más frecuente (Pleosporales) con 70 OTUs (**Figura 5**). Para 126 OTUs no se identificó hasta este nivel, mientras que seis de ellos se presentaron bajo la denominación “incertae sedis”, término usado para referirse a organismos con una posición taxonómica no bien establecida dentro de la clasificación (Baltazar y Gibertoni, 2009).

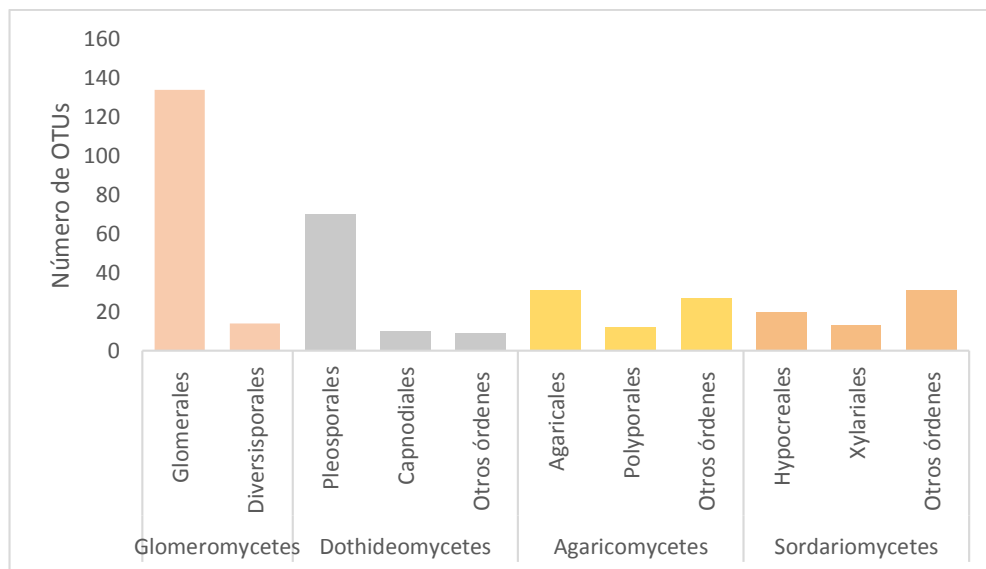


Figura 5. Distribución de frecuencias de OTUs de hongos endófitos asociados a la raíz de *B. orellana* pertenecientes a las clases más representativas con sus órdenes más frecuentes.

Fuente y elaboración: Valeria Maza

Los 409 OTUs asignados a nivel de Familia se distribuyeron en un total de 103 familias siendo Glomeracea la predominante con 133 OTUs. En la gran mayoría, las OTUs se asociaron a familias que no presentaban mucha incidencia, incluso familias únicas que ocurrían una vez (**Anexo 1**). Para 174 OTUs no se pudo identificar a este rango taxonómico mientras que 29 OTUs se identificaron como “incertae sedis”.

Comparación de la comunidad de hongos endófitos entre localidades

De los 409 OTUs de hongos endófitos asociados a la raíz de *Bixa orellana* asignados a nivel de familia, se encontró un total de 220 OTUs en Macará, 174 en Jamboé, 158 OTUs en los Encuentros y 108 en Paltas.

En las cuatro localidades los filos más representativos fueron Ascomycota, Glomeromycota y Basidiomycota. El filo Ascomycota fue el más frecuente con 113 OTUs en Macará y 74

OTUs en Paltas, mientras que Glomeromycota fue el más incidente con 76 OTUs en Jamboé y 72 OTUs en los Encuentros (**Figura 6**).

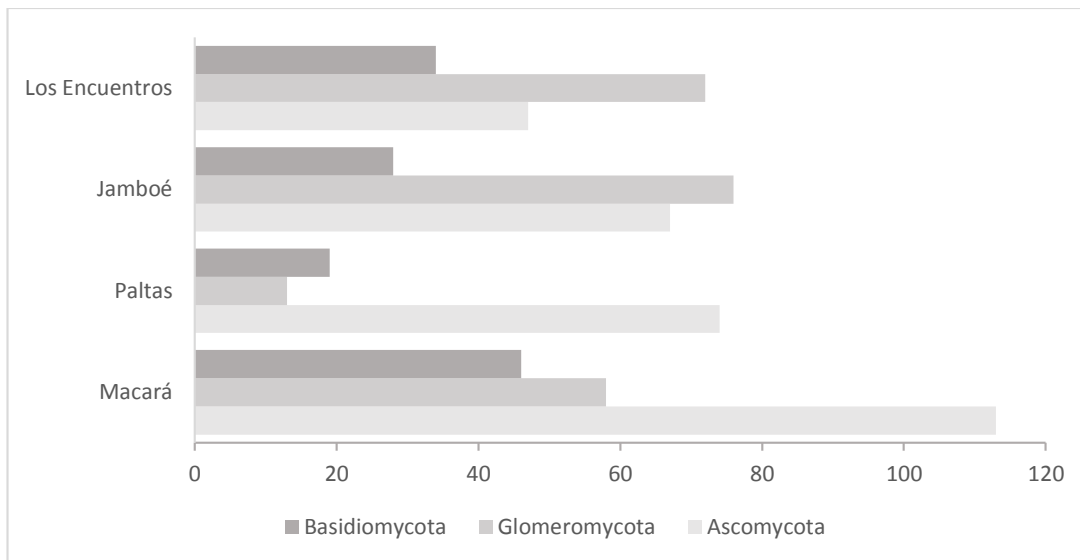


Figura 6. Frecuencia de OTUs asociados a las raíces de *B. orellana* correspondientes a los Filos más representativos en cada localidad de estudio.

Fuente y elaboración: Valeria Maza

En la localidad de Macará la clase dominante fue Glomeromycetes con 58 OTUs mientras que en Paltas la clase Dothideomycetes fue la más representativa con 40 OTUs asociados a este taxón, para las localidades de Jamboé y Los Encuentros dominó Glomeromycetes con 76 y 72 OTUs respectivamente, para estas dos últimas localidades las clases que también presentaron alta incidencia fueron Dothideomycetes y Agaricomycetes.

Aunque las OTUs estaban asociadas a una variedad de familias en cada una de las localidades (**Anexo 2**), en todas estas la familia Glomeraceae fue la más incidente (**Figura 7**).

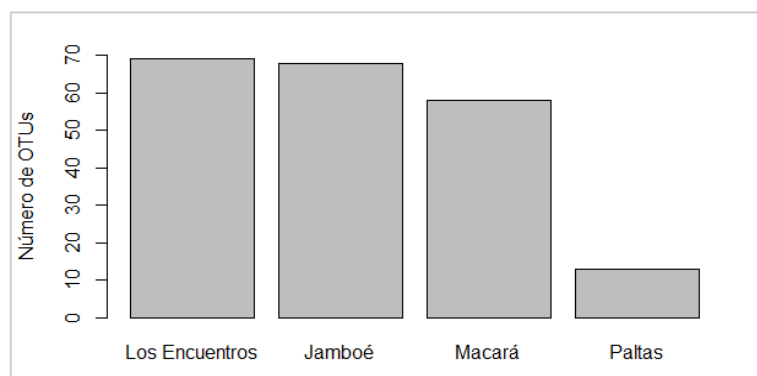


Figura 7. Número de OTUs de hongos endófitos pertenecientes a Glomeraceae asociadas a la raíz de *Bixa orellana* en las cuatro localidades de estudio.

Fuente y elaboración: Valeria Maza

El número de OTUs observados en cada una de las localidades no fue representativo puesto que presentan en Paltas 38%, Jamboé 40%, Los Encuentros 58% y Macará 66% de la diversidad esperada.

En base al esfuerzo de muestreo realizado las curvas de acumulación de las cuatro localidades de estudio no llegaron a su asíntota (**Figura 8**).

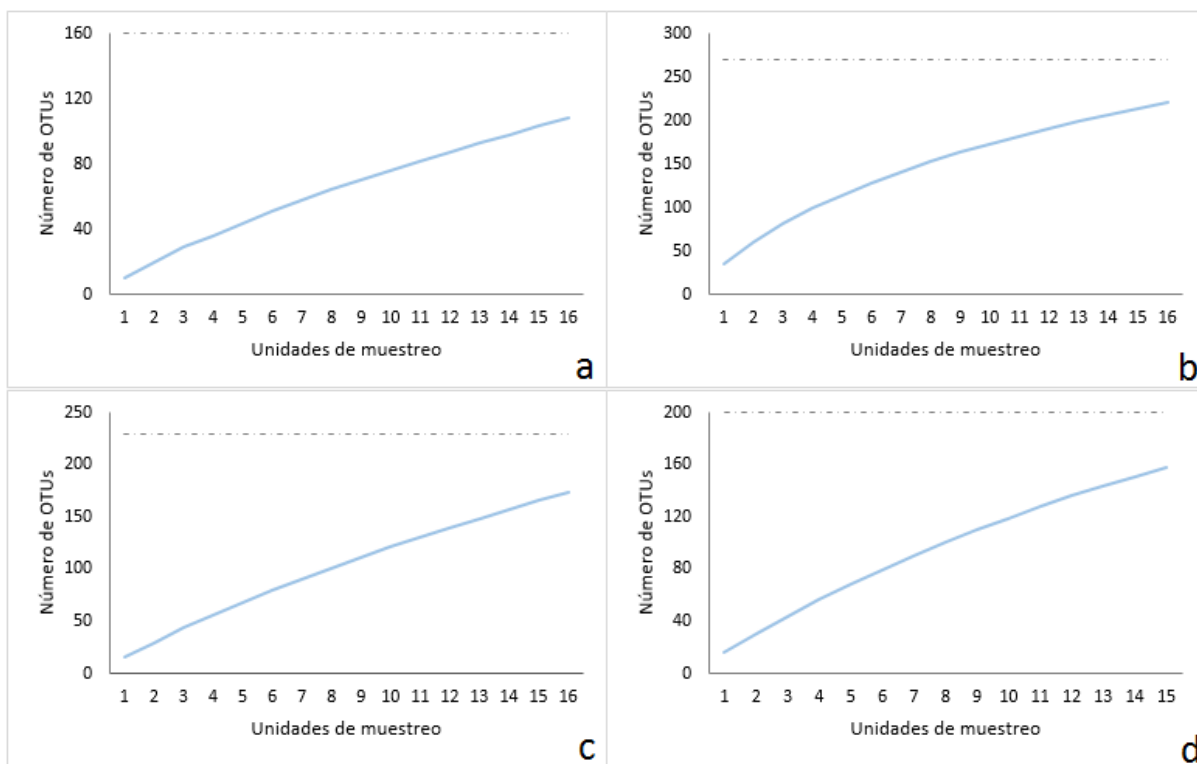


Figura 8. Curvas de acumulación de OTUs asociados a la raíz de *B. orellana* de las localidades de estudio. a: Paltas; b: Macará; c: Jamboé; d: Los Encuentros.

Fuente y elaboración: Valeria Maza

Un total de 15 OTUs se compartieron en los diferentes sitios, mientras que 88 OTUs fueron exclusivos de Jamboé, 73 de Macará, 57 de Los Encuentros y 19 OTUs de Paltas (**Figura 9**).

Macará fue el sitio que más OTUs compartió con otras localidades, con Paltas 80 OTUs y con Los Encuentros 79 OTUs.

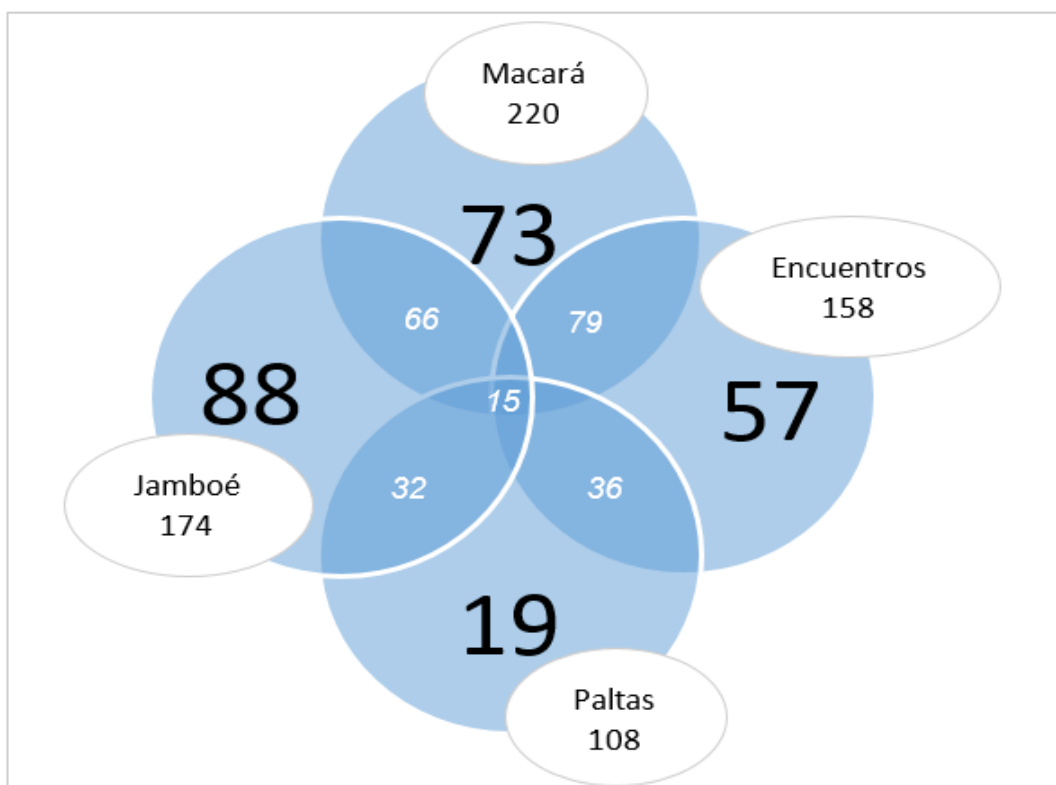


Figura 9. Distribución de OTUs endófitas asociados a la raíz de *B. orellana*, por localidad de estudio. El número total de OTUs de cada localidad se encuentra junto al nombre de la misma. Los OTUs únicos para cada sitio se presentan en negrita, los OTUs compartidos entre localidades se encuentran de color blanco.

Fuente y elaboración: Valeria Maza

De acuerdo a los índices de Chao-Jaccard y Chao-Sørensen existe la más alta similitud de las comunidades endófitas fúngicas de las localidades de Macará y Paltas, la menor similitud observada fue entre las localidades de Paltas y Jamboé (**Tabla 2**).

Tabla 2. Similitud entre los sitios de estudio representados con los índices Chao-Jaccard y Chao-Sørensen.

Comparación	Chao-Jaccard	Chao-Sørensen
Macará vs. Paltas	0,323	0,488
Macará vs. Jamboé	0,201	0,335
Macará vs. Los Encuentros	0,264	0,418
Paltas vs. Jamboé	0,128	0,227
Paltas vs. Los Encuentros	0,157	0,271
Jamboé vs. Los Encuentros	0,186	0,313

Fuente y elaboración: Valeria Maza

La diferencia en las comunidades de hongos endófitos asociados a la raíz de *B. orellana* fue altamente significativa (ANOSIM, $p=0.0001$), sin embargo de acuerdo al valor estadístico R (0,138) no se pueden considerar totalmente diferentes pues para esto, el valor de R debe ser elevado (0,75-1) (Schiller, 2003). Las comunidades de endófitos asociados a *B. orellana* se diferenciaron significativamente en todas las comparaciones por pares, siendo la localidad de Macará la que más difiere con cada una de las localidades restantes (**Tabla 3**).

Tabla 3. Comparación entre cada uno de las localidades de estudio por pares.

	Los Encuentros	Jamboé	Macará	Paltas
Los Encuentros		0,0499	0,0005	0,0074
Jamboé	0,0499		0,0002	0,0165
Macará	0,0005	0,0002		0,0003
Paltas	0,0074	0,0165	0,0003	

Fuente y elaboración: Valeria Maza

DISCUSIÓN

Bixa orellana posee una alta importancia económica que radica en su uso en la industria culinaria, cosmética e inclusive médica (Fontinele et al., 2018), ya que se la ha usado para el tratamiento de múltiples enfermedades, usando diversas partes de la planta como las raíces, las hojas o semillas (Ulbricht et al., 2012), lo que hace de ésta, una especie de alto interés de estudio. Hasta la fecha, este es el primer estudio que presenta la diversidad de hongos endófitos de las raíces de *B. orellana*, pues actualmente solo se ha emitido un primer reporte sobre la diversidad fúngica endófito de las hojas y tallo en esta especie (Kannan et al., 2017).

En base a los resultados se encontraron OTUs pertenecientes no sólo a hongos sino también asociados a otros reinos. A pesar de que los cebadores usados fueron específicos para el reino Fungi, se ha descrito que estos poseen un alto porcentaje de co-amplificación de secuencias pertenecientes a otros reinos (Martin y Rygielwicz, 2005).

A nivel de filo, 271 OTUs correspondieron a Ascomycota, siendo el filo con mayor frecuencia asociado a la raíz de *B. orellana*, seguido por Glomeromycota y Basidiomycota. Estos fillos han sido los más reportados como colonizadores de raíces de varias especies (Buée et al.,

2009; Koyama, Maherali, y Antunes, 2019; Wehner et al., 2014), aunque generalmente Ascomycota es el grupo dominante (Geisen et al., 2017; González, Vilo, y Bascuñán, 2017).

De acuerdo a las curvas de acumulación de especies de las localidades muestreadas, el esfuerzo de muestreo no fue el suficiente para reportar la riqueza de endófitos estimada. Así mismo se encontró dominancia por muy pocos taxones, pues la mayoría de OTUs tenían ocurrencias únicas. Patrones similares se han encontrado frecuentemente en estudios que tratan de reportar la comunidad endófito fúngica (Gazis y Chaverri, 2010; Vaz et al., 2014, 2018).

Como se mencionó anteriormente, Kannan et al. (2017), han realizado hasta el momento el único estudio sobre la diversidad de endófitos asociados a hojas y tallos de *B. orellana*. En cuanto a diversidad fúngica, en este describen que la colonización en la hoja fue dominada por *Pestalotiopsis* sp. (Sporocadaceae), seguido de *Phoma* sp. (Didymellaceae), *Phylosticta* (Botryosphaeriaceae) y *Nigrospora* sp (Trichosphaeriaceae); mientras, que el tallo estaba dominado por *Pestalotiopsis* sp (Sporocadaceae), seguido por *Nigrospora sphaerica* y *Chaetomium* sp (Chaetomiaceae) (Kannan et al., 2017).

Muchos endófitos fúngicos son altamente específicos de su hospedador (Firáková, Šturdíková, y Múčková, 2007; Ren, Lutzoni, Miadlikowska, Laetsch, y Arnold, 2012; Wehner et al., 2014), así como también entre especies vegetales que se encuentran estrechamente relacionadas, ya que pueden compartir una fenología y rasgos de la raíz similares (Davies et al., 2013). Sin embargo, se ha demostrado que los hongos endófitos no se presentan de forma ubicua, sino que también exhiben especificidad de tejidos, lo que explica su inmensa diversidad (Roy y Banerjee, 2018).

En relación a lo indicado por Roy y Banerjee (2018), si bien en el presente estudio se obtuvieron OTUs asociados a los géneros encontrados en las hojas y tallos de la especie, estos no fueron frecuentes, lo que justificaría que la comunidad endófito encontrada en las raíces de *B. orellana* difiera altamente de la reportada en otros tejidos de la especie. Wearn, Sutton, Morley, y Gange (2012), encontraron que las comunidades endófitas en huéspedes pertenecientes a las familias Asteraceae, Polygonaceae y Plantaginaceae fueron más diversas en la raíz que en los tejidos de las hojas. De igual manera Geisen et al. (2017), tampoco demostraron una superposición de la composición endófito en las semillas y raíz de *Centaurea stoebe*, pues la comunidad endófito fue mayor en las semillas, demostrando así que la similitud de las comunidades endófitas tanto en diferentes especies de plantas hospederas como en los órganos dentro de un mismo huésped es muy baja, afirmando que la mayoría de los endófitos tienen una localización restringida en los tejidos de las plantas.

Según Koyama, Maherali, y Antunes (2019), la disposición espacial de las plantas hospedadoras individuales predicen la estructura de la comunidad fúngica, independientemente de la planta hospedera. Los hongos endófitos se transmiten vertical y horizontalmente en la planta hospedera por fragmentación hifal y/o por esporas de planta a planta (Vaz et al., 2018). Debido a esto, la microbiota que rodea a las especies vegetales hospederas en cada área de estudio, es probablemente la responsable de los endófitos fúngicos que colonizan a los hospederos, independientemente de si corresponden a la misma especie (Vaz, Da Costa, Raad, y Góes-Neto, 2013). Si bien, este postulado parece contradecir al de la especificidad de la planta hospedera, es probable que, tanto la identidad de la planta huésped, como su disposición espacial en el campo, contribuyan a estructurar las comunidades de hongos endófitos.

Gran parte de la biomasa microbiana del suelo puede estar constituida por los hongos micorrízicos arbusculares, mismos que tienen la capacidad de colonizar prácticamente todos los tipos de plantas angiospermas y gimnospermas en todos los ecosistemas y suelos (De Carvalho, Tavares, Cardoso, y Kuyper, 2010; Smith y Read, 2008). En este estudio, en todas las localidades la clase Glomeromycetes con la familia Glomeraceae fue la más incidente. En Los Encuentros, Jamboé y Macará se halló la mayor cantidad de OTUS de la familia Glomeraceae y con menor intensidad en Paltas. Estos resultados coinciden con los expuestos por Palacios (2017), quien mediante tinción y cuantificación de porcentaje de colonización encontró el mayor porcentaje de hongos micorrízicos arbusculares en las raíces de *B. orellana* la localidad de Los Encuentros y en menor porcentaje en Paltas.

Aunque la comunidad fúngica sea capaz de dispersarse y colonizar sus hospederos, está sujeta a variables ambientales que a su vez seleccionan a los que se adaptan mejor a las condiciones ambientales locales (Hanson, Fuhrman, Horner-Devine, y Martiny, 2012). En los bosques tropicales húmedos las comunidades endófitas son más diversas que en los bosques secos tropicales (Banerjee, 2011) o inclusive bosques boreales (Arnold y Lutzoni, 2007). Suryanarayanan, Murali, y Venkatesan (2002), afirman que las comunidades de endófitos en los árboles de bosque siempre verde poseen la mayor diversidad de especies que cualquier otro tipo de bosque, siendo la temporada de lluvias la época en que más número de endófitos se presentó, concluyendo que la variación encontrada entre sitios está fuertemente asociada con los factores ambientales, además que la riqueza de endófitos disminuye en elevaciones altas y sitios secos, siendo las tasas más altas de infección en los sitios húmedos y de baja elevación (Ren et al., 2012; Zimmerman y Vitousek, 2012). Este patrón se refleja en los presentes resultados ya que, de las cuatro localidades estudiadas, Paltas fue donde se recuperó el menor número de OTUs siendo esta localidad la que mayor altitud (1360-1774 m s.n.m) y baja temperatura presenta de todas las localidades

muestreadas (18,6 °C). Por otro lado, Macará presentó el mayor número de OTUs de hongos endófitos, coincidiendo con lo expuesto anteriormente, ya que esta localidad tiene bajas altitudes (657-815m) y temperaturas de 25,5 °C. Si bien las localidades de Jamboé y Los Encuentros también presentan temperaturas elevadas, fueron en las que se encontró un alto número de OTUs en comparación con Paltas que presenta una marcada diferencia, por lo que se cree que la variación que se encontró en los sitios está fuertemente asociada a los factores ambientales.

CONCLUSIONES

Este estudio reportó por primera ocasión los hongos endófitos asociados a la raíz de *B. orellana*, especie de gran interés en múltiples campos.

La familia de hongos endófitos más incidente en las muestras de todas las localidades de estudio fue Glomeracea perteneciente a la clase Glomeromycetes.

La composición de la comunidad endófito fúngica de las raíces de *Bixa orellana* varió significativamente entre las localidades de estudio, el elevado valor de disimilitud entre estas radica en la alta presencia de taxones raros poco frecuentes en cada uno de los sitios de estudio, sugiriendo que cada localidad posee una comunidad característica de hongos endófitos.

Los factores ambientales característicos de cada localidad podrían explicar las diferencias de esta diversidad en las diferentes localidades.

Considerando que al menos cada individuo vegetal alberga al menos un tipo de endófito, y que muy pocos de estos han sido estudiados se postula que la oportunidad de encontrar nuevas especies de hongos endófitos interesantes entre la inmensa variedad de plantas presentes en diferentes ecosistemas es excelente.

BIBLIOGRAFÍA

- Akshatha, V., Giridhar, P., y Ravishankar, G. A. (2011). Morphological diversity in *Bixa orellana* L. and variations in annatto pigment yield. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 86(4), 319–324. <https://doi.org/10.1080/14620316.2011.11512767>
- Altschup, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E., y Lipman, D. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403–410.
- Alvarado, L., y Chuquimarca, E. (2015). *Diseño del circuito turístico para la Mancomunidad “Bosque Seco” que recorra los cantones: Celica, Puyango, Pindal, Zapotillo y Macará. Período 2015 – 2025*. Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador.
- Araque Espinoza, I. S. (2017). *Recuperación de tocotrienoles de las semillas de Bixa orellana L. mediante extracción supercrítica con CO₂*. Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador.
- Arnold, E., y Lutzoni, F. (2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*, 88(3), 541–549.
- Baltazar, J. M., y Gibertoni, T. B. (2009). A checklist of the aphylloroid fungi (Basidiomycota) recorded from the Brazilian Atlantic Forest. *Mycotaxon*, 109, 439–442.
- Banerjee, D. (2011). Endophytic fungal diversity in tropical and subtropical plants. *Journal of Microbiology*, 6(1), 54–62.
- Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R., Uroz, S., y Martin, F. (2009). 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist*, 184, 449–456.
- Cevallos, S., Sánchez, A., Decock, C., Declerck, S., y Suárez, J. P. (2016). Are there keystone mycorrhizal fungi associated to tropical epiphytic orchids? *Mycorrhiza*, 6(6), 640–642. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0746-8>
- Chao, A. (1987). Estimating the Population Size for Capture-Recapture Data with Unequal Catchability. *Biometrics*, 43(4), 783–791.
- Chao, A., Chazdon, R. L., Colwell, R. K., y Shen, T.-J. (2005). Un nuevo método estadístico para la evaluación de la similitud en la composición de especies con datos de incidencia y abundancia. *Ecology Letters*, 8, 148–159.
- Clarke, K. R. (1993). Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, 18(1988), 117–143.
- Collwell, R. (2013). EstimateS: statistical estimation of species richness and shared species from samples. User's Guide.
- Davies, T. J., Wolkovich, E. M., Kraft, N. J. B., Salamin, N., Allen, J. M., Ault, T. R., ... Travers, S. E. (2013). Phylogenetic conservatism in plant phenology. *Journal of Ecology*, (Chuine 2010), 1520–1530. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12154>
- De Araujo Vilar, D., de Araujo Vilar, M. S., Moura, T. F. A., Raffin, F. N., Oliveira, M. R., De Oliveira Franco, C. F., ... Barbosa-Filho, J. M. (2014). Traditional uses, chemical constituents, and biological activities of *Bixa orellana* L.: A Review. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/857292>
- De Carvalho, M. X., Tavares, R. D. C., Cardoso, M. I., y Kuyper, T. W. (2010). Mycorrhizal associations in agroforestry systems. *Soil Biology and Agriculture in the Tropics*, 185–208. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-05076-3>
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 10(10). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>
- Firáková, S., Šturdíková, M., y Múčková, M. (2007). Bioactive secondary metabolites

- produced by microorganisms associated with plants. *Versita*, 62(3), 251–257. <https://doi.org/10.2478/s11756-007-0044-1>
- Fontinele, L., Cardoso de Sousa, R., Freitas, V., De Oliveira, E., Queiroz, E., y Eiras, C. (2018). Norbixin extracted from urucum (*Bixa orellana* L.) for the formation of conductive composites with potential applications in electrochemical sensors. *Surfaces and Interfaces*, 13, 92–10. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2018.08.002>
- Frega, N., Mozzon, M., y Bocci, F. (1998). Identification and estimation of tocotrienols in the annatto lipid fraction by gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(12), 1723–1727.
- Gallo, M. B. C., Chagas, F. O., Almeida, M. O., Macedo, C. C., Cavalcanti, B. C., Barros, F. W. A., ... Pupo, M. T. (2009). Endophytic fungi found in association with *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural products. *Journal of Basic Microbiology*, 49(2), 142–151. <https://doi.org/10.1002/jobm.200800093>
- Gamboa, M. (2006). Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. *Acta Biológica Colombiana*, 18. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v11s1/v11s1a01.pdf>
- Gazis, R., y Chaverri, P. (2010). Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. *Fungal Ecology*, 3(3), 240–254. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2009.12.001>
- Geisen, S., Kostenko, O., Cnossen, M. C., Hooven, F. C., Vreš, B., y Putten, W. H. Van Der. (2017). Seed and Root Endophytic Fungi in a Range Expanding and a Related Plant Species. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01645>
- Gobierno Autónomo Descentralizado cantón Macará. (2014). *Plan de desarrollo y ordenamiento territorial del cantón Macará*.
- Gobierno Autónomo Descentralizado de la Parroquia Lauro Guerrero. (2015). *Plan de desarrollo y ordenamiento territorial de la parroquia Lauro Guerrero*.
- Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial de Los Encuentros. (2015). *Plan de desarrollo y ordenamiento territorial parroquia de Los Encuentros*.
- Gobierno autónomo descentralizado parroquial de Timbara. (2019). *Actualización del plan de desarrollo y ordenamiento territorial parroquial de Timbara*.
- González, M., Vilo, C., y Bascuñán, L. (2017). Molecular characterization of endophytic fungi associated with the roots of *Chenopodium quinoa* inhabiting the Atacama Desert , Chile. *Genomics Data*, 11, 109–112. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2016.12.015>
- Guamán, A. (2014). *Cantón Paltas: Estrategias para su desarrollo económico y social*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., y Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontología Electrónica*, 4(1), 1–9.
- Hanson, C. A., Fuhrman, J. A., Horner-Devine, M. C., y Martiny, J. B. H. (2012). Beyond biogeographic patterns : processes shaping the microbial landscape. *Nature Reviews Microbiology*, 10(7), 497–506. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2795>
- Heredia, C., Alarcón, A., Hernández, L., Ferrera, R., y Almaraz, J. (2014). Diversidad, ecología e importancia potencial de los hongos endófitos septados oscuros en México. *Botanical Sciences*, 92(3), 321–333.
- Husain, K., Zhang, A., Shivers, S., Yadley, A., Coppola, D., Yang, C., y Malafa, M. (2019). Chemoprevention of azoxymethane-induced colon carcinogenesis by Delta-Tocotrienol.

Cancer Prevention Research. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-18-0290>

- Kannan, K., Ashwanandhini, G., Hemasindhu, B., Vinithkumar, D., y Senthamarai, M. (2017). Investigation of endophytic fungi associated with *Bixa orellana* L., a medicinal plant collected from western ghats of sathyamangalam - A first report. *Journal of Bacteriology y Mycology: Open Access*, 5(5), 381–385. <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2017.05.00150>
- Kim, Y., Wang, W., Okla, M., Kang, I., Moreau, R., y Chung, S. (2016). Suppression of NLRP3 inflammasome by gamma-tocotrienol ameliorates type 2 diabetes. *Journal of Lipid Research*, 57, 66–76. <https://doi.org/10.1194/jlr.M062828>
- Koyama, A., Maherali, H., y Antunes, P. M. (2019). Plant geographic origin and phylogeny as potential drivers of community structure in root-inhabiting fungi. *Journal of Ecology*, 0–2. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13143>
- Kuan, S., Chin, K., Hj, F., y Ahmad, F. (2018). Exploring the potential of tocotrienol from *Bixa orellana* as a single agent targeting metabolic syndrome and bone loss. *Bone*, 116, 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.07.003>
- Louro, R. P., y Santiago, L. J. M. (2016). Development of carotenoid storage cells in *Bixa orellana* L. seed arils. *Protoplasma*, 253(1), 77–86. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0789-2>
- Malagón, O., Morocho, V., Cueva, A., Andrade, J., Ojeda, S., y Lucero, H. (2015). *Estudios para la colección, conservación y aprovechamiento de especies vegetales de interés medicinal en la región Sur del Ecuador*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Martin, K. J., y Rygiewicz, P. T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-28>
- Mohamed, W. M. Y., Sayeed, S., Saxena, A. K., y Oothuman, P. (2018). Oxidative stress status and neuroprotection of tocotrienols in chronic cerebral hypoperfusion-induced neurodegeneration rat animal model. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 8, 47–52. <https://doi.org/10.4103/ijnpnd.ijnpnd>
- Murray, M. G., y Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8, 4321–4326.
- Op De Beeck, M., Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J., y Colpaert, J. V. (2014). Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097629>
- Otero, J. T., Ackerman, J. D., y Bayman, P. (2002). Diversity and host specificity of endophytic Rhizoctonia-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*, 89(11), 1852–1858. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.11.1852>
- Palacios, D. (2017). *Determinación del porcentaje de colonización de hongos micorrízicos arbusculares(HMA) en plantaciones de Bixa orellana*. Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador.
- Poma, M. (2015). *Plan estratégico de desarrollo turístico sostenible para la parroquia Los Encuentros Cantón Yantzaza, Provincia de Zamora Chinchipe*. Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador.
- Raddatz-Mota, D., Pérez-Flores, L. J., Carrari, F., Mendoza-Espinoza, J. A., de León-Sánchez, F. D., Pinzón-López, L. L., ... Rivera-Cabrera, F. (2017). Achiote (*Bixa orellana* L.): a natural source of pigment and vitamin E. *Journal of Food Science and Technology*, 54(6), 1729–1741. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2579-7>
- Ren, J., Lutzoni, F., rancois, Miadlikowska, J., Laetsch, A., y Arnold, El. (2012). Host and

- geographic structure of endophytic and endolichenic fungi at a continental scale. *American Journal of Botany*, 99(5), 898–914. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100459>
- Rey, W. A. (2012). *Extracción de tocotrienoles a partir de la semillas de achiote (Bixa orellana), usando CO₂ supercrítico como solvente*. Universidad del Valle, Cali, Colombia.
- Rodrigues, K. (1994). The foliar fungal endophytes of the amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia*, 86(3), 376–385. <https://doi.org/10.2307/3760568>
- Saikkonen, K. (2007). Forest structure and fungal endophytes. *Fungal Biology Reviews*, 21(2–3), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.001>
- Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, Y. K., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., y García-Méndez, Claudia Macías-Rubalcava, M. L. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico Biológicas*, 16(2), 132–146. [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(13\)72084-9](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(13)72084-9)
- Santamaría, J., y Bayman, P. (2005). Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology*, 50(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0002-1>
- Schardl, C. L., Leuchtman, A., y Spiering, M. J. (2004). Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 315–340. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141735>
- Schiller, C. (2003). Monitoring river health initiative technical report number 36. Retrieved from <http://pandora.nla.gov.au/tep/25389>
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A. K., y Krohn, K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, 996–1004. <https://doi.org/10.1017/S0953756202006342>
- Shahid-ul-Islam, Rather, L. J., y Mohammad, F. (2016). Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications - A review. *Journal of Advanced Research*, 7(3), 499–514. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.11.002>
- Smith, S., y Read, D. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. (Academic Press, Ed.) (Third). New York.
- Sunitha, V., Nirmala Devi, D., y Srinivas, C. (2013). Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. *World Journal of Agricultural Sciences*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.5829/idosi.wjas.2013.9.1.72148>
- Suryanarayanan, T. S., Murali, T. S., y Venkatesan, G. (2002). Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. *Canadian Journal of Botany*, 80(8), 818–826. <https://doi.org/10.1139/B02-069>
- Tedersoo, L., Sánchez, S., Koljalg, U., Bahram, M., Döring, M., Schigel, D., ... Abarenkov, K. (2018). High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Diversity*, 90, 135–159. <https://doi.org/10.1007/s13225-018-0401-0>
- Terhonen, E., Keriö, S., Sun, H., y Asiegbu, F. (2014). Endophytic fungi of Norway spruce roots in boreal pristine mire, drained peatland and mineral soil and their inhibitory effect on *Heterobasidion parviporum* in vitro. *Fungal Ecology*, 9, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.01.003>
- Tran, A. T., Ramalinga, M., Kedir, H., Clarke, R., y Kumar, D. (2014). Autophagy inhibitor 3-methyladenine potentiates apoptosis induced by dietary tocotrienols in breast cancer cells. *European Journal of Nutrition*, 54. <https://doi.org/10.1007/s00394-014-0707-y>

- Ulbricht, C., Windsor, R. C., Brigham, A., Bryan, J. K., Conquer, J., Costa, D., ... Weissner, W. (2012). An evidence-based systematic review of annatto (*Bixa orellana* L.) by the natural standard research collaboration. *Journal of Dietary Supplements*, 9, 57–77. <https://doi.org/10.3109/19390211.2012.653530>
- Uzma, F., Konappa, N. M., y Chowdappa, S. (2016). Diversity and extracellular enzyme activities of fungal endophytes isolated from medicinal plants of Western Ghats, Karnataka. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4), 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.ejbas.2016.08.007>
- Vaz, A., Da Costa, A., Raad, L., y Góes-Neto, A. (2013). Fungal endophytes associated with three South American Myrtaceae (Myrtaceae) exhibit preferences in the colonization at leaf level. *Fungal Biology*, 8(75). <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.11.010>
- Vaz, A., Fonseca, P. L. C., Badotti, F., Skaltsas, D., Tomé, L. M. R., Silva, A. C., ... Góes-neto, A. (2018). A multiscale study of fungal endophyte communities of the foliar endosphere of native rubber trees in Eastern Amazon. *Scientific Reports*, 8(October), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34619-w>
- Vaz, A., Fontenla, S., Rocha, F. S., Brandao, L., Vieira, M. L. A., Garcia, V. D. E., ... Rosa, C. A. (2014). Fungal endophyte b -diversity associated with Myrtaceae species in an Andean Patagonian forest. *Fungal Diversity*, 8(31), 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.12.008>
- Vieira, M. L. A., Johann, S., Hughes, F. M., Rosa, C. A., y Rosa, L. H. (2014). The diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi associated with medicinal plant *Baccharis trimera* (Asteraceae) from the Brazilian savannah. *Canadian Journal of Microbiology*, 60(12), 847–856. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0449>
- Wearn, J. A., Sutton, B. C., Morley, N. J., y Gange, A. C. (2012). Species and organ specificity of fungal endophytes in herbaceous grassland plants. *Journal of Ecology*, 100(5), 1085–1092. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2012.01997.x>
- Wehner, J., Powell, J. R., Muller, L. A. H., Caruso, T., Veresoglou, S. D., Hempel, S., y Rillig, M. C. (2014). Determinants of root-associated fungal communities within Asteraceae in a semi-arid grassland. *Journal of Ecology*, 102(2), 425–436. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12197>
- White, T., Bruns, T., Lee, S. B., y Taylor, J. W. (1990). Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, (January).
- Zheng, Y., Qiao, X., Miao, C., Liu, K., Chen, Y.-W., Xu, L.-H., y Zhao, L.-X. (2015). Diversity , distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. *Annals of Microbiology*, 66, 529–542. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1153-7>
- Zimmerman, N. B., y Vitousek, P. M. (2012). Fungal endophyte communities reflect environmental structuring across a Hawaiian landscape. *PNAS*, 109(32), 13022–13027. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209872109>

ANEXOS

Anexo 1. Número de OTUs de hongos endófitos asociados a las raíces de *B. orellana*, identificados por familia.

Familia	Número de OTUs	Familia	Número de OTUs
Acaulosporaceae	8	Marasmiaceae	1
Agaricaceae	2	Massarinaceae	3
Amphisphaeriaceae	1	Melanommataceae	3
Aspergillaceae	9	Metschnikowiaceae	1
Bionectriaceae	2	Microdochiaceae	1
Bolbitiaceae	1	Morosphaeriaceae	4
Botryosphaeriaceae	3	Mortierellaceae	4
Brachybasidiaceae	1	Mycenaceae	8
Bulleribasidiaceae	3	Mycosphaerellaceae	2
Ceratobasidiaceae	4	Myrmecridiaceae	3
Ceratocystidaceae	1	Myxotrichaceae	1
Chaetomellaceae	1	Nectriaceae	7
Chaetomiaceae	1	Neopyrenochaetaceae	3
Cladosporiaceae	6	Nigrogranaceae	1
Clavariaceae	3	Ophiocordycipitaceae	2
Clavicipitaceae	3	Orbiliaceae	3
Corticaceae	3	Periconiaceae	1
Crepidotaceae	1	Phaeococcomycetaceae	1
Cucurbitariaceae	7	Phaeosphaeriaceae	12
Cyphellophoraceae	2	Physalacriaceae	1
Cystobasidiaceae	1	Plectosphaerellaceae	1
Cystofilobasidiaceae	2	Pleosporaceae	1
Debaryomycetaceae	7	Pleurotheciaceae	1
Dermateaceae	1	Polyporaceae	5
Diaporthaceae	6	Psathyrellaceae	3
Dictyosporiaceae	1	Pseudopyrenochaetaceae	1
Didymellaceae	9	Ramalinaceae	4
Didymosphaeriaceae	5	Rhynchogastremataceae	3
Dipodascaceae	2	Saccharomycodaceae	1
Entolomataceae	2	Sacchettoeciaceae	2
Entorrhizaceae	1	Sarcosomataceae	1
Filobasidiaceae	1	Schizoparmaceae	1
Geastraceae	1	Schizophyllaceae	2
Gigasporaceae	2	Sebacinaceae	2
Glomeraceae	133	Serendipitaceae	2
Glomerellaceae	1	Sporidiobolaceae	2
Helotiaceae	4	Sporocadaceae	2
Herpotrichiellaceae	13	Stachybotryaceae	2
Hyaloscyphaceae	4	Steccherinaceae	3
Hydnodontaceae	4	Sympoventuriaceae	1
Hygrophoraceae	1	Teratosphaeriaceae	2
Hypoxylaceae	1	Thyridariaceae	2

Hysterangiaceae	1	Trichocomaceae	3
Irpicaceae	1	Tricholomataceae	3
Lachnocladiaceae	1	Trichomeriaceae	3
Lasiosphaeriaceae	2	Trichosphaeriaceae	4
Lentitheciaceae	1	Tubeufiaceae	2
Lichtheimiaceae	1	Umbelopsidaceae	1
Lophiostomataceae	1	Verrucariaceae	1
Lycoperdaceae	1	Wallemiaceae	2
Magnaporthaceae	2	Xylariaceae	3
Malasseziaceae	6	Incertae sedis	29
		Sin identificación	174

TOTAL: 612 OTUs

Anexo 2. Familias de hongos endófitos asociados a la raíz de *B. orellana* presentes en las zonas de estudio: Macará, Paltas, Jamboé y Los Encuentros.

Jamboé		Encuentros	
Acaulosporaceae	Magnaporthaceae	Acaulosporaceae	Melanommataceae
Agaricaceae	Malasseziaceae	Agaricaceae	Metschnikowiaceae
Aspergillaceae	Melanommataceae	Amphisphaeriaceae	Microdochiaceae
Bionectriaceae	Morosphaeriaceae	Aspergillaceae	Morosphaeriaceae
Brachybasidiaceae	Mortierellaceae	Bulleribasidiaceae	Mortierellaceae
Chaetomellaceae	Mycenaceae	Ceratobasidiaceae	Mycenaceae
Cladosporiaceae	Nectriaceae	Ceratocystidaceae	Nectriaceae
Clavariaceae	Orbiliaceae	Cladosporiaceae	Ophiocordycipitaceae
Clavicipitaceae	Periconiaceae	Clavicipitaceae	Orbiliaceae
Crepidotaceae	Phaeococcomycetaceae	Cucurbitariaceae	Phaeosphaeriaceae
Cucurbitariaceae	Phaeosphaeriaceae	Cystobasidiaceae	Physalacriaceae
Cyphellophoraceae	Pleosporaceae	Debaryomycetaceae	Plectosphaerellaceae
Cystofilobasidiaceae	Polyporaceae	Diaporthaceae	Pleurotheciaceae
Debaryomycetaceae	Psathyrellaceae	Dictyosporiaceae	Polyporaceae
Dermateaceae	Ramalinaceae	Didymellaceae	Psathyrellaceae
Didymosphaeriaceae	Rhynchogastremataceae	Entolomataceae	Ramalinaceae
Entolomataceae	Schizophyllaceae	Entorrhizaceae	Rhynchogastremataceae
Entorrhizaceae	Serendipitaceae	Gigasporaceae	Serendipitaceae
Geastraceae	Sporidiobolaceae	Glomeraceae	Sporidiobolaceae
Gigasporaceae	Sporocadaceae	Glomerellaceae	Sporocadaceae
Glomeraceae	Stachybotryaceae	Herpotrichiellaceae	Stachybotryaceae
Helotiaceae	Symptoventuriaceae	Hydnodontaceae	Steccherinaceae
Herpotrichiellaceae	Thyridariaceae	Incertae sedis	Thyridariaceae
Incertae sedis	Trichomeriaceae	Lasiosphaeriaceae	Tricholomataceae
Lachnocladiaceae	Trichosphaeriaceae	Magnaporthaceae	Trichosphaeriaceae
Lasiosphaeriaceae	Tubeufiaceae	Malasseziaceae	Tubeufiaceae
Lichtheimiaceae	Verrucariaceae	Marasmiaceae	Umbelopsidaceae
Lycoperdaceae		Massarinaceae	Wallemiaceae
Macará		Paltas	
Aspergillaceae	Mortierellaceae	Aspergillaceae	Myxotrichaceae
Bionectriaceae	Mycenaceae	Bionectriaceae	Nectriaceae
Bolbitiaceae	Mycosphaerellaceae	Botryosphaeriaceae	Neopyrenochaetaceae
Botryosphaeriaceae	Myrmecridiaceae	Bulleribasidiaceae	Orbiliaceae
Brachybasidiaceae	Myxotrichaceae	Cladosporiaceae	Periconiaceae
Bulleribasidiaceae	Nectriaceae	Clavicipitaceae	Phaeosphaeriaceae

Ceratobasidiaceae	Neopyrenochaetaceae	Cucurbitariaceae	Plectosphaerellaceae
Cladosporiaceae	Nigrogranaceae	Cyphellophoraceae	Pleosporaceae
Clavariaceae	Ophiocordycipitaceae	Debaryomycetaceae	Polyporaceae
Clavicipitaceae	Orbiliaceae	Diaporthaceae	Pseudopyrenochaetaceae
Corticaceae	Periconiaceae	Didymellaceae	e
Cucurbitariaceae	Phaeosphaeriaceae	Glomeraceae	Ramalinaceae
Cyphellophoraceae	Plectosphaerellaceae	Incertae sedis	Rhynchogastremataceae
Cystobasidiaceae	Polyporaceae	Lentitheciaceae	Sacchettoeciaceae
Debaryomycetaceae	Psathyrellaceae	Malasseziaceae	Sarcosomataceae
Dermateaceae	Pseudopyrenochaetaceae	Massarinaceae	Serendipitaceae
Diaporthaceae	e	Melanommataceae	Sporidiobolaceae
Didymellaceae	Ramalinaceae	Morosphaeriaceae	Steccherinaceae
Didymosphaeriaceae	Rhynchogastremataceae	Mortierellaceae	Teratosphaeriaceae
Dipodascaceae	Saccharomycodaceae	Mycenaceae	Trichocomaceae
Entolomataceae	Sarcosomataceae	Mycosphaerellaceae	Trichomeriaceae
Entorrhizaceae	Schizoparmaceae	Myrmecridiaceae	Trichosphaeriaceae
Filobasidiaceae	Schizophyllaceae		Xylariaceae
Glomeraceae	Serendipitaceae		
Helotiaceae	Sporidiobolaceae		
Herpotrichiellaceae	Sporocadaceae		
Hyaloscyphaceae	Stachybotryaceae		
Hydnodontaceae	Steccherinaceae		
Hypoxylaceae	Sympoventuriaceae		
Hysterangiaceae	Teratosphaeriaceae		
Incertae sedis	Thyridariaceae		
Irpicaceae	Trichocomaceae		
Lophiostomataceae	Tricholomataceae		
Magnaporthaceae	Trichomeriaceae		
Malasseziaceae	Trichosphaeriaceae		
Massarinaceae	Tubeufiaceae		
Morosphaeriaceae	Wallemiaceae		
	Xylariaceae		
