



**CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL
DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA**

DIVISIÓN DE EDUCACIÓN

PROGRAMA DE POSGRADO

**Efecto de los cambios potenciales de temperatura en hongos endófitos
asociados a una poácea (*Chusquea subtessellata*) del páramo de Costa Rica**

**Tesis sometida a consideración de la División de Educación y el Programa de
Posgrado
como requisito para optar al grado de**

MAGISTER SCIENTIAE

En Manejo y Conservación de Bosques Tropicales y Biodiversidad

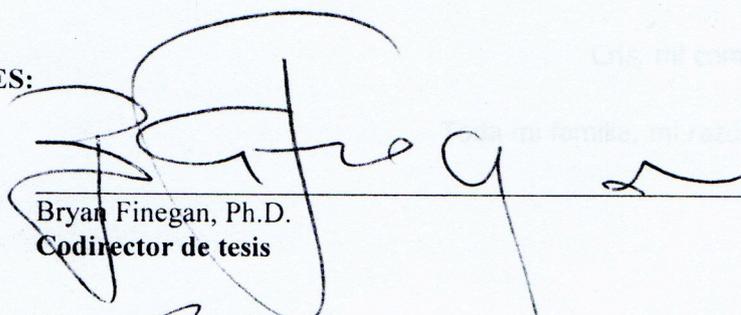
**Por
Carolina Seas Carvajal**

**Turrialba, Costa Rica
2017**

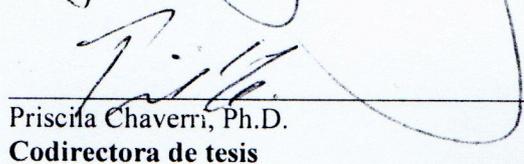
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por la División de Educación y el Programa de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del estudiante, como requisito parcial para optar por el grado de

**MAGISTER SCIENTIAE EN MANEJO Y CONSERVACIÓN DE
BOSQUES TROPICALES Y BIODIVERSIDAD**

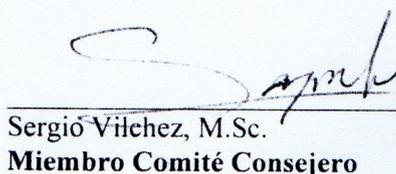
FIRMANTES:



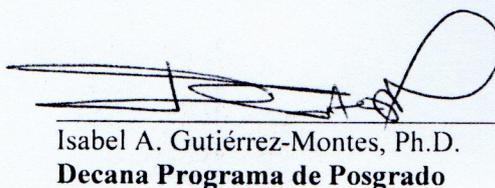
Bryan Finegan, Ph.D.
Codirector de tesis



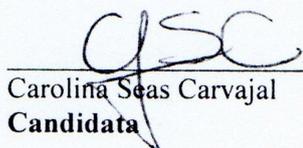
Priscila Chaverri, Ph.D.
Codirectora de tesis



Sergio Vilchez, M.Sc.
Miembro Comité Consejero



Isabel A. Gutiérrez-Montes, Ph.D.
Decana Programa de Posgrado



Carolina Seas Carvajal
Candidata

DEDICATORIA

Mami y Papi, quienes han sido el mayor soporte en cada uno de mis pasos.

Cris, mi compañero de vida y aventuras.

Toda mi familia, mi razón de ser, de amar y de vivir.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Estatal a Distancia por el apoyo financiero brindado a través de su Acuerdo de Mejoramiento Institucional y el Consejo de Becas Institucional, para poder cumplir este sueño.

A todos los profesores por sus enseñanzas, gracias. Especial agradecimiento a Priscila Chaverri por ser un ejemplo de mujer fuerte y empoderada en la ciencia, que me brindó su apoyo en este camino compartiendo su fascinación por los hongos.

A Bryan Finegan por su apoyo y motivación en este trabajo. A Sergio Vílchez por ser guía durante todo este proceso, y también durante lo que sentí fue un eterno proceso de análisis de datos.

A todos mis queridos boscosos y allegados culturales, esta Maestría no hubiese sido lo mismo sin esta familia que somos ahora. Gracias por enseñarme a seguir sin prisa, pero sin pausa; porque no pasa nada y usted tranquila. Por todos los mensajes de positivismo.

Todo mi agradecimiento a los excelentes asistentes de campo, Andrea Pacheco, Andrea Paiz, Luis Pedro Utrera y Cristhian Ureña. La experiencia en un lugar tan místico como el páramo y en especial el Chirripó, fue aún mejor gracias a su compañía.

En el laboratorio, Beatriz Segura, Grace Cobos, Andrea Paiz; por su ayuda, motivación y amistad nunca terminaré de agradecerles.

A mi familia, porque desde siempre han apoyado mis sueños y me han dado motivación, fuerza y amor para seguir luchando por ellos. A mi mamá, Alicia Carvajal, porque nunca ha permitido que me rinda.

A Cris, por todo el amor y paciencia en este proceso; por siempre caminar a mi lado y darme tanta felicidad.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
TABLA DE CONTENIDO	V
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE CUADROS	VII
LISTA DE ACRÓNIMOS, ABREVIATURAS Y UNIDADES	VIII
RESUMEN	IX
ABSTRACT	IX
I. SÍNTESIS GENERAL DE LA TESIS	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes	2
1.2 Justificación	3
1.3 Importancia.....	3
2. OBJETIVOS.....	5
2.1 Objetivo General	5
2.2 Objetivos Específicos	5
2.3 Hipótesis de Investigación	5
3. MARCO REFERENCIAL	6
4. REFERENCIAS.....	14
II. ARTÍCULO 1	18
Diversidad de hongos endófitos psicrófilicos de <i>Chusquea subtessellata</i> (Poaceae) en el páramo, Costa Rica	
INTRODUCCIÓN	18
METODOLOGÍA.....	19
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	29
REFERENCIAS.....	31
III. ARTÍCULO 2	35
Respuesta del crecimiento de hongos endófitos psicrófilicos, asociados a <i>Chusquea subtessellata</i>, ante cambios de temperatura	
INTRODUCCION	35
METODOLOGÍA.....	36
RESULTADOS	38
DISCUSION	42
REFERENCIAS.....	44
ANEXO 1	47

LISTA DE FIGURAS

II. ARTÍCULO 1 18

Diversidad de hongos endófitos psicrófilos de *Chusquea subtessellata* (Poaceae) en el páramo, Costa Rica

- Fig. 1.** Ubicación general de las áreas de estudio: Cerro Buena Vista (3 491msnm) y Cerro Chirripó (3 819msnm). Elaborado por: Ing. Danhy Estid Fuentes (2014). Fuente: Atlas de Costa Rica (2014).....20
- Fig 2.** Grupos de curvas de crecimiento basados en ANOVA24
- Fig. 3.** Residuos parciales del crecimiento radial (mm) de las cuatro grupos de curvas de crecimiento entre 4 y 25°C.....24
- Fig. 4.** Curvas de acumulación de especies basados en interpolación y extrapolación no asintóticas según el sitio (a) y según la parte vegetal (b)27
- Fig. 5.** Diagrama de ordenación (NMS) que muestra la relación entre los sitios Buena Vista y Chirripó y el gradiente altitudinal28

III. ARTÍCULO 2 35

Respuesta del crecimiento de hongos endófitos psicrófilos, asociados a *Chusquea subtessellata*, ante cambios de temperatura

- Fig. 1.** Ubicación general de las áreas de estudio: Cerro Buena Vista (3 491msnm) y Cerro Chirripó (3 819msnm). Elaborado por: Ing. Danhy Estid Fuentes (2014). Fuente: Atlas de Costa Rica (2014).....36
- Fig. 2.** Diagrama del diseño en parcelas subdivididas en cuadrado latino para evaluar, en laboratorio, la respuesta del crecimiento de hongos endófitos psicrófilos, asociados a *Chusquea subtessellata*, ante una gama de temperaturas.37
- Fig. 3.** Diagrama del diseño del experimento de adaptación al aumento potencial de temperatura.....37
- Fig 4.** Grupos de curvas de crecimiento basados en ANOVA39
- Fig. 5.** Crecimiento radial (mm) de los tres grupos de curvas de crecimiento basados en ANOVA.....39
- Fig. 6.** Curvas de crecimiento de los grupos de hongos psicrófilos durante los experimentos de aumento de temperatura y cambio de temperatura entre el día y la noche. AU: aumento de 5°C y DN: cambios entre el día (20°C) y la noche (10°C)....40
- Fig. 7.** Comparación de curvas iniciales y posteriores a cada experimento.41

LISTA DE CUADROS

I. SÍNTESIS GENERAL DE LA TESIS	1
CUADRO 1	6
Distribución geográfica y altitudinal y géneros de algunas familias de plantas que cuentan con estudios con hongos endófitos	
CUADRO 2	10
Superficie (en ha.) cubierta por páramo en Costa Rica	
II. ARTÍCULO 1	18
Diversidad de hongos endófitos psicrófilicos de <i>Chusquea subtessellata</i> (Poaceae) en el páramo, Costa Rica	
CUADRO 1	25
Cantidad de UTO psicrófilicas de acuerdo con la altitud y parte vegetal en los sitios Buena Vista y Chirripó, Costa Rica	
CUADRO 2	26
Identificación de UTO psicrófilicos presentes en cada sitio según la parte vegetal	
CUADRO 3	27
Resumen de la diversidad de UTO de hongos endófitos psicrófilicos de acuerdo con la parte vegetal en los sitios Buena Vista y Chirripó, Costa Rica	
CUADRO 4	49
Valores de vectores propios del NMS	

LISTA DE ACRÓNIMOS, ABREVIATURAS Y UNIDADES

ACRÓNIMOS

ACLA-C: Área de Conservación La Amistad Caribe

ACLA-P: Área de Conservación La Amistad Pacífico

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ASP: Áreas Silvestres Protegidas

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

Bp-M: Bosque Pluvial Montano

Bp-M/pp-SA: Bosque de transición, Bosque Pluvial Montano-Páramo Pluvial Subalpino

GEI: Gases de Efecto Invernadero

ITS: Internal Transcribed Spacer

NMS: Escalonamiento Multidimensional no Métrico

PCR: Reacción de Cadena de la Polimerasa

pp-SA: Páramo Pluvial Subalpino

SINAC: Sistema Nacional de Áreas de Conservación, Costa Rica.

UTO: Unidad Taxonómica Operativa

ABREVIATURAS

msnm: metros sobre el nivel del mar

UNIDADES

°C: grados Celsius

ha: hectáreas

km²: kilómetros cuadrados

m²: metros cuadrados

mm: milímetros

RESUMEN

Se caracterizó la comunidad de hongos endófitos psicrófilicos asociados con *Chusquea subtessellata* (Poaceae) del páramo costarricense, y se demostró que la mayoría de hongos se adaptaba a los cambios de temperatura. De 666 aislamientos fúngicos de tallos, hojas y raíces, la identificación molecular nos permitió identificar 29 Unidades Taxonómicas Operativas (UTO). La mayoría de UTO identificados pertenecían al Phylum Ascomycota (Sordariomycetes, Dothidiomycetes y Leotiomycetes), con la excepción de dos del Phylum Basidiomycota. Las UTO más frecuentemente aisladas fueron *Microdochium lycopodium*, *Arthrinium sp3* y *Arthrinium serenense*, y representantes del género *Trichoderma*. Se encontraron hongos endófitos psicrófilicos a lo largo del gradiente altitudinal; pero sólo cinco se encontraron en los dos sitios de estudio. En el laboratorio, se crearon curvas de crecimiento y el análisis de conglomerados agrupó los UTO en cuatro grupos de curvas de crecimiento basados en ANOVA. El comportamiento de crecimiento varió en función de dos experimentos: a) aumento de temperatura de 5°C y b) variaciones de temperatura entre día y noche ($R^2= 0.497$, $p= 0.00494$). Se observó crecimiento a lo largo del tiempo durante los 10 ciclos en los que se sometieron las UTO en ambos experimentos. Sin embargo, en algunos casos, el crecimiento fue débil. Finalmente, las curvas de crecimiento se crearon para tres grupos después de ambos experimentos ($R^2= 0.368$, $p> 0.05$). Estos hongos fueron capaces de moderar los desafíos de temperatura. Se requiere un estudio adicional para determinar si la adaptación ocurre en estos hongos para la fluctuación de la temperatura, asociada con los efectos anticipados del cambio climático. Se puede esperar que esto tenga algún impacto en el ecosistema. El páramo, sus plantas, hongos y otros organismos probablemente se verán afectados por el calentamiento global. Si las plantas y los hongos, a través de la simbiosis, se adaptan para hacer frente a los impactos del calentamiento global, esto puede resultar en excelentes estrategias para la conservación de la biodiversidad.

ABSTRACT

We characterized the community of psychrophilic endophytic fungi associated with *Chusquea subtessellata* (Poaceae) from the Costa Rican paramo, and we demonstrated that the majority of fungi adapted to changes in temperature. Of 666 fungal isolates from stems, leaves and roots, molecular identification allowed us to identify 29 Operative Taxonomic Units (OTU). Most identified OTU's belonged to the Phylum Ascomycota (Sordariomycetes, Dothidiomycetes and Leotiomycetes), with the exception of two of the Phylum Basidiomycota. The most frequently isolated OTU's were *Microdochium lycopodium*, *Arthrinium sp3* and *Arthrinium serenense*, and representatives from the genus *Trichoderma*. Psychrophilic endophytic fungi were found along the altitudinal gradient; but only five were found at the two study sites. In the laboratory, growth curves were created and the cluster analysis grouped OTU's into four groups of growth curves based on ANOVA. Growth behavior varied as a function of two experiments: a) 5°C temperature increase and b) temperature variations between day and night ($R^2=0.497$, $p=0.00494$). Growth was observed over time during the 10 cycles OTUs were subjected to in both experiments; however, in some cases, growth was weak. Finally, the growth curves were created for three groups after both experiments ($R^2=0.368$, $p>0.05$). These fungi were capable to moderate survive temperature challenges. Further study is warranted to determine if adaptation occurs in these fungi for temperature fluctuation, associated with the anticipated effects of climate change. This can be expected to have some impact on the ecosystem. Paramo, their plants, fungi and other organisms are likely be affected by global warming. If plants and fungi, through symbiosis, adapt together to face the impacts of global warming, this may result in excellent strategies for the conservation of biodiversity.

I. SÍNTESIS GENERAL DE LA TESIS

1. INTRODUCCIÓN

Existen estimaciones que sugieren la presencia de más de un millón de especies de hongos asociados a plantas vivas, conocidos como biótrofos (Delaye *et al.* 2013). Algunos hongos biótrofos de plantas pueden vivir a expensas de las células vivas de los tejidos vegetales sin causar daños o síntomas (por ejemplo: endófitos y micorrizas)(Ulloa *et al.* 2006). Los endófitos se han encontrado en todas las plantas muestreadas hasta el momento, en todos los ecosistemas y en todos los tejidos. Se han encontrado desde los desiertos hasta las zonas alpinas; en frutos, hojas, tallos y raíces; y desde plantas no vasculares hasta árboles (Redman *et al.* 2002, Gamboa-Gaitán 2006, Webster y Weber 2007, Leung *et al.* 2011). Sin embargo, a pesar de su naturaleza ubicua, poco se sabe de sus funciones dentro de la planta (Saikkonen *et al.* 2004, Delaye *et al.* 2013).

Según Sadoth (2008), cada tipo de vegetación tiene una diversidad particular de hongos saprobios, parásitos, patógenos y micorrízicos. Existe evidencia, principalmente con micorrizas y hongos de suelo, de que la diversidad de hongos puede ser impulsora o mantenedora de diversidad vegetal (Summerbell 2005, Crowther y Bradford 2013). Por ejemplo, Zak y Willig (2004) reportan que un bosque de coníferas contiene una diversidad fúngica más restringida que la existente en otros bosques templados, por lo que es de suponer que los bosques tropicales tengan una diversidad mayor. También, Chaverri y Vílchez (2006) indican que la diversidad de hongos hipocreales (Ascomycota) está relacionada con el estado de sucesión y fragmentación del bosque. Por lo tanto, se puede hipotetizar que los endófitos también pueden ser importantes para mantener una cierta diversidad de plantas.

Existe poca información sobre las funciones de los endófitos en ecosistemas de temperaturas extremas, como zonas desérticas, alpinas, subalpinas o páramos. Por ejemplo, se ha reportado que ciertos hongos melanizados endófitos de raíz pueden proteger a las plantas contra sequías y temperaturas extremas en sitios desérticos (Redman *et al.* 2002, Kivlin *et al.* 2013). Para zonas de temperaturas extremas frías, muy poco se sabe (Lopera *et al.* 2008, Leung *et al.* 2011, Cabezas *et al.* 2012, Miles *et al.* 2012, Zhang y Yao 2015). Sin embargo, ya que algunos endófitos tienen una relación mutualista con la planta (es decir, protección contra varios tipos de estreses, por ejemplo, enfermedades, herbivoría, sequía e inundaciones) (Gamboa-Gaitán 2006), se podría suponer que ciertos endófitos son esenciales para que las plantas se desarrollen mejor en estos ecosistemas fríos (Lopera *et al.* 2008, Leung *et al.* 2011, Kivlin *et al.* 2013, Zhang y Yao 2015).

La información anterior se refiere principalmente a la biología de los hongos endófitos, pero recientemente también se han desarrollado investigaciones para conocer mejor las aplicaciones prácticas de los endófitos (Schulz *et al.* 2002, Bailey *et al.* 2008, Miles *et al.* 2012). De ahí se conocen sus usos para el control biológico de plagas y enfermedades de plantas, para la producción de enzimas y metabolitos secundarios en medicina, combustibles, degradación de plásticos, biorremediación, entre otros (Suryanarayanan *et al.* 2002, Backman y Sikora 2008). Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de estudios en otras plantas y diferentes ecosistemas que contribuyan al conocimiento de sus aplicaciones prácticas y usos económicos.

Uno de los ecosistemas poco estudiados con respecto a su diversidad fúngica, son los páramos. Y aún menos son las investigaciones que se han publicado sobre endófitos en estos ecosistemas (Lopera *et al.* 2008, Cabezas *et al.* 2012, Miles *et al.* 2012). Estos estudios caracterizaron la diversidad de endófitos en las plantas de páramo *Espeletia* (Familia Asteraceae). Estos demostraron el potencial que tienen algunos endófitos de *Espeletia* para el biocontrol de algunas enfermedades de plantas (Lopera *et al.* 2008, Miles *et al.* 2012) y uno para la producción de celulasas (Cabezas *et al.* 2012).

Los páramos son ecosistemas exclusivos de la zona neotropical, de montaña alta, con vegetación heterogénea, psicrófila, muy vellosa, herbácea y generalmente sin árboles grandes. Se encuentran encima de los 2800-3200msnm (límite superior del bosque) y por debajo de los 4500-4800msnm (límite inferior de la nieve permanente) (Kappelle & Horn 2005). Estos ecosistemas son frágiles y se prevé que serán de los más afectados por el calentamiento global (Hofstede *et al.* 2014). Por lo tanto, estas zonas de temperaturas extremas frías son lugares ideales para estudiar el impacto del calentamiento global en la biodiversidad.

Estudios demuestran que cambios en uno o dos grados de temperatura, pueden afectar negativamente las especies que están adaptadas a vivir solo en esos ecosistemas (Buytaert *et al.* 2011). Se predice que el cambio climático va a desplazar los límites del ecosistema y reducirá fuertemente la superficie total de las zonas alpinas tropicales. Dicho desplazamiento y un mayor aislamiento de los fragmentos restantes inducirán la extinción de especies y pérdida de biodiversidad. Condiciones más secas y más calientes del suelo provocarán una rotación más rápida del carbono orgánico, disminuyendo el almacenamiento de carbono orgánico por debajo del suelo (Buytaert *et al.* 2011).

Los páramos de Costa Rica y Panamá cuentan con nueve especies de plantas endémicas, dominantes y que son indicadoras de páramo: *Chusquea subtessellata* (Poaceae), *Hypericum irazuense* (Hypericaceae), *H. strictum* (Hypericaceae), *Comarostaphylis arbutoides* (Ericaceae), *Escallonia myrtiloides* (Escalloniaceae), *Valeriana prionophylla* (Valerianaceae), *Pernettya próstata* (Ericaceae), *Senecio oerstedianus* (Asteraceae), *Vaccinium consanguineum* (Ericaceae).

1.1 Antecedentes

Se ha encontrado un grado de relación entre la altitud y la diversidad en ciertos grupos de organismos (reptiles, aves, mamíferos, plantas, etc.) principalmente por el cambio de temperatura asociado (Sadoth 2008). Sin embargo, poco se sabe respecto a su relación con la diversidad fúngica. Al estudiar la comunidad de microhongos en gradientes altitudinales, algunos estudios encontraron que la diversidad disminuye conforme aumenta la altitud, por ejemplo los estudios de Raviraja *et al.* (1998) en Ghats Occidentales en la India; Stephenson *et al.* (2004) en Ecuador; Rojas y Stephenson (2008) en Isla del Coco, Costa Rica; y Rojas-Jiménez *et al.* (2016) en un gradiente altitudinal de bosque lluvioso en el Braulio Carrillo, Costa Rica.

La falta de información respecto a la relación de la altitud con la comunidad fúngica y en especial de hongos endófitos se debe a que existen muy pocos estudios empíricos. Existen algunos estudios experimentales con microorganismos de suelo que indican algún tipo de afectación en los hongos debido al calentamiento global. Sin embargo, según Callaghan *et al.* (2014) la distribución de los hongos va a ser favorecida con los aumentos de temperatura, ya que en general los hongos crecen mejor entre 20-25°C (incluyendo la mayoría de los hongos que viven en zonas de temperaturas frías extremas). Lo anterior también lo reporta otro estudio que investigó cómo los hongos simbiotes alteran las respuestas de las plantas ante el cambio climático, indicando un efecto positivo de los endófitos melanizados de raíz hacia las plantas (Kivlin *et al.* 2013). Más recientemente Chaverri y Amador-Fernández, (com. pers.) muestran que aproximadamente un 5 % de los endófitos aislados de tres plantas de páramo son psicrófilos, es decir, crecen mejor a 15°C que a >20 °C.

Bajo un escenario de cambio climático, las variaciones en los patrones de temperatura y lluvias son dos de los principales factores que afectan la biodiversidad en sus diferentes niveles (Bellard *et al.* (2012). Tomando en consideración que en los páramos la humedad y el factor térmico son factores limitantes para muchas de sus especies, el considerar su estudio es de vital importancia para generar un conocimiento base en relación con el estado de riesgo actual. En conclusión, considerada la potencial relación entre los hongos y la altitud, tanto como la vulnerabilidad de estos ecosistemas de páramo, es necesario considerar la capacidad de las relaciones simbióticas presentes para enfrentar las consecuencias del calentamiento global.

1.2 Justificación

Con esta investigación se pretende identificar si los cambios de temperatura pueden influir en la abundancia de hongos endófitos en los bosques tropicales, como forma de establecer los impactos potenciales del cambio climático. La importancia de conocer esta información reside en que los hongos endófitos pueden beneficiar o no a la adaptación de especies vegetales en los distintos escenarios climáticos propuestos por la ciencia (IPCC 2014).

El calentamiento global podría afectar los beneficios de los hongos en las plantas, específicamente endófitos, quizás llevándolos a desaparecer y con eso afectar la salud de la planta o hasta perder aplicaciones prácticas. Por ejemplo, se podrían perder especies endófitas con potencial para control biológico de plagas y enfermedades de plantas, como productores de enzimas y metabolitos secundarios, degradación de plásticos, o biorremediación, entre otros (Schulz *et al.* 2002). Ya que los endófitos en ecosistemas de páramos de Costa Rica no han sido estudiados, se desconoce la utilidad que puedan tener las enzimas y metabolitos que puedan producir.

Es fundamental conocer cuáles podrían ser los grupos biológicos más afectados y si ya existe algún tipo de evidencia de la afectación de estos ecosistemas reflejada en modificaciones del comportamiento de la fauna, el buen estado de las comunidades de plantas, en la ampliación de la distribución de especies hacia las cumbres o en la extinción de especies.

1.3 Importancia

En Costa Rica existe poca información científica sobre el estado de vulnerabilidad de los páramos ante el cambio climático ni cuáles serían las especies más pensadas

ante este fenómeno. Por esta razón, es fundamental la generación de conocimiento que permita tomar decisiones de conservación y manejo, y a la vez despertar una sensibilización y conciencia nacional ante dicha problemática.

De esta forma, la información generada en este proyecto demostrará los efectos potenciales del calentamiento global sobre las relaciones entre hongos endófitos y plantas, constituyendo una herramienta fundamental para facilitar la toma de decisiones, particularmente en relación con las acciones a considerar para la conservación de estos ecosistemas que, mayoritariamente, se encuentran bajo alguna categoría de Área Silvestre Protegida (ASP) administrada por el Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Caracterizar la comunidad de hongos endófitos psicrófilos asociados a una poácea (*Chusquea subtessellata*) del páramo de Costa Rica, y evaluar cómo pueden ser afectados por cambios potenciales de temperatura.

2.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar la diversidad de hongos endófitos psicrófilos asociados a *Chusquea subtessellata*, en el páramo de Costa Rica.
2. Determinar si la diversidad de hongos endófitos psicrófilos de *Chusquea subtessellata* está asociada a la altitud.
3. Evaluar, en laboratorio, la respuesta del crecimiento de hongos endófitos psicrófilos asociados a *Chusquea subtessellata*, ante cambios de temperaturas.

2.3 Hipótesis de investigación

1. Especies de hongos endófitos psicrófilos se encuentran en *Chusquea subtessellata* de páramo.
2. Los hongos endófitos psicrófilos de *Chusquea subtessellata* son más abundantes a mayor altitud.
3. Los hongos endófitos psicrófilos de *Chusquea subtessellata* no crecen bajo temperaturas mayores a los de su ambiente natural.
4. Al someter repetidamente los hongos psicrófilos a aumentos de temperatura, los hongos dejarán de crecer y morirán o alternatively, se adaptarán a las temperaturas más altas y dejarán de ser psicrófilos.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 Hongos endófitos, sus asociaciones y distribución en el trópico

La simbiosis entre plantas y hongos se produce desde hace varias decenas de millones de años (Carroll 1995 en Gamboa-Gaitán 2006). Dicha asociación parece tener una alta especificidad del hongo con la planta hospedera, aunque en un grado menor en las zonas tropicales que las templadas. Sin embargo, hay que señalar que sí pueden existir casos de especificidad alta en el trópico, pero aún faltan más estudios (Gamboa-Gaitán 2006, Unterseher *et al.* 2013).

De acuerdo con Chaverri *et al.* (2011) la mayoría de hongos endófitos pertenecen al Filo Ascomycota. Estos hongos endófitos se han estudiado en los siguientes taxones vegetales tropicales: palmas, orquídeas y otras epífitas, especies de las familias Sapotaceae, Fabaceae, Ochnaceae, Olacaceae, Asteraceae, Anacardiaceae, Meliaceae, Rubiaceae, Magnoliaceae y Sterculiaceae (Gamboa-Gaitán 2006), y muchísimas familias más. En estos taxones se ha estudiado un número relativamente bajo de especies en cada familia, lo que indica que es necesario un mayor trabajo de campo para catalogar e inventariar los endosimbiontes de especies vegetales tropicales (cuadro 1, anexo 1).

Por lo tanto, se considera que la distribución de hongos endófitos es mundial, pero estará relacionada con la distribución de las especies de plantas con las que se asocian. En los trópicos y en los diferentes gradientes altitudinales, la abundancia de estas especies vegetales será variable y, por ende, la abundancia de hongos asociados a ellas (Cuadro 1).

Para el caso de Costa Rica, se han estudiado hongos endófitos a lo largo de un gradiente altitudinal (400-2900msnm) en el bosque lluvioso del Braulio Carrillo asociados a 92 especies de plantas. En este estudio todos los hongos endófitos identificados pertenecían a tres clases de Ascomycota, ocho órdenes, 16 familias y 25 géneros. Presentando una mayor diversidad en las zonas bajas del gradiente y disminuyendo en la parte alta del mismo (Rojas-Jiménez *et al.* 2016).

CUADRO 1

Distribución geográfica y altitudinal, y géneros de algunas familias de plantas que cuentan con estudios con hongos endófitos*

Familia	Distribución geográfica	Ámbito altitudinal	Géneros
Arecaceae (palmas)	Zonas tropicales del mundo, algunas llegan incluso a regiones subtropicales del nuevo y del viejo mundo.	Desde el nivel del mar (<i>Cocos nucifera</i>) hasta los 2 500msnm (<i>Trachycarpus</i>)	ca. 189 gén. y más de 2 000 spp.
Orchidaceae	Cosmopolita, considerada una de las familias más grandes de plantas	Desde el nivel del mar hasta los 5 000msnm	Alrededor de 700 gén. y unas 20 000 spp.

	con flores en el mundo; en el neotrópico centros de alta diversidad lo son países como Colombia, Ecuador y Perú.		
Otras epífitas (Araceae)	Cosmopolita, pero más diversa en regiones tropicales y subtropicales, muy común en bosques muy húmedos.	Desde el nivel del mar hasta los 2 300msnm	105 gén. y alrededor de 3 200 spp.
Anacardiaceae	Regiones tropicales y subtropicales, mediterráneas y templadas.	Hasta 2 000msnm	73 gén. y alrededor de 850 spp.
Asteraceae	Se distribuye en todos los continentes, excepto el de la Antártida, con una concentración especial en las regiones templadas de Rusia y Estados Unidos y en las tropicales y subtropicales de América.	Sin información	con aproximadamente 1535 gén. y 23000-32000 spp.
Fabaceae	Cosmopolita	Reportes en México hasta 4 000msnm	650-700 gén. y 18 000 spp., en América existen alrededor de 272 gén. y 6 700 spp.
Magnoliaceae	Amplia en el mundo, pero más diversa en el Sureste de Asia.	Sin información	Alrededor de 10 gén. y unas 220 spp., América tropical hay unas 60 spp.
Meliaceae	Principalmente en el neotrópico, solamente <i>Azadirachta</i> , <i>Melia</i> y <i>Toona</i> crecen en el continente asiático.	Sin información	ca. 50 gén. y 550 spp.

Ochnaceae	Distribución pantropical, aunque está ausente en las Islas del Pacífico.	Hasta 1 900msnm en los Andes	La conforman ca. 30 gén. y 500 spp.
Rubiaceae	Cosmopolita, pero principalmente pantropical.	Sin información	650 gén. y 13 000 spp., 217 gén. y alrededor de 5 000 spp. en el neotrópico
Sapotaceae	Más diversa en tierras bajas con climas muy húmedos.	Principalmente por abajo de los 1 000 m.	53 gén. y 1 100 spp., pantropical; 11 gén. y alrededor de 408 spp. en el neotrópico

* Información de acuerdo a Milliken *et al.* (2009), Plant List (2010) y Castro (2013).

3.2 Distribución altitudinal de hongos endófitos y factores asociados

La abundancia y diversidad de especies de microhongos endófitos se relaciona con el sustrato en el que se encuentra y condiciones biofísicas de humedad, luz, temperatura, precipitación, entre otros. La localización geográfica y el grado del disturbio del ecosistema pueden influir en su distribución a lo largo de gradientes altitudinales (Rojas-Jiménez *et al.* 2016). A continuación, se explica cada factor que, potencialmente, puede influir en la distribución altitudinal de los hongos endófitos, basándose en estudios realizados en el trópico.

3.2.1 Sustrato: debido a que los hongos están asociados a tejidos vegetales, la presencia de la planta hospedera es indispensable cuando se trata de especies con alta especificidad. La falta de la planta por cualquier razón implica para los hongos una reducción de su hábitat dificultando su crecimiento y reproducción, además de restringir su distribución (Hernández *et al.* 2014). Por ejemplo, Gilbert *et al.* (1994) indica que hay una alta relación de densidad y distancia entre árboles adultos de *Ocotea whitei* y su hongo fitopatógeno asociado en Isla Barro de Colorado, Panamá. La relación del sustrato con el crecimiento del hongo ha sido más estudiada en laboratorio para especies de hongos con fines comerciales, comestibles o para la agroindustria, reportando por ejemplo que *Pleurotus ostreatus* tiene preferencia de algunos sustratos lignocelulósicos para un crecimiento óptimo (Varnero *et al.* 2010, Maza *et al.* 2014). Para el caso específico de hongos endófitos considerados termotolerantes, Redman *et al.* (2002) presentan un caso de curvas de crecimiento de un hongo endófito y la presencia, o no, de su hospedero de la familia Poaceae.

3.2.2 Humedad, luz, temperatura, precipitación: estos cuatro factores están altamente relacionados entre sí. Cuando existe precipitación constante habrá alta humedad y, por otro lado, la temperatura puede aumentar o disminuir. La disponibilidad de luz con la que se cuente beneficiará o no a las especies de hongos (Sánchez 2009). Estos cuatro factores tendrán mayor influencia respecto al crecimiento óptimo del micelio de cada especie, así como su reproducción, independientemente del punto del gradiente altitudinal en el que se encuentre.

Li *et al.* (2012) concluyeron que los hongos endófitos tienen alta capacidad adaptativa al frío. Para el caso de hongos basidiomicetes, Kauserud *et al.* (2010) indican que para poder fructificar esperarán a condiciones adecuadas de temperatura. Por último, en cuanto a la influencia de luz, esta permitirá que el hongo realice una mejor síntesis de compuestos celulares en mayor presencia de luz (Savón *et al.* 2003). Además de la relación hongo-planta, se suma la preferencia de temperatura a la cual el hongo crecerá mejor. Es por eso que los hongos endófitos se pueden conocer como mesofílicos, cuando su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 15-30°C o psicrófilos cuando prefieren temperaturas menores. Estos últimos pueden ser obligados o facultativos (Ulloa *et al.* 2006).

3.2.3 Grado de disturbio del ecosistema: a pesar de que la relación de la diversidad de microhongos y la sucesión de bosques no ha sido muy estudiada, hay evidencias que sugieren que los servicios que proveen al ecosistema pueden disminuir al deteriorarse sus hábitats, por ejemplo, al ser deforestadas o alteradas (Chaverri y Vélchez 2006). Miller y Lodge (1997) describen las respuestas de los hongos ante disturbios producidos por la agricultura y forestería, enfatizando que cultivos convencionales (no sostenibles) generan una heterogeneidad espacial en el suelo que produce que la colonización del micelio se dificulte.

Estos mismos autores proponen el uso de buenas prácticas sostenibles para que la biota del suelo no sea perjudicada, incluyendo a los microhongos. Por ejemplo, Del Val *et al.* (1999) reportan que la diversidad de micorrizas arbusculares es menor en ambientes con suelos contaminados con metales pesados. Por otro lado, Chaverri y Vélchez (2006) mostraron que la diversidad de hongos hipocreales está relacionada con el estado de sucesión y fragmentación del bosque tropical lluvioso. Los autores demostraron que la mayor diversidad de hongos patógenos se encontró en bosques con uno o dos años de regeneración, y su diversidad fue inversamente proporcional a la edad del bosque; por lo tanto, el fragmento de bosque de 20 a 22 años fue el que contaba con el menor número de especies en total.

3.2.4 Cambio altitudinal: así como para otros grupos de organismos se observa una disminución de su diversidad al aumentar la altitud, asociado principalmente con la disminución de temperatura; en hongos se ha encontrado que al aumentar la altitud la diversidad de especies disminuye, lo cual puede estar relacionado con la también disminución de especies vegetales a las cuales asociarse (Raviraja *et al.* 1998, Sadoth 2008, Stephenson *et al.* 2004, Rojas & Stephenson 2008, Giraldo-Pamplona *et al.* 2012, Unterseher *et al.* 2013).

Rojas y Stephenson (2008) analizaron la ecología de mixomicetes a lo largo de un gradiente de elevación en la Isla del Coco, Costa Rica (nivel del mar hasta 634msnm), donde se encontró una diversidad más similar a la de otras islas como Puerto Rico que a la diversidad reportada para Costa Rica. Además, igual que lo reportado para otros grupos, la diversidad disminuyó conforme aumentaba la elevación. Un segundo caso de estudio se refiere a los hongos endófitos de hábitats peruanos de tierras altas y bajas y sus ensamblajes específicos con plantas hospederas (Unterseher *et al.* 2013), donde la distribución de la especie vegetal influyó en la presencia del hongo endófito. Por ende, si la abundancia de una planta disminuye con la altitud, también disminuirá la abundancia del hongo.

El tercer y más reciente estudio publicado fue en un gradiente altitudinal de 400 a 2900msnm en el bosque lluvioso de Costa Rica (Rojas-Jiménez *et al.* 2016). Los autores indican

que cada estrato presentaba una composición y diversidad de especies muy particular, contando siempre con la presencia de algunas pocas especies ubicuas y dominantes. Además, el estudio también indica que, al aumentar la elevación, la riqueza de endófitos disminuía.

3.3 Ecosistemas de páramo

El páramo consiste en un ecosistema de vegetación tropical de alta montaña por encima de la línea continua de vegetación arbórea (2800-3200msnm) y por debajo de la línea de nieve perpetua (4500-4800msnm). Ha sido un paisaje influenciado por la glaciación, por lo que no existe ninguna definición sencilla para describirlo, sino que se caracteriza por una gran variedad de aspectos geográficos, geológicos, climáticos, fisionómicos y florísticos (Kappelle y Horn 2005, Hofstede *et al.* 2014).

Los páramos se localizan en la región neotropical (11°N latitud y 8°S latitud) del bioma pantropical alpino-subalpino húmedo. Esquina noroccidental de Suramérica, principalmente Venezuela, Colombia y Ecuador, con algunos sitios remotos en Costa Rica y Panamá y el norte de Perú (Hofstede *et al.* 2014). Costa Rica constituye el límite norte de su distribución, donde se distribuye básicamente en las partes altas de los volcanes Irazú y Turrialba, en el sector sur del complejo del cerro Buena Vista, cerro de la Muerte y Cerro de las Vueltas, cerros Cuericí, Urán, Chirripó y Amo y en el cerro Kamuk; cubriendo aproximadamente unos 152km², lo que representa el 0,4 % del territorio de todo el páramo neotropical existente (Cuadro 2, Kappelle 2005).

CUADRO 2

Superficie (en ha.) cubierta por páramo en Costa Rica.

Área de conservación	Superficie de páramo (en ha., 3100-3819m)
La Amistad-Caribe (Cerro Kamuk)	1 057
La Amistad-Pacífico (Cerro Echandi, Parque Nacional Chirripó con los cerros Urán, Cuericí, Chirripó y Amo)	11 538
Pacífico Central (Cerro Buena Vista y Las Vueltas)	1 409
Cordillera Volcánica Central (Volcán Irazú y Turrialba)	1 201
Total	15 205

Fuente: Modificado de Kappelle y Horn (2005).

El páramo es un recurso de gran interés científico que ofrece una importante pila genética, con especies para la región centroamericana. Es un sitio visitado por fauna variada, entre la que se encuentra especies en peligro de extinción. Las lagunas y riachuelos allí existentes conforman importantes cuencas hidrográficas para la vida humana y silvestre, por lo que es necesaria su conservación (Chaverri y Cleef 1996). Para ello es necesario generar más

información a nivel ecológico que permita realizar acciones orientadas a una gestión integral de este ecosistema.

En el caso de Costa Rica, las áreas de páramos presentan condiciones climáticas de gran variación de temperaturas, así como alta humedad y precipitación asociadas a la influencia de los vientos alisios que penetran desde el Caribe. Adicionalmente, los efectos volcánicos también tienen influencia en los páramos como el Irazú y el Turrialba (IMN 2000, Solano 2000).

El conocimiento que se tiene sobre la diversidad biológica de los páramos de Costa Rica es poco, y se centra en la identificación taxonómica de algunos grupos. También es poco lo que se conoce sobre la ecología y estructura de sus comunidades. En cuanto a la ecología, hay varios trabajos entre los que destacan los de Horn (1990, 1997, 1998) sobre los efectos de los incendios y el de Chaverri y Cleef (1996) respecto a la estructura de las comunidades vegetales. También destaca la labor de Kappelle *et al.* (2005), quienes hicieron una clasificación de los páramos costarricenses que dio como resultado un total de 21 ecosistemas paramunos (13 ecosistemas subalpinos y 8 alpinos); así como el trabajo de Chaverri y Cleef (1996), sobre la descripción de las comunidades vegetales de los páramos, con algunas observaciones sobre la conservación del ambiente de páramo.

Respecto a la flora paramuna, a pesar de que el páramo ocupa no más del 2 % de la superficie del planeta, su flora es extremadamente diversa (Hofstede *et al.* 2003). En cuanto a plantas no vasculares, se enlistan 114 géneros de líquenes, 163 géneros de musgos y 88 géneros de hepáticas. En plantas vasculares se habla de 52 géneros de helechos, un género de gimnosperma, 101 géneros de monocotiledóneas y 364 de dicotiledóneas, siendo las dos familias de plantas vasculares más importantes Asteraceae y Poaceae (Kappelle y Horn 2005).

La vegetación en este ecosistema cuenta con adaptaciones morfológicas y fisiológicas que permiten adaptarse a condiciones de aire de elevaciones altas (menor contenido de agua y presiones bajas de gases como O₂ y CO₂), bajas temperaturas, radiación ultravioleta intensa, cambios rápidos de insolación, efectos de la desecación por los vientos, sequia fisiológica, daños físicos por granizo o nieve. Es por eso que por lo general tienen tasas de crecimiento y descomposición bajas, y la productividad primaria y la sucesión vegetal natural toman mucho tiempo, especialmente cuando se presentan especies leñosas (Azócar *et al.* 2006). Todo lo anterior generando un alto endemismo.

Es por eso que para el páramo ístmico se consideran como plantas endémicas, dominantes e indicatoras (Vargas y Sánchez 2005; citando a Vargas y Sánchez 1988, Kappelle 1990): *Chusquea subtessellata* (Poaceae), *Hypericum irazuense* (Hypericaceae), *H. strictum* (Hypericaceae), *Comarostaphylis arbutoides* (Ericaceae), *Escallonia myrtiloides* (Escalloniaceae), *Valeriana prionophylla* (Valerianaceae), *Pernettya próstata* (Ericaceae), *Senecio oerstedianus* (Asteraceae), *Vaccinium consanguineum* (Ericaceae). De las anteriores, *C. subtessellata* (Poaceae) es muy abundante, fácil de identificar y se encuentra presente en la mayoría de los páramos de Costa Rica; por lo que se eligió como la especie de planta hospedera en este estudio.

3.3.1 *Chusquea subtessellata*

Hierba de tamaño mediano (0.30-2.0m), láminas foliares (1-11 x 0.4-1.2cm) con una espina punzante en la punta. Inflorescencias moradas o rosado-café de octubre a abril. Frutos negros de enero a julio. Se encuentra en Costa Rica y Panamá, desde los 2200m hasta los 3800m (Alfaro 2003).

Es bastante común en los páramos, y buena colonizadora en las áreas que han sufrido quemadas o incendios, lo que puede a su vez ser un problema para la regeneración del bosque. También se conoce como una especie de importancia para la alimentación de la danta (*Tapirus bairdii*) (Edwards-Widmer 1999, Alfaro 2003).

3.4 Calentamiento global y su potencial efecto en los hongos

El cambio climático corresponde a un fenómeno que afecta el planeta de manera natural permitiendo mantener las condiciones climáticas, como la temperatura, en un rango aceptable para la vida (Jiménez 2009). Sin embargo, dado el aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), debido principalmente a las actividades humanas y el alto consumo de combustibles fósiles, los cambios en dichas condiciones han sido alterados dando paso a un acelerado aumento de temperatura anual en las últimas décadas (IPCC 2000, Jiménez 2009).

Dicho calentamiento ya se está percibiendo y va en aumento, lo que en teoría puede afectar a la biodiversidad, pero son conclusiones inferenciales y necesitan de estudios experimentales para comprobar dichas hipótesis. Por ejemplo, se indica que parece estar correlacionado a la aparición de varias enfermedades importantes como la aspergilosis del coral (Ward *et al.* 2007) y el declive de las ranas, entre otros (Ward *et al.* 2007). Algunas investigaciones en zonas de temperaturas frías extremas demuestran que el crecimiento de algunas plantas se ve beneficiado por el aumento en la temperatura, y otras plantas, como helechos y musgos, se ven negativamente afectadas (Callaghan *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2005).

Estudios en gradientes altitudinales reflejan que los ecosistemas de montaña se encuentran entre los más vulnerables y propensos a experimentar alteraciones o modificaciones de sus especies ante el cambio climático. Esto se debe al alto endemismo que poseen y a las necesidades tan específicas en cuanto a las condiciones y recursos que requieren los organismos que lo conforman. Con el fin de brindar una base para entender los posibles cambios que se pueden dar en la distribución de hongos endófitos en un gradiente altitudinal, se debe modelar tomando en cuenta los posibles escenarios de cambio climático que han sido propuestos por la ciencia (IPCC 2014).

Existen pocos estudios con hongos que incorporen los efectos potenciales del cambio climático. Estudios iniciales han concluido que la fructificación de hongos durante el año ha modificado sus patrones. Kauserud *et al.* (2010), con datos de colectas de herbario entre 1960-2007 en el Reino Unido y Noruega, concluyen que, debido al aumento de temperatura promedio, los hongos han modificado sus periodos de fructificación. Estudios como este son indicios de que cambios en la temperatura y precipitación promedio modificarán los ciclos de vida de los hongos y con ello los beneficios mutualistas que ofrecen a las plantas se podrían ver afectados también.

Desprez-Loustau *et al.* (2007) buscaron simular los efectos de un escenario de cambio climático en la distribución geográfica y actividad de hongos patogénicos del bosque. Para la mayoría de las especies en el estudio, los autores encontraron que aumentos de temperatura favorecen el crecimiento de las especies de hongos, especialmente en aquellas que tienen baja capacidad de soportar inviernos (el estudio no se basaba solo en especies tropicales). Sin embargo, para otras especies como *Mycosphaerella* el efecto positivo del aumento de temperatura se ve contrarrestado por la disminución en la precipitación.

Callaghan *et al.* (2014) indica que la distribución de los hongos va a ser favorecida con los aumentos de temperatura, ya que crecen mejor entre 20-25°C, incluyendo la mayoría de los hongos que viven en zonas de temperaturas frías extremas. Lo anterior también lo reporta otro estudio que investigó cómo los hongos simbioses alteran las respuestas de las plantas ante el cambio climático, indicando un efecto positivo de los endófitos melanizados de raíz hacia las plantas (Kivlin *et al.* 2013).

Según lo anterior, las especies podrían desplazarse a mayores altitudes en busca de sus condiciones actuales de temperatura y precipitación, pero también serían capaces de adaptarse a condiciones fluctuantes de temperatura y humedad. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que si se trata de especies con una alta especificidad de hospedero o preferencia por temperaturas frías (psicrofílicos), su distribución también dependerá de la capacidad adaptativa de la planta.

4. BIBLIOGRAFÍA

- Alfaro, E. 2003. Plantas comunes del Parque Nacional Chirripó, Costa Rica. Heredia, Costa Rica, INBIO. 385p.
- Azócar, A; Rada, F; Smale, M. 2006. Ecofisiología de plantas de páramo. Merida, Venezuela, ICAE. 182p.
- Backman, PA; Sikora, RA. 2008. Endophytes: An emerging tool for biological control. *Biological Control* 46(1): 1-3.
- Bailey, BA; Bae, H; Strem, MD; Crozier, J; Thomas, SE; Samuels, GJ; Vinyard, BT; Holmes, KA. 2008. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control* 46(1): 24-35.
- Bellard, C; Bertelsmeier, C; Leadley, P; Thuiller, W; Courchamp, F. 2012. Impacts of climate change on the future of biodiversity. *Ecology Letters* 15:365-377.
- Buytaert, W; Cuesta-Camacho, F; Tobón, C. 2011. Potential impacts of climate change on the environmental services of humid tropical alpine regions. *Global Ecology and Biogeography* 20(1): 19-33.
- Cabezas, L; Calderon, C; Medina, LM; Bahamon, I; Cardenas, M; Bernal, AJ; Gonzalez, A; Restrepo, S. 2012. Characterization of cellulases of fungal endophytes isolated from *Espeletia* spp. *Journal of Microbiology* 50(6): 1009-1013.
- Callaghan, TV; Björn, LO; Chernov, Y; Chapin, T; Torben, R; Huntley, B; Ims, R a; Johansson, M; Jolly, D; Jonasson, S; Matveyeva, N; Panikov, N; Oechel, W; Shaver, G; Elster, J; Ingibjörg, S; Laine, K; Taulavuori, K; Taulavuori, E; Zöckler, C; Bjorn, LO; Christensen, TR. 2014. Climate Change and UV-B Impacts on Arctic Tundra and Polar Desert Ecosystems Responses and at to Projected the Species Changes Level in Climate. *Ambio* 33: 418-435.
- Castro, E. 2013. Florula Digital La Selva OET. Páginas de familias. (en línea, sitio web). Consultado 30 jun. 2015. Disponible en <http://guarea.ots.ac.cr/florula4/families.php>
- Crowther, TW; Bradford, MA. 2013. Thermal acclimation in widespread heterotrophic soil microbes. *Ecology Letters* 16(4): 469-477.
- Chaverri, A. & Cleef, A. 2005. Comunidades vegetales de los páramos de los macizos de Chirripó y Buenavista, Costa Rica. En M. Kappelle & S. P. Horn (Eds.), *Páramos de Costa Rica*. (pp. 397-435). Santo Domingo de Heredia: Editorial INBio.
- Chaverri, A; Cleef, AM. 1996. Las comunidades vegetacionales en los páramos del Macizo Chirripó y Buena Vista. *Revista Forestal Centroamericana* 5(17): 44-49.
- Chaverri, P; Huhndorf, SM; Rogers, JD. 2011. Microhongos comunes de Costa Rica y otras regiones tropicales: ascomycota, pezizomycotina, sordariomycetes. Heredia, Costa Rica, INBIO. 241p.
- Chaverri, P; Vílchez, B. 2006. Hypocrealean (Hypocreales, Ascomycota) Fungal Diversity in Different Stages of Tropical Forest Succession in Costa Rica. *Biotropica* 38(4): 531-543.
- Del Val, C; Barea, JM; Azcon-Aguilar, C. 1999. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology* 65(2): 718-723.

- Delaye, L; García-Guzmán, G; Heil, M. 2013. Endophytes versus biotrophic and necrotrophic pathogens-are fungal lifestyles evolutionarily stable traits? *Fungal Diversity* 60: 125-135.
- Desprez-Loustau, ML; Robin, C; Reynaud, G; Deque, M; Badeau, V; Piou, D; Husson, C; Marcais, B. 2007. Simulating the effects of a climate-change scenario on the geographical range and activity of forest-pathogenic fungi. *Canadian Journal of Plant Pathology* 29(2): 101-120.
- Edwards-Widmer, Y. 1999. The ecological role of bamboo (*Chusquea* spp.) in the old-growth *Quercus* forests of the Cordillera de Talamanca, Costa Rica. Tesis de doctorado. Zurich, Suiza, Instituto de Tecnología de Zurich. 208p.
- Gamboa-Gaitán, M. 2006. Hongos Endófitos Tropicales: Conocimiento actual y perspectivas. *Acta Biológica Colombiana* 11(1): 3–20.
- Gilbert, GS; Foster, RB; Hubbell, SP. 1994. Density and distance-to-adult effects of a canker disease of trees in a moist tropical forest. *Oecologia* 98(1): 100-108.
- Giraldo-Pamplona, W; Corrales-Osorio, A; Yepes-Quintero, A; Duque-Montoya, Á. 2012. Caracterización estructural de bosques tropicales a lo largo de un gradiente altitudinal en el departamento de Antioquia, Colombia. *Actualidad biológica* 34(97): 187-197.
- Hernández, MC; González, SGM; Hernández, NB; Herrera, S; Camino, M. 2014. Hongos asociados a especies de plantas amenazadas en Cuba. *Revista del Jardín Botánico Nacional* 34: 97-100.
- Hofstede, R; Calles, J; López, V; Polanco, R; Torres, F; Ulloa, J; Vásquez, A; Cerra, M. 2014. Los páramos andinos ¿Qué sabemos? Estado de conocimiento sobre el impacto del cambio climático en el ecosistema páramo. Quito, Ecuador, UICN. 154p.
- Hofstede, R; Segarra, P; Mena, P. 2003. Los páramos del mundo. Proyecto Atlas Mundial de los Páramos. Quito, Ecuador, Global Peatland Initiative/NC-UICN/Ecociencia. 82p
- Horn, S. 1990. Vegetation recovery after the 1976 fire in Chirripó National Park., Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 38(2): 267-275.
- Horn, S. 1997. Postfire resprouting of *Hypericum irazuense* in the Costa Rican páramos: Cerro Asunción revisited. *Biotropica*, 29(4): 529-531.
- Horn, S. 1998. Postfire regrowth of *Vaccinium consanguineum* (Ericaceae) in the Costa Rican páramos. *Revista de Biología Tropical* 46(4):1117-1120.
- IMN (Instituto Meteorológico Nacional). 2000. Datos Climáticos y Atlas climatológico (en línea, sitio web). Consultado 20 nov. 2015. Disponible en www.imn.ac.cr
- IPCC (Panel Intergubernamental de Cambio Climático). 2010. Informe especial: escenarios de emisiones (en línea). Consultado 18 nov. 2015. Disponible en <http://www.grida.no/climate/ipcc/spmpdf/sres-s.pdf>
- IPCC (Panel Intergubernamental de Cambio Climático). 2014. Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of working groups I, II and III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Pachauri, RK; Meyer, LA (eds.). Geneva, Switzerland. 151p.
- Jiménez, M. 2009. Resiliencia de los ecosistemas naturales terrestres de Costa Rica al cambio climático. Tesis de Maestría. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 155 p.
- Kappelle, M; Horn, S. 2005. Páramos de Costa Rica. Heredia, Costa Rica, INBIO. 767p.

- Kausserud, H; Heegaard, E; Semenov, MA; Boddy, L; Halvorsen, R; Stige, LC; Sparks, TH; Gange, AC; Stenseth, NC. 2010. Climate change and spring-fruited fungi. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 277(1685): 1169-1177.
- Kivlin, SN; Emery, SM; Rudgers, JA. 2013. Fungal symbionts alter plant responses to global change. *American Journal of Botany* 100(7): 1445-1457.
- Leung, G; Robson, GD; Robinson, CH. 2011. Characterisation of cold-tolerant fungi from a decomposing High Arctic moss. *Soil Biology and Biochemistry* 43(9): 1975-1979.
- Li, HY; Shen, M; Zhou, ZP; Li, T; Wei, YL; Lin, LB. 2012. Diversity and cold adaptation of endophytic fungi from five dominant plant species collected from the Baima Snow Mountain, Southwest China. *Fungal Diversity* 54(1): 79-86.
- Lopera, C; Avila, L; Rojas, A; Franco-Molano, AE; Cepero, MC; Restrepo, S. 2008. Fungal endophytes from the Colombian Andean Paramo ecosystem inhibit the growth of plant pathogens in vitro. *Phytopathology* 98(6): S94.
- Miles, LA; Lopera, C; González, S; de García, MCC; Franco, AE; Restrepo, S. 2012. Exploring the biocontrol potential of fungal endophytes from an Andean Colombian Paramo ecosystem. *BioControl* 57(5): 697-710.
- Miller, RM; Lodge, DJ. 1997. Fungal responses to disturbance: agriculture and forestry. *The mycota* 4: 65-84.
- Milliken, W; Klitgård, B; Baracat, A. 2009. Neotropikey - Interactive key and information resources for flowering plants of the Neotropics (en línea, sitio web). Consultado 30 jun. 2015. Disponible en www.kew.org/neotropikey
- Raviraja, NS; Sridhar, KR; Bärlocher, F. 1998. Fungal diversity richness in Western Ghat streams (southern India): is it related to pH, temperature or altitude? *Fungal Diversity* 1: 179-191
- Redman, RS; Sheehan, KB; Stout, RG; Rodriguez, RJ; Henson, JM. 2002. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science* 298(5598): 1581.
- Rojas-Jiménez, K; Hernández, M; Blanco, J; Vargas, LD; Acosta-Vargas, LG; Tamayo, G. 2016. Richness of cultivable endophytic fungi along an altitudinal gradient in wet forests of Costa Rica. *Fungal Ecology* 20: 124-131.
- Rojas, C; Stephenson, SL. 2008. Myxomycete ecology along an elevation gradient on Cocos Island, Costa Rica. *Fungal Diversity* 29: 117- 127.
- Sadoth, VM. 2008. Ecología de comunidades de macromicetos a lo largo de un gradiente altitudinal en Santa Catarina Ixtepeji, Oaxaca. Tesis de maestría. Oaxaca, México, Instituto Politécnico Nacional. 68p.
- Saikkonen, K; Wäli, P; Helander, M; Faeth, SH. 2004. Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in Plant Science* 9(6): 275-280.
- Sánchez, I. 2009. Análisis de la estructura y diversidad de las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociados a plantas de especial interés ecológico en ambientes mediterráneos. Granada, Nicaragua, Universidad de Granada. 195p.
- Savón, RCB; Quevedo, HJM; Fernández, CD; Manrique, CEM; Sevilla, EIR. 2003. Influencia de la luz en la calidad proteica de *Pleurotus ostreatus* var. Florida. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 22(4): 226-231.

- Schulz, B; Boyle, C; Draeger, S; Ro, A; Krohn, K. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites*. *Mycology research* 106(September): 996-1004.
- Solano, J; Villalobos, R. 2000. Regiones y Subregiones Climáticas de Costa Rica (en línea). San José, Costa Rica, Instituto Meteorológico Nacional. Consultado 10 nov. 2015. Disponible en www.imn.ac.cr/publicaciones/estudios/Reg_climaCR
- Stephenson, SL; Schnittler, M; Lado, C. 2004. Ecological characterization of a tropical myxomycete assemblage – Maquipucuna Cloud Forest Reserve, Ecuador. *Mycologia* 96: 488-497
- Summerbell, RC. 2005. Root endophyte and mycorrhizosphere fungi of black spruce, *Picea mariana*, in a boreal forest habitat: influence of site factors on fungal distributions. *Studies in Mycology* 53: 121-145.
- Suryanarayanan, TS; Murali, TS; Venkatesan, G. 2002. Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. *Canadian Journal of Botany* 80(8): 818-826.
- The Plant List. 2010. Version 1. The Plant List (en línea). Consultado 30 jun. 2015. Disponible en <http://www.theplantlist.org/>
- Ulloa, M; Hanlin, R; Aguilar, S; Acosta, E. 2006. Nuevo diccionario ilustrado de micología. Minnesota, Estados Unidos, American Phytopathological Society.
- Unterseher, M; Gazis, R; Chaverri, P; Guarniz, CFG; Tenorio, DHZ. 2013. Endophytic fungi from Peruvian highland and lowland habitats form distinctive and host plant-specific assemblages. *Biodiversity and Conservation* 22: 999–1016.
- Vargas, G; Sánchez, JJ. 2005. Plantas con flores de los páramos de Costa Rica y Panamá. *En* Kapelle, M; Horn, S (eds.). *Páramos de Costa Rica*. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica, INBIO. 397-435p.
- Ward, JR, Kim, K; Harvell, CD. 2007. Temperature affects coral disease resistance and pathogen growth. *Marine Ecology Progress Series* 329:115-121.
- Webster, J, Weber, R. 2007. *Introduction to Fungi*. New York, USA, Cambridge. 875 p.
- Zak, JC; Willig, MR. 2004. Fungal biodiversity patterns. *En* Mueller, GM; Bills, GF; Foster, MS (eds.). *Biodiversity of Fungi. Inventory and monitoring methods*. London, U.K., Elsevier Academic.
- Zhang, T; Yao, YF. 2015. Endophytic Fungal Communities Associated with Vascular Plants in the High Arctic Zone Are Highly Diverse and Host-Plant Specific. *Plos One* 10(6): e0130051.
- Zhang, W; Parker, KM; Luo, Y; Wan, S; Wallace, LL; Hu, S. 2005. Soil microbial responses to experimental warming and clipping in a tallgrass prairie. *Global Change Biology* 11:266-277.

II. ARTÍCULO 1

Diversidad de hongos endófitos psicrófilicos de *Chusquea subtessellata* (Poaceae) en el páramo, Costa Rica

Carolina Seas

Manejo y Conservación de Bosques Tropicales y Biodiversidad, Escuela de Posgrado, CATIE, Turrialba, Costa Rica; carolina.seas@catie.ac.cr

INTRODUCCIÓN

Los endófitos se han encontrado en todas las plantas muestreadas hasta el momento, en todos los ecosistemas y en todos los tejidos. Se han encontrado desde los desiertos hasta las zonas alpinas, en frutos, hojas, tallos y raíces; y desde plantas no vasculares hasta árboles (Redman *et al.* 2002, Gamboa-Gaitán 2006, Webster y Weber 2007, Leung *et al.* 2011). También, se ha demostrado que algunos endófitos tienen una relación mutualista con la planta (es decir, protección contra varios tipos de estreses, enfermedades, herbivoría, sequía e inundaciones) (Gamboa-Gaitán 2006), y se podría suponer que ciertos endófitos son esenciales para que las plantas se desarrollen mejor en ecosistemas de temperaturas extremas (Redman *et al.* 2002, Lopera *et al.* 2008, Leung *et al.* 2011, Kivlin *et al.* 2013, Zhang y Yao 2015).

Uno de los ecosistemas de temperaturas extremas poco estudiados con respecto a su diversidad fúngica, son los páramos. Y aún menos son las investigaciones que han publicado sobre endófitos en estos ecosistemas (Lopera *et al.* 2008, Cabezas *et al.* 2012, Miles *et al.* 2012). Estos estudios caracterizaron la diversidad de endófitos en las plantas de páramo *Espeletia* (Familia Asteraceae). Además, demostraron el potencial que tienen algunos endófitos de *Espeletia* para el biocontrol de algunas enfermedades de plantas (Lopera *et al.* 2008, Miles *et al.* 2012) y uno para la producción de celulasas (Cabezas *et al.* 2012).

Sumado a las condiciones de temperatura, al estudiar la comunidad de microhongos en gradientes altitudinales, algunos estudios encontraron que la diversidad disminuye conforme aumenta la altitud: Raviraja *et al.* (1998) en Ghats Occidentales en la India; Stephenson *et al.* (2004) en Ecuador; Rojas y Stephenson (2008) en Isla del Coco, Costa Rica; y Rojas-Jiménez *et al.* (2016) en un gradiente altitudinal de bosque lluvioso en el Braulio Carrillo, Costa Rica. Sin embargo, aún se carece de información respecto a esta relación y en especial de hongos endófitos, dado que existen muy pocos estudios empíricos.

Para este estudio se enfocará en los hongos endófitos psicrófilicos, los cuales se caracterizan porque tienen preferencia a crecer en temperaturas entre 10 y 20°C (Mueller *et al.* 2004). Por lo que existe la interrogante de que en este caso la comunidad fúngica puede variar en el gradiente altitudinal de manera directamente proporcional, ya que a mayor altura (menor temperatura), mayor diversidad de hongos endófitos psicrófilicos. En este estudio, se busca caracterizar la diversidad de hongos endófitos psicrófilicos asociados a *C. subtessellata* en el páramo de Costa Rica y conocer si están asociados a la altitud.

METODOLOGÍA

Sitio y planta de estudio

El estudio se llevó a cabo en el páramo de Costa Rica, el cual se encuentra en la Cordillera de Talamanca y cubre 152Km² (15 205ha). Los muestreos se realizaron en los ecosistemas de páramo pertenecientes a las áreas de conservación Pacífico Central y La Amistad-Pacífico (Figura 1), específicamente en el cerro Buena Vista (3 491msnm) y cerro Chirripó (3 820msnm). La región es dominada por bosques de roble y ecosistemas de páramo (a partir de los 3 100msnm). La temperatura varía de 0°C-25°C, pero durante la época seca puede alcanzar - 5°C y 28°C. Esta época seca va de noviembre a abril, y la época lluviosa de mayo a octubre (Avalos *et al.* 2012).

Las plantas consideradas como endémicas, dominantes e indicadoras de ecosistema de páramo ístmico citadas por Vargas & Sánchez (2005; citando a Vargas & Sánchez 1988, Kapelle 1990) son: *Chusquea subtessellata* (Poaceae), *Hypericum irazuense* (Hypericaceae), *H. strictum* (Hypericaceae), *Comarostaphylis arbutoides* (Ericaceae), *Escallonia myrtiloides* (Escalloniaceae), *Valeriana prionophylla* (Valerianaceae), *Pernettya próstata* (Ericaceae), *Senecio oerstedianus* (Asteraceae), *Vaccinium consanguineum* (Ericaceae). De dichas especies, *Chusquea subtessellata* (Poaceae) es muy abundante, fácil de identificar y se encuentra presente en la mayoría de los páramos de Costa Rica; por lo que se eligió como la especie de planta hospedera en este estudio. *C. subtessellata* es bastante común en los páramos y buena colonizadora en las áreas que han sufrido quemadas o incendios, lo que puede a su vez ser un problema para la regeneración del bosque. También se conoce como una especie de importancia para la alimentación de la danta (*Tapirus bairdii*) (Edwards-Widmer 1999, Alfaro 2003).

La literatura indica que *C. subtessellata* tiene un ámbito de distribución desde los 2 200m hasta los 3 800m (Alfaro 2003), sin embargo, solo se logró identificar plantas a partir de los 3 270m. De tal forma que, a partir de este punto y hasta lo más alto de cada cerro (3 500m en cerro Buena Vista y 3 800m en cerro Chirripó), se realizaron puntos de colecta cada 100m de altitud separado por al menos 50m entre sí. Además, en cada punto se identificaron dos plantas (unidades de crecimiento) de *C. subtessellata*; y se tomaron muestras de hojas, tallos y raíces. Para el cerro Buena Vista se realizaron tres puntos de colecta cada 100m de altitud, para un total de 18 plantas. En el caso del cerro Chirripó, se realizaron seis puntos de colecta cada 100m de altitud, para un total de 56, la muestra no fue de 72 plantas, ya que a los 3300m y 3800m solo se encontraron plantas en dos puntos de colecta.

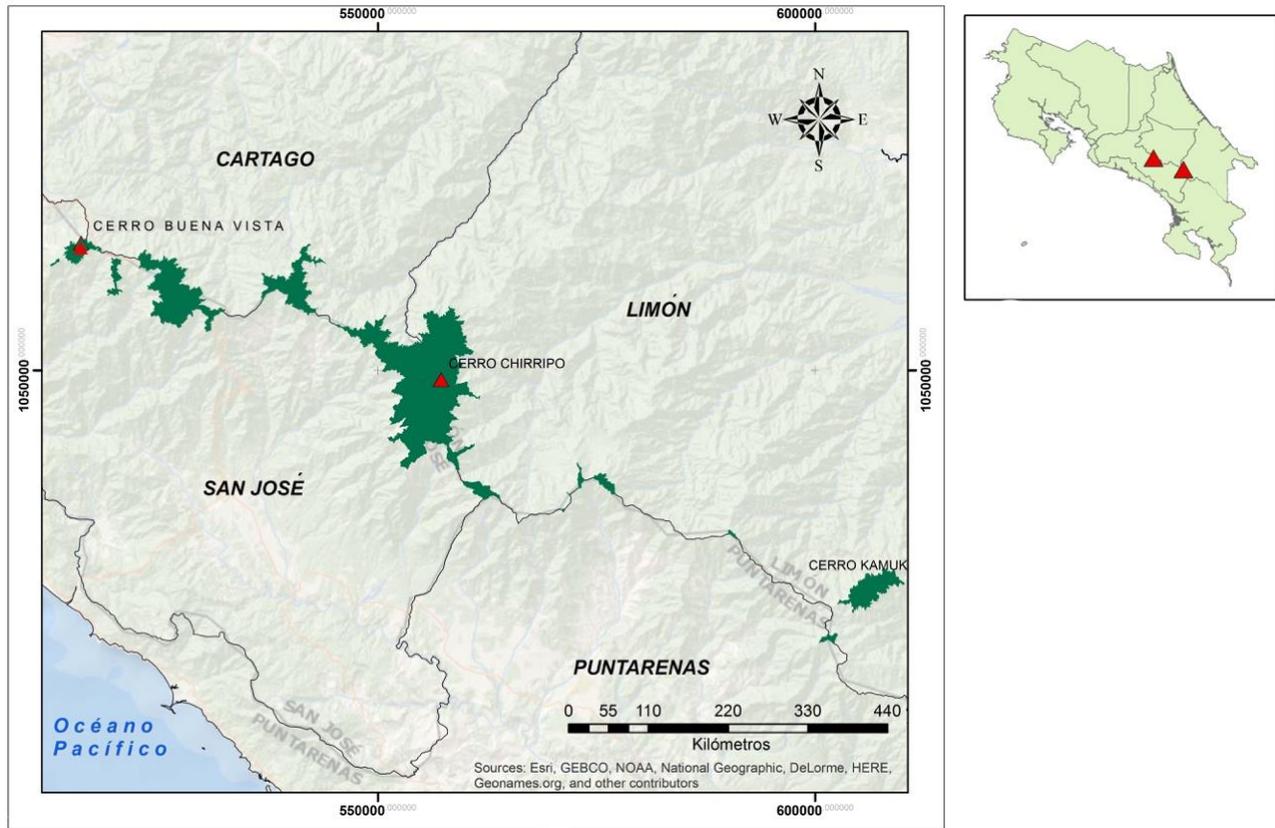


Figura. 1. Ubicación general de las áreas de estudio: cerro Buena Vista (3 491msnm) y cerro Chirripó (3 819msnm). Elaborado por: Ing. Danhy Estid Fuentes (2014). Fuente: Atlas de Costa Rica (2014)

Criterios de selección de la muestra vegetal

Con el fin de seleccionar las muestras vegetales de manera consistente, en cada punto de colecta se tomó en cuenta criterios que permiten seleccionar las muestras lo mejor posible. Las plantas debían estar sin efecto de la sombra o con la menor sombra posible y sin ataques de herbivoría o daño evidente (Rossman *et al.* 1998, Cornelissen *et al.* 2003, Pérez-Harguindeguy *et al.* 2013). Las hojas se colectaron a un metro de altura del suelo, los tallos se colectaron a 50 cm de altura del suelo; y las raíces, con ayuda de una pala, se excavó en la base de la planta para tomar muestras de raíces de la planta que se encontraran entre los 10 cm a 25 cm de profundidad. Las muestras se almacenaron en bolsas plásticas y se trasladaron en hieleras (sin hielo) para mantener un buen ambiente por un periodo no mayor a las 24 horas.

Diversidad de hongos endófitos psicrófilicos asociados a una poácea en el páramo

Se aislaron endófitos de hojas, tallos y raíces de *C. subtessellata*. Se colectaron hojas, tallos y raicillas por planta, que a su vez se dividieron en tres pedacitos de aproximadamente 5x5mm cada uno (por ejemplo: 74 plantas x 1 hoja/planta x 3 pedacitos/hoja = 222 pedacitos de hoja). Después de regresar del campo, se realizó el aislamiento para evitar el sobrecrecimiento de saprófitos, se hizo en un periodo menor a las 24 horas después de la colecta de la muestra vegetal.

Para eliminar los contaminantes superficiales de los tejidos vegetales, se usaron técnicas descritas por Summerbell (2005), Gazis y Chaverri (2010), Leung *et al.* (2011), Miles *et al.* (2012) y Rojas-Jiménez *et al.* (2016). Primero, los tejidos de las plantas se sometieron a inmersiones secuenciales de hipoclorito de sodio (cloro comercial) al 2 % por un minuto; alcohol 90 % por pocos segundos y agua estéril destilada, por pocos segundos. Segundo, los pedacitos de tejido se colocaron en platos Petri individuales con medio de cultivo papa-dextrosa-agar y antibiótico (para evitar el crecimiento de bacterias endófitas o contaminantes). Tercero, los platos Petri se incubaron a temperaturas bajas (15°C) para seleccionar los hongos psicrófilicos, y hasta que el micelio del hongo empezara a crecer del tejido de la planta. Cuarto, estas colonias se trasladaron a platos Petri con medio de cultivo nuevo para obtener cultivos puros.

Se calculó la frecuencia de aislamiento que corresponde a la fórmula $N_d/N_t \times 100$, donde N_t es el total de fragmentos y N_d los fragmentos en los que se detectaron endófitos (Rosa *et al.* 2009). Para realizar estos aislamientos y cultivos puros, se utilizaron cámaras de transferencia en el Laboratorio de Fitoprotección del CATIE, Turrialba, Costa Rica. Los cultivos puros de los endófitos se preservaron para futuros estudios y usos en biotecnología o control biológico. Tres o cuatro porciones del cultivo en agar (aproximadamente 5 x 5 mm) se colocaron en crioviales con agua destilada.

Crecimiento de hongos endófitos psicrófilicos ante una gama de temperaturas

Finalizado el proceso de aislamiento, se procedió a separar por morfotipos tomando en cuenta el sitio, la altitud, parte vegetal, coloración y características macroscópicas del micelio. Dichos morfotipos se pusieron a crecer en cámaras bioclimáticas con 12h luz/12h oscuridad a 10°C y 25°C, con el fin de empezar a discriminar los aislamientos psicrófilicos. Los morfotipos que mostraron mayor crecimiento radial a 10°C, se consideraron como psicrófilicos y, por ende, con los que se seguiría trabajando. En ambos casos se realizaron tres repeticiones para cada morfotipo.

Con el fin de construir las curvas de crecimiento, se pusieron a crecer los morfotipos seleccionados a cuatro temperaturas: 4, 10, 20 y 25°C, en una cámara bioclimática con 12h luz/12h oscuridad. El crecimiento radial (mm) se midió hasta las 192h. Posteriormente, al obtener las curvas de crecimiento, se confirmó si un aislamiento era psicrófilico cuando su temperatura óptima de crecimiento fue a 10 o 20°C (Mueller *et al.* 2004). Para este experimento se utilizaron las cámaras bioclimáticas del Laboratorio de Fitoprotección del CATIE, Turrialba, Costa Rica. Se realizaron cuatro repeticiones y se aleatorizó el uso de las cámaras para reducir el error experimental bajo un diseño experimental en parcelas subdivididas en cuadrado latino.

Identificación de los endófitos psicrófilicos

Se identificaron los hongos endófitos psicrófilicos usando secuenciación de ADN. Para la identificación molecular, se extrajo ADN usando el kit comercial Prepman Ultra Reagent y se realizó Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR) usando los oligonucleótidos del espacio de transcripción interna 5 y 4 (región ITS, por sus siglas en inglés; ADN del ribosoma nuclear) y se enviaron a secuenciar a Macrogen (Maryland, Estados Unidos).

El ensamblaje y alineación de secuencias se hizo utilizando el programa Geneious 10 (Kearse *et al.* 2012). Se utilizó la región de ITS porque esta tiene la base de datos de referencia

más grande para hongos (GenBank, NCBI, NIH) y es fácil comparar usando una búsqueda de BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La extracción de ADN y PCR se realizó en el laboratorio de la Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica.

La identificación se realizó a nivel de Unidades Taxonómicas Operativas (UTO), las cuales se definieron según la similitud de sus secuencias consensuadas al 99 % y ordenadas en un árbol del vecino más cercano con el programa Geneious 10 (Kearse *et al.* 2012).

Análisis de datos

Con el fin de caracterizar la diversidad de hongos endófitos psicrófilos asociados a *C. subtessellata* en el páramo, se generaron curvas de rarefacción para conocer la eficiencia de muestreo y la contribución de las muestras a la diversidad total registrada. Además, se estimó la riqueza de especies e índice de diversidad de Shannon y Simpson basados en presencia y ausencia. Posteriormente, la diversidad beta se evaluó mediante un análisis de escalonamiento multidimensional no métrico (NMS). Para comparar la diversidad de hongos (riqueza e índices de diversidad) entre los sitios, se trabajó con modelos lineales (generalizados) mixtos para las variables respuesta de riqueza de especies, índice de Shannon e índice de Simpson, declarando como efecto fijo la altitud y parte vegetal, y como efecto aleatorio el sitio. Todo lo anterior utilizando la interfase del *software* Infostat (DiRenzo *et al.* 2011) y el paquete *vegan* de R (Oksanen *et al.* 2007). Se realizó un análisis de especies indicadoras (Dufrene & Legendre 1997, DeCaceres *et al.* 2010) para conocer si los hongos endófitos psicrófilos encontrados están asociados a la altitud.

Se ajustaron curvas cuadráticas para cada UTO por sitio, altitud, parte vegetal y repeticiones; posteriormente, con los parámetros de cada curva (B0, B1, B2), se agruparon las curvas con un análisis de conglomerados. Además, mediante un modelo aditivo generalizado, se determinó si existía efecto de la temperatura en las curvas de crecimiento. Para modelar las curvas de crecimiento de cada grupo, se realizaron también modelos aditivos generalizados con efecto aleatorio de los UTO. Utilizando el paquete *mgcv* de R (Wood 2001), con la función de distribución Tweedie.

RESULTADOS

De 74 plantas colectadas, se obtuvo 169 aislamientos de 222 fragmentos de raíces, para una frecuencia de aislamiento del 76.13 %. En el caso de hojas, la frecuencia fue del 45.95 % (102 aislamientos) y para tallos del 29.73 % (66 aislamientos). En 329 platos Petri no se registró crecimiento alguno. Inicialmente, se contó con 225 morfotipos (68 para el cerro Buena Vista y 157 para el cerro Chirripó). Posterior a las mediciones de crecimiento radial (mm) a 10°C y 25°C, se establecieron como potenciales psicrófilos 58 (25.77 %) aislamientos dado que presentaron mayor crecimiento radial a 10°C (cuadro 1 en anexo 1). La identificación molecular de dichos aislamientos permitió identificar 29 Unidades Taxonómicas Operativas (UTO). Para el cerro Buena Vista el 37.93 % (11 UTO) eran psicrófilos y para el cerro Chirripó un 79.31 % (23 UTO).

Las UTO identificadas, al menos a nivel de orden, pertenecen en su mayoría al Filo Ascomycota, a excepción de dos del Filo Basidiomycota (*Phanerochaetaceae* sp. y *Sterigmatomyces halophilus*). Estas dos fueron encontradas solamente en el cerro Buena Vista,

la primera que corresponde a un porial (Orden Polyporales) aislado del tallo y la segunda de una raíz (IMA 2016). El resto pertenecen a tres clases del filo Ascomycota: Sordariomycetes (*Arthrinium* sp1, *Arthrinium* sp2, *Arthrinium* sp3 y *Arthrinium serenense*, Cordycipitaceae sp., *Microdochium lycopodium*, Ophiostomataceae sp., *Pestalotiopsis* sp., *Purpureocillium lilacinum*, *Trichoderma cf. asperellum*, *Trichoderma* sp., *Trichoderma viridescens* y Xylariaceae sp.), Dothideomycetes (*Cladosporium cf. varians*, *Paracamosporium* sp. y *Aureobasidium pullulans*) y Leotiomyces (Heliales sp., *Pezicula melanigena*) (IMA 2016).

Las tres UTO más frecuentemente aisladas son *Microdochium lycopodium*, *Arthrinium* sp3 y *Arthrinium serenense*; además del género *Trichoderma*. Solamente cinco de los 29 UTO identificadas se encontraron en ambos sitios, y sólo uno de ellos no coincide en la parte vegetal, *Arthrinium* sp3. Los otros cuatro coinciden de la siguiente manera; UTO_23 y *Pestalotiopsis* sp. en raíces, *Microdochium lycopodium* en hojas y *Arthrinium serenense* en tallos (cuadro 2).

Se hallaron hongos endófitos psicrófilicos a lo largo de todo el gradiente. Sin embargo, en algunos casos hubo ausencia en algunas partes vegetales y a ciertas altitudes. Para el cerro Buena Vista, no se encontraron en raíces a 3300m; para el cerro Chirripó en raíces y tallos a los 3300m, tallos y hojas a los 3600m y hojas a los 3800m (cuadro 1). Las raíces contaron con mayor cantidad de UTO psicrófilicas, pero la diferencia no es significativamente diferente a lo encontrado en hojas y tallos.

Posteriormente, se construyeron las curvas de crecimiento de acuerdo con el promedio de crecimiento radial (mm) obtenido a 4, 10, 20 y 25°C para los UTO psicrófilicas, estas curvas permitieron corroborar las especies psicrófilicas. Para lo anterior, se comprobó que sí existía efecto de la temperatura en el crecimiento ($F=9.036$, $p<0.05$). Además, el análisis de conglomerados agrupó los UTO en cuatro grupos de curvas de crecimiento basados en ANOVA (figura 2). La figura 3 muestra los ajustes de las curvas de crecimiento obtenidas para estos cuatro grupos ($R^2=0.456$, $p<2e-16$).

El primer grupo de curvas de crecimiento (G1 en Figura 3.) crece mejor entre los 15 y 20°C, a estas temperaturas el crecimiento es mayor que a los 4°C; a los 25°C el crecimiento es mayor que a 4°C, pero menor que el promedio de crecimiento entre los 15 y 20°C. El segundo grupo de crecimiento (G2 en Figura 3) en general crece muy poco (en promedio menos de 10mm en todo el rango de temperaturas). Su crecimiento se da solo entre los 10 y 20°C, teniendo un máximo a los 15°C. El tercer grupo (G3 en Figura 3.) en promedio creció por debajo de los 23mm en el periodo de 8 días, el máximo de crecimiento se da alrededor de los 15°C, entre 10 y 20°C crece más que a 25°C, pero a su vez el promedio de crecimiento a 25°C es mayor que el obtenido a 4°C. Por último, el grupo cuatro (G4 en Figura 3.) corresponde al grupo con mayor crecimiento promedio bajo cualquier temperatura, es un grupo conformado por una sola especie (*Trichoderma viridescens*). El máximo de crecimiento se dio entre 15 y 20°C, el menor crecimiento se dio a los 4°C; a 25°C el grupo muestra crecimiento, pero es menor que el crecimiento obtenido entre 10 y 20°C.

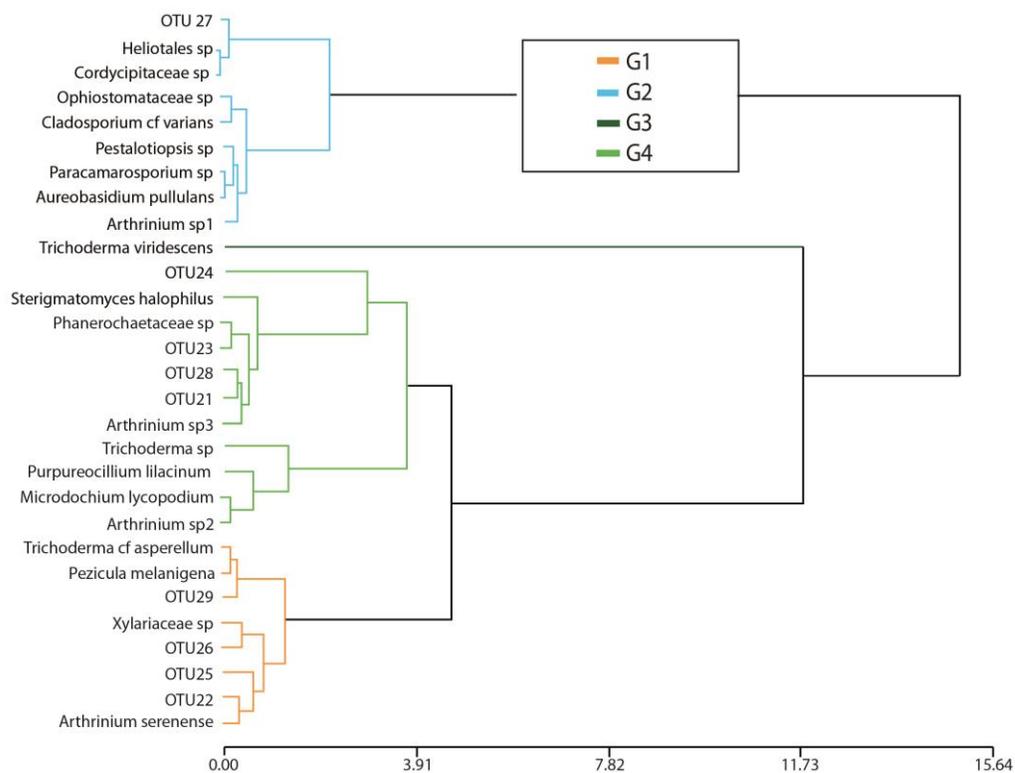


Figura 2. Grupos de curvas de crecimiento basados en ANOVA

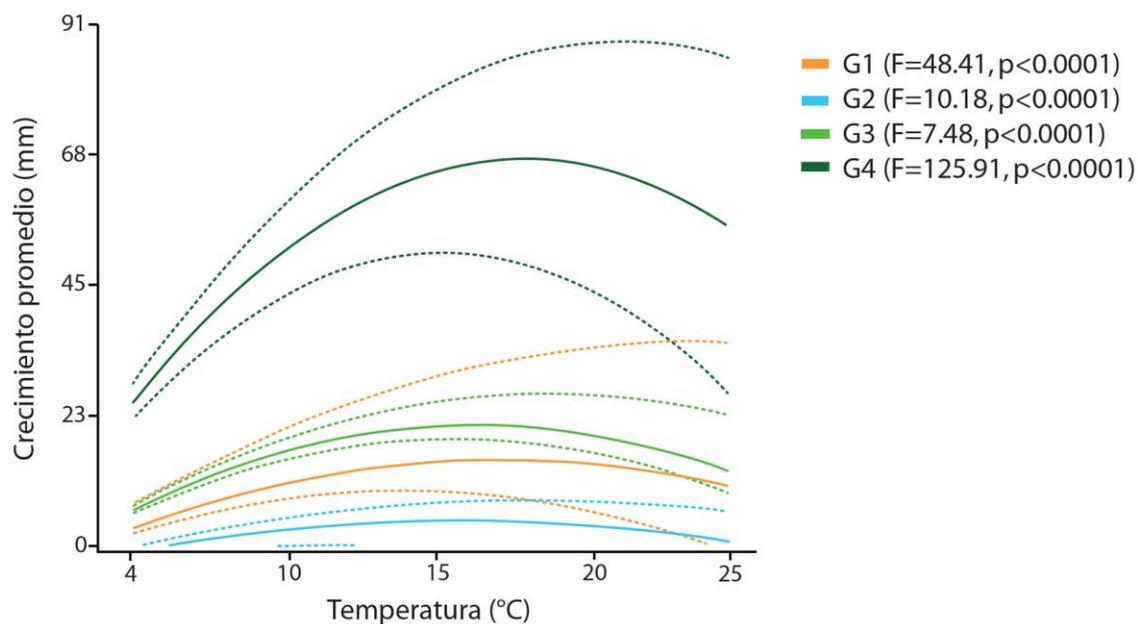


Figura 3. Residuos parciales del crecimiento radial (mm) de los cuatro grupos de curvas de crecimiento entre 4 y 25°C.

CUADRO 1

Cantidad de UTO psicrófilas de acuerdo con la altitud y parte vegetal en los sitios Buena Vista y Chirripó, Costa Rica

Sitio	Altitud	Parte vegetal	UTO psicrófilico
Buena Vista	3300	Tallo	2
		Hoja	1
		Raíz	0
	3400	Tallo	1
		Hoja	3
		Raíz	2
	3500	Tallo	3
		Hoja	2
		Raíz	2
Chirripó	3300	Tallo	0
		Hoja	2
		Raíz	0
	3400	Tallo	2
		Hoja	2
		Raíz	8
	3500	Tallo	2
		Hoja	5
		Raíz	2
	3600	Tallo	0
		Hoja	0
		Raíz	5
	3700	Tallo	2
		Hoja	5
		Raíz	1
	3800	Tallo	2
		Hoja	0
		Raíz	2

CUADRO 2

Identificación de UTO psicrófilos presentes en cada sitio según la parte vegetal.

UTO	Buena Vista			Chirripó		
	Hoja	Raíz	Tallo	Hoja	Raíz	Tallo
<i>Arthrinium_serenense*</i>			X	X		X
<i>Arthrinium_sp1</i>				X		
<i>Arthrinium_sp2</i>					X	
<i>Arthrinium_sp3**</i>			X	X	X	
<i>Aureobasidium_pullulans</i>						X
<i>Cladosporium_cf_varians</i>				X		
<i>Cordycipitaceae_sp</i>				X		
<i>Heliales_sp</i>					X	
<i>Microdochium_lycopodium*</i>	X			X	X	
<i>Ophiostomataceae_sp</i>					X	
OTU_21	X					
OTU_22			X			
OTU_23*	X			X		
OTU_24		X				
OTU_25				X		
OTU_26						X
OTU_27				X		
OTU_29					X	
OUT_28						X
<i>Paracamarosporium_sp</i>					X	
<i>Pestalotiopsis_sp*</i>	X			X		
<i>Pezicula_melanigena</i>					X	
<i>Phanerochaetaceae_sp</i>			X			
<i>Purpureocillium_lilacinum</i>					X	X
<i>Sterigmatomyces_halophilus</i>		X				
<i>Trichoderma_cf_asperellum</i>					X	
<i>Trichoderma_sp</i>		X				
<i>Trichoderma_viridescens</i>					X	
<i>Xylariaceae_sp</i>				X		

* Coincide en sitio y parte vegetal. ** Coincide solo en sitio

Para ambos sitios no se detectaron diferencias en la riqueza acumulada, las curvas esperan seguir acumulando nuevas especies, si se aumenta el esfuerzo en los muestreos, especialmente en el cerro Buena Vista (figura 4a). Para el caso de la curva de acuerdo con la parte vegetal, hay una mayor acumulación de especies en hojas y raíces, estas últimas no difieren (Figura 4b). El índice de riqueza de especies fue mayor en el cerro Chirripó, y como ya se dijo anteriormente, en hojas y raíces se obtuvo mayor diversidad (cuadro 3). La diversidad alfa analizada mediante los índices de Shannon y Simpson no permite observar alguna asociación con la altitud o la parte vegetal de la planta. Los valores más altos se encontraron en el Chirripó en raíces a los 3400m y hojas a los 3700m (Shannon=1.62, Simpson=0.8). No se evidenció interacción entre piso altitudinal y parte vegetal para riqueza de especies e índices de diversidad de Shannon y Simpson. Solamente se encontró un efecto para la diversidad de Simpson con el sitio, siendo mayor la diversidad en el cerro Chirripó ($F=4.81$, $p=0.025$).

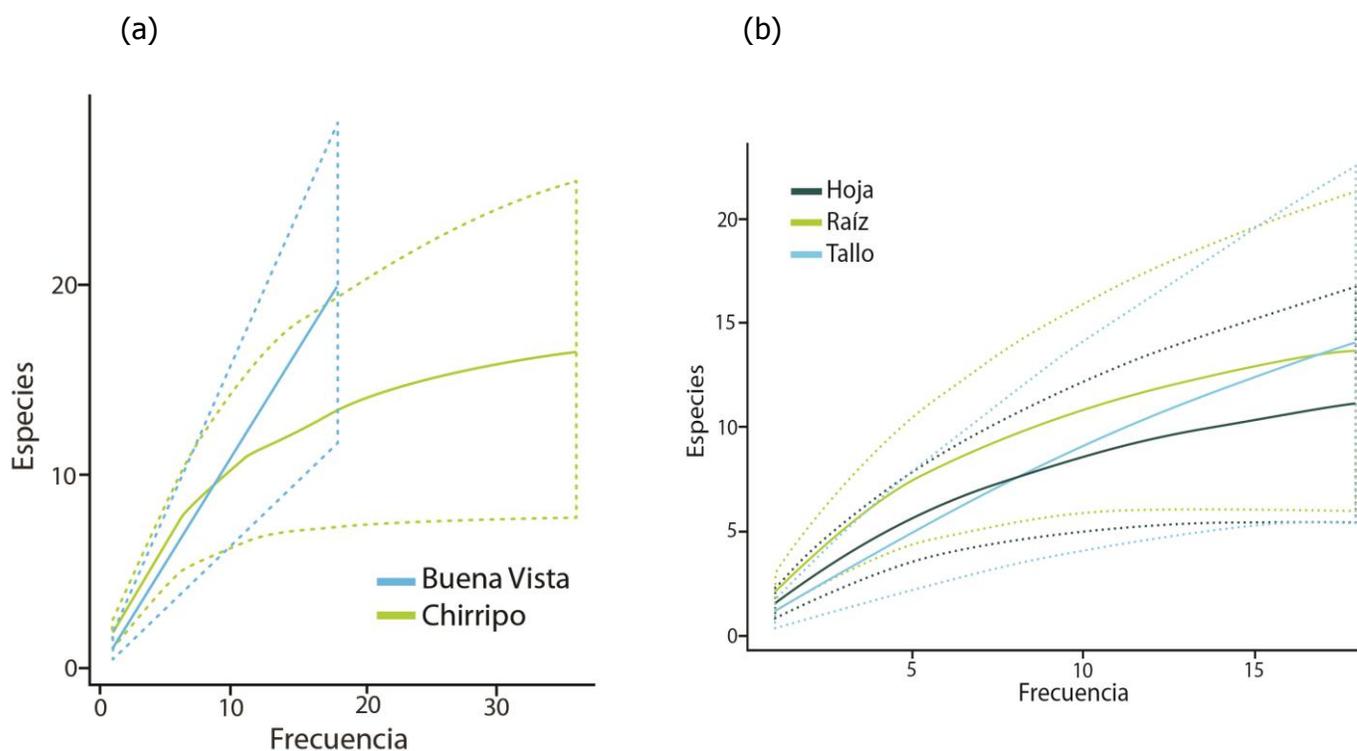


Figura. 4. Curvas de acumulación de especies basados en interpolación y extrapolación no asintóticas según el sitio (a) y según la parte vegetal (b)

CUADRO 3

Resumen de la diversidad de UTO de hongos endófitos psicrófilicos de acuerdo con la parte vegetal en los sitios Buena Vista y Chirripó, Costa Rica

Sitio	Parte vegetal	Riqueza de especies
Buena Vista	Hoja	3
	Raíz	4
	Tallo	3
Chirripó	Hoja	11
	Raíz	15
	Tallo	7

La ordenación de la comunidad de UTO evaluada en los sitios de estudio, no mostró una separación entre lo identificado en Buena Vista y Chirripó (figura. 5). Aunque el eje uno mostró que coincide con el gradiente altitudinal de los puntos mayormente evaluados en ambas zonas (entre 3 400 y 3 500). Los sitios se ordenaron en función de las UTO que muestran que hay un gradiente de elevación sin importar el sitio (eje 1: $r^2=0.13$, $p=0.08$; eje 2: $r^2=2xe^{-3}$, $p=0.83$). La UTO que más separó los puntos en el eje uno es *Microdochium lycopodium* ($r=0.72$), *Arthrinium* sp3 ($r=-0.57$) mientras que en el eje dos las UTO fueron *Arthrinium* sp3 ($r=0.76$) y *Arthrinium serenense* ($r=-0.58$) (cuadro 2 en anexo 1).

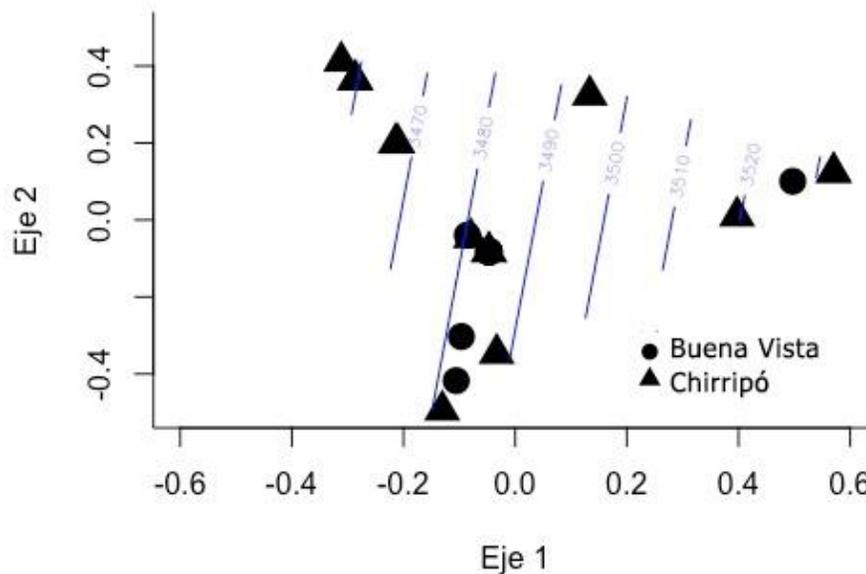


Figura. 5. Diagrama de ordenación (NMS) que muestra la relación entre los sitios Buena Vista y Chirripó y el gradiente altitudinal

Por último, el análisis de especies indicadoras en el gradiente altitudinal no mostró ninguna UTO como indicador al gradiente de elevación.

DISCUSIÓN

El resultado de un diseño de experimento que incluyó más de un sitio de muestreo y, además, un gradiente altitudinal, se refleja en que la frecuencia de aislamiento y cantidad de unidades taxonómicas operacionales psicrófilas (UTO) obtenida es mayor que la reportada en otros estudios de hongos endófitos de ecosistemas con temperaturas extremas frías y obtenidos de tejido vivo de poáceas y otras familias (Saikkonen *et al.* 2000, Rosa *et al.* 2009, Leung *et al.* 2011). Sin embargo, son similares a los valores obtenidos en estudios con más de un sitio de muestreo o enfocados en ecosistemas de páramo, aunque no específicamente en la familia Poaceae (Rosa *et al.* 2010, Miles *et al.* 2012).

La variabilidad de respuesta de las curvas de crecimiento de los cuatro grupos (Figura. 2) se podría explicar en la variedad taxonómica que se encuentra en cada uno. Sin embargo, Crowther y Bradford (2011) y Leung *et al.* (2011) muestran cómo una misma especie psicrófila puede variar su crecimiento promedio considerablemente. También, así como Rosa *et al.* (2009) lo cuestionan en su investigación, también nace la interrogante en este estudio sobre si al menos algunas de las especies encontradas son exclusivas a la poácea estudiada.

En el grupo uno hay representación de las clases Sordariomycetes y Leotiomycetes, además de los UTO sin identificar. Las UTO como *Pezizula melanigena* y *Trichoderma cf asperellum* fueron principalmente aisladas de muestras del cerro Chirripó y en raíces. Estas especies han sido descritas como especies que crecen mejor alrededor de los 20°C, lo que coincide con ser descritas aquí como psicrófilas (Kowalski *et al.* 1998, Begouede *et al.* 2007). Por último, *T. asperellum* es conocido como un controlador biológico o antagonista muy efectivo contra varias enfermedades de plantas (Samuels *et al.* 2010).

El grupo dos es el que cuenta con más diversidad taxonómica. Dentro de este se encuentran representadas las tres clases de Ascomycota que fueron aisladas (Dothideomycetes, Sordariomycetes y Leotiomycetes), por lo que en este grupo hay gran representación de hongos comúnmente encontrados como saprófitos (Webster y Weber 2007). Además, en este grupo es donde menor crecimiento promedio se obtuvo.

En el grupo tres solamente hay representación de una especie, *Trichoderma viridescens*. Corresponde a todo un complejo de especies cuya distribución se indica en Europa, y un solo aislamiento para Estados Unidos y otro para Japón, por lo que no ha sido reportado para Costa Rica (Jaklitsch *et al.* 2013). El aislamiento es de una raíz, lo que concuerda con el género *Trichoderma* que son conocidos como hongos de suelo (Chaverri y Samuels 2003).

Finalmente, en el último grupo se encuentran las dos UTO que pertenecen al filo Basidiomycota y todos los demás son Sordariomycetes, más las UTO aún sin identificar. Los Basidiomycota fueron aislados únicamente del cerro Buena Vista. El basidiomicete *Sterigmatomyces halophilus* inicialmente era considerado un hongo asexual y originario de áreas marinas (Fell 1966); es necesario recabar más información sobre su distribución actual.

De las UTO más comunes, se sabe que *Arthrimum* es encontrada como endófito (Crous *et al.* 2013) e incluso recientemente se describieron dos especies nuevas de *Arthrimum* asociadas a un bambú en China (Dq *et al.* 2016). Por lo que es necesario definir si las UTO identificadas

solo hasta el género *Arthrimum* son posibles nuevas especies asociadas al bambú *C. subtessellata*. El *Microdochium* es un género que es frecuente encontrarlo en hojas vivas, y el *M. lycopodium* de hojas de *Lycopodium annotinum* (Hernández-Restrepo *et al.* 2016); plantas de este género se pueden encontrar en los páramos costarricenses. Y, por último, *Trichoderma* sp., que es común encontrarlo en el suelo y raíces, y, además, es un buen controlador biológico (Chaverri y Samuels 2003, Harman *et al.* 2004).

Las cinco UTO que coinciden en ambos sitios pertenecen a Sordariomycetes, los cuales cumplen una función en los ecosistemas como patógenos y endófitos de plantas, artrópodos y mamíferos, micoparásitos y saprobios involucrados en la descomposición y ciclado de nutrientes (Zhang *et al.* 2006). Además, incluye endófitos que viven dentro del tejido vivo sobre el nivel del suelo de plantas aparentemente sanas. Las plantas hospederas se benefician al aumentar su resistencia a sequías, reducen la herbivoría y se limitan las infecciones por patógenos (Zhang *et al.* 2006). Las plantas en el páramo pueden estar siendo beneficiadas por la presencia de estos endófitos para soportar los cambios de temperatura durante el día, incluyendo algunas temperaturas muy bajas en algunos periodos del año; y también radiaciones del sol muy fuertes.

De las 20 UTO identificadas a algún nivel, al menos 11 han sido descritas como psicrófilicas o que al menos han crecido a temperaturas menores de 20°C: *Arthrimum* sp. en Sienna *et al.* (2009), *Aureobasidium pullulans* en Kuehn y Gunderson (1963) y Kachalkin (2010), *Microdochium lycopodium*, al menos otras especies del mismo género en Wang *et al.* (2015), el género *Purpureocillium* en Santiago *et al.* (2016), el género *Sterigmatomyces* en Kachalkin (2010) y el género *Trichoderma* en Harman *et al.* (2004) y Hassan *et al.* (2016). De las otras UTO no se encontró literatura que respaldara si han sido descritos como psicrófilicos anteriormente.

Respecto a la diversidad alfa, no se detectaron diferencias en la riqueza de especies acumulada. La curva de acumulación por sitio (figura. 4a) requiere que se aumente el esfuerzo de muestreo en el cerro Buena Vista, sin embargo, cabe aclarar que no se puede alcanzar el nivel del cerro Chirripó debido a la diferencia de altitud en cada cerro. Se obtuvo mayor diversidad en hojas y raíces, lo cual concuerda con la biología de las UTO identificadas (Zhang *et al.* 2006). Sin embargo, también se nota que los tallos de *C. subtessellata* eran muy fuertes y eso hizo que fueran difíciles de manipular para los aislamientos.

Para la diversidad beta, la tasa de remplazo de especies se podría dar en el rango de altitud que comparten ambos sitios (3 300- 3 500m), que es lo que se ve reflejado en la figura 5. Las UTO con más importancia en los ejes del análisis de NMS son especies que se comparten en ambos sitios y pertenecen a Sordariomycetes, y que como se explicó anteriormente, tienen un rol muy importante en el hábitat que se encuentran (Zhang *et al.* 2006).

No se pudo asociar la diversidad de hongos endófitos psicrófilicos con la altitud. Sin embargo, la razón principal fue que el gradiente ni siquiera alcanzó los 1 000m, a pesar de que la literatura indicaba que *C. subtessellata* se encontraba desde los 2 200m, solamente se encontró a partir de los 3 270m. Quizás sea necesario una mayor exploración del área de estudio, con el fin de poder aumentar la información a lo largo del gradiente, y poder asociar las especies con la altitud en un gradiente mayor a 1 000m como se ha hecho en otros estudios con endófitos (Rojas-Jiménez *et al.* 2016).

Conocer la ecología de los hongos endófitos en ecosistemas como el páramo es de gran importancia, su especificidad al hospedero y características ambientales como la temperatura pueden ser muy altas; lo cual puede generar un impacto en el ecosistema en caso de no ser posible su adaptación a cambios en el ambiente como se espera ocurra con los efectos del cambio climático. Para un trabajo futuro, la identificación a nivel de especie de todos los endófitos, no solamente los psicrófilos, es muy importante.

BIBLIOGRAFÍA

- Alfaro, E. 2003. Plantas comunes del Parque Nacional Chirripó, Costa Rica. Heredia, Costa Rica, INBIO. 385p.
- Avalos, G; Soto, A; Alfaro, W. 2012. Effect of artificial feeders on pollen loads of the hummingbirds of Cerro de La Muerte, Costa Rica. *International Journal of Tropical Biology and Conservation* 60(1).
- Begoude, BAD; Lahlali, R; Friel, D; Tondje, PR; Jijakli, MH. 2007. Response surface methodology study of the combined effects of temperature, pH, and aw on the growth rate of *Trichoderma asperellum*. *Journal of Applied Microbiology* 103(4): 845-854.
- Cabezas, L; Calderon, C; Medina, LM; Bahamon, I; Cardenas, M; Bernal, AJ; Gonzalez, A; Restrepo, S. 2012. Characterization of cellulases of fungal endophytes isolated from *Espeletia* spp. *Journal of Microbiology* 50(6): 1009-1013.
- Chaverri, P; Samuels, GJ. 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores. *Studies in Mycology* 2003(48): 1-113.
- Cornelissen, JHC; Lavorel, S; Garnier, E; Diaz, S; Buchmann, N; Gurvich, DE; Reich, PB; Steege, H ter; Morgan, HD; Van Der Heijden, MGA; Pausas, JG; Poorter, H. 2003. A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide . *Australian Journal of Botany* no.51: 335-380.
- Crous, PW; Groenewald, JZ. 2013. A phylogenetic re-evaluation of *Arthrimum*. *IMA Fungus* 4(1): 133-154.
- De Caceres, M; Legendre, P; Moretti, M. 2010. Improving indicator species analysis by combining groups of sites. *Oikos* 119(10): 1674-1684.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., & Robledo, Y. C. 2011. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>, 8, 195-199.
- Dq, D; Hb, J; Lz, T; Dj, B. 2016. Two new species of *Arthrimum* (Apiosporaceae , Xylariales) associated with bamboo from Yunnan , China. 7(December): 1332-1345.
- Dufrêne, M; Legendre, P. 1997. Species assemblages and indicator species: The need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs* 67(3): 345-366.
- Edwards-Widmer, Y. 1999. The ecological role of bamboo (*Chusquea* spp.) in the old-growth *Quercus* forests of the Cordillera de Talamanca, Costa Rica. Tesis de doctorado. Zurich, Suiza, Instituto de Tecnología de Zurich. 208p.

- Fell, JW. 1966. Sterigmatomyces, a new fungal genus from marine areas. *Antonie van Leeuwenhoek* 32(1): 99-104.
- Gamboa-Gaitán, M. 2006. Hongos Endófitos Tropicales: Conocimiento actual y perspectivas. *Acta Biológica Colombiana* 11(1): 3–20.
- Gazis, R; 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.
- Harman, GE; Howell, CR; Viterbo, A; Chet, I; Lorito, M. 2004. Trichoderma species--opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews. Microbiology* 2(1): 43-56.
- Hassan, N; Rafiq, M; Hayat, M; Shah, AA; Hasan, F. 2016. Psychrophilic and psychrotrophic fungi: a comprehensive review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 15(2): 147-172.
- Hernández-Restrepo, M; Groenewald, JZ; Crous, PW. 2016. Taxonomic and phylogenetic re-evaluation of *Microdochium*, *Monographella*; and *Idriella*; *Persoonia* - *Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 36(1): 57-82.
- International Mycological Association (IMA). 2016. MycoBank Data Base. Disponible en <http://www.mycobank.org/>
- Jaklitsch, WM; Samuels, GJ; Ismaiel, A; Voglmayr, H. 2013. Disentangling the *Trichoderma viridescens* complex. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 31(December): 112-146.
- Kachalkin, a. V. 2010. New data on the distribution of certain psychrophilic yeasts in Moscow oblast. *Microbiology* 79(6): 840-844.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond, A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- Kivlin, SN; Emery, SM; Rudgers, JA. 2013. Fungal symbionts alter plant responses to global change. *American Journal of Botany* 100(7): 1445-1457.
- Kowalski, T; Halmschlager, E; Schrader, K. 1998. *Cryptosporiopsis melanigena* sp. nov., a root-inhabiting fungus of *Quercus robur* and *Q. petraea*. *Mycological Research* 102(3): 347-354.
- Kuehn, HH; Gunderson, MF. 1962. Psychrophilic and mesophilic fungi in fruit-filled pastries. *Applied microbiology* 10(4): 354-358.
- Leung, G; Robson, GD; Robinson, CH. 2011. Characterisation of cold-tolerant fungi from a decomposing High Arctic moss. *Soil Biology and Biochemistry* 43(9): 1975-1979.
- Lopera, C; Avila, L; Rojas, A; Franco-Molano, AE; Cepero, MC; Restrepo, S. 2008. Fungal endophytes from the Colombian Andean Paramo ecosystem inhibit the growth of plant pathogens in vitro. *Phytopathology* 98(6): S94.
- Miles, LA; Lopera, C; González, S; de García, MCC; Franco, AE; Restrepo, S. 2012. Exploring the biocontrol potential of fungal endophytes from an Andean Colombian Paramo ecosystem. *BioControl* 57(5): 697-710.

- Mueller, GM; Schmit, JP; Hubndorf, SM; Ryvarden, L; O'Dell, T; Lodge, DJ; Leacock, P, Mata, M; Umaña, L; Wu, Q; Czederpiltz, DL. 2004. Recommended protocols for sampling macrofungi. En: Mueller, GM; Bills, GF; Foster, MS (eds.). Biodiversity of Fungi. Inventory and monitoring methods. London, U.K., Elsevier Academic.
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, B., Stevens, M. H. H., Oksanen, M. J., & Suggests, M. A. S. S. 2007. The vegan package. Community ecology package, 10, 631-637.
- Pérez-Harguindeguy, N; Díaz, S; Lavorel, S; Poorter, H; Jaureguiberry, P; Bret-Harte, MS; Cornwell, WK; Craine, JM; Gurvich, DE; Urcelay, C; Veneklaas, EJ; Reich, PB; Poorter, L; Wright, IJ; Ray, P; Enrico, L; Pausas, JG; Vos, AC de; Buchmann, N; Funes, G; Quétier, F; Hodgson, JG; Thompson, K; Morgan, HD; Steege, H ter; Heijden, MGA van der; Sack, L; Blonder, B; Poschlod, P; Vaieretti, M V.; Conti, G; Staver, AC; Aquino, S; Cornelissen, JHC. 2013. New Handbook for standardized measurement of plant functional traits worldwide. Australian Journal of Botany no.61: 167-234.
- Raviraja, NS; Sridhar, KR; Bärlocher, F. 1998. Fungal diversity richness in Western Ghat streams (southern India): is it related to pH, temperature or altitude? Fungal Diversity 1: 179-191
- Redman, RS; Sheehan, KB; Stout, RG; Rodriguez, RJ; Henson, JM. 2002. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. Science 298(5598): 1581.
- Rojas-Jiménez, K; Hernández, M; Blanco, J; Vargas, LD; Acosta-Vargas, LG; Tamayo, G. 2016. Richness of cultivable endophytic fungi along an altitudinal gradient in wet forests of Costa Rica. Fungal Ecology 20: 124-131.
- Rojas, C; Stephenson, SL. 2008. Myxomycete ecology along an elevation gradient on Cocos Island, Costa Rica. Fungal Diversity 29: 117- 127.
- Rosa, LH; Almeida Vieira, MDL; Santiago, IF; Rosa, CA. 2010. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) in Antarctica. FEMS Microbiology Ecology 73(1): 178-189.
- Rosa, LH; Vaz, ABM; Caligiorno, RB; Campolina, S; Rosa, CA. 2009. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). Polar Biology 32(2): 161-167.
- Rossmann, A; Rodham, T; Dell, T; Thorn, G. 1998. All Taxa Biodiversity Inventory Costa Rican Conservation Area. s.l., s.e., 213.
- Saikkonen, K; Ahlholm, J; Helander, M; Lehtimäki, S; Niemeläinen, O. 2000. Endophytic fungi in wild and cultivated grasses in Finland. Ecography 23(3): 360-366.
- Samuels, GGJG; Ismaiel, A; Bon, M-CM-C; Respinis, S De; De Respinis, S; Petrini, O. 2010. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. Mycologia 102(4): 944-966.
- Santiago, IF; Rosa, CA; Rosa, LH. 2016. Endophytic symbiont yeasts associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis*. Polar Biology no.2010: 1-7.

- Sienna, OF. 2009. Book of Abstracts and Book of Abstracts and Book of Abstracts and Contributed Papers Contributed Papers Contributed Papers Book of Abstracts and Contributed Papers
- Stephenson, SL; Schnittler, M; Lado, C. 2004. Ecological characterization of a tropical myxomycete assemblage – Maquipucuna Cloud Forest Reserve, Ecuador. *Mycologia* 96: 488-497
- Summerbell, RC. 2005. Root endophyte and mycorrhizosphere fungi of black spruce, *Picea mariana*, in a boreal forest habitat: influence of site factors on fungal distributions. *Studies in Mycology* 53: 121-145.
- Vargas, G; Sánchez, JJ. 2005. Plantas con flores de los páramos de Costa Rica y Panamá. *En* Kapelle, M; Horn, S (eds.). *Páramos de Costa Rica*. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica, INBIO. 397-435p.
- Wang, M; Jiang, X; Wu, W; Hao, Y; Su, Y; Cai, L; Xiang, M; Liu, X. 2015. Psychrophilic fungi from the world ' s roof. *Persoonia* 2015: 100-112.
- Webster, J, Weber, R. 2007. Introduction to Fungi. New York, USA, Cambridge. 875 p.
- Wood, S. N. (2001). mgcv: GAMs and generalized ridge regression for R. *R news*, 1(2), 20-25.
- Zhang, T; Yao, YF. 2015. Endophytic Fungal Communities Associated with Vascular Plants in the High Arctic Zone Are Highly Diverse and Host-Plant Specific. *Plos One* 10(6): e0130051.
- Zhang, N; Castlebury, LA; Miller, AN; Huhndorf, SM; Schoch, CL; Seifert, KA; Rossman, AY; Rogers, JD; Kohlmeyer, J; Volkmann-Kohlmeyer, B; Sung, G-H. 2006. An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. *Mycologia* 98(6): 1076-87.

III. ARTÍCULO 2

Respuesta del crecimiento de hongos endófitos psicrófilicos asociados a *Chusquea subtessellata* ante cambios de temperatura

Carolina Seas

Manejo y Conservación de Bosques Tropicales y Biodiversidad, Escuela de Posgrado, CATIE, Turrialba, Costa Rica; carolina.seas@catie.ac.cr

INTRODUCCIÓN

Los hongos endófitos pertenecen en su mayoría al Filo Ascomycota (Chaverri *et al.* 2011), los mismos se han estudiado asociados a diferentes taxones vegetales (Gamboa-Gaitán 2006), pero muy pocos estudios se refieren a especies fúngicas asociadas a plantas de ecosistemas extremos, como el páramo (Lopera *et al.* 2008, Rosa *et al.* 2010, Cabezas *et al.* 2012, Miles *et al.* 2012). Un hongo endófito es considerado psicrófilico cuando tiene preferencia a crecer a temperaturas entre 10 y 20°C (Mueller *et al.* 2004). A la fecha se han reportado varias especies con esta característica (Wang *et al.* 2015, Hassan *et al.* 2016), pero muy poco se conoce de su capacidad para adaptarse y crecer a temperaturas fuera de su ámbito óptimo (Arthur y Watson 1976, Robinson 2001, Leung *et al.* 2011).

Actualmente, dado el aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), debido principalmente a las actividades humanas y el alto consumo de combustibles fósiles, los cambios en las condiciones climáticas, como la temperatura, han sido alterados dando paso a un acelerado aumento de temperatura anual en las últimas décadas (Jiménez 2009, IPCC 2010). Dicho calentamiento ya se está percibiendo y va en aumento, lo que en teoría puede afectar a la biodiversidad, pero son conclusiones inferenciales y necesitan de estudios experimentales para comprobar dicha hipótesis. Por ejemplo, algunas investigaciones en zonas de temperaturas frías extremas demuestran que el crecimiento de algunas plantas se ve beneficiado por el aumento en la temperatura, y otras plantas, como helechos y musgos, se ven negativamente afectadas (Callaghan *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2005).

Lo anterior hace cuestionar la capacidad de los hongos endófitos psicrófilicos para adaptarse ante un potencial aumento de temperatura. Es por eso que en este estudio se busca evaluar, en laboratorio, la respuesta del crecimiento de hongos endófitos psicrófilicos asociados a *Chusquea subtessellata*, ante cambios de temperaturas.

METODOLOGÍA

Selección de hongos endófitos psicrófilicos

Se utilizaron 17 Unidades Taxonómicas Operativas (UTO) de endófitos psicrófilicos asociados a la planta *Chusquea subtessellata*. Las UTO utilizadas en este estudio pertenecen en su mayoría al Filo Ascomycota, a excepción del Basidiomycota (*Phanerochaetaceae* sp.). Los ascomicetes pertenecen a dos clases: Sordariomycetes (*Arthinium* sp1, *Arthrinium* sp3 y *Arthrinium serenense*, *Microdochium lycopodium*, *Pestalotiopsis* sp., *Purpureocillium lilacinum*, *Trichoderma* cf. *asperellum*, *Trichoderma* sp.) y Dothideomycetes (*Paracamosporium* sp.). Asociado a cada UTO se contaba con información del sitio de colecta, altitud, parte vegetal y repeticiones; los mismos provenientes de un estudio previo en el páramo de Costa Rica (Seas 2017) (Figura. 1), específicamente en el cerro Buena Vista (3 491msnm) y cerro Chirripó (3 820msnm). La región es dominada por bosques de roble y ecosistemas de páramo (a partir de los 3 100msnm). La temperatura varía de 25°C-0°C, pero durante la época seca puede alcanzar -5°C y 28°C. Esta época seca va de noviembre a abril, y la época lluviosa de mayo a octubre (Avalos *et al.* 2012).

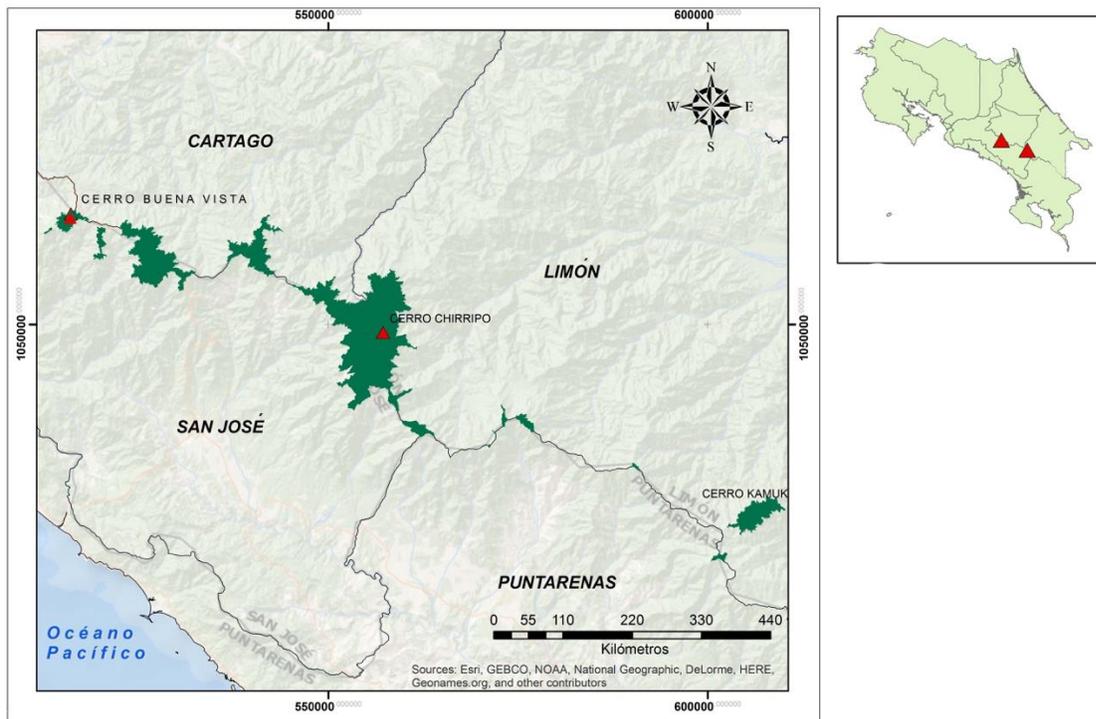


Figura. 1. Ubicación general de las áreas de estudio: cerro Buena Vista (3 491msnm) y cerro Chirripó (3 819msnm). Elaborado por: Ing. Danhy Estid Fuentes (2014). Fuente: Atlas de Costa Rica (2014)

Respuesta de crecimiento ante una gama de temperaturas

Con el fin de construir las curvas de crecimiento, se pusieron a crecer las UTO seleccionadas a cuatro temperaturas: 4, 10, 20 y 25°C, en una cámara bioclimática con 12h luz / 12h oscuridad. Al obtener las curvas de crecimiento, se confirmó si la UTO era psicrófila cuando su temperatura óptima de crecimiento fue entre 10 y 20°C (Mueller *et al.* 2004). Se realizaron

cuatro repeticiones y se aleatorizó el uso de las cámaras para reducir el error experimental. El diseño adoptado fue cuadrado latino con parcelas subdivididas (Figura. 2).

Repetición	Cámara 1	Cámara 2	Cámara 3	Cámara 4
1	A	B	C	D
2	B	C	D	A
3	C	D	A	B
4	D	A	B	C

A = 4°C, B = 10°C, C=20°C, D=25°C

Figura. 2. Diagrama del diseño en parcelas subdivididas en cuadrado latino para evaluar, en laboratorio, la respuesta del crecimiento de hongos endófitos psicrófilos, asociados a *Chusquea subtessellata*, ante una gama de temperaturas.

Posteriormente, se sometieron repetidamente (por 10 ciclos) a una temperatura 5°C mayor a su temperatura óptima de crecimiento, para determinar su capacidad de adaptarse a los potenciales aumentos de temperatura (Figura. 3). Estas mutaciones pueden aumentar (o disminuir) la aptitud de estos hongos en temperaturas más altas y conllevar a una aclimatación a ambientes más calientes. Adicionalmente, se realizó un experimento preliminar para conocer la respuesta de los hongos a variaciones de temperatura en periodos cortos. De tal manera que se siguió el procedimiento descrito en la figura 3, pero la temperatura de incubación no fue constante; sino que se intercaló entre 10°C y 20°C por intervalos de 12 horas (día y noche) con cada una de estas temperaturas.

Finalizados los 10 ciclos en ambos experimentos, se construyeron de nuevo las curvas de crecimiento a cuatro temperaturas: 4, 10, 20 y 25°C, en una cámara bioclimática con 12h luz(día) / 12h oscuridad (noche). Para este experimento se utilizaron las cámaras bioclimáticas del Laboratorio de Fitoprotección del CATIE, Turrialba, Costa Rica.

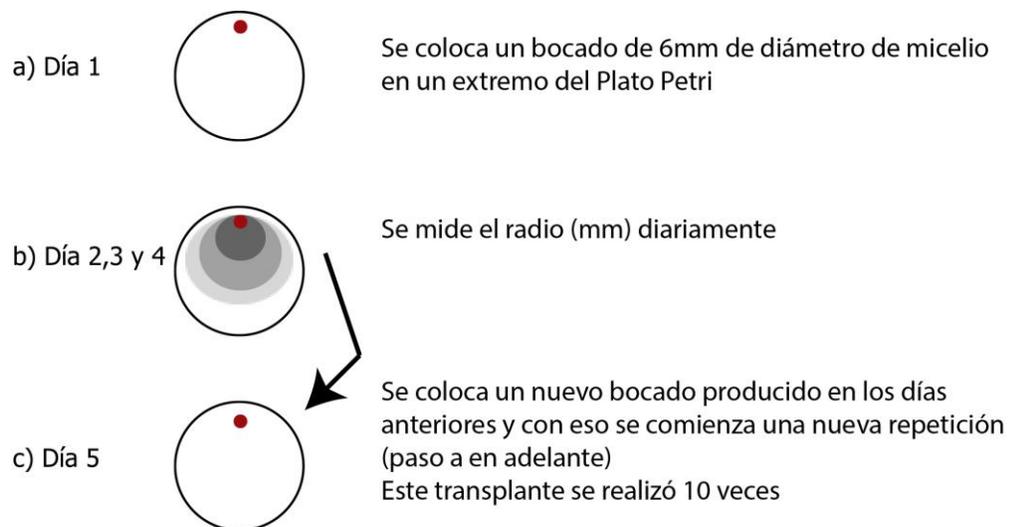


Figura. 3. Diagrama del diseño del experimento de adaptación al aumento potencial de temperatura

Análisis de datos

Se ajustaron curvas cuadráticas para cada UTO por sitio, altitud, parte vegetal y repeticiones; posteriormente, con los parámetros de cada curva (B0, B1, B2), se agruparon las curvas con un análisis de conglomerados. Mediante modelos aditivos generalizados con efecto aleatorio de los UTO, se evaluó el comportamiento de las curvas de crecimiento iniciales, durante el experimento de aumento de 5°C y cambios de temperatura entre el día y la noche; y las curvas posteriores a estos experimentos. Y finalmente, el comportamiento de las curvas iniciales versus las curvas finales obtenidas posterior a los experimentos. Los modelos se realizaron con el paquete *mgcv* de R (Wood 2001), utilizando la función de distribución Tweedie.

RESULTADOS

Se construyeron las curvas de crecimiento de acuerdo con el promedio de crecimiento radial (mm) obtenido a 4, 10, 20 y 25°C para las UTO agrupadas según el análisis de conglomerados en tres grupos de curvas de crecimiento basados en ANOVA (figura. 4). La figura 5 muestra el ajuste de las curvas de crecimiento obtenidas para estos tres grupos ($R^2=0.40$, $p<0.05$).

El primer grupo de curvas de crecimiento (G1 en Figura. 5.) crece mejor entre los 15 y 20°C, a estas temperaturas el crecimiento es mayor que a los 4°C; a los 25°C el crecimiento es mayor que a 4°C, pero menor que el promedio de crecimiento entre los 15 y 20°C. El segundo grupo de crecimiento (G2 en Figura. 5) en general crece muy poco (en promedio menos de 10mm en todo el rango de temperaturas). Su crecimiento se da solo entre los 10 y 20°C, teniendo un máximo a los 15°C. Finalmente, el tercer grupo (G3 en Figura. 5.) en promedio creció por debajo de los 23mm en el periodo de 8 días, el máximo de crecimiento se da alrededor de los 15°C, entre 10 y 20°C crece más que a 25°C, pero a su vez el promedio de crecimiento a 25°C es mayor que el obtenido a 4°C.

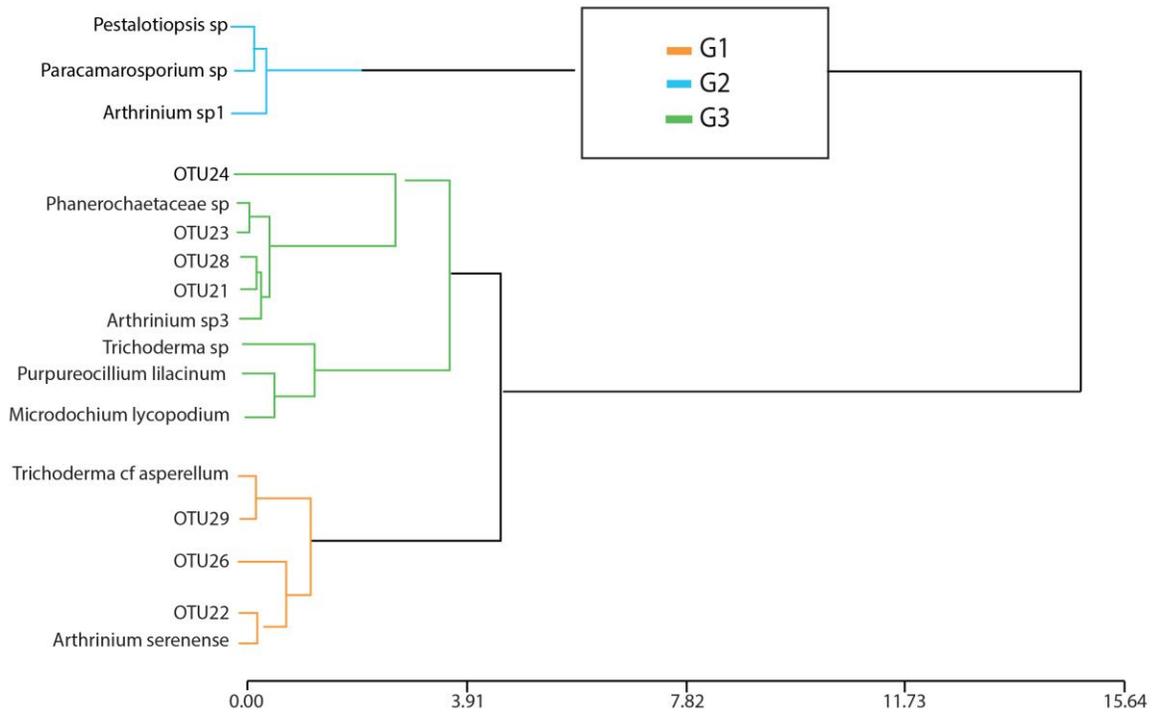


Figura 4. Grupos de curvas de crecimiento basados en ANOVA

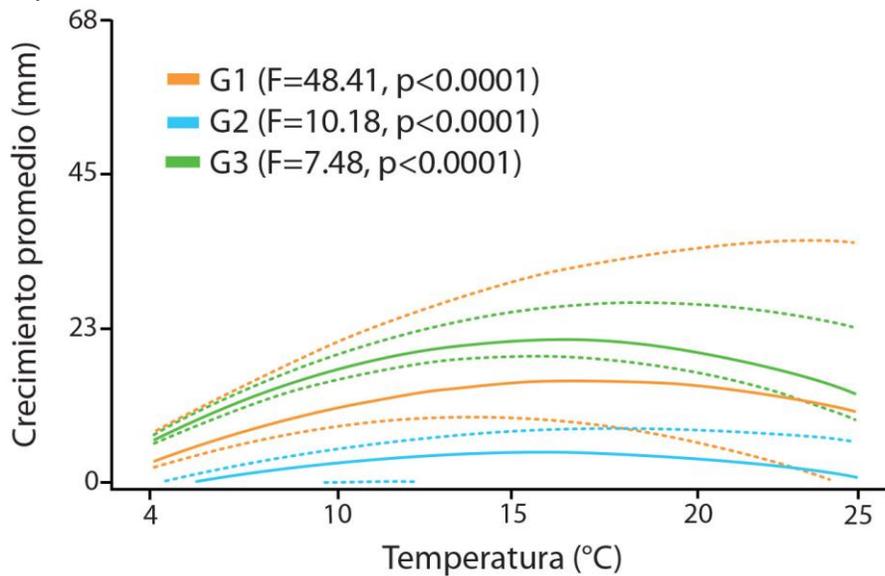


Figura 5. Crecimiento radial (mm) de los tres grupos de curvas de crecimiento basados en ANOVA

El comportamiento de crecimiento varió en el experimento de aumento de 5°C y cambios de temperatura entre el día y la noche ($R^2=0.497$, $p=.00494$). Siempre se observó algún crecimiento a través del tiempo durante los 10 ciclos en que fueron sometidos en ambos experimentos; sin embargo, en algunos casos este crecimiento fue muy débil (Figura. 6).

Finalmente, se ajustaron las curvas de crecimiento a cuatro temperaturas (4, 10, 20 y 25°C) para los tres grupos posteriores a ambos experimentos ($R^2=0.368$, $p>0.05$). Para las curvas posteriores al aumento de 5°C en la temperatura en el grupo uno, los crecimientos en general fueron menores y parecen mostrar que están más adaptados a crecer a temperaturas

mayores a 20°C. Para el grupo dos se observa cómo las curvas de crecimiento posterior al aumento de temperatura tienen una variabilidad muy grande y que, además, parece indicar que ahora crece mejor a temperaturas menores que antes del experimento. En el grupo tres, el comportamiento de la curva se mantiene, pero los promedios de crecimiento son menores (Figura. 7.).

Para el caso del experimento de cambio de temperatura entre el día y la noche, en los tres grupos las curvas muestran crecimientos principalmente entre los 10 y 20°C. Cabe recalcar que para el grupo dos la variabilidad es grande y mayor que en los otros grupos (Figura. 7).

Además, en el cuadro 1 en el anexo 2 se puede observar el comportamiento por separado de cada uno de los UTO. En dicho cuadro se observan UTO como *Arthirinium serenense* (del grupo 1) que no soportaron ningún experimento y murieron. *Paracamosporium* sp., también del grupo 1, no soportó el experimento de aumento de 5°C, pero sí sobrevivió al cambio de temperatura entre el día y la noche. *Microdochium lycopodium* (grupo 2) mantuvo su comportamiento de crecimiento, pero disminuyó su crecimiento radial promedio. Por último, casos como el de *Trichoderma cf. asperellum* (grupo 3) que posterior al experimento de aumento de temperatura modificó su comportamiento e inclusive dejó de ser psicrófilico.

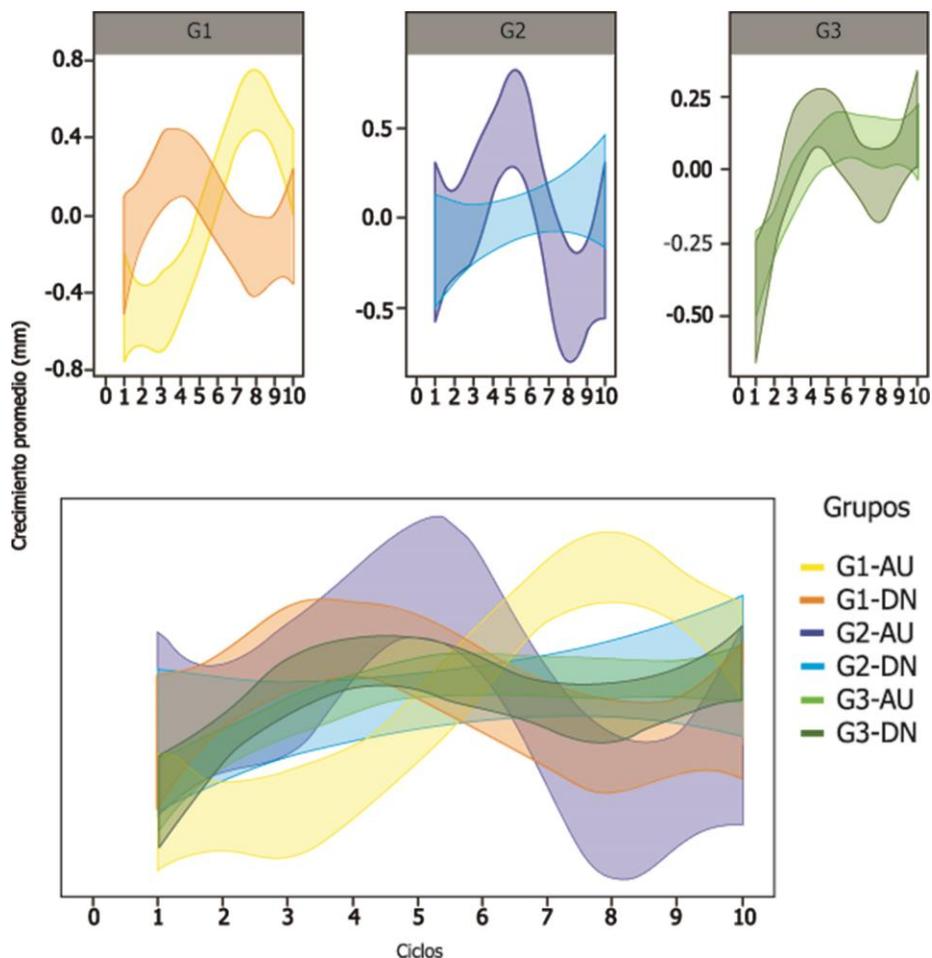


Figura. 6. Curvas de crecimiento de los grupos de hongos psicrófilicos durante los experimentos de aumento de temperatura y cambio de temperatura entre el día y la noche. AU: aumento de 5°C y DN: cambios entre el día (20°C) y la noche (10°C)

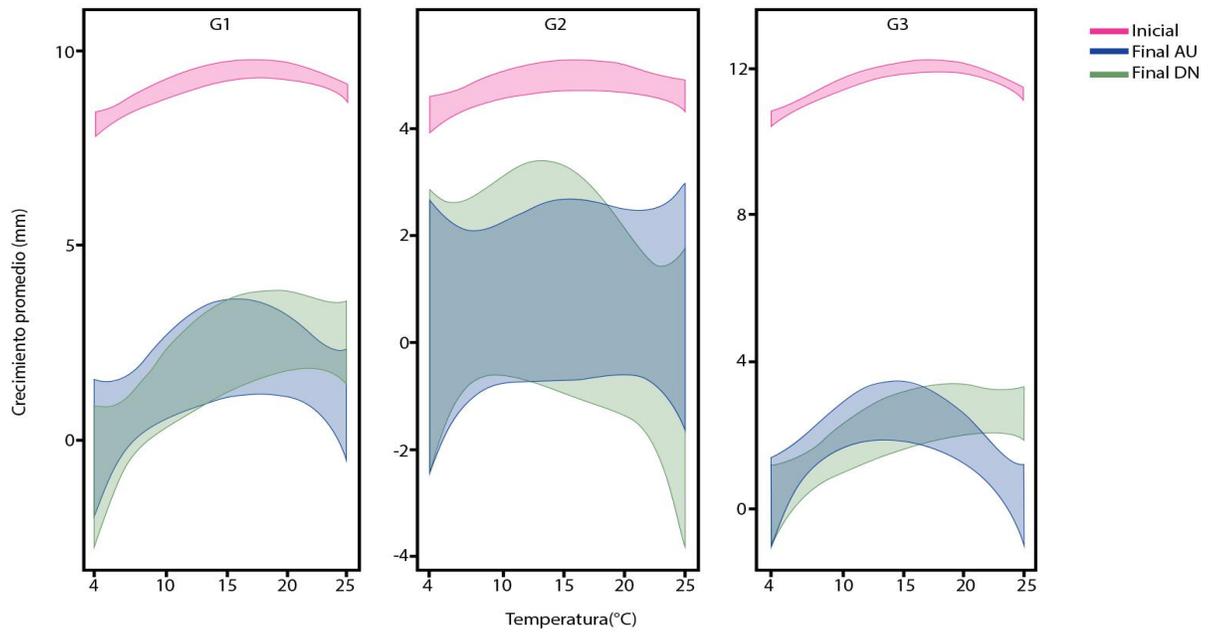


Figura. 7. Comparación de curvas iniciales y posteriores a cada experimento.

DISCUSIÓN

Se demuestra en este estudio que la mayoría de hongos psicrófilos aislados de *Chusquea subtessellata* en el páramo de Costa Rica, tienen capacidad de adaptación a aumentos o cambios en periodos cortos de temperaturas; con excepción de *Arthrinium serenense*. Por otro lado, otros como *Trichoderma cf. asperellum* que en un periodo tan corto es capaz de aclimatarse a las nuevas condiciones de temperatura.

Durante los ciclos de ambos experimentos (Figura. 6), los hongos tuvieron distintos comportamientos en donde intentaban adaptarse a crecer en su nuevo ambiente. La figura 7 muestra cómo posterior a estos cambios, los grupos modificaron sus curvas de crecimiento, donde se observa que se están aclimatando a crecer a temperaturas mayores que su temperatura óptima de crecimiento previa al estudio, esto en el caso de las curvas posteriores al aumento de temperatura.

Sin embargo, en las curvas finales posterior al experimento de cambios de temperatura en periodos cortos, los grupos están creciendo principalmente entre 10 y 20°C. Lo anterior, según Arthur y Watson (1976), puede ser debido a que existe una correlación directa entre la temperatura de crecimiento y el grado de saturación de lípidos en la membrana; más recientemente, Crowther y Bradford (2011) mencionan que la eficiencia del crecimiento a distintas temperaturas se debe a compensaciones evolutivas en la estructura de las enzimas y membranas celulares asociadas con la adaptación bioquímica a la temperatura.

Parmesan (2006) indica que el poco conocimiento que existe respecto a la adaptación de los organismos al calentamiento global, se debe a que la mayoría de estudios se han dado en adaptaciones con animales, y muy pocos con plantas u hongos. Para al menos siete UTO en este estudio, se encontró literatura que las describe como psicrófilas o que al menos han crecido a temperaturas menores de 20°C, pero ningún estudio ha investigado la capacidad de estas especies de tolerar temperaturas diferentes a su óptima de crecimiento como se hace en esta investigación, por ejemplo, *Arthrinium* sp. (Sienna *et al.* 2009), *Microdochium lycopodium* y al menos otras especies del mismo género (Rosa *et al.* 2010, Wang *et al.* 2015), *Purpureocillium* (Santiago *et al.* 2016), y *Trichoderma* (Harman *et al.* 2004, Hassan *et al.* 2016).

Estudios anteriores han demostrado que existe una alta especificidad de los endófitos de temperaturas extremas con su hospedero (Singh *et al.* 2006, Rosa *et al.* 2009, Redman *et al.* 2002, Santiago *et al.* 2016, Dq *et al.* 2016); pero muy poco se conoce de sus curvas de crecimiento a distintas temperaturas. La variabilidad de respuesta de las curvas de crecimiento de los tres grupos aquí estudiados se podría explicar debido a la variedad taxonómica que se encuentra en cada uno, especialmente en el grupo 2 (Figura. 5). Sin embargo, en estudios como el de Crowther y Bradford (2011) y Leung *et al.* (2011) se observa cómo una misma especie puede variar su crecimiento promedio considerablemente, sin tener claro por qué ocurre de esa manera. Además, Redman *et al.* (2002) mencionan que todas las plantas en un ecosistema natural están en simbiosis con hongos y en su estudio el hongo no crece sin la planta y la planta a altas temperaturas solo sobrevive en presencia del hongo.

Por otra parte, observaciones de Robinson (2001) muestran cambios en los ciclos de los hongos en zonas muy frías, y que por eso solo esporulan en verano y otoño. Kivlin (2013) indica que los hongos simbiotes alteran las respuestas de la planta ante cambio climático como sequía, deposición de N, y calentamiento.

Por último, Miles *et al.* (2012) estudia el potencial de biocontrol que tienen especies endófitas aisladas de plantas del páramo colombiano. En este estudio, la comparación de las curvas iniciales con las finales muestra que los hongos intentaban adaptarse a las nuevas condiciones de temperatura a las que fueron expuestos, sin embargo, a ninguna temperatura alcanzaron los mismos promedios de crecimiento previos al experimento.

Estudios demuestran que cambios en uno o dos grados de temperatura, pueden afectar negativamente las especies que están adaptadas a vivir solo en esos ecosistemas (Buytaert *et al.* 2011), pero con este estudio se está comprobando que en periodos cortos algunas especies de hongos pueden iniciar a adaptarse. Si estos endófitos pueden colaborar con la adaptación de las plantas, también quizás el desplazamiento del páramo como ecosistema puede de alguna manera detenerse o disminuir su velocidad. Jiménez (2009) en sus modelajes predecía que para el 2020 el páramo como ecosistema en Costa Rica estaría sustituido o sufriendo una transición total a bosque pluvial montano, pero tomando en cuenta que tres años antes aún se cuenta con el mismo, evidencia que el ecosistema completo ha venido adaptándose al cambio.

Ahora, es necesario continuar con estudios que permitan determinar si la adaptación o no adaptación a cambios en la temperatura, como se espera ocurra con los efectos del cambio climático, por parte de estos hongos puede generar algún impacto en el ecosistema. Los páramos, sus plantas, hongos y demás organismos pueden llegar a verse afectados por el calentamiento global (Hofstede *et al.* 2014). Por lo tanto, que existan organismos en simbiosis (planta-hongo) que puedan adaptarse en conjunto para enfrentar los impactos del calentamiento global, puede resultar en excelentes estrategias para la conservación de la biodiversidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Arthur, H; Watson, K. 1976. Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts. *Journal of Bacteriology* 128(1): 56-68.
- Avalos, G; Soto, A; Alfaro, W. 2012. Effect of artificial feeders on pollen loads of the hummingbirds of Cerro de La Muerte, Costa Rica. *International Journal of Tropical Biology and Conservation* 60(1).
- Buytaert, W; Cuesta-Camacho, F; Tobón, C. 2011. Potential impacts of climate change on the environmental services of humid tropical alpine regions (En an increase in temperature will accelerate microbial and fungal activity, resulting in faster decomposition.). *Global Ecology and Biogeography* 20(1): 19-33.
- Cabezas, L; Calderon, C; Medina, LM; Bahamon, I; Cardenas, M; Bernal, AJ; González, A; Restrepo, S. 2012. Characterization of cellulases of fungal endophytes isolated from *Espeletia* spp. *Journal of Microbiology* 50(6): 1009-1013.
- Callaghan, TV; Björn, LO; Chernov, Y; Chapin, T; Torben, R; Huntley, B; Ims, R a; Johansson, M; Jolly, D; Jonasson, S; Matveyeva, N; Panikov, N; Oechel, W; Shaver, G; Elster, J; Ingibjörg, S; Laine, K; Taulavuori, K; Taulavuori, E; Zöckler, C; Bjorn, LO; Christensen, TR. 2014. Climate Change and UV-B Impacts on Arctic Tundra and Polar Desert Ecosystems Responses and at to Projected the Species Changes Level in Climate. *Ambio* 33: 418-435.
- Chaverri, P; Huhndorf, SM; Rogers, JD. 2011. Microhongos comunes de Costa Rica y otras regiones tropicales: ascomycota, pezizomycotina, sordariomycetes. Heredia, Costa Rica, INBIO. 241p.
- Chaverri, P; Samuels, GJ. 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores. *Studies in Mycology* 2003(48): 1-113.
- Crous, PW; Groenewald, JZ. 2013. A phylogenetic re-evaluation of *Arthrinium*. *IMA Fungus* 4(1): 133-154.
- Crowther, TW; Bradford, M a. 2013. Thermal acclimation in widespread heterotrophic soil microbes. *Ecology Letters* 16(4): 469-477.
- Dq, D; Hb, J; Lz, T; Dj, B. 2016. Two new species of *Arthrinium* (Apiosporaceae, Xylariales) associated with bamboo from Yunnan, China. 7 (December): 1332-1345.
- Gamboa-Gaitán, M. 2006. Hongos Endófitos Tropicales: Conocimiento actual y perspectivas. *Acta Biológica Colombiana* 11(1): 3–20.
- Gao, L; Liu, X. 2010. Nutritional requirements of mycelial growth and sporulation of several biocontrol fungi in submerged and on solid culture. *Mikrobiologiya* 79(5): 622-629.
- Harman, GE; Howell, CR; Viterbo, A; Chet, I; Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species--opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews. Microbiology* 2(1): 43-56.

- Hassan, N; Rafiq, M; Hayat, M; Shah, AA; Hasan, F. 2016. Psychrophilic and psychrotrophic fungi: a comprehensive review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 15(2): 147-172.
- Hernández-Restrepo, M; Groenewald, JZ; Crous, PW. 2016. Taxonomic and phylogenetic re-evaluation of *Microdochium*, *Monographella*; and *Idriella*; *Persoonia* - *Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 36(1): 57-82.
- Hofstede, R; Calles, J; López, V; Polanco, R; Torres, F; Ulloa, J; Vásquez, A; Cerra, M. 2014. Quito, Ecuador, Los páramos andinos ¿Qué sabemos? Estado de conocimiento sobre el impacto del cambio climático en el ecosistema páramo (2014, Quito, Ecuador). 2014. Ed.
- IPCC (Panel Intergubernamental de Cambio Climático). 2010. Informe especial: escenarios de emisiones (en línea). Consultado 18 nov. 2015. Disponible en <http://www.grida.no/climate/ipcc/spmpdf/sres-s.pdf>
- Jiménez, M. 2009. Resiliencia de los ecosistemas naturales terrestres de Costa Rica al cambio climático. Tesis de maestría. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 155 p.
- Kivlin, SN; Emery, SM; Rudgers, JA. 2013. Fungal symbionts alter plant responses to global change. *American Journal of Botany* 100(7): 1445-1457.
- Leung, G; Robson, GD; Robinson, CH. 2011. Characterisation of cold-tolerant fungi from a decomposing High Arctic moss. *Soil Biology and Biochemistry* 43(9): 1975-1979.
- Lopera, C; Avila, L; Rojas, A; Franco-Molano, AE; Cepero, MC; Restrepo, S. 2008. Fungal endophytes from the Colombian Andean Paramo ecosystem inhibit the growth of plant pathogens in vitro. *Phytopathology* 98(6): S94.
- Miles, LA; Lopera, C; González, S; de García, MCC; Franco, AE; Restrepo, S. 2012. Exploring the biocontrol potential of fungal endophytes from an Andean Colombian Paramo ecosystem. *BioControl* 57(5): 697-710.
- Mueller, GM; Schmit, JP; Hubendorf, SM; Ryvarden, L; O'Dell, T; Lodge, DJ; Leacock, P, Mata, M; Umaña, L; Wu, Q; Czederpiltz, DL. 2004. Recommended protocols for sampling macrofungi. En: Mueller, GM; Bills, GF; Foster, MS (eds.). *Biodiversity of Fungi. Inventory and monitoring methods*. London, U.K., Elsevier Academic.
- Parmesan, C. 2006. Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annual Review of Ecology and Systematics* 37(1): 637-669.
- Redman, RS; Sheehan, KB; Stout, RG; Rodriguez, RJ; Henson, JM. 2002. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science (New York, N.Y.)* 298(5598): 1581.
- Robinson, CH. 2001. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. 151(2): 341-353.
- Rosa, LH; Almeida Vieira, MDL; Santiago, IF; Rosa, CA. 2010. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) in Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology* 73(1): 178-189.
- Rosa, LH; Vaz, ABM; Caligiorne, RB; Campolina, S; Rosa, CA. 2009. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). *Polar Biology* 32(2): 161-167.

- Santiago, IF; Rosa, CA; Rosa, LH. 2016. Endophytic symbiont yeasts associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis*. Polar Biology no.2010: 1-7.
- Sienna, OF. 2009. Book of Abstracts and Contributed Papers
- Singh, S; Puja, G; Bhat, D. 2006. Psychrophilic fungi from Schirmacher Oasis, East Antarctica. CURRENT SCIENCE-BANGALORE- 2006.
- Wang, M; Jiang, X; Wu, W; Hao, Y; Su, Y; Cai, L; Xiang, M; Liu, X. 2015. Psychrophilic fungi from the world ' s roof. Persoonia 2015: 100-112.
- Wood, S. N. (2001). mgcv: GAMs and generalized ridge regression for R. R news, 1(2), 20-25.
- Zhang, N; Castlebury, LA; Miller, AN; Huhndorf, SM; Schoch, CL; Seifert, KA; Rossmann, AY; Rogers, JD; Kohlmeyer, J; Volkmann-Kohlmeyer, B; Sung, G-H. 2006. An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. Mycologia 98(6): 1076-87.
- Zhang, W; Parker, KM; Luo, Y; Wan, S; Wallace, LL; Hu, S. 2005. Soil microbial responses to experimental warming and clipping in a tallgrass prairie. Global Change Biology 11:266-277.

ANEXO 1

CUADRO 1

Detalle de las UTO de endófitos psicrofílicos presentes en las muestras obtenidas de los cerros Chirripó y Buena Vista.

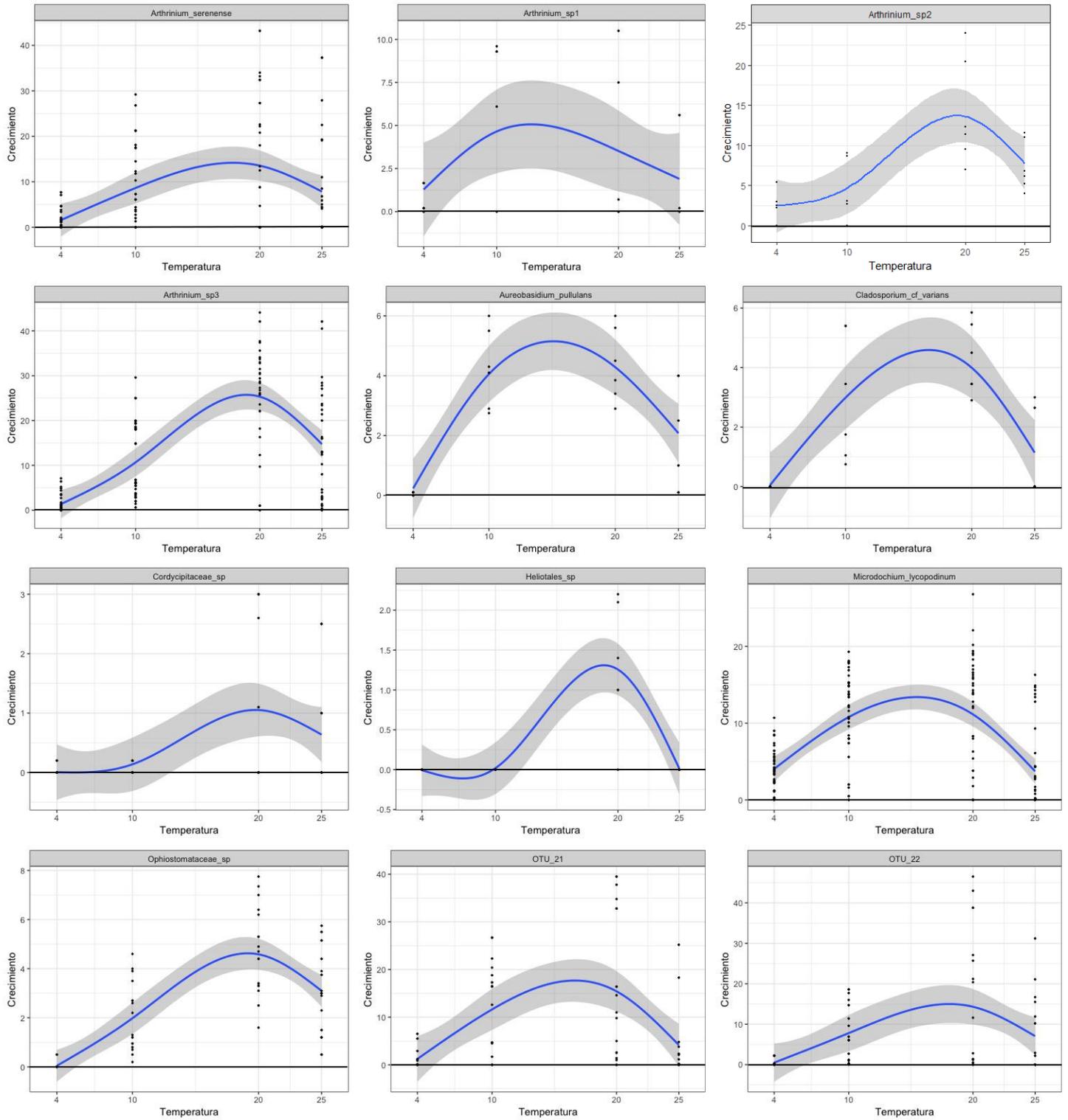
UTO	Sitio	Altitud	Parte vegetal	Morfotipo
<i>Arthrinium_serenense</i>	Buena Vista	3400	Tallo	BV-27
	Chirripó	3500	Tallo	CH-49
			Hoja	CH-56
				CH-56
				CH-80
CH-81				
<i>Arthrinium_sp1</i>	Chirripó	3700	Hoja	CH-113
<i>Arthrinium_sp2</i>	Chirripó	3600	Raiz	CH-104
<i>Arthrinium_sp3</i>	Buena Vista	3300	Tallo	BV-08
	Chirripó	3300	Hoja	CH-04
		3400	Hoja	CH-15
			Raiz	CH-16
		3600	Raiz	CH-97
3700	Hoja	CH-112		
<i>Aureobasidium_pullulans</i>	Chirripó	3400	Tallo	CH-31
<i>Cladosporium_cf_varians</i>	Chirripó	3400	Hoja	CH-35
<i>Cordycipitaceae_sp</i>	Chirripó	3700	Hoja	CH-118
				CH-119
<i>Heliotales_sp</i>	Chirripó	3600	Raiz	CH-96
<i>Microdochium_lycopodium</i>	Buena Vista	3400	Raiz	BV-38
	Chirripó	3600	Raiz	CH-100
		3500	Raiz	CH-57
				CH-58
		3700	Tallo	CH-109
Raiz	CH-110			
<i>Ophiostomataceae_sp</i>	Chirripó	3400	Raiz	CH-21
				CH-22
				CH-24
<i>OTU_21</i>	Buena Vista	3400	Hoja	BV-31
				BV-32
				BV-33

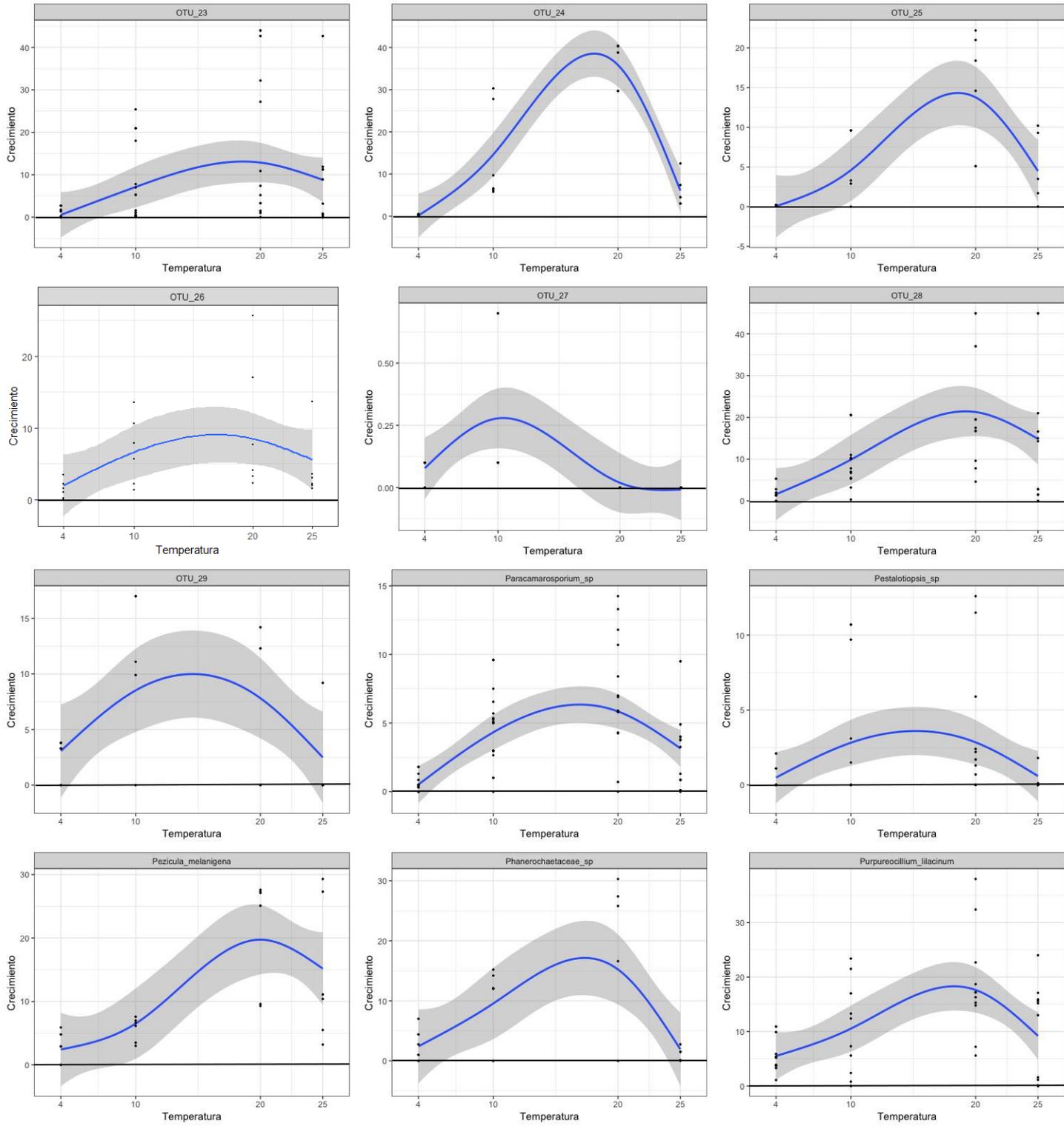
<i>OTU_22</i>	Buena Vista	3500	Tallo	BV-43
				BV-44
				BV-46
<i>OTU_23</i>	Buena Vista	3500	Hoja	BV-47
				BV-53
	Chirripó	3500	Hoja	CH-77
<i>OTU_24</i>	Buena Vista	3500	Raiz	BV-58
<i>OTU_25</i>	Chirripó	3300	Hoja	CH-03
<i>OTU_26</i>	Chirripó	3400	Tallo	CH-30
<i>OTU_27</i>	Chirripó	3700	Hoja	CH-114
<i>OTU_29</i>	Chirripó	3800	Raiz	CH-155
<i>OTU_28</i>	Chirripó	3800	Tallo	CH-144
				CH-145
<i>Paracamarosporium_sp</i>	Chirripó	3400	Raiz	CH-36
		3800	Raiz	CH-37
<i>Pestalotiopsis_sp</i>	Buena Vista	3300	Hoja	BV-12
	Chirripó	3700	Hoja	CH-116
<i>Pezicula_melanigena</i>	Chirripó	3400	Raiz	CH-25
<i>Phanerochaetaceae_sp</i>	Buena Vista	3300	Tallo	BV-07
<i>Purpureocillium_lilacinum</i>	Chirripó	3500	Tallo	CH-44
			Raiz	CH-61
<i>Sterigmatomyces_halophilus</i>	Buena Vista	3400	Raiz	BV-37
<i>Trichoderma_cf_asperellum</i>	Chirripó	3400	Raiz	CH-38
<i>Trichoderma_sp</i>	Buena Vista	3500	Raiz	BV-61
<i>Trichoderma_viridescens</i>	Chirripó	3600	Raiz	CH-92
<i>Xylariaceae_sp</i>	Chirripó	3500	Hoja	CH-78

CUADRO 2

Valores de vectores propios del NMS

UTO	Eje 1	Eje 2
<i>Arthrinium.serenense</i>	-0.10	-0.58
<i>Arthrinium.sp1</i>	-0.26	0.19
<i>Arthrinium.sp3</i>	-0.57	0.76
<i>Aureobasidium.pullulans</i>	0.02	-0.13
<i>Cladosporium.cf.varians</i>	-0.31	0.31
<i>Cordycipitaceae.sp</i>	-0.26	0.19
<i>Heliales.sp</i>	0.23	0.26
<i>Microdochium.lycopodium</i>	0.72	0.35
<i>Paracamarosporium.sp</i>	-0.21	0.16
<i>Pestalotiopsis.sp</i>	-0.26	0.16
<i>Pezicula.melanigena</i>	-0.23	0.23
<i>Phanerochaetaceae.sp</i>	0.16	-0.05
<i>Purpureocillium.lilacinum</i>	0.33	-0.16
<i>Ophiostomataceae.sp</i>	-0.23	0.23





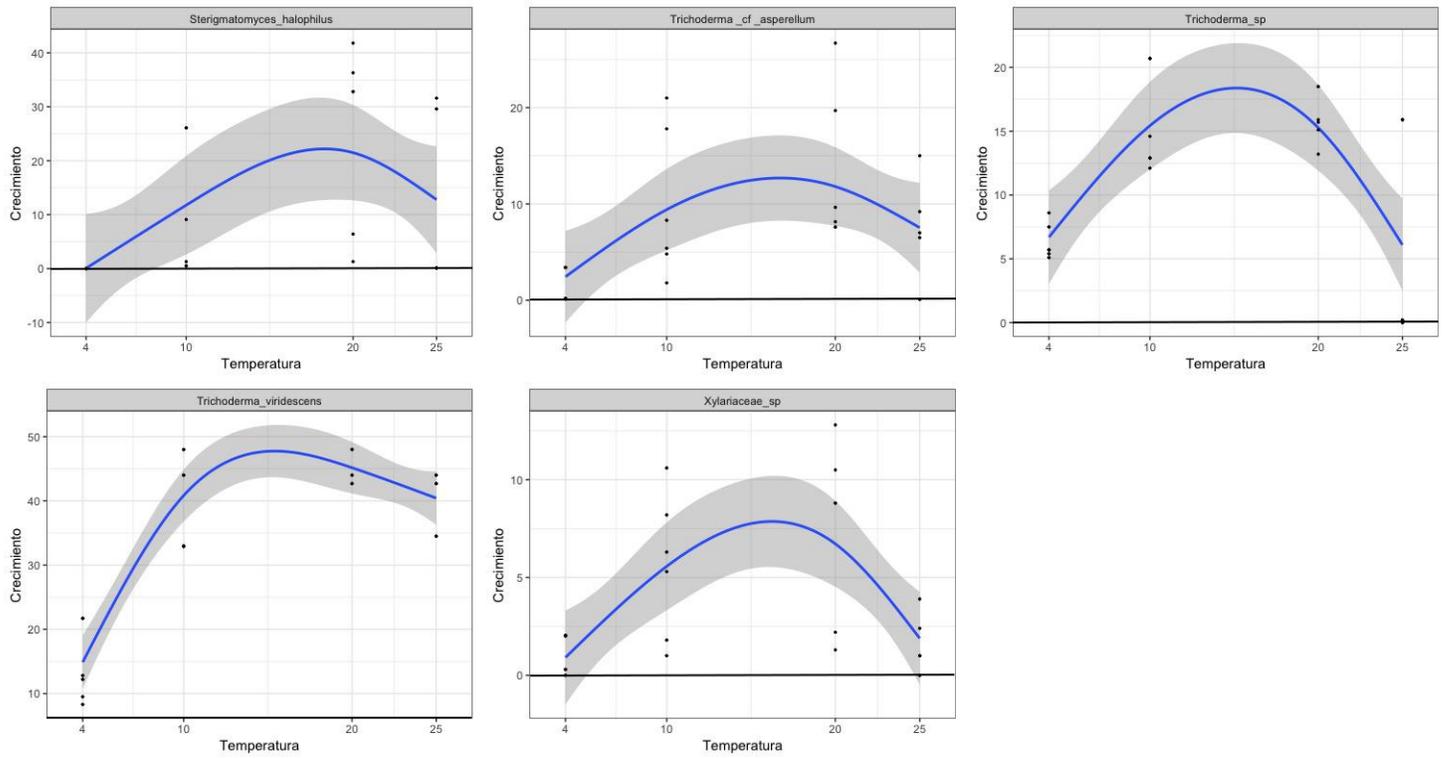
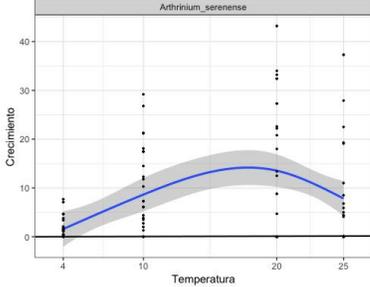
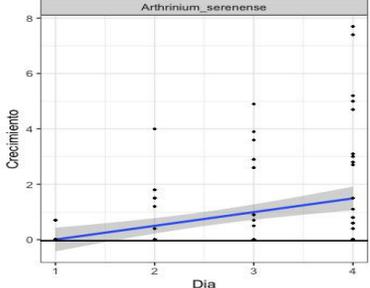
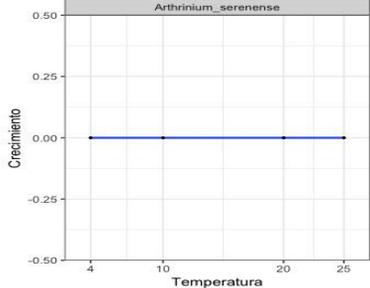
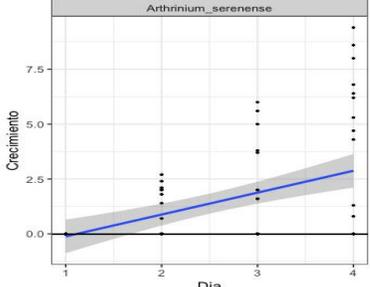
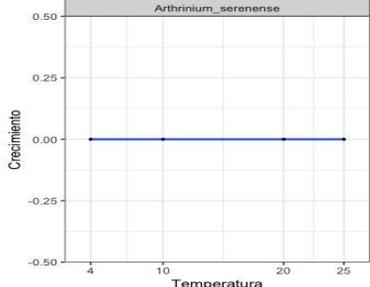
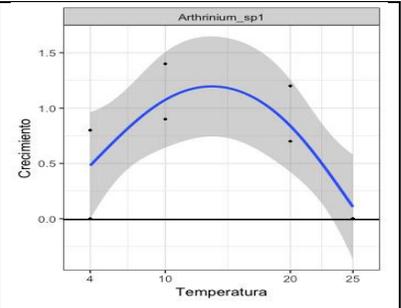
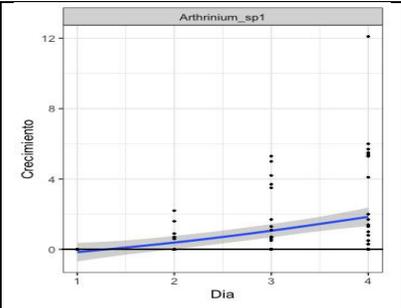
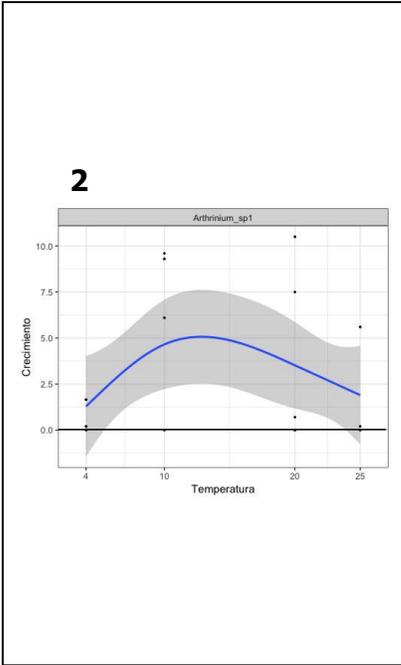


Figura. 1. Crecimiento radial (mm) de los 29 UTO psicrófilicos a cuatro diferentes temperaturas (°C) previo al experimento

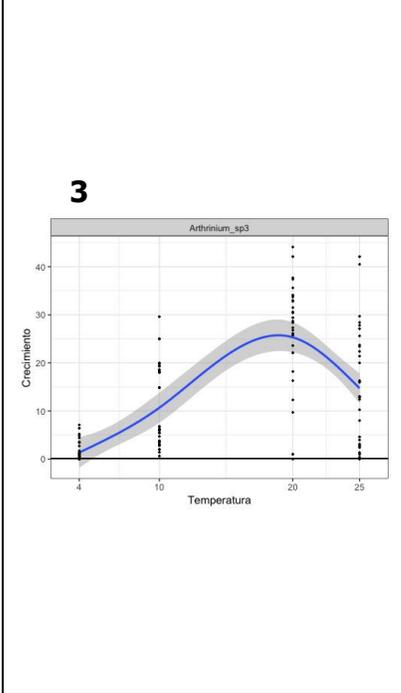
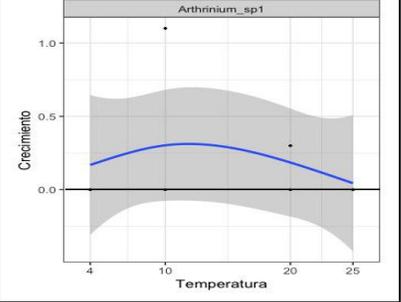
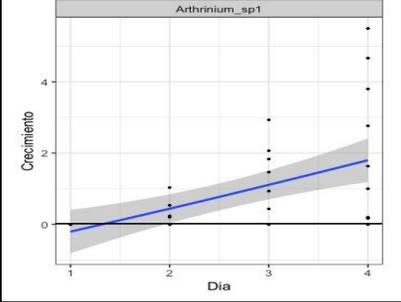
CUADRO 3

Curvas de crecimiento iniciales, curvas de crecimiento diario durante el experimento de aumento de 5°C, cambios de temperatura entre el día y la noche y curvas finales de crecimiento. Todos los crecimientos medidos en milímetros.

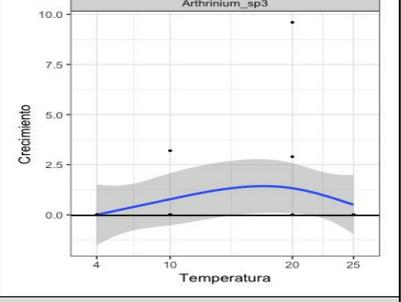
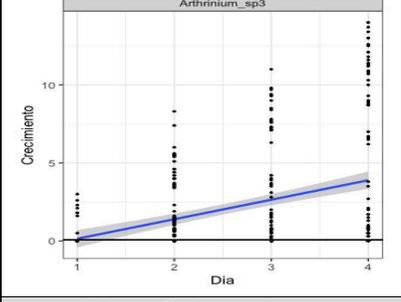
Curva inicial	Experimento	Curva final
<p>1</p> 	<p>Aumento de 5°C</p>  	
	<p>Cambio Día/Noche</p>  	
Aumento de 5°C		



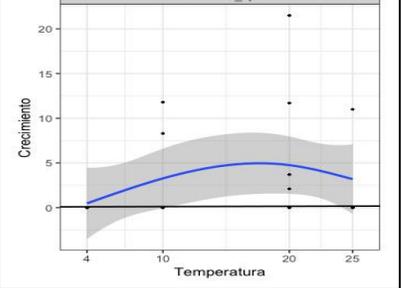
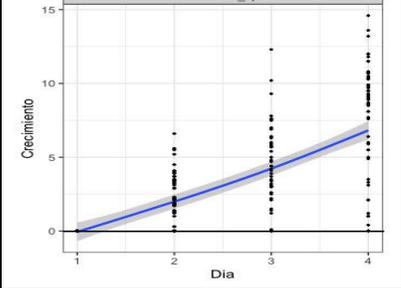
Cambio Día/Noche



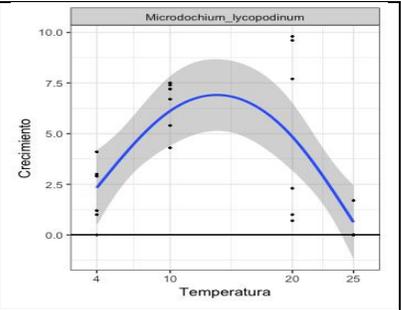
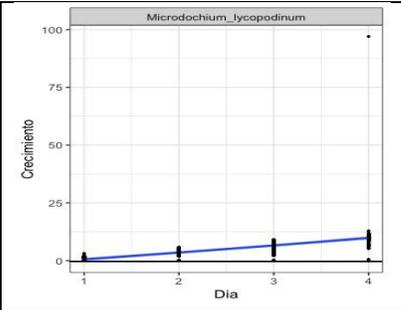
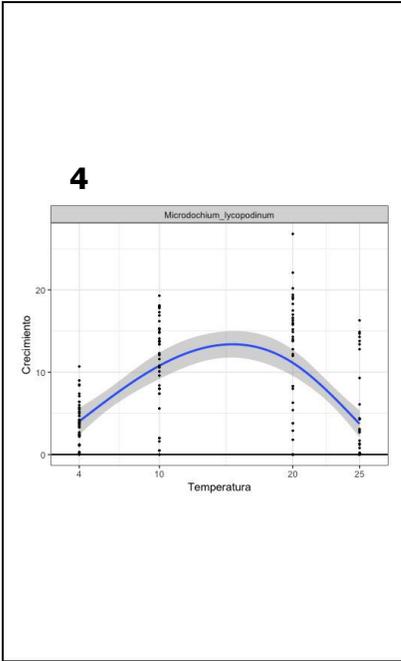
Aumento de 5°C



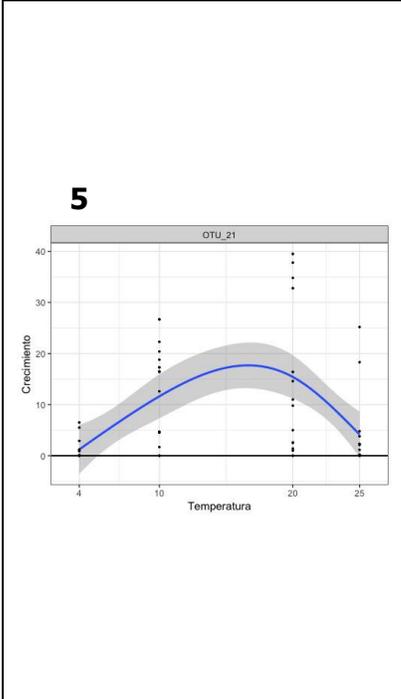
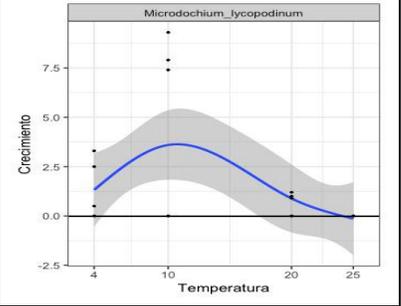
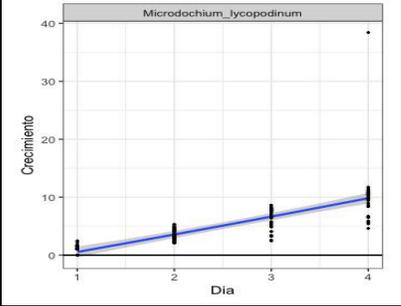
Cambio Día/Noche



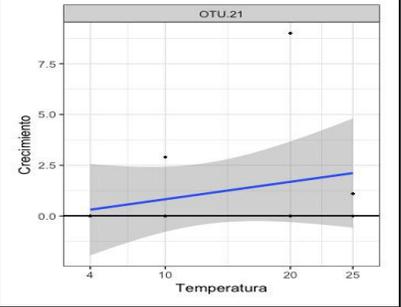
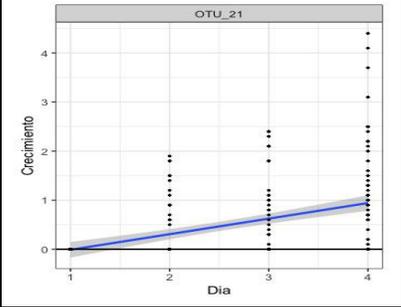
Aumento de 5°C



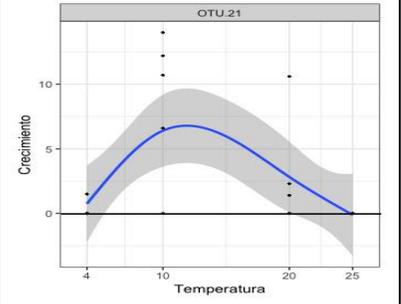
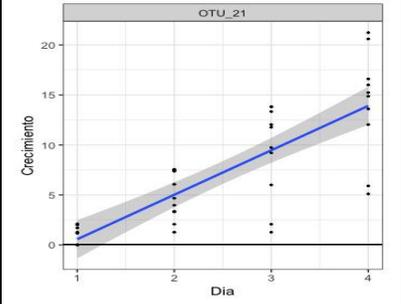
Cambio Día/Noche



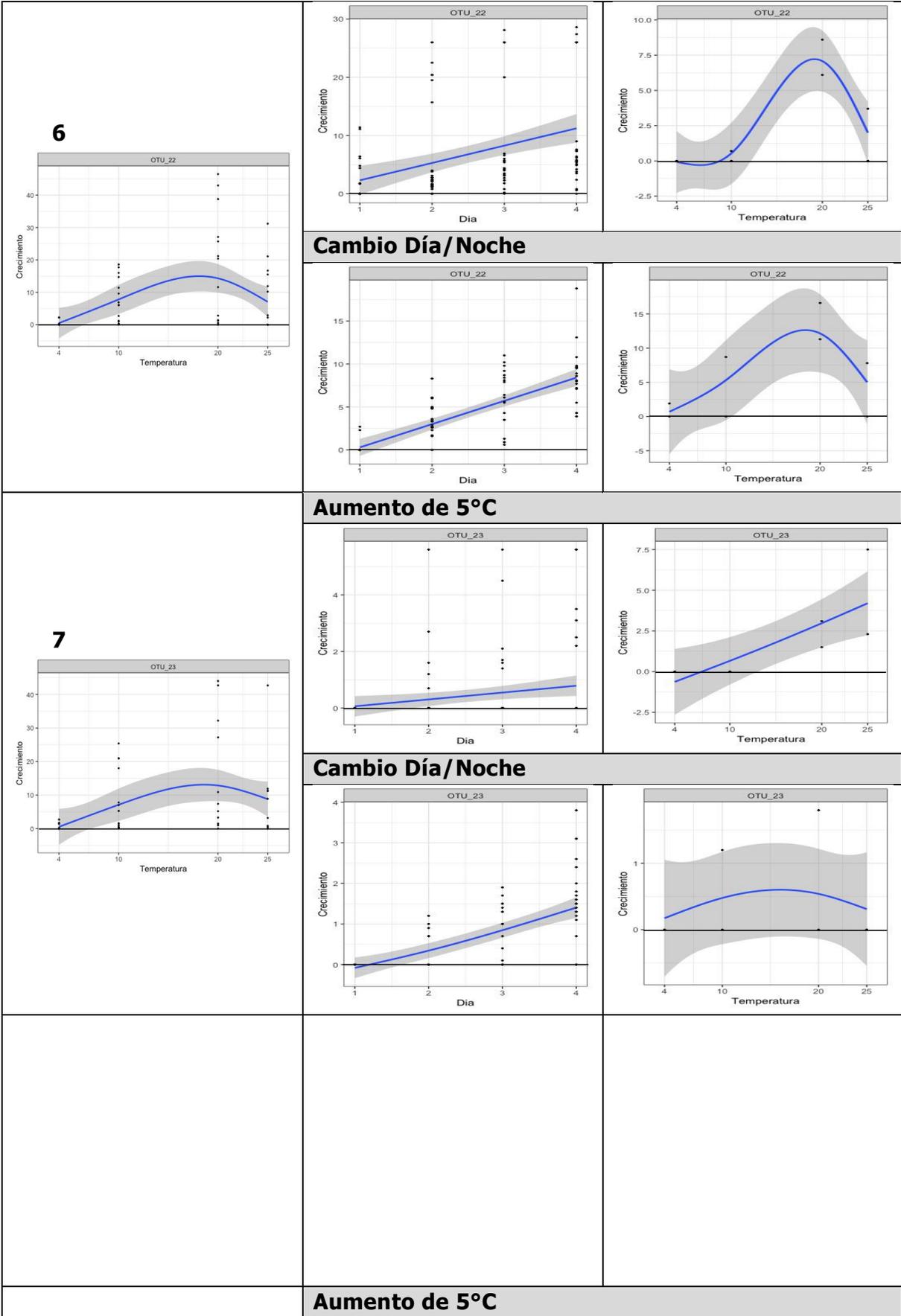
Aumento de 5°C

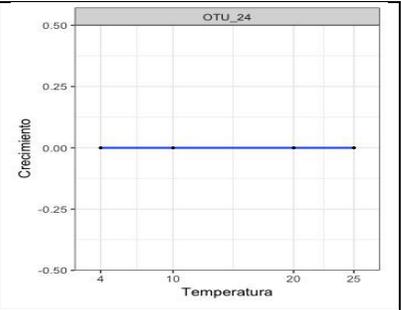
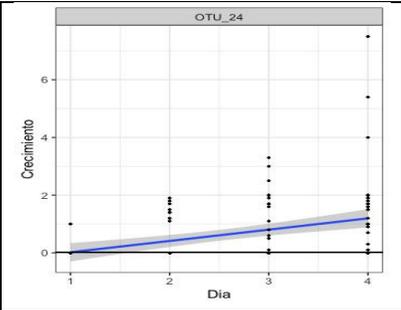
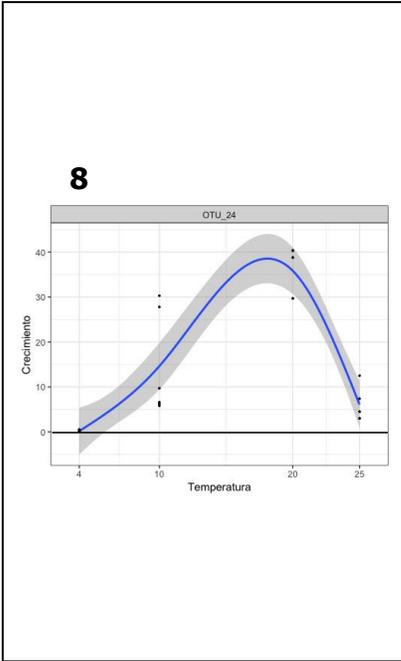


Cambio Día/Noche

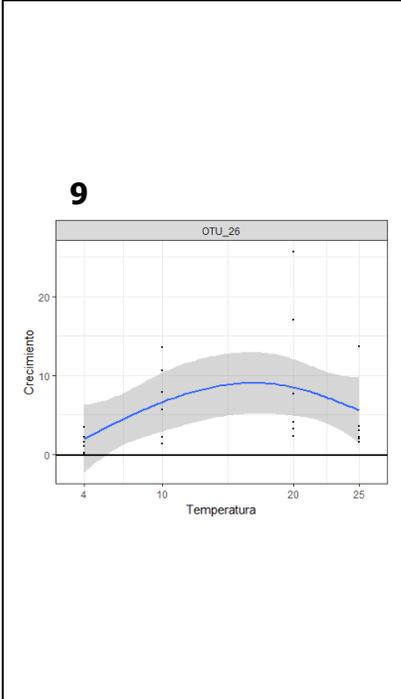
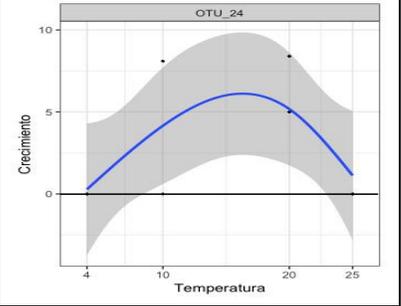
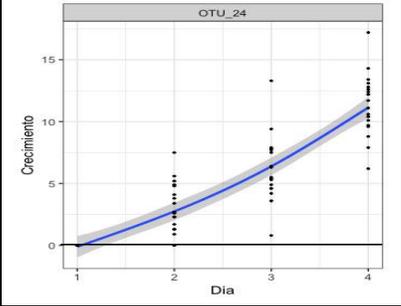


Aumento de 5°C

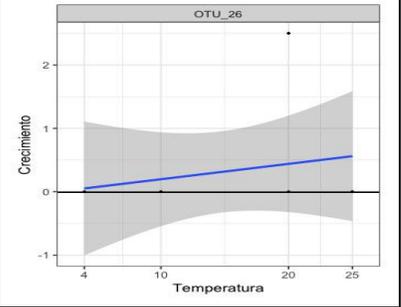
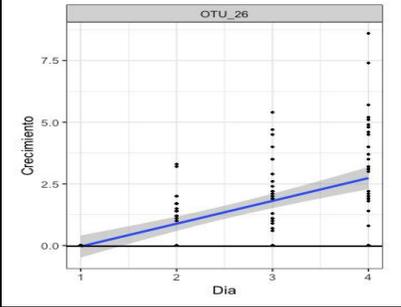




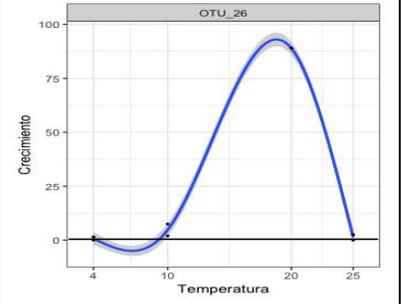
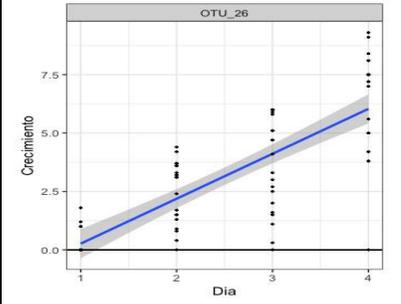
Cambio Día/Noche



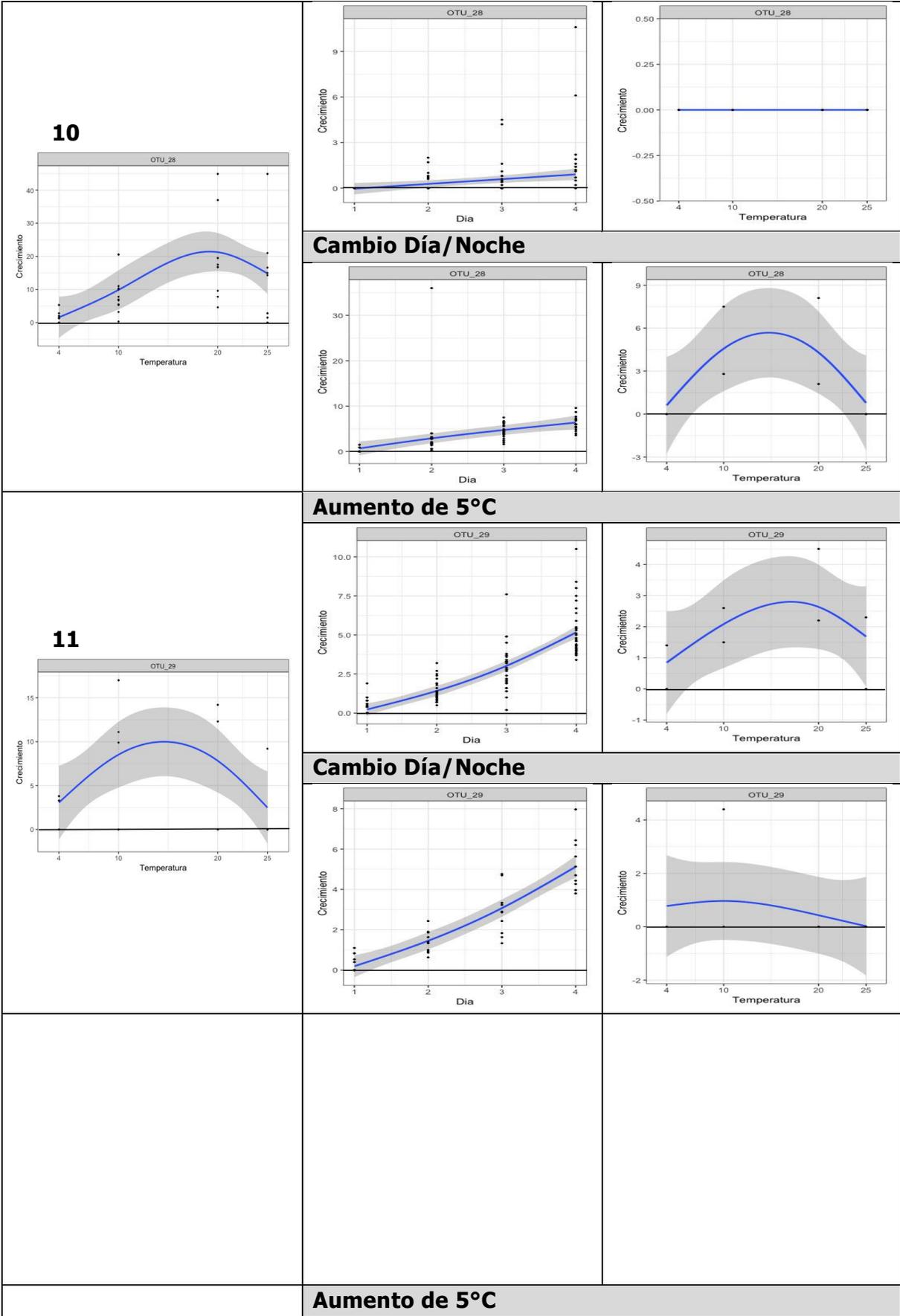
Aumento de 5°C

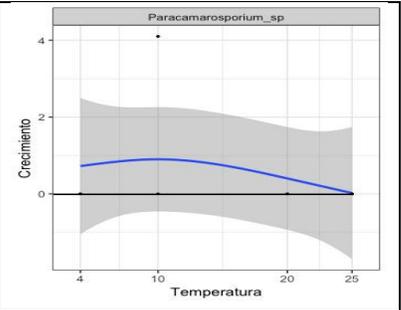
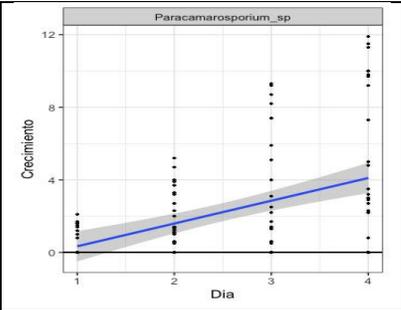
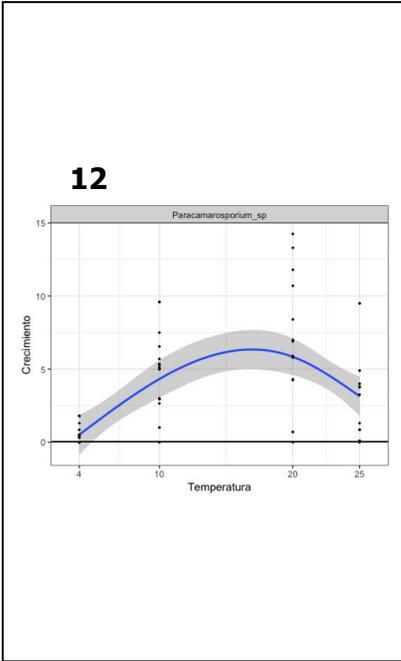


Cambio Día/Noche

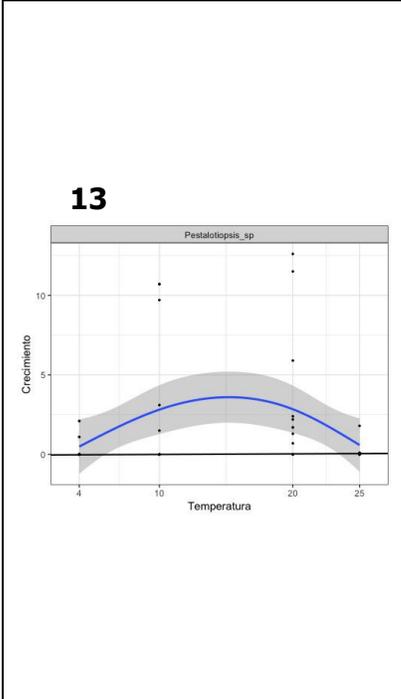
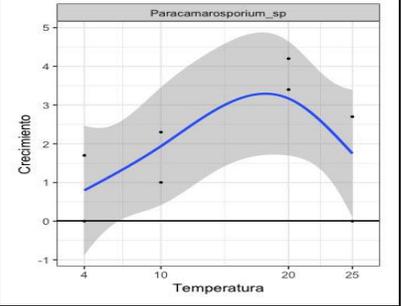
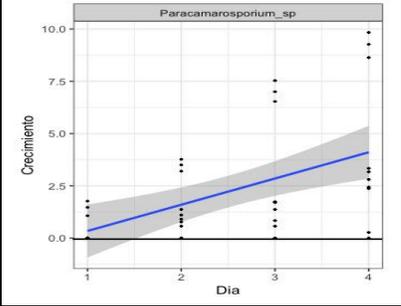


Aumento de 5°C

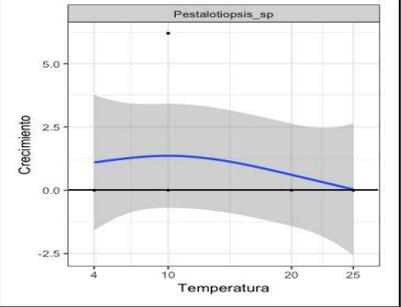
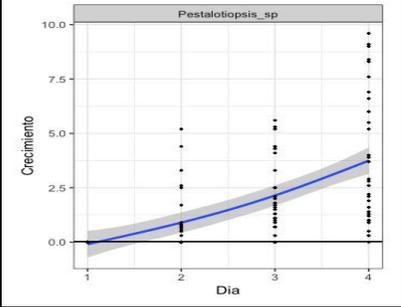




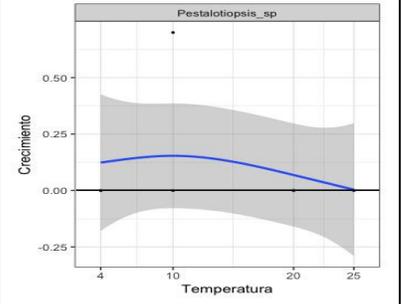
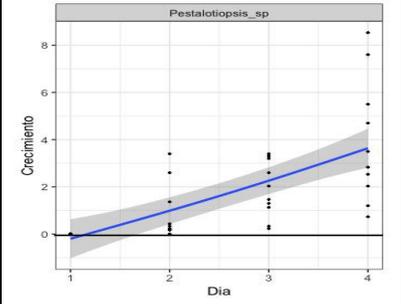
Cambio Día/Noche



Aumento de 5°C

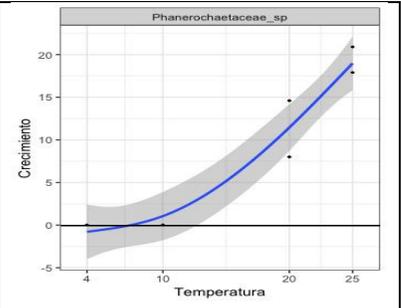
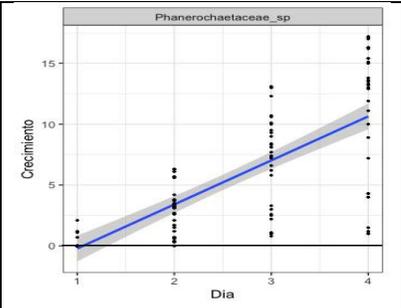
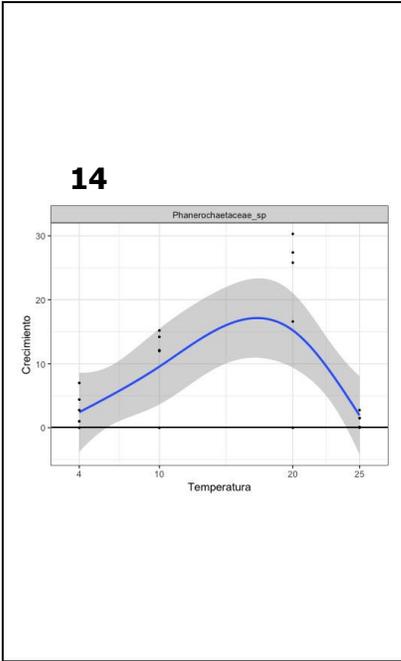


Cambio Día/Noche

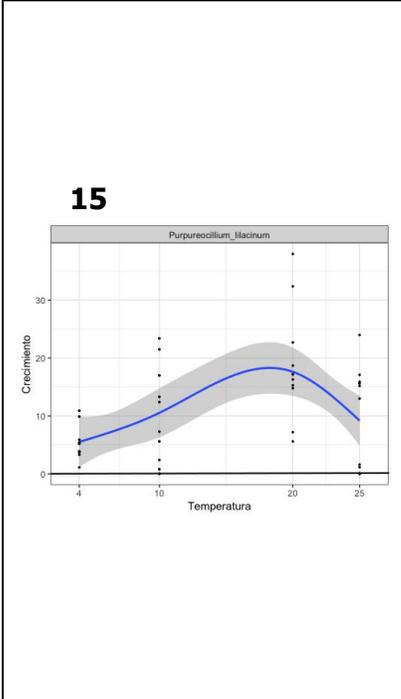
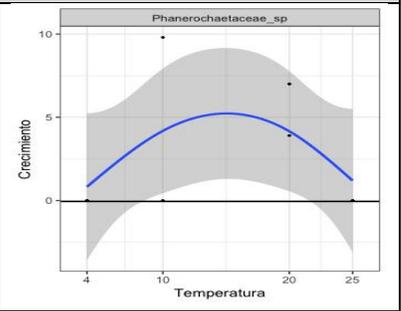
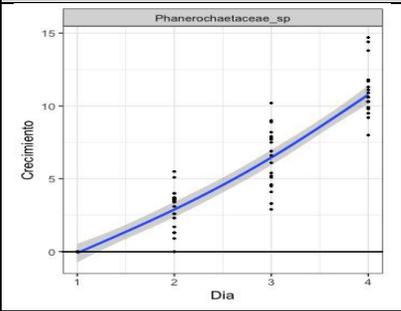


Aumento de 5°C

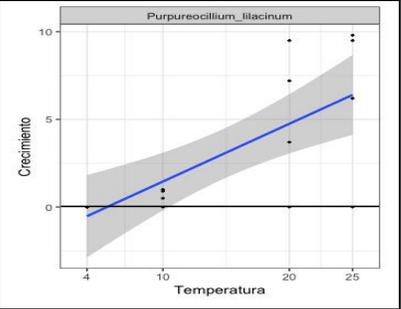
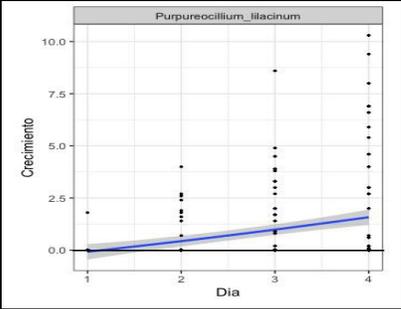
Aumento de 5°C



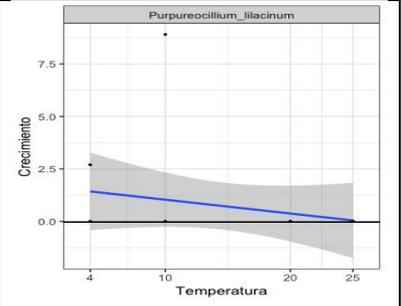
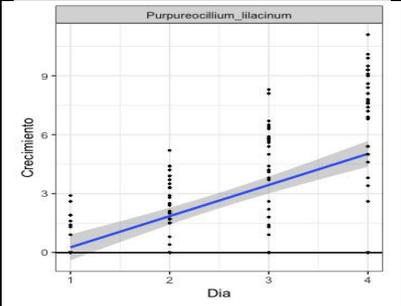
Cambio Día/Noche



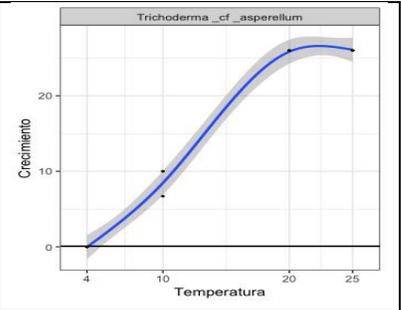
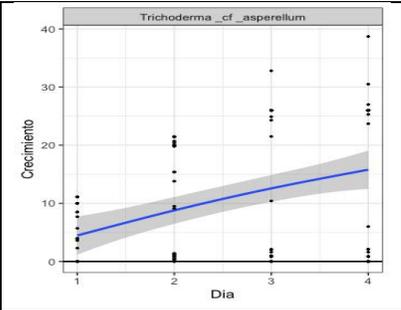
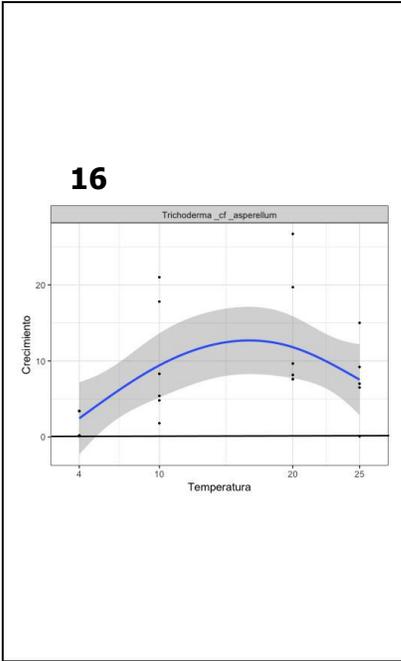
Aumento de 5°C



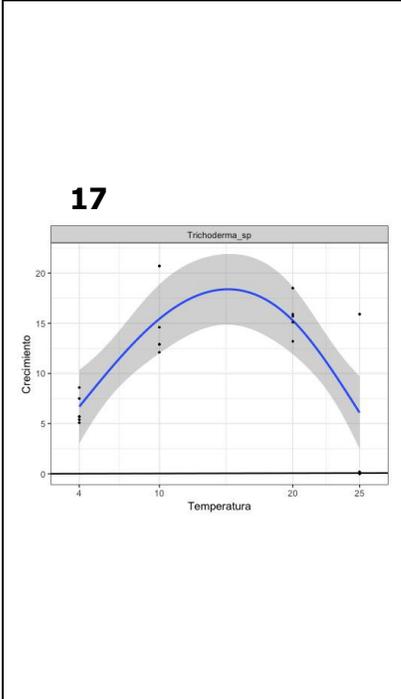
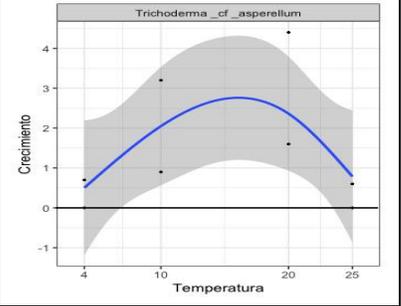
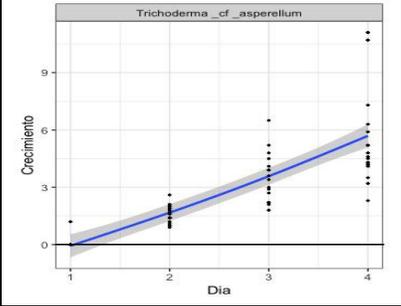
Cambio Día/Noche



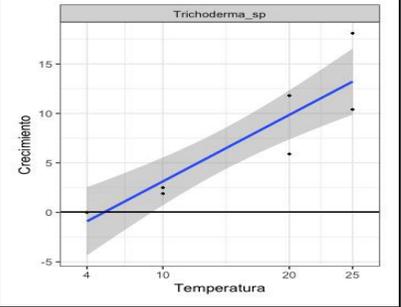
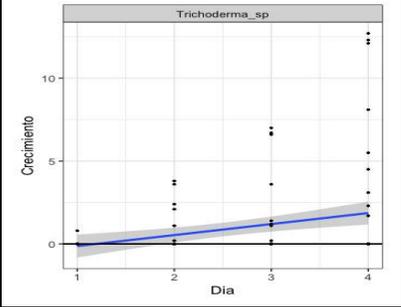
Aumento de 5°C



Cambio Día/Noche



Aumento de 5°C



Cambio Día/Noche

