



UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

---



Facultad de Biología

Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas

“Efecto del cambio de uso de suelo en la fisiología e interacciones ecológicas foliares de especies de encinos en Michoacán”

TESIS

Para Obtener el Grado de

Doctora en Ciencias Biológicas

Opción: Conservación y Manejo de Recursos Naturales

PRESENTA

M. en C. María Isabel Méndez Solórzano

Tutor: Dr. Gerardo Vázquez Marrufo

Comité tutorial:

Dr. Ken Oyama. IIES-UNAM

Dra. Luciana Raggi Hoyos. IIES-UNAM

Dra. Pamela Navarrete Ramírez. IIAF-UMSNH

Dr. John Larsen. IIES-UNAM

Morelia, Michoacán, Mayo de 2026

## **DEDICATORIA**

**A mi madre**

*Este logro es tan tuyo como mío, porque tus sacrificios, tu amor incondicional y tu fe en mí fueron el motor que me permitió llegar hasta aquí.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca No. 732728.

A la Secretaría de Desarrollo Institucional, UNAM y a la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH, por financiar este proyecto.

## CONTENIDO

|                                     |     |
|-------------------------------------|-----|
| i) RESUMEN GENERAL.....             | 1   |
| ii) ABSTRACT .....                  | 3   |
| iii) INTRODUCCIÓN GENERAL.....      | 5   |
| A. JUSTIFICACIÓN .....              | 12  |
| iv) PLANTEAMIENTO DE HIPÓTEIS ..... | 13  |
| v) OBJETIVOS .....                  | 14  |
| A. GENERAL .....                    | 14  |
| B. PARTICULARES.....                | 14  |
| vi) RESULTADOS .....                | 15  |
| A. CAPÍTULO I .....                 | 15  |
| 1) ABSTRACT.....                    | 16  |
| 2) INTRODUCTION.....                | 17  |
| 3) MATERIAL AND METHODS.....        | 19  |
| 4) RESULTS .....                    | 25  |
| 5) DISCUSSION .....                 | 39  |
| 6) CONCLUSIONS .....                | 43  |
| 7) SUPPLEMENTARY MATERIAL .....     | 44  |
| B. CAPÍTULO II.....                 | 46  |
| 1) ABSTRACT.....                    | 47  |
| 2) INTRODUCTION.....                | 48  |
| 3) MATERIALS AND METHODS.....       | 50  |
| 4) RESULTS .....                    | 54  |
| 5) DISCUSSION .....                 | 62  |
| 6) CONCLUSIONS .....                | 66  |
| 7) SUPPLEMENTARY TABLE .....        | 68  |
| 8) SUPPLEMENTARY FIGURES .....      | 73  |
| C. CAPÍTULO III .....               | 99  |
| 1) RESUMEN .....                    | 99  |
| 2) INTRODUCCIÓN .....               | 99  |
| 3) MATERIALES Y MÉTODOS.....        | 101 |
| 4) RESULTADOS .....                 | 105 |
| 5) DISCUSIÓN .....                  | 112 |

|                                                    |            |
|----------------------------------------------------|------------|
| <b>vii) DISCUSIÓN GENERAL.....</b>                 | <b>116</b> |
| <b>viii) PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES.....</b> | <b>124</b> |
| <b>ix) CONCLUSIONES FINALES .....</b>              | <b>125</b> |
| <b>x) BIBLIOGRAFÍA GENERAL .....</b>               | <b>126</b> |
| <b>xi) ANEXO 1.....</b>                            | <b>154</b> |

## **i) RESUMEN GENERAL**

La conversión de bosques templados a sistemas agrícolas intensivos constituye una de las principales fuerzas de cambio global en dichos ecosistemas, con efectos tanto en la pérdida de cobertura forestal como en la alteración de los procesos ecológicos. La expansión de los huertos de aguacate en México es un ejemplo de este tipo de conversión, en la que las respuestas de las plantas y sus comunidades deben evaluarse conjuntamente. Debido a sus condiciones edafológicas y climáticas, el estado de Michoacán presenta tasas elevadas de cambio de uso del suelo, ya que es ideal para el cultivo de aguacate. En dicho contexto, en este trabajo se evaluó el impacto del cambio en el uso del suelo de bosque a huerto de aguacate en los atributos funcionales foliares de las especies de encino *Quercus castanea* y *Q. obtusata*, en sus interacciones bióticas de herbivoría por insectos y de daño por patógenos, y en la diversidad de hongos endófitos foliares. En ambas especies de encino se encontraron niveles más altos de área foliar, de contenido de clorofila y de área foliar específica, en sitios dominados por huertos de aguacate, mientras que en los sitios con mayor cobertura de bosque, las hojas presentaron mayor contenido de agua, mayor grosor y mayor densidad foliar. Estos resultados indican que el cambio en el uso del suelo, además de alterar la estructura del hábitat, impone un filtro ecológico que modifica los atributos funcionales foliares, lo que favorece estrategias más adquisitivas en los encinos. En el tejido foliar de ambas especies de *Quercus* se observó un incremento significativo tanto de la herbivoría por insectos como del daño causado por patógenos en sitios con una mayor proporción de huertos de aguacate que en aquellos dominados por bosque, lo que sugiere una mayor vulnerabilidad de las plantas en ambientes transformados. De 112 cepas de hongos endófitos foliares aisladas en cultivo axénico de ambas especies de encinos, todas pertenecieron al phylum Ascomycota y se distribuyeron en cuatro clases, diez órdenes y 32 géneros. Los patrones de exclusividad de género y los índices de riqueza mostraron de manera consistente una mayor diversidad en los paisajes dominados por bosque que en los dominados por huerto. El análisis de metabarcoding de la mycobiota foliar se correlacionó con dichos resultados, ya que mostró comunidades dominadas por Ascomycota, distribuidas en 169 géneros. La diversidad alfa no difirió significativamente entre las coberturas de bosque, pero la diversidad beta de las comunidades fúngicas sí. Lo que indica que la conversión de bosque a huerto conlleva cambios en la estructura de las comunidades de hongos endófitos foliares cultivables de especies de encinos y una tendencia a la reducción de la diversidad en paisajes más alterados por la actividad agrícola. La riqueza y la composición de hongos endófitos estuvieron

más fuertemente determinadas por la identidad del hospedero que por el cambio de uso del suelo, lo que revela que las comunidades endofíticas no responden directamente a la perturbación, sino que lo hacen a través de mecanismos mediados por la planta y su contexto ecológico inmediato. El análisis integrador mediante modelos de ecuaciones estructurales confirma que los efectos del cambio de uso del suelo operan predominantemente de forma indirecta. Además, se detectó un efecto positivo significativo de los atributos funcionales sobre la herbivoría y de la herbivoría sobre el daño por patógenos, mientras que las relaciones directas con el daño por patógenos y con la riqueza de hongos endófitos no resultaron significativas. Este resultado es relevante, ya que no se confirma la expectativa de que la transformación del hábitat impacte directamente en las comunidades microbianas.

Este trabajo demuestra que el cambio en el uso del suelo desencadena efectos en cascada que reconfiguran el funcionamiento del bosque, pero con impactos no lineales ni directos. Los resultados evidencian los efectos indirectos mediados por atributos funcionales foliares sobre las interacciones bióticas y, de manera conjunta, determinan la estructura de las comunidades asociadas. En particular, la ausencia de efectos directos sobre la riqueza de hongos endófitos sugiere que la complejidad de la red ecológica actúa como amortiguador frente a la perturbación. Estos hallazgos subrayan la necesidad de realizar estudios integrales que permitan comprender la multidimensionalidad de las respuestas ecológicas ante la intensificación agrícola y aporten una base sólida para replantear estrategias de manejo y conservación en paisajes forestales altamente transformados.

**Palabras clave:** hongos endófitos, *Quercus*, atributos funcionales foliares, fragmentación de bosque, bosques templados.

## ii) ABSTRACT

The conversion of temperate forests into intensive agricultural systems is a key driver of global change in these ecosystems, affecting both forest cover loss and ecological processes. The expansion of avocado orchards in Mexico illustrates this type of land-use change, where plant responses and their communities must be considered together. Due to its soil and climate characteristics, the State of Michoacán experiences high rates of land-use change, making it ideal for avocado cultivation. This study examined the impact of land-use change from forest to avocado orchard on the foliar functional traits of *Quercus castanea* and *Q. obtusata*, their interactions with insects and pathogens, and the diversity of foliar endophytic fungi. In both oak species, higher leaf area, chlorophyll content, and specific leaf area were found in sites dominated by avocado orchards. Conversely, in areas with more forest cover, leaves had higher water content, were thicker, and showed higher leaf density. These results suggest that land-use change not only alters habitat structure but also creates an ecological filter that modifies foliar functional traits, promoting more resource-acquisitive strategies in oaks. Notably, there were significant increases in insect herbivory and pathogen damage on the leaves of both *Quercus* species in sites with a higher proportion of avocado orchards compared to forest-dominated areas, indicating increased plant vulnerability in altered environments. Among 112 endophytic fungal strains isolated from axenic cultures of both oak species, all belonged to the phylum Ascomycota and included four classes, ten orders, and 32 genera. Patterns of genus exclusivity and richness indices consistently demonstrated greater diversity in forest-dominated landscapes than in orchard-dominated ones. Metabarcoding analysis of foliar mycobiota supported these findings, revealing communities dominated by Ascomycota across 169 genera. While alpha diversity did not differ significantly between forest and orchard sites, the composition of fungal communities indicated that converting forests to orchards alters the structure of cultivable foliar endophytic fungal communities in oak species, with trends toward reduced diversity in landscapes more heavily impacted by agriculture. The richness and composition of endophytic fungi were more strongly influenced by host identity and biotic interactions than by land-use change, suggesting that endophytic communities do not respond directly to disturbance but through plant-mediated mechanisms within their immediate ecological context. Structural equation modeling confirmed that the effects of land-use change mainly operate indirectly. A significant positive relationship was found between foliar functional traits and herbivory, and between herbivory and pathogen damage, whereas direct links between these traits and pathogen damage or endophytic fungal richness were not significant. This finding is important because it does not support the idea that habitat transformation directly impacts microbial communities. Overall, this research demonstrates that land-use change triggers cascading effects that modify forest functioning, with non-linear and indirect impacts. The results highlight the role of foliar functional attributes in mediating biotic interactions and shaping community structure. The lack of direct

effects on endophytic fungal richness suggests that the complexity of ecological networks buffers ecosystems from disturbance. These findings emphasize the importance of comprehensive research to understand the multidimensional responses of ecosystems to agricultural intensification and to develop informed strategies for managing and conserving highly altered forest landscapes.

### iii) INTRODUCCIÓN GENERAL

Los bosques templados se encuentran entre los ecosistemas más distribuidos a nivel global, cubriendo entre el 16 % y el 26 % de la superficie forestal mundial (Keenan *et al.*, 2015; Riitters *et al.*, 2016; FAO y UNEP, 2020). Estos ecosistemas son de gran importancia ecológica porque albergan una alta diversidad de especies y conforman la asociación más extensa de pinos (*Pinus* spp.) y encinos (*Quercus* spp.) a nivel mundial (Singh y Zobel, 2025). En México, los bosques templados ocupan el segundo lugar en extensión entre los tipos de vegetación, cubriendo el 16.96 % de la superficie vegetal (INEGI, 2014), proporcionando múltiples servicios ambientales (Galicia y Zarco-Arista, 2014). El género *Quercus* es uno de los principales representantes arbóreos de los bosques templados (Manos y Hipp, 2021), con una amplia distribución global (Denk *et al.*, 2017; Backs y Ashley, 2021). México es el segundo centro de diversificación de este género (Hipp *et al.*, 2018), ya que alberga aproximadamente 161 especies de encino, de un total de alrededor de 450 descritas a nivel mundial (Denk *et al.*, 2017), de las cuales 109 son endémicas del país (Galicia *et al.*, 2015). Este alto nivel de endemismo hace que los encinos mexicanos sean un tema de gran interés científico y ecológico, no solo por los servicios ambientales que proporcionan, sino también porque son considerados superhospederos debido a la alta diversidad biológica que albergan, incluyendo plantas epífitas (Martínez-Meléndez *et al.*, 2022), artrópodos (García-Jain *et al.*, 2023), hongos endófitos (Nguyen *et al.*, 2021; Menkis *et al.*, 2022), entre otros.

Entre las principales amenazas que enfrentan los bosques templados a nivel global se encuentran la deforestación y el cambio de uso de suelo asociados a la producción maderera no regulada, la expansión de asentamientos urbanos, el pastoreo de ganado y el incremento de la superficie destinada a la agricultura, procesos que han aumentado en México en los últimos años (Legarreta-Miranda *et al.*, 2021; Ramírez-Mejía *et al.*, 2024). Estas transformaciones provocan cambios en la estructura del paisaje y del microclima, la modificación de los ciclos biogeoquímicos, la degradación del suelo y la pérdida de especies (Viljur *et al.*, 2022). La fragmentación forestal representa la pérdida progresiva de hábitat a partir de una matriz forestal continua, lo que da lugar a múltiples fragmentos con diferentes formas y tamaños, así como niveles de aislamiento (Haddad *et al.*, 2015; Fahrig *et al.*, 2019). Una de las principales características de los paisajes fragmentados es la reducción tanto del tamaño como de la calidad del hábitat boscoso, lo que incrementa la distancia entre parches y dificulta el desplazamiento y la conectividad de las especies que los

habitan (Ziv y Davidowitz, 2019). Estas condiciones se relacionan con una disminución de la riqueza de especies y una alteración en la composición de las comunidades biológicas (Cunningham *et al.*, 2014; Maney *et al.*, 2022).

En México, los bosques templados han experimentado una fragmentación creciente. Entre 1976 y 2000, se reportaron tasas de cambio del 0.25 % anual, asociadas principalmente a procesos de deforestación y degradación del hábitat (Mas *et al.*, 2002; Castro-Navarro *et al.*, 2017; Mas y González, 2015). Como consecuencia, entre 2001 y 2014 se registró un incremento de 291,000 hectáreas en la superficie destinada a actividades agrícolas (Bonilla-Moheno y Aide, 2020). Debido a la alta deforestación y al cambio de uso del suelo hacia agrosistemas, más del 40 % de la cobertura de los bosques templados se ha perdido en México, lo que ha generado paisajes altamente fragmentados (Klooster y Masera, 2000). Particularmente, el estado de Michoacán representa una de las regiones más amenazadas en términos de degradación del hábitat y de extinción de comunidades forestales (Molina Sánchez *et al.*, 2019; Denvir *et al.*, 2021). Presenta un alto grado de fragmentación y pérdida de hábitat (Mas *et al.*, 2017), con tasas de deforestación anuales del 0.09 al 0.16 % (Mas *et al.*, 2017). Se estima que, entre 2001 y 2017, cerca del 20 % de la deforestación total en Michoacán estuvo relacionada con la expansión del cultivo de aguacate (Cho *et al.*, 2021), lo que constituye la principal actividad antrópica crítica que impulsa la conversión de bosques nativos en huertos en esta región (Brown, 2003). Los huertos de aguacate han reemplazado los bosques de pino-encino (Denvir *et al.*, 2021), con una superficie plantada de 213,422 hectáreas en 2019 (INEGI, 2019), lo que genera fragmentos de bosque intercalados con cultivos y amenaza la biodiversidad (Pérez-Solache *et al.*, 2022).

El consumo de aguacate a nivel mundial ha aumentado en las últimas décadas, alcanzando una producción de 5, 575, 358 toneladas anuales (Arias *et al.*, 2018). México contribuye con el 45.95 % de las exportaciones mundiales (SAGARPA, 2017a), lo que lo posiciona como el principal productor global. El estado de Michoacán es considerado el área productora de aguacate más importante de México y del mundo, ya que aporta el 84 % de la producción nacional (Villanueva-Tomas y Zepeda-Anaya, 2018) y es el único estado que presenta producción durante todo el año (CEDRSSA, 2015). Esto se debe a que la región aguacatera de Michoacán presenta condiciones climáticas adecuadas para la producción intensiva de aguacate (Barsimantov y Navia Antezana,

2012), similares a las requeridas por los bosques de pino-encino, lo que ha derivado en una matriz de bosque fragmentada en la zona de cultivo (Chávez-León *et al.*, 2012).

En los fragmentos de bosque, las condiciones abióticas difieren de las del bosque continuo, ya que presentan una mayor intensidad de luz solar, una temperatura más alta y menor humedad (Tuff *et al.*, 2016; Ziv y Davidowitz, 2019). Esto ocurre porque el bosque original se fragmenta en parches más pequeños, lo que facilita la entrada de luz solar e incrementa la velocidad del viento. La temperatura suele aumentar debido a una mayor incidencia de radiación solar, lo que provoca una disminución de la humedad (Laurance, 2004; Tuff *et al.*, 2016). Las plantas responden a estas nuevas condiciones ambientales modificando distintos atributos de sus hojas para adaptarse a ambientes cambiantes (Viscosi, 2015; Kusi y Karsai, 2020). Los rasgos funcionales foliares se consideran características medibles que reflejan respuestas evolutivas y ecológicas a variaciones en las condiciones abióticas, influyendo en el desempeño y la aptitud de las plantas (Lavorel *et al.*, 2011; Pérez-Harguindeguy *et al.*, 2016; Zambrano *et al.*, 2020). Por lo tanto, la disposición, la forma, el tamaño y la anatomía de las hojas difieren considerablemente según las condiciones de crecimiento de la planta (Bruschi *et al.*, 2003).

Por ejemplo, el área foliar es importante en el balance de agua y energía de la planta y, en general, hojas más pequeñas se asocian con ambientes de alta radiación, calor, frío o sequía (Cornelissen *et al.*, 2003; Lara-De La Cruz *et al.*, 2020). En *Quercus castanea*, Lara-de la Cruz *et al.* (2020) encontraron que las hojas en sitios más húmedos eran más grandes. De manera similar, en *Q. ilex* se ha reportado una relación positiva entre la disponibilidad de agua y el tamaño foliar (Niinemets, 2015). El grosor foliar está vinculado con las tasas fotosintéticas por unidad de área foliar y se ha correlacionado positivamente con la temperatura media y la radiación solar (Onoda *et al.*, 2011). El área foliar específica (SLA, por sus siglas en inglés) se define como el área foliar por unidad de masa foliar seca ( $M^2/Kg$ ) (Ali *et al.*, 2017). En ambientes fragmentados, se ha reportado que el SLA se relaciona positivamente con la temperatura y la incidencia de luz solar, como se observó en *Ulmus elongata* (Liu *et al.*, 2017). En las hierbas del sotobosque de un paisaje fragmentado, se observó una relación negativa entre el área foliar específica y el tamaño de los parches de bosque (Vanneste *et al.*, 2019). A escala global, se ha documentado que el contenido de masa seca foliar disminuye en ambientes con temperaturas más bajas (Kuppler *et al.*, 2020).

Estudios recientes en *Q. castanea* y *Q. obtusata*, bajo diferentes proporciones de cobertura vegetal entre bosque nativo y huerto de aguacate, indican que en fragmentos con mayor proporción de bosque que de huerto se observa un mayor grosor foliar, un mayor contenido de agua y una mayor masa fresca foliar. En contraste, en sitios con proporciones menores de bosque que de huerto, se registraron valores más altos de área foliar específica, contenido de clorofila y área foliar (Pérez-Solache *et al.*, 2023). Estos resultados sugieren que la estructura del paisaje y el cambio en el uso del suelo generan respuestas funcionales en las hojas, con implicaciones ecológicas más amplias.

Los insectos herbívoros y los patógenos foliares explotan recurrentemente, de manera simultánea o no, una misma planta hospedera, impactando el desempeño de cada uno y la aptitud de la planta, y, eventualmente, modificando la abundancia, la distribución de las plantas y la estructura de las comunidades (Biere y Bennett, 2013; Hauser *et al.*, 2013; Ratnadass y Deguine, 2020; Van Dijk *et al.*, 2022). Por ejemplo, los insectos herbívoros interactúan directamente con los patógenos foliares al consumir o transportar sus esporas, e indirectamente cuando ocurren cambios químicos en sus plantas hospederas como resultado del daño causado por los insectos herbívoros, lo que, a su vez, influye en la ocurrencia de patógenos (Costa *et al.*, 2021; Ohgushi *et al.*, 2007). La fragmentación del bosque provoca la pérdida no aleatoria de especies, lo que modifica las interacciones entre las plantas y sus hospederos asociados (Liu *et al.*, 2018). Este proceso afecta negativamente la abundancia y la riqueza de insectos herbívoros, y las especies especialistas son las más vulnerables (Rossetti *et al.*, 2017). Además, las plantas que habitan en fragmentos más pequeños suelen estar más expuestas al ataque de herbívoros y patógenos, ya que las condiciones microclimáticas pueden favorecer su proliferación (Benítez-Malvido y Lemus-Albor, 2005; Fontúrbel y Murúa, 2014). Se ha documentado que en hábitats fragmentados y agrosistemas, la abundancia de insectos herbívoros aumenta debido a la disminución o pérdida de enemigos naturales (efectos top-down) (Cuevas-Reyes *et al.*, 2013; García-Jain *et al.*, 2023), y los fragmentos más pequeños son los más expuestos a patógenos foliares debido a condiciones microclimáticas que favorecen su proliferación (Fontúrbel y Murúa, 2014).

Los cambios fisiológicos y morfológicos en los atributos funcionales foliares pueden influir directamente en las interacciones antagónicas, como la incidencia de insectos herbívoros (Barbour *et al.*, 2015) y de hongos patógenos (González-Teuber *et al.*, 2021), lo que, a su vez, afecta la dinámica poblacional y la estructura de sus comunidades (Fonseca *et al.*, 2000; Poorter *et al.*,

2004). De esta manera, los atributos funcionales actúan como reguladores de las interacciones planta-herbívoro-patógeno (Schöb *et al.*, 2013; van Dijk *et al.*, 2022). Algunos caracteres funcionales foliares están relacionados de diferentes maneras con los mecanismos de resistencia de las plantas contra el ataque de insectos herbívoros y hongos patógenos, tales como defensas físicas, como el área foliar específica, la dureza y el grosor foliares, y las defensas químicas, como la producción de metabolitos secundarios (Costa *et al.* 2021). Las defensas físicas pueden incluir la resistencia estructural, que dificulta la penetración de patógenos en los tejidos vegetales, y/o el consumo de las hojas por insectos (Onoda *et al.*, 2011; González-Teuber *et al.*, 2020, 2021). Otros caracteres, como el contenido de clorofila y el tamaño foliar, constituyen indicadores importantes de la calidad de la planta y pueden aumentar la incidencia de enemigos naturales (Aguilar-Peralta *et al.*, 2021; García-Jain *et al.*, 2023).

Se ha demostrado que tanto la calidad nutricional de las plantas (p. ej., contenido de agua y de nitrógeno) como los caracteres morfológicos (p. ej., área foliar específica, tamaño, grosor, pubescencia y dureza) influyen en la incidencia y el desempeño de insectos herbívoros y de hongos patógenos foliares (Poorter *et al.*, 2004; González-Teuber *et al.*, 2020). Por ejemplo, se ha reportado una relación positiva entre el área foliar específica y la herbivoría (Ruiz-Carbayo *et al.*, 2020) y una relación negativa entre la herbivoría y el grosor foliar (Aguilar-Peralta *et al.*, 2021). Asimismo, se ha observado que las plantas con hojas más grandes y con menor número de tricomas son más susceptibles al consumo por parte de herbívoros (Barbour *et al.*, 2015). En el caso del daño causado por patógenos, se ha encontrado una relación positiva con el contenido de clorofila (Costa *et al.*, 2021) y una mayor susceptibilidad en hojas delgadas o con defensas estructurales reducidas (González-Teuber *et al.*, 2021). En un estudio realizado a lo largo de un gradiente de fragmentación, se reportaron niveles más altos de herbivoría en *Q. castanea* y *Q. deserticola* en los fragmentos de bosque más pequeños (García-Jain *et al.*, 2023; Maldonado-López *et al.*, 2015, 2016), así como un incremento del daño por patógenos cuando los parches estaban más aislados. En otro estudio realizado en 30 fragmentos de bosques mixtos y puros, se evaluaron simultáneamente los niveles de herbivoría por insectos y la incidencia de tizón foliar en álamos, encontrando mayores niveles de daño en los fragmentos más pequeños y aislados (Wang *et al.*, 2021). Además, se observó que un aumento en la riqueza de especies redujo el daño tanto por herbívoros como por patógenos.

Ejemplos específicos muestran cómo las interacciones entre plantas, insectos herbívoros y hongos patógenos pueden tener efectos diversos y especie-específicos. Klut *et al.* (2002) estudiaron la interacción entre *Cirsium arvense*, el hongo fitopatógeno *Puccinia punctiformis* y tres especies de insectos herbívoros. Encontraron que los insectos no solo actuaban como vectores al transportar esporas del hongo, incrementando las tasas de infección en plantas sanas, sino que, además, una de las especies de herbívoros presentaba un aumento de la mortalidad al alimentarse de plantas infectadas. Estos resultados sugieren que las interacciones planta-herbívoro-patógeno pueden tener efectos mutuamente beneficiosos o antagónicos, según las especies involucradas y el contexto ecológico.

Además de los hongos patógenos, existen otros grupos de hongos que colonizan los tejidos de las plantas sin causar síntomas visibles ni daño aparente y que desempeñan un papel importante en las interacciones ecológicas (Jia *et al.*, 2020). Este grupo es el de los hongos endófitos, cuya presencia y funciones aún son poco conocidas en muchas especies vegetales, especialmente en ambientes afectados por la fragmentación y el cambio de uso del suelo. Los hongos endófitos colonizan los tejidos vivos de las plantas, incluidos hojas, ramas, tallos y raíces (Grabka *et al.*, 2022). Estos organismos habitan los órganos vegetales y, en algún momento de su vida, pueden colonizar los tejidos internos de la planta sin causar daño aparente a su hospedante (Petrini, 1991; Rodriguez *et al.*, 2009). Sin embargo, bajo diferentes condiciones ambientales, pueden formar asociaciones que van desde el mutualismo hasta el comensalismo y el parasitismo (Grabka *et al.*, 2022; Verma *et al.*, 2022). Los hongos endófitos son un grupo polifilético muy diverso, conformado principalmente por ascomicetos y basidiomicetos, que establecen asociaciones mutualistas con múltiples especies vegetales (Verma *et al.*, 2022).

Se ha descrito la diversidad de especies de hongos endófitos de *Quercus* spp. en diferentes regiones geográficas (Fisher *et al.*, 1994; Moricca y Ragazzi, 2008; Alidadi *et al.*, 2019; Nguyen *et al.*, 2021). Además, se ha documentado que la comunidad de hongos endófitos en encinos varía según el estado fenológico de la planta, las condiciones climáticas, la región geográfica, los factores de estrés y entre especies simpátricas (Collado *et al.*, 2000; Ragazzi *et al.*, 2003; Moricca *et al.*, 2012; Koide *et al.*, 2017). Sin embargo, todavía es escaso el conocimiento sobre la diversidad de hongos endófitos presentes en los encinos mexicanos, a pesar de su relevancia ecológica y de su potencial para protegerlos de herbívoros y patógenos (Arnold y Lewis, 2005; Grabka *et al.*, 2022).

Diversos estudios han demostrado que los hongos endófitos pueden influir en la resistencia de las plantas al estrés biótico y abiótico, mediante la producción de metabolitos secundarios y la inducción de defensas sistémicas (Fontana *et al.*, 2021; Morales-Vargas *et al.*, 2024). Lo anterior se ha demostrado en las especies de *Quercus* (Ferus *et al.*, 2019; Jin *et al.*, 2019; Costa *et al.*, 2025), por lo que es importante comprender la diversidad de estos hongos y sus fluctuaciones, relacionadas con diversos factores del entorno, con la finalidad de establecer estrategias más sólidas para la conservación de los ecosistemas formados por estas especies arbóreas. Se ha planteado que los cambios en la estructura del hábitat, como la deforestación o la transformación del bosque en sistemas agrícolas, pueden alterar la composición y la diversidad de las comunidades endofíticas (Ngubane *et al.*, 2023; Gowtham *et al.*, 2024; Li y Dong, 2025). En particular, la pérdida de cobertura forestal puede reducir la diversidad microbiana asociada a las plantas, lo que podría afectar su salud y su capacidad de adaptación a entornos cambiantes (Matsumura y Fukuda, 2013).

El análisis de la diversidad de hongos endófitos se ha realizado tradicionalmente mediante métodos de cultivo. Sin embargo, algunos hongos endófitos requieren condiciones especiales para su crecimiento y no es posible su reproducción en un medio de cultivo universal (Dos Reis *et al.*, 2022), lo que puede llevar a subestimar su diversidad real (Arnold y Lutzoni, 2007). En la última década, el uso de métodos moleculares de alto rendimiento ha transformado el estudio de las comunidades microbianas (Thangavel *et al.*, 2025). Una de las técnicas utilizadas es el metabarcoding, que permite identificar de manera más eficiente a los hongos de una muestra ambiental mediante la secuenciación de marcadores genéticos (Milazzo *et al.*, 2021). En los hongos, la región ITS (Internal Transcribed Spacer) se ha convertido en el "código de barras" universal para la identificación de especies, tanto de aislados fúngicos como en técnicas independientes de cultivo (Schoch *et al.*, 2012; Nilsson *et al.*, 2019). Con ayuda del metabarcoding se han descrito comunidades microbianas y su sensibilidad a factores ambientales y antropogénicos (Faticov *et al.*, 2024). Estudios recientes han documentado la respuesta de los hongos endófitos al aclareo forestal (Liu *et al.*, 2024) y a los gradientes de elevación (Zhang *et al.*, 2024) en distintos grupos de plantas. Sin embargo, hasta la fecha no existe información sobre cómo las comunidades de hongos endófitos foliares responden a la fragmentación forestal asociada al cambio de uso de suelo. En particular, los encinos mexicanos, por su importancia ecológica y su amplia distribución, constituyen un modelo adecuado para evaluar estas dinámicas (Valencia-A, 2004).

## A. JUSTIFICACIÓN

Dado que una gran proporción de las especies de *Quercus* de México son endémicas, su estudio es prioritario por razones tanto ecológicas como evolutivas. Debido a la gran relevancia ecológica y social de los bosques templados de encino de Michoacán, su conservación es prioritaria a nivel global y nacional, tanto por los servicios ecosistémicos que prestan como por la diversidad de especies que albergan. En el contexto de alta deforestación y fragmentación en los bosques templados de Michoacán ocasionados por la expansión del cultivo de aguacate, así como la escasa información sobre los efectos de estos cambios en las interacciones ecológicas y la diversidad microbiana asociada a los encinos, en el presente estudio se planteó determinar la influencia del cambio de uso de suelo de bosque a huerto de aguacate tanto en los rasgos funcionales foliares como en la coocurrencia de daño por herbivoría y patógenos en *Q. castanea* y *Q. obtusata*. También se evaluaron, mediante técnicas de cultivo y metabarcoding, los cambios en la diversidad de hongos endófitos foliares asociados a estas especies de encino, debido a la modificación del uso de suelo de bosque a huerto. Específicamente, para el desarrollo del proyecto se buscó responder las siguientes preguntas:

- 1) ¿Se observan cambios en los caracteres funcionales foliares de *Q. castanea* y *Q. obtusata* en función de la variación en la cobertura de bosque y de huertos de aguacate?
- 2) ¿Cuál es la variación en la coocurrencia de insectos herbívoros y hongos patógenos en *Q. castanea* y *Q. obtusata* entre sitios con cobertura de bosque y de huertos de aguacate?
- 3) Si los caracteres funcionales foliares de *Q. castanea* y *Q. obtusata* varían entre áreas con cobertura de bosque y huertos de aguacate diferentes, ¿cómo afecta esta variación en la cantidad de daño foliar causado por insectos herbívoros y hongos patógenos?
- 4) ¿El cambio de uso de suelo de bosque a huerto de aguacate afecta la riqueza y la estructura de las comunidades de hongos endófitos foliares asociadas a estas especies de encino?

#### **iv) PLANTEAMIENTO DE HIPÓTEIS**

El cambio de uso de suelo asociado al cultivo de aguacate en Michoacán modifica los atributos funcionales foliares de los encinos presentes en esas zonas: hojas más grandes, con mayor contenido de clorofila y mayor densidad foliar en zonas con menor cobertura de bosque que en zonas con mayor cobertura de huerto de aguacate. Además, las interacciones con herbívoros y patógenos foliares se verán afectadas, siendo más intensas en sitios con menor proporción de bosque frente a huerto de aguacate. Del mismo modo, la diversidad de hongos endófitos foliares se verá disminuida en encinos de sitios con menor proporción de cobertura de bosque que de huerto de aguacate.

## **v) OBJETIVOS**

### **A. GENERAL**

Determinar el efecto del cambio de uso de suelo en la fisiología e interacciones ecológicas foliares de especies de encinos en sitios con diferentes proporciones de cobertura vegetal entre bosque y huerto de aguacate en Michoacán

### **B. PARTICULARES**

Evaluar los atributos funcionales foliares y el daño foliar causado por insectos herbívoros y patógenos foliares en *Q. castanea* y *Q. obtusata* que se encuentran bajo diferentes proporciones de cobertura vegetal entre bosque y huertos de aguacate en la franja aguacatera del estado de Michoacán.

Comparar la diversidad y riqueza de hongos endófitos foliares cultivables presentes en *Q. castanea* y *Q. obtusata*, que se encuentran bajo diferentes proporciones de cobertura vegetal entre bosque y huertos de aguacate, en la franja aguacatera del estado de Michoacán.

Evaluar la diversidad de hongos endófitos foliares en encinos bajo diferentes proporciones de cobertura vegetal mediante la técnica de metabarcoding.

## vi) RESULTADOS

### A. CAPÍTULO I

Co-occurrence of insect herbivores and foliar pathogens in oak species along a Mexican avocado agrosystems mosaic: the importance of leaf functional traits

María Isabel Méndez-Solórzano<sup>1</sup>, Yurixhi Maldonado-López<sup>2</sup>, Ken Oyama<sup>3</sup>, Mário M. Espírito-Santo<sup>4</sup>, Marcela Sofía Vaca-Sánchez<sup>3</sup>, Magno Augusto Zazá Borges<sup>4</sup>, Fagundes Marcílio<sup>4</sup>, Pablo Cuevas-Reyes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Ecología de Interacciones Bióticas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, C.P. 58030 Morelia, Michoacán, México.

<sup>2</sup>Cátedras CONAHCYT-Instituto de Investigaciones Sobre los Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.

<sup>3</sup>Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad Morelia, Universidad Nacional Autónoma de México, Morelia, Michoacán, México.

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Uso dos Recursos Naturais, Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Montes Claros, 39401-089, Montes Claros, MG, Brazil.

\*Correspondence

Pablo Cuevas-Reyes

Address:

Email: [pcragalla@gmail.com](mailto:pcragalla@gmail.com)

## 1) ABSTRACT

Plant-herbivore-pathogen interactions are influenced by biotic factors such as plant ontogeny, chemical defense, nutritional quality and phenological patterns. Little is known about the factors shaping biotic interactions in anthropized habitats such as avocado agrosystems. We determine the effects of the changes in foliar functional characters expression on the simultaneous incidence of chewing herbivorous insects and foliar pathogens in the same host oak species (*Quercus castanea* and *Q. obtusata*) along a mosaic of temperate forest and avocado orchards. We distinguish three forest/avocado cover classes (more forest cover than orchard, similar forest and orchard cover and less forest cover than orchard) in Michoacan state, Mexico. Ten adults of each host plant species were selected from each location to determine foliar functional characters, herbivore and pathogen damage. Foliar area, chlorophyll content, specific foliar area, leaf area damaged by herbivorous insects and leaf area damaged by pathogens were higher in individuals of both host plant species growing in locations with lower forest/avocado cover than individuals from locations with similar forest and orchard cover and locations with more forest cover than orchard. Contrary, higher values of foliar fresh mass, foliar water content, foliar thickness, foliar density and foliar dry matter content were detected in trees from sites with higher forest/avocado cover proportion. Trees from locations of less forest cover than orchard had higher herbivore and pathogen damage indexes followed by sites with similar and higher forest/avocado cover proportions. Our findings emphasize the responses and linkages of oak functional characters related with forest fragmentation and its consequences on multitrophic interactions between plants and their antagonist herbivorous insects and pathogens as well as the possibly detrimental impact on *Q. castanea* and *Q. obtusata* fitness as avocado cover increases in relation to forests in agrosystems and temperate forests.

Keywords Agrosystems, avocado orchards, biotic interactions; chewing insect herbivores, functional plant traits, fungal pathogens, temperate forest

## 2) INTRODUCTION

Herbivorous insects and foliar pathogens recurrently exploit, simultaneously or not, the same host plant, impacting each other's performance and host plants fitness, eventually modifying plant abundance, distribution and the structure of communities (Biere & Bennett 2013; Hauser et al. 2013; Ratnadass & Deguine 2020; Van Dijk et al. 2022). For example, herbivorous insects directly interact with foliar pathogens by consuming or transporting their spores; and indirectly when chemical changes in their host plants occur as a result of the damage caused by herbivorous insects, which in turn influence the pathogens occurrence (Costa et al. 2021; Ohgushi et al. 2007). Thus, the co-occurrence of herbivorous insects and foliar pathogens on the same host plants can generate multiple consequences: (i) complementary effects on survival and performance of host plants (i.e. no interactions); (ii) synergistic effects when the produced damage by herbivorous insects and pathogens exceeds the sum of the individual damage from each of them (i.e. positive interactions); and (iii) antagonist effects when insect herbivores can induce plant resistance against foliar pathogens or vice versa (Biere & Bennett 2013; Costa et al. 2021; Hauser et al. 2013; Ratnadass & Deguine 2020).

Plant-herbivore-pathogen interactions are frequently affected by biotic factors including plant chemical defense and their quality of nutrients, phenological patterns, plant ontogeny and foliar functional characters variation (Costa et al. 2021; González-Teuber et al. 2019, 2021; Lavorel et al. 2011). Particularly, foliar functional characters are considered as measurable traits that reflect evolutionary and ecological responses to variations in abiotic conditions, influencing plant performance and fitness (Lavorel et al. 2011; Pérez-Harguinegy et al. 2016; Zambrano et al. 2020). Some foliar functional characters are related in different ways to plant resistance mechanisms against the attack of herbivorous insects and pathogenic fungi, such as physical (e.g., specific foliar area, foliar toughness and thickness) and chemical defenses (e.g., secondary chemical compounds based in nitrogen and carbon) (Costa et al. 2021). For example, physical defenses provide structural resistance that makes it more difficult for pathogens to penetrate plant tissues and/or for insects to consume the leaves (González-Teuber et al. 2019, 2021; Onoda et al. 2011). Other characters including chlorophyll content and foliar size, represent important plant quality estimators that can increase the incidence of natural enemies (Aguilar-Peralta et al. 2021; García-Jain et al. 2022).

Herbivorous insects and foliar pathogens co-occurrence may be also affected for human activities such as deforestation and land-use change to agrosystems, leading to forest fragmentation (Arnold

& Fonseca 2011; García-Guzmán 2016). Forest fragmentation represents the progressive habitat loss from a continuous forest matrix, resulting in the formation of multiple fragments with different shapes and sizes, as well as isolation levels (Fahrig et al. 2019; Haddad et al. 2015). In these fragments, abiotic conditions are different, with higher sunlight intensity and temperature and lower humidity (Tuff et al. 2016; Ziv & Davidowitz 2019), causing biodiversity loss and increasing the chance of colonization by invasive species (Shimrah et al. 2022). Particularly, it has been documented that in fragmented habitats and agrosystems, abundance of herbivorous insects increases due to natural enemies decreases or loss (i.e., top-down effects) (Cuevas-Reyes et al. 2013; García-Jain et al. 2022), with smallest fragments being more exposed to foliar pathogens due to microclimatic conditions that favor their proliferation (Fontúrbel & Murúa 2014). Similarly, foliar functional characters change in response to variation of abiotic conditions in fragmented habitats, affecting the incidence of insect herbivores and pathogens (García-Jain et al. 2022; Pérez-Solache et al. 2022). Thus, an increase of conservative functional foliar characters is expected for plants growing in small forest fragments and on the edges of medium and large fragments, which are characterized by high temperature and low water availability (Ramírez-Valiente & Cavender-Bares 2017; Slattery & Fenner 2021).

Due to high deforestation and land-use change to agrosystems, more than 40% of the temperate forest ecosystems cover has been lost in Mexico, generating highly fragmented landscapes (Klooster & Masera 2000). Particularly, the state of Michoacán represents one of the most endangered regions, with deforestation rates from 0.09 to 0.16 % per year (Mas et al. 2017). It is estimated that in 2001 and 2017, nearly 20% of the total deforestation in Michoacán was related with the avocado farming expansion (Cho et al. 2021), representing the main critical anthropic activity driving the conversion of native forests to orchards in this region (Brown 2003). Avocado orchards have replaced pine-oak forests (Denvir et al., 2021) with a planted area of 213,422 ha in 2019 (INEGI 2019), generating forest fragments interspersed with crops and threatening biodiversity (Pérez-Solache et al. 2022). Our objective was to determine the influence of foliar functional characters on the co-occurrence of herbivory and pathogen damage in *Quercus castanea* and *Q. obtusata* in fragments with different forest and avocado orchards cover. The following questions were raised: (i) Do foliar functional characters of *Q. castanea* and *Q. obtusata* change in function of forest and avocado orchards cover variation? (ii) How the co-occurrence of herbivorous insects and fungal pathogens on *Q. castanea* and *Q. obtusata* vary among sites with different forest

and avocado orchards cover? And (iii) if functional foliar characters of *Q. castanea* and *Q. obtusata* vary among areas with different forest and avocado orchards cover, how does this variation affect the amount of foliar damage caused by herbivorous insects and fungal pathogens?

### 3) MATERIAL AND METHODS

#### *Study area*

This research was carried out in the so-called “avocado belt” in Michoacán, Mexico, represented by a mosaic of temperate forest fragments interspersed with avocado orchards (Pérez-Solache et al. 2022). Forest cover and avocado crops variation was identified using satellite pictures such as Landsat, SPOT Sentinel and Rapid Eye with TM 5, ETM+, as well as OLI sensors (Neinavaz et al. 2020). Based on this data, we selected six locations with different proportion of forest and avocado orchards, ensuring the presence of *Quercus castanea* and *Q. obtusata*: (a) two locations with more forest cover than orchard: (1) Llanitos: (84 %/16 %) and (2) La Yácata: (74/26 %); (b) two locations with similar forest and orchard cover: (1) El Embrujo: (52/48 %) and (2) Ex-hacienda (54/46 %), and (c) two sites with less forest cover than orchard: (1) Caramécuaro (38/62 %) and (2) Las Joyas (35/65 %) (Figure 1). All locations have a comparable management history, which consisted in clearing the original forest matrix and introducing organic avocado farming by eliminating the use of synthetic insecticides. In addition, all locations are both similar in age after logging (range 15-20 years) and in size (range 60-80 ha). We made a buffer area of 1000 m radius at each location.

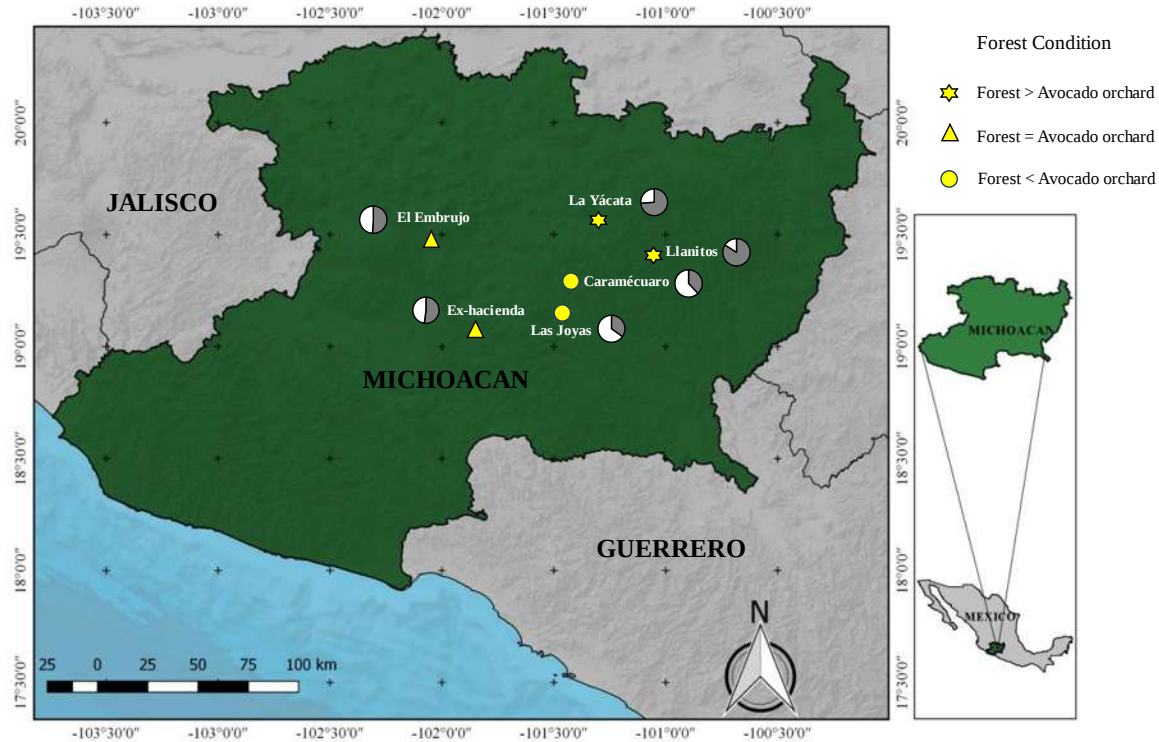


Figure 1 Distribution map of the study sites in the avocado belt in Michoacán state, México. The stars represent sites with higher forest cover. The triangles are the locations with similar proportions of forest cover and avocado orchards. The circles represent the locations with higher avocado orchard.

### Study system

*Quercus castanea* Née. It's a deciduous tree distributed from Mexico to Central America from 1,400 and 2,600 m a.s.l. Reaches up to 20 m of height with a trunk diameter of up to 60 cm. Leaves occur in the wet period (July to December) and are oblanceolate, oblong, lanceolate and obovate. Adaxial leaf surface is grayish, slightly shiny, while the adaxial part is yellowish with the presence of tomentum. Fruits are produced once a year (November to January), in groups of 2 or 3 ovoid acorns (Arizaga et al. 2009).

*Quercus obtusata* Bonpl. It's a deciduous tree endemic to Mexico, but widely distributed from 1,500 to 2600 m a.s.l., with 3 to 20 m in height. Leaves also occur in the wet period (July to December) with a green adaxial surface, shiny and tomentose base, while the abaxial part is

yellowish green hairy. Fruits are produced once a year (September to November), in groups of 2 or 3 ovoid acorns (16 to 18 mm long by 13 to 15 mm in diameter) (Arizaga et al. 2009).

#### *Leaf damage measurements by herbivorous insects and fungal pathogens*

Sampling was performed from October to December 2022 at the end of the wet period, when the maximum abundance of herbivorous insects and pathogenic activities has been accumulated. In each location, ten trees of each plant species were selected (i.e., *Q. castanea*: N= 10 per site, N = 60 in total; *Q. obtusata*: N= 10 per site, N = 60 in total). In each tree, we selected two branches from each canopy stratum (i.e., lower, medium and higher) (Maldonado-López et al. 2022) and then, 30 leaves were arbitrarily collected (N= 1800 leaves for each oak species) and photographed. The apparent injury caused by herbivorous insects and pathogenic fungi was cautiously examined on each collected leaf using ImageJ software 1.48 (Rasband 2016). The proportion of foliar area damaged by herbivorous insects and by pathogenic fungi was estimated separately for all collected leaves as (the foliar area damaged/total foliar area) \* 100 (Costa et al. 2021; Cuevas-Reyes et al. 2018) (Figure 2). After this, all leaves were separated into six different classes of area injury: (1) 0 % undamaged/leaf complete; (2) 1-5 % of foliar area injured; (3) 6-12 % of foliar area injured; (4) 13-25 % of foliar area injured; (5) 26- 50 % of foliar area injured; and (6) 50-100 % of foliar area injured (Costa et al. 2021). Three different signs of foliar damage were identified and classified: (a) foliar damage caused by herbivorous chewing insects; (b) foliar damage caused by pathogenic fungi considering leaf spots that consist of necrotic and collapsed tissue (i.e., spots with shades of orange to brown, with frequently circular and elliptical shapes) (Agrios 2005).

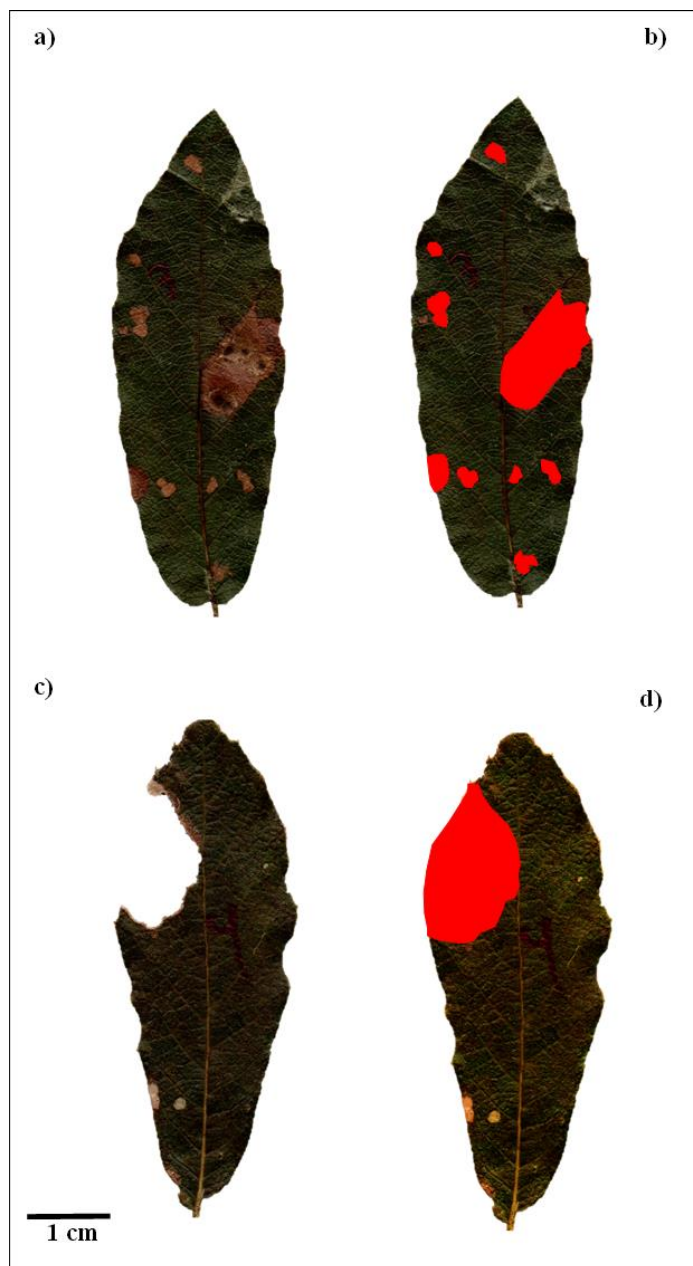


Figure 2. Leaf damage measurements by herbivorous insects and fungal pathogens for *Q. castanea* and *Q. obtusata*. a) Original leaf with fungal pathogen injury; b) Reconstructed leaf with fungal pathogen injury; c) Original leaf with herbivorous insects damage and d) Reconstructed leaf with herbivorous insects damage. The centimeter indicates the scale with which the measurements were made.

We used a pathogenic injury index per host plant (PII) and herbivore injury index per host plant (HII) (Dirzo & Domínguez 1995):  $PII \text{ or } HII = \sum (ni \times i)/n$ , where  $ni$  represent the number of leaves for each damage category,  $i$  represent the damage class, and  $n$  is the total number of leaves sampled per plant. We estimated the total injure index per plant (TII) as the  $TII = PII + HII$ .

### *Foliar functional characters analyses*

To determine the changes in foliar functional characters, we collected 30 complete leaves (without apparent injury by natural enemies) in each of the trees where the herbivorous insects and pathogenic fungi injury were estimated. We first weigh all leaves to estimate foliar fresh weight, fresh matter and foliar water content (Vaca-Sánchez et al. 2024), and then, we dry all leaves using an oven at 60 °C for 72 hours.

We determined the following foliar characters, as indicators of plant water use: (i) foliar water content [(foliar fresh mass – foliar dry mass)/foliar area] and (ii) foliar fresh mass (foliar fresh weight/ foliar area). For light acquisition, we assessed (i) chlorophyll content with a transportable chlorophyll meter SPAD-502 Minolta (Pérez-Solache et al. 2022) and (ii) specific foliar area estimated by the foliar area/ foliar dry mass ratio. Finally, for nutrient use and conservation, we determine (i) foliar area as explained above, (ii) foliar thickness using a micrometer Mitutoyo (Kawasaki, Japan), (iii) foliar density estimated by [(foliar dry mass/ foliar area) \* foliar thickness], and (iv) foliar dry matter content obtained by the proportion foliar dry mass/ foliar fresh mass (Pérez-Solache et al. 2022).

### *Statistical analyses*

To determine the independence of the locations, a spatial autocorrelation analysis using Moran's I coefficient was made. This coefficient makes it possible to identify and characterize scattered, random, or grouped land cover conformations in accord to spatial position (García-Jain et al. 2021). Moran's I coefficient values range from -1 to 1. Values close to -1 to 1 show a great spatial autocorrelation between locations, while values close to zero indicate a random spatial distribution (Fu et al. 2014; Pérez-Solache et al. 2022).

We detected Moran's I coefficient values nearby to 0 in all eight parameters associated to foliar functional characters (foliar area = -0.042, chlorophyll content = -0.046, specific foliar area = 0.086, foliar fresh matter = 0.033, foliar water content = -0.219, foliar thickness = 0.072, foliar density = -0.051, foliar dry matter content = -0.211, foliar area damaged by herbivorous insects = -0.066 and the foliar area damaged by pathogenic fungi = 0.057) for individuals of *Q. castanea* and *Q. obtusata* occurring in fragments with different forest cover and avocado orchards, corroborating the independency of our sites in all analyses (Figure S1, supplementary material).

A generalized linear mixed model (GLMM) was performed to identify the effects of the variation in the percentage of forest cover/avocado orchards on leaf functional traits, foliar area removed by herbivorous insects and foliar area injured by pathogenic fungi associated with oak species. We used a normal distribution of errors and identity function (Stokes et al. 2012). To build the model, we used the classes of the percentage of forest cover (more forest cover than orchard vs. similar forest and orchard cover vs. less forest cover than orchard), oak species (*Q. castanea* and *Q. obtusata*) and the forest cover \* oak species interaction on the eight- foliar functional characters, foliar area removed by herbivorous insects and foliar area injured by pathogens. We performed a distinct model for each dependent variable. The percentage of forest cover and oak species were used as independent variables, the locations were used as a random factor, foliar functional characters and foliar area removed by herbivorous insects and leaf area injured by pathogenic fungi were considered as dependent variables. We performed an LSMeans test for posteriori comparisons among foliar functional characters, foliar area removed by herbivorous insects and foliar area injured by pathogenic fungi, respectively (SAS 2000). We performed a Kolmogorov-Smirnov and Levene analyses to verified the homoscedasticity and normality of all foliar functional characters, foliar area removed by herbivorous insects and foliar area injured by pathogens (Aguilar-Peralta et al. 2021).

To evaluate the effects of changes in forest cover on the percentage of foliar area removed by herbivorous insects, as well as on the proportion of damaged leaves by herbivorous insects and pathogenic fungi, two-way ANOVA tests were applied respectively. The percentage of foliar area removed by herbivorous insects, and the proportion of damaged leaves by herbivorous insects and pathogens were transformed by arcsin previous to analysis.

To determine the differences in herbivore injury index (HII), pathogen injury index (PII) and total injury index (TII) between the three forest-orchard coverages classes, we applied a logistic regression analysis using CATMOD process (SAS 2000). Considering that the dependent variable data does not fit a normal distribution, we used a distribution type Poisson with a logarithmic link function. Finally, we performed a Mann–Whitney  $U$  to determine the differences in HII, PII and TII between forest-orchard coverages (Stokes et al. 2012).

We performed a logistic regression analysis applying CATMOD method for each injury index separately (SAS 2000) to evaluate the changes in the frequency of damaged leaves between the different damaged categories as well as among forest-orchard coverages.

To rule out the collinearity of our data set (i.e., between foliar functional characters), a variance inflation factor (VIF,  $V$ ) was estimated applying the standard least squares regression test (Dascălu & Cozma 2009). For all leaf functional traits analyzed, we detected multicollinearity effects only in leaf water content ( $V = 8.33$ ) and leaf density ( $V = 10.2$ ) for both oak species studied. Therefore, these leaf functional traits were not included in the multiple regression analysis and the Principal Component Analyses (PCAs). A multiple regression analysis was performed to determine the association among foliar functional characters with foliar area removed by herbivorous insects and foliar area injured by pathogens. The models considered foliar area removed by herbivorous insects and foliar area injured by pathogens as dependent variables (two separate models) and six foliar functional characters (foliar area, foliar fresh mass, specific foliar area, chlorophyll content, foliar dry matter content and foliar thickness) as independent variables (Guerra et al. 2010). We also performed PCAs separately for *Q. castanea* and *Q. obtusata* to evaluate the relationship among the six foliar functional characters, foliar area removed by herbivorous insects and foliar area injured by pathogens in the three forest/orchard coverage classes. We implemented the statistical analyses applying JMP statistical software version 15.1.0 (SAS 2000).

#### **4) RESULTS**

*Landscape effects on foliar functional characters, foliar area removed by herbivorous insects and foliar area injured by pathogens*

We detected differences in all eight foliar functional characters examined, foliar area damaged by herbivorous insects and foliar area injured by pathogens among the three different forest percentage

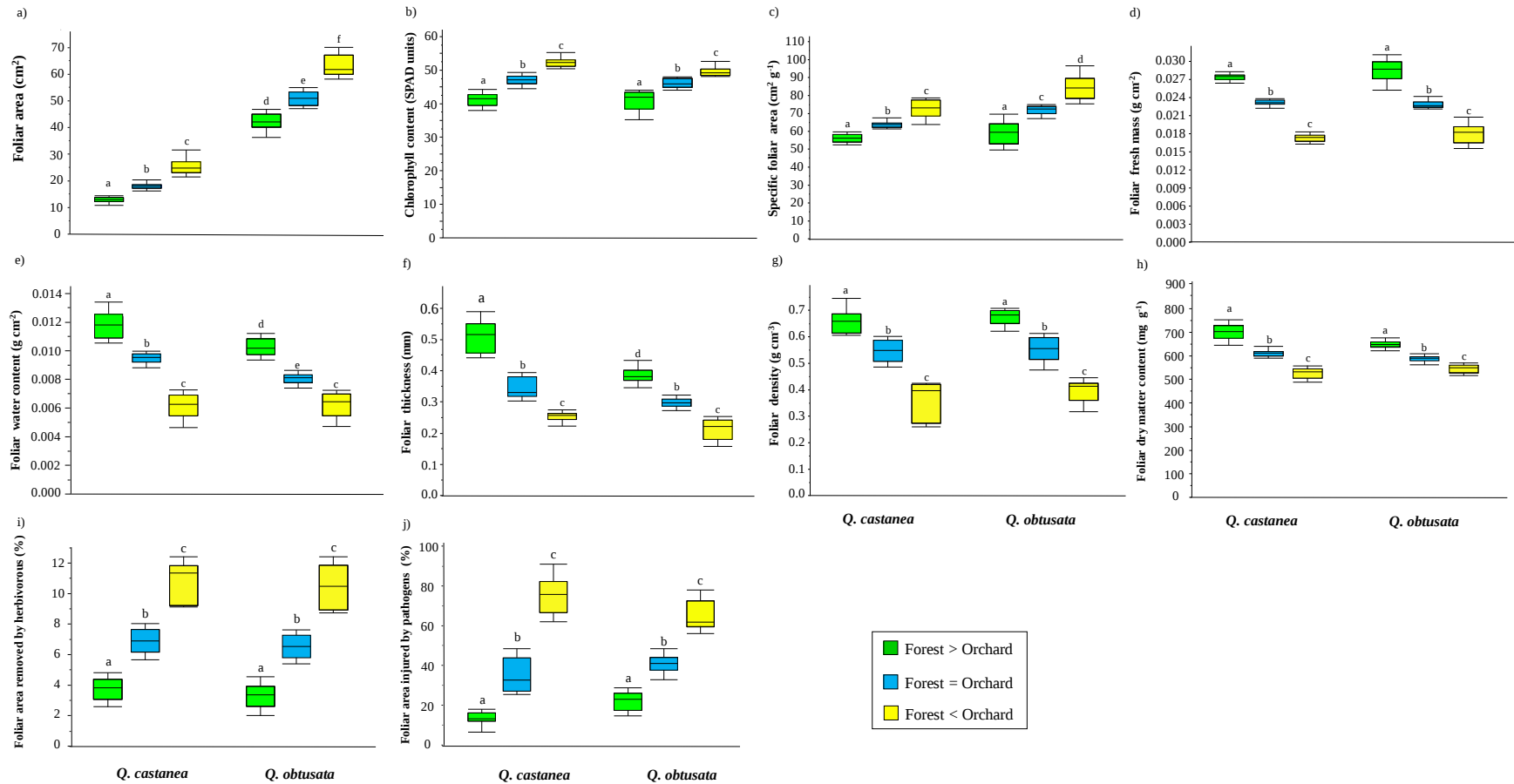
classes and between *Q. castanea* and *Q. obtusata*. We also detected a substantial effect in the forest cover \* oak species interaction for all variables with the exception of foliar area damaged by herbivorous insects (Table 1). In particular, *Quercus castanea* and *Q. obtusata* individuals occurred in locations with low forest/avocado cover proportion had higher values of foliar area, chlorophyll content, specific foliar area, foliar area damaged by herbivorous insects and foliar area injured by pathogens than individuals from locations with similar forest and orchard cover and locations with more forest cover than orchard (Figures 3a, b, c, i, j). In contrast, higher values of foliar fresh mass, foliar water content, foliar thickness, foliar density and foliar dry matter content were detected in trees from sites with high forest/avocado cover proportion (Figures 3d, e, f, g, h).

1 Table 1. Results of mixed model testing the effects of different percentages of forest cover, oak species (*Q. castanea* and *Q. obtusata*)  
2 and their interaction (Percentage Forest cover \* oak species) on leaf functional traits, leaf area removed by herbivores and leaf area  
3 damaged by pathogens.

| Response variable                          | Explanatory variables                    | Num DF | Den DF | <i>F</i> | <i>P</i> < |
|--------------------------------------------|------------------------------------------|--------|--------|----------|------------|
| Foliar area (cm <sup>2</sup> )             | Percentage of forest cover               | 1      | 4      | 43.92    | 0.001*     |
|                                            | Oak species                              | 1      | 112    | 3754.50  | 0.0001*    |
|                                            | Percentage of forest cover * oak species | 1      | 112    | 40.65    | 0.001*     |
| Chlorophyll content (SPAD units)           | Percentage of forest cover               | 1      | 3.9    | 297.35   | 0.0001*    |
|                                            | Oak species                              | 1      | 112    | 22.05    | 0.0001*    |
|                                            | Percentage of forest cover * oak species | 1      | 112    | 14.98    | 0.0002*    |
| Foliar thickness (mm)                      | Percentage of forest cover               | 1      | 4      | 67.20    | 0.001*     |
|                                            | Oak species                              | 1      | 112    | 92.05    | 0.0001*    |
|                                            | Percentage of forest cover * oak species | 1      | 112    | 24.15    | 0.0001*    |
| Foliar water content (g cm <sup>-2</sup> ) | Percentage *forest cover                 | 1      | 4      | 37.36    | 0.003*     |
|                                            | Oak species                              | 1      | 112    | 33.79    | 0.0001*    |
|                                            | Percentage of forest cover * oak species | 1      | 112    | 11.23    | 0.0001*    |
| Foliar fresh mass (g cm <sup>-2</sup> )    | Percentage of forest cover               | 1      | 4      | 44.29    | 0.002*     |
|                                            | Oak species                              | 1      | 112    | 21.89    | 0.0001*    |

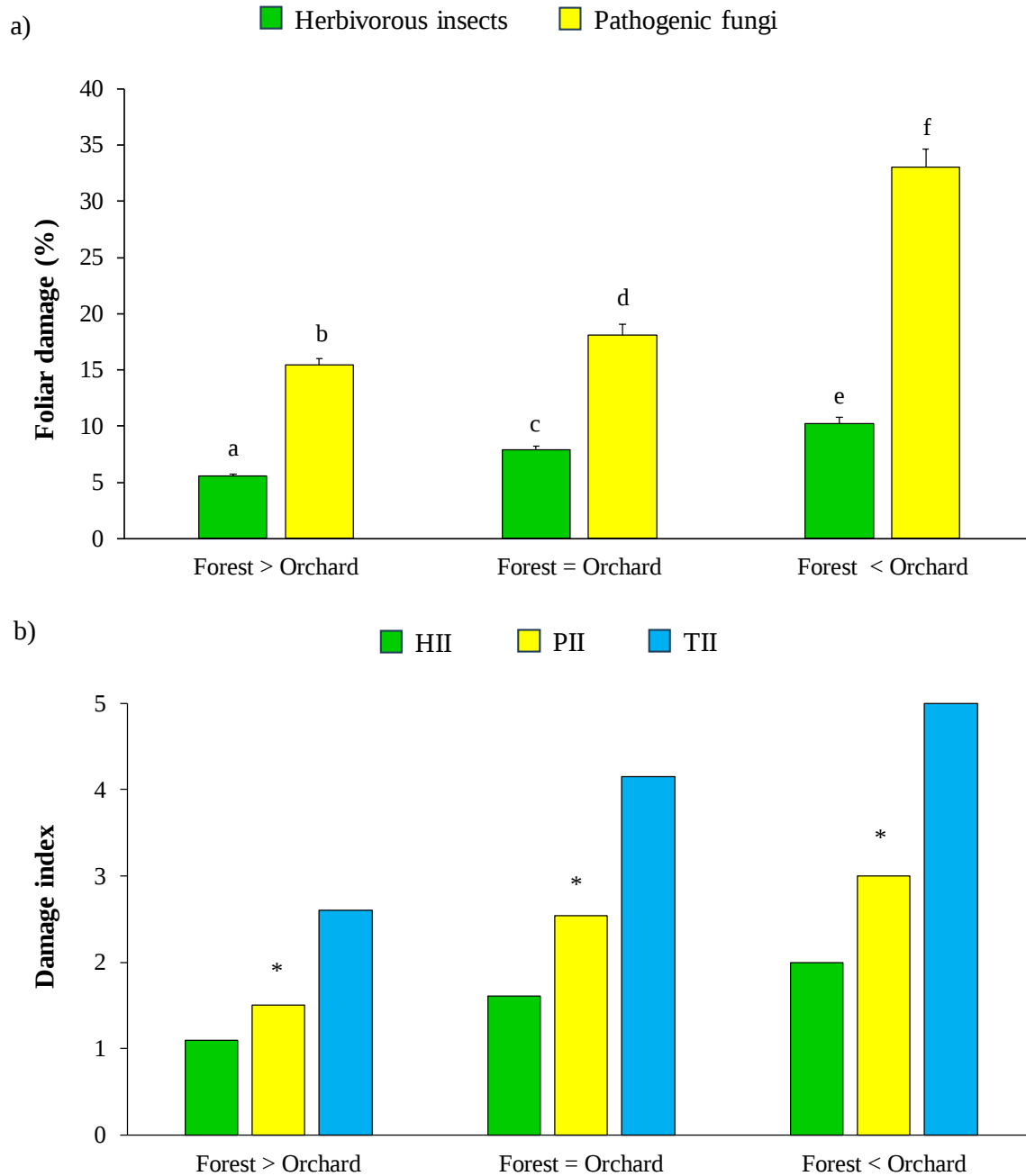
|                                                             |                                          |   |     |       |         |
|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------|---|-----|-------|---------|
|                                                             | Percentage of forest cover * oak species | 1 | 112 | 10.29 | 0.001*  |
| Specific Foliar area (cm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )     | Percentage of forest cover               | 1 | 4   | 61.04 | 0.0001* |
|                                                             | Oak species                              | 1 | 112 | 46.23 | 0.0001* |
|                                                             | Percentage of forest cover * oak species | 1 | 112 | 10.91 | 0.0001* |
| Foliar density (g.cm <sup>-3</sup> )                        | Percentage of forest cover               | 1 | 4   | 52.79 | 0.001*  |
|                                                             | Oak species                              | 1 | 112 | 6.22  | 0.001*  |
|                                                             | Percentage of forest cover * oak species | 1 | 112 | 4.011 | 0.04*   |
| Foliar dry matter content (g <sup>2</sup> cm <sup>2</sup> ) | Percentage of forest cover               | 1 | 3.9 | 99.29 | 0.0006* |
|                                                             | Oak species                              | 1 | 112 | 13.42 | 0.0004* |
|                                                             | Percentage of forest cover * oak species | 1 | 112 | 35.89 | 0.0001* |
| Foliar area removed by herbivores (%)                       | Percentage of forest cover               | 1 | 4   | 59.13 | 0.001*  |
|                                                             | Oak species                              | 1 | 112 | 11.54 | 0.0009* |
|                                                             | Percentage of forest cover * oak species | 1 | 112 | 5.21  | 0.04    |
| Foliar area damaged by pathogens (%)                        | Percentage of forest cover               | 1 | 4   | 29.37 | 0.005*  |
|                                                             | Oak species                              | 1 | 112 | 8.96  | 0.009*  |
|                                                             | Percentage of forest cover * oak species | 1 | 112 | 35.57 | 0.0001* |

\*Significant values  $P < 0.05$



## *Patterns of foliar damage by herbivorous insects and pathogens*

Total leaf area damaged by herbivorous insects and leaf area injured by pathogens differed significantly among forest orchard cover classes (see Table 1). In the first case, levels of leaf area damaged by herbivorous insects were higher in locations with less forest cover than orchard followed by locations with similar forest and orchard cover and locations with more forest cover than orchard ( $F = 121.3$ ; d.f. = 2;  $P < 0.001$ ) (Figure 4a). Similarly, foliar area injured by pathogens was higher in trees occurring in locations with less forest cover than orchard in both oak species, decreasing as forest cover increases ( $F = 111.4$ ; d.f. = 2;  $P < 0.001$ ) (see Figure 4a). Furthermore, we observed significant differences in the levels of HII, PII and TII among the three forest/avocado cover classes ( $\chi^2 = 124.1$ ; d.f. = 2;  $P < 0.0001$ ). *Q. castanea* and *Q. obtusata* individuals showed higher levels of HII ( $\chi^2 = 213.3$ ; d.f. = 2;  $P < 0.002$ ), PII ( $\chi^2 = 127.6$ ; d.f. = 2;  $P < 0.001$ ), and TII ( $\chi^2 = 139.4$ ; d.f. = 2;  $P < 0.001$ ) in locations with low forest/avocado cover proportion followed by sites with similar and high forest/avocado cover proportions (Figure 4b).



25

26 Figure 4 Patterns of foliar damage by herbivorous insects and pathogens. (a) Differences in

27 herbivory levels and foliar pathogen injury between the three forest-orchard covers in accordance

28 with the mixed-effect models. Different letters indicate significant differences according to the

29 LSMeans test test ( $P < 0.05$ ). (b) Comparison of herbivore injury index (HII), pathogen injury

30 index (PII) and total injury index (TII) among the different forest/orchard coverages. The asterisk

31 indicates significant differences according a Mann–Whitney test ( $P < 0.05$ ).

*Frequency of distribution of herbivore injury index (HII) and pathogen injury index (PII)*

We found significant differences in HII among the six damage categories ( $\chi^2 = 341.4$ ; d.f. = 4;  $P < 0.0001$ ) and between forest cover classes ( $\chi^2 = 217.7$ ; d.f. = 2;  $P < 0.0001$ ) (Figure 5a). Particularly, the most frequent category of leaf damage was index 2 (1-5%) in *Q. castanea* and *Q. obtusata* for all forest cover classes (Figure 4a). However, the categories 3 (6-12 %), 4 (13-25%) and 5 (26-50%) increased as forest cover decreased (Figure 5a). Similarly, significant differences frequency of leaves among categories were observed for the PII ( $\chi^2 = 132.4$ ; d.f. = 4;  $P < 0.0001$ ) and among forest cover classes ( $\chi^2 = 136.5$ ; d.f. = 2;  $P < 0.001$ ) (Figure 5b). The low-damage categories (2 to 4) were more frequent in sites with similar and high forest/avocado cover proportions for both oak species, whereas the categories of greatest damage (5 and 6) were the more predominant in sites with low forest/avocado cover proportion (Figure 5b).

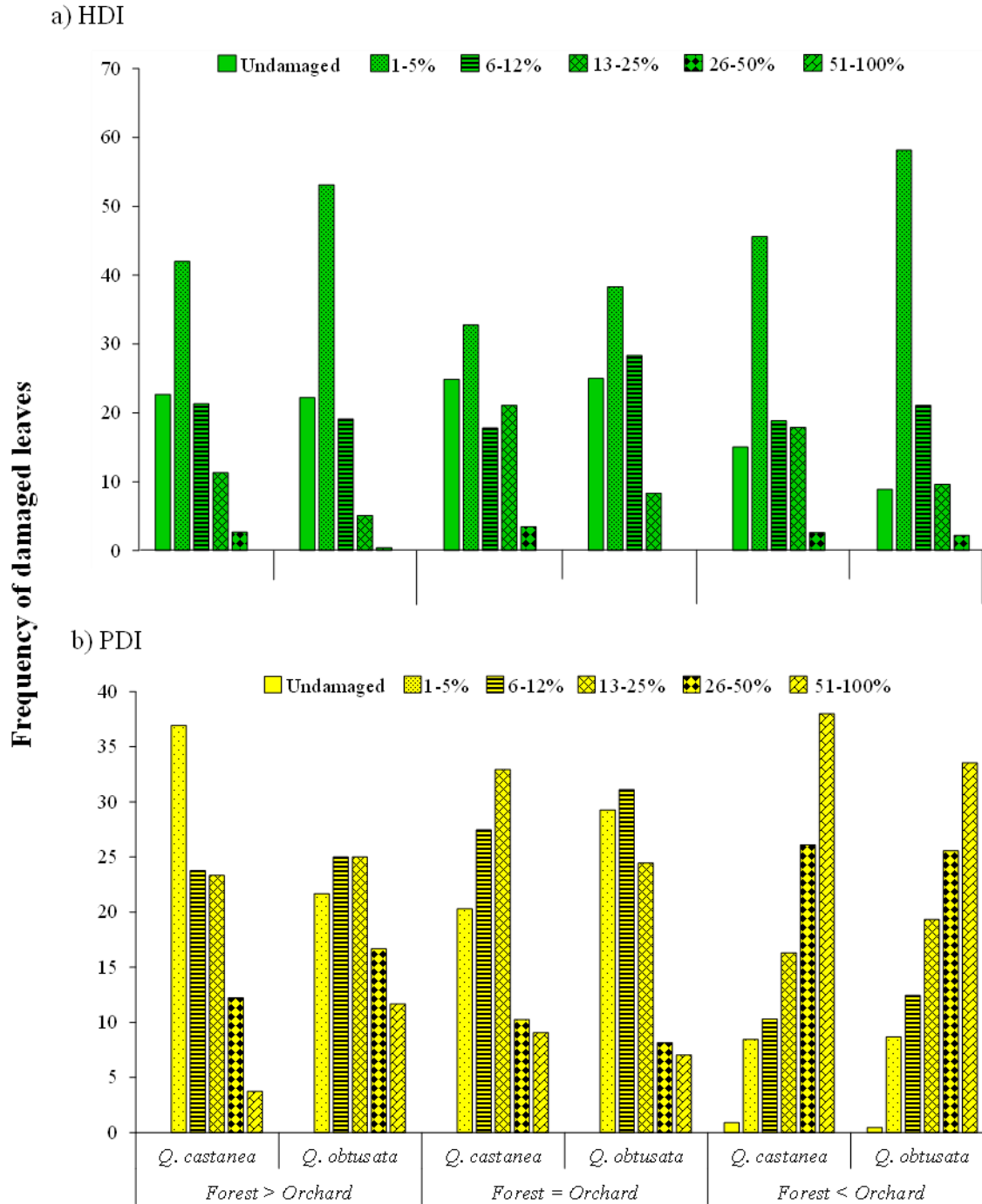
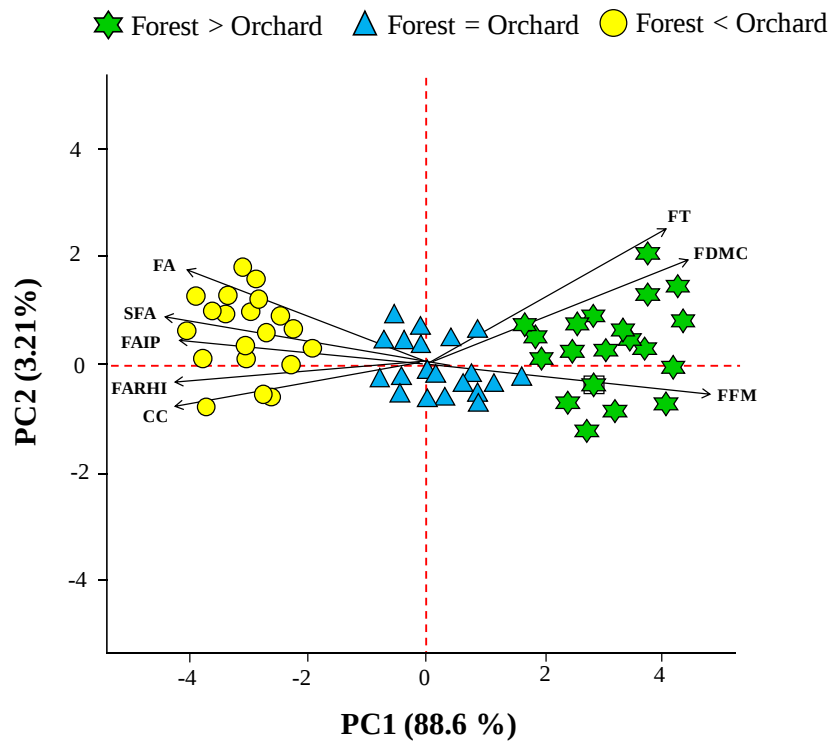


Figure 5 Frequency of distribution of herbivore injury index (HII) and pathogen injury index (PII) of *Quercus castanea* and *Q. obtusata*. Categories of damage were as follows: classes of area injury: (1) 0 % undamaged/leaf complete; (2) 1-5 % of foliar area injured; (3) 6-12 % of foliar area injured; (4) 13-25 % of foliar area injured; (5) 26- 50 % of foliar area injured; and (6) 51-100 % of foliar area injured.

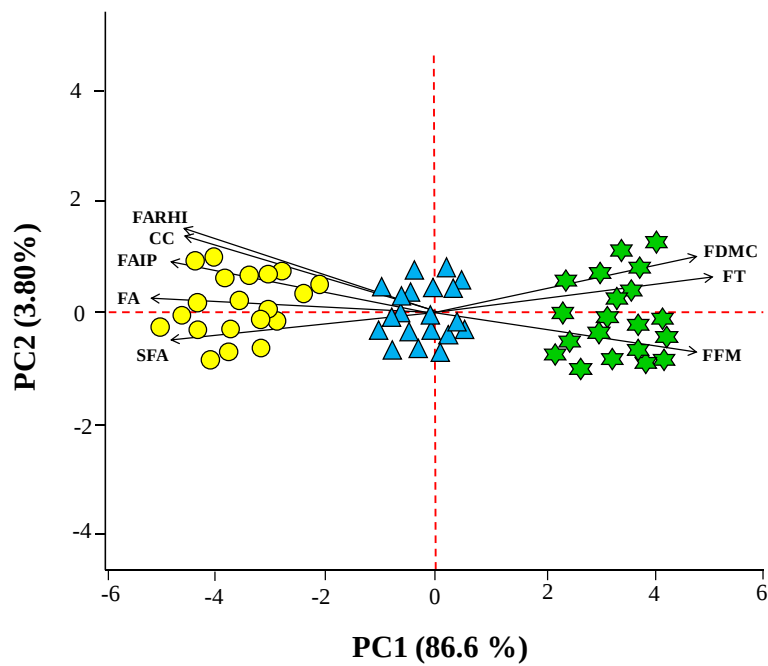
50 *Relationships among foliar functional characters, foliar area damaged by herbivorous insects and*  
51 *foliar area injured by pathogens*

52 The PC axis-1 and axis-2 of leaf functional traits, foliar area damaged by herbivorous insects and  
53 foliar area injured by pathogens for *Q. castanea* accounted for 88.6 % and 3.2 % of total variance,  
54 respectively, and separated three main groups: (i) individuals from locations of low forest/avocado  
55 cover proportion showed an association with foliar area, specific foliar area, chlorophyll content,  
56 foliar area damaged by herbivorous insects and foliar area injured by pathogens, located in the left  
57 of the PCA biplot ; (ii) individuals of locations with similar forest/avocado cover proportion were  
58 located at the center; and (iii) individuals of locations with high forest/avocado cover proportion  
59 were located in the right of the PCA biplot associated with foliar thickness, foliar dry matter  
60 content, foliar water content and foliar fresh mass (Figure 6a). Similarly, in PCA of *Q. obtusata*,  
61 the scores of the axes 1 and 2 described the 87.6 % and 3.8 % of overall variance, separately (Figure  
62 6b), showing the same separation pattern observed for *Q. castanea* (Figure 6b).

a)



b)



63

64 Figure 6 Results of principal component analysis of foliar functional characters, foliar damage by  
 65 herbivorous insects and pathogens between different forest/orchard coverages in a) *Quercus*

*castanea* and b) *Quercus obtusata*. Foliar area (FA), chlorophyll content (CC), foliar thickness (FT), specific foliar area (SFA), foliar dry matter content (FDMC), foliar fresh mass (FFM), foliar area removed by herbivorous insects (FARHI) and foliar area injured by pathogens (FAIP).

According of multiple regression analysis, we detected positive relationships of both foliar area damaged by herbivorous insects (Full model=  $R^2 = 0.69$ ;  $d.f. = 53$ ;  $F = 34.2$ ;  $P < 0.001$ ) and foliar area injured by pathogens (Full model=  $R^2 = 0.71$ ;  $d.f. = 53$ ;  $F = 51.56$ ;  $P < 0.001$ ) with acquisitive foliar characters: foliar area, chlorophyll content and specific foliar area for *Q. castanea*. Contrary, a negative relationship was detected between foliar area damaged by herbivorous insects and foliar area injured by pathogens with conservative foliar characters: foliar thickness, foliar fresh mass and foliar dry matter content (Table 2a). For *Q. obtusata*, the multiple regression indicated a similar trend, showing positive relationships of foliar area damaged by herbivorous insects (Full model:  $R^2 = 0.77$ ;  $d.f. = 53$ ;  $F = 44.2$ ;  $P < 0.001$ ) and foliar area injured by pathogens (Full model:  $R^2 = 0.81$ ;  $d.f. = 53$ ;  $F = 71.56$ ;  $P < 0.001$ ) with acquisitive foliar characters (i.e. foliar area, chlorophyll content and specific foliar area) and negative relationships with conservative foliar characters (foliar thickness, foliar fresh mass and foliar dry matter content) (Table 2b).

83 Table 2. Multiple regressions test of foliar area removed by herbivorous insects, foliar area injured by pathogens against foliar functional  
84 characters with percentages of forest cover.

| a) <i>Q. castanea</i>                 |                           |       |        |      |         |
|---------------------------------------|---------------------------|-------|--------|------|---------|
| Variable response                     | Explanatory variable      | $R^2$ | $d.f.$ | $F$  | $P <$   |
| Foliar area removed by herbivores (%) | Foliar area               | 0.82  | 1      | 31.6 | 0.0001* |
|                                       | Specific foliar area      | 0.85  | 1      | 35.2 | 0.0001* |
|                                       | Chlorophyll content       | 0.85  | 1      | 26.6 | 0.0001* |
|                                       | Foliar fresh mass         | -0.86 | 1      | 39.4 | 0.0001* |
|                                       | Foliar dry matter content | -0.83 | 1      | 46.4 | 0.0001* |
|                                       | Foliar thickness          | -0.78 | 1      | 34.6 | 0.0001* |
| Foliar area injured by pathogens (%)  | Foliar area               | 0.85  | 1      | 12.7 | 0.0001* |
|                                       | Specific foliar area      | 0.92  | 1      | 49.7 | 0.0002* |
|                                       | Chlorophyll content       | 0.82  | 1      | 16.6 | 0.0001* |
|                                       | Foliar fresh mass         | -0.84 | 1      | 19.4 | 0.0001* |
|                                       | Foliar dry matter content | -0.91 | 1      | 26.4 | 0.0001* |
|                                       | Foliar thickness          | -0.89 | 1      | 14.6 | 0.0004* |
| b) <i>Q. obtusata</i>                 |                           |       |        |      |         |
| Variable response                     | Explanatory variable      | $R^2$ | $d.f.$ | $F$  | $P <$   |
| Foliar area removed by herbivores (%) | Foliar area               | 0.75  | 1      | 22.7 | 0.0001* |
|                                       | Specific foliar area      | 0.79  | 1      | 29.7 | 0.0001* |
|                                       | Chlorophyll content       | 0.79  | 1      | 26.6 | 0.0001* |

|                                      |                           |       |   |      |         |
|--------------------------------------|---------------------------|-------|---|------|---------|
|                                      | Foliar fresh mass         | -0.81 | 1 | 19.4 | 0.0001* |
|                                      | Foliar dry matter content | -0.85 | 1 | 26.4 | 0.0002* |
|                                      | Foliar thickness          | -0.83 | 1 | 14.6 | 0.0004* |
| Foliar area injured by pathogens (%) | Foliar area               | 0.86  | 1 | 24.1 | 0.0001* |
|                                      | Specific foliar area      | 0.89  | 1 | 19.7 | 0.0002* |
|                                      | Chlorophyll content       | 0.90  | 1 | 36.6 | 0.0001* |
|                                      | Foliar fresh mass         | -0.94 | 1 | 39.4 | 0.0001* |
|                                      | Foliar dry matter content | -0.83 | 1 | 26.4 | 0.0002* |
|                                      | Foliar thickness          | -0.82 | 1 | 24.6 | 0.0001* |

---

\*Significant values  $P < 0.05$

## 5) DISCUSSION

*Landscape effects on foliar functional characters, foliar area damaged by herbivorous insects and foliar area injured by pathogens.*

Foliar functional characters shape plant responses associated with changes in environmental conditions, influencing plant fitness and thus having important consequences on ecosystem functions and biotic interactions (Gong et al. 2023). We detected differences in foliar functional characters between locations with different forest cover and avocado orchards for *Q. castanea* and *Q. obtusata*. Individuals from locations with more forest cover than orchard exhibited greater foliar thickness, foliar density, foliar dry matter content (i.e., conservative characters), leaf fresh mass and leaf water content (i.e., acquisitive traits) for both species. Instead, *Q. castanea* and *Q. obtusata* individuals from locations with higher percentage of avocado orchards displayed higher chlorophyll content, foliar area and specific foliar area (i.e., acquisitive characters), as well as higher foliar area removed by herbivorous insects (FARHI) and foliar area injured by pathogens (FAIP). These results are consistent with the “leaf economics spectrum” (LES) (Wright et al. 2004), which states that variation in foliar characters within species reflects a gradient in resource-use from conservative to acquisitive strategies (e.g., Hayes et al. 2019; Martin et al. 2018). Oaks occurring in locations with less forest cover than avocado orchard had greater soil nutrient availability such as nitrogen, magnesium and phosphates (Vaca-Sánchez et al. 2024), leading to acquisitive foliar characters (i.e., high foliar area, specific foliar area, chlorophyll content), affecting plant-insect interactions. Some studies indicate that agrosystems, including polycultures, favor nutrient capture and recycling processes, leading to an improvement in carbon sequestration and storage, as well as the hydrological cycle, increasing soil fertility and nutrient availability for plants (Isaac et al. 2017; Kimaro et al. 2011).

We observed that *Q. castanea* and *Q. obtusata* individuals displayed higher foliar herbivory damage in locations with less forest cover than avocado orchard. This result is in line with the “The plant vigor hypothesis” (Price 1991), which states that insect herbivores show a greater preference for feeding on larger plants with more vigorous growth (i.e., acquisitive traits) due to their higher nutritional quality. This agrees with other studies that have documented higher levels of herbivory as forest fragmentation increases (García-Jain et al. 2021; Maldonado-López et al. 2015; Pérez-Solache et al. 2022); suggesting that small forest

fragments (i.e., locations with higher percentage of avocado orchards in the landscape) experience more drastic environmental changes than larger fragments, resulting in an increase on plant quality (e.g., canopy cover) and more acquisitive foliar characters (e.g. specific foliar area, foliar area, chlorophyll content). In addition, as result of the avocado areas increase water and nutrient availability for oaks due to irrigation and nutrient addition in crops. Thus, these plant tissues represent resources of high nutritional value for insect herbivores (García-Jain et al. 2021; Maldonado-López et al. 2015; Vaca-Sanchez et al. 2024). Additionally, our results of multiple regressions tests, indicated a strong positive relationship among herbivory and leaf area, specific leaf area, chlorophyll content and leaf fresh mass (e.g., acquisitive characters), but a negative relationship with foliar thickness and foliar dry matter content; which are associate with plant defense against herbivorous insects.

In an earlier study, Pérez-Solache et al. (2022) detected that the trees growing in locations with higher orchard cover had higher quantity and quality of tree resources for herbivorous insects. This fact could be associated with the higher herbivory values in these locations. Therefore, lower levels of herbivory in trees from locations with low orchard cover (i.e., high forest cover) suggests a resource conservation strategy, with higher resources allocation to plant defense against herbivorous insects (e.g., increased leaf thickness and chemical defense production) (Stevens et al. 2016). An alternative explanation is the fact that herbivorous insect abundance increases with forest fragmentation due to the loss or decrease of natural enemies such as parasitoids and predators (i.e., top-down effects) (García-Jain et al. 2022; Pfeifer et al. 2017). Some studies have documented that organisms of higher trophic levels are more susceptible to forest fragmentation effects as a result of greater resource requirements and forest cover (e.g., locations with higher orchard cover) than lower trophic-level organisms (Martinson & Fagan 2014; Murphy et al. 2016; Rossetti et al. 2017; Slattery & Fenner 2021).

The multiple regression models also exhibited a positive association among foliar area injured by pathogens and foliar area, specific foliar area, chlorophyll content, and a negative relationship with foliar characters associated with plant defense (e.g., foliar thickness and foliar dry matter content). It has been suggested that foliar thickness and density can limit the penetration and proliferation of pathogens in the mesophyll tissue (Van Bael et al. 2017).

Therefore, we could expect a negative association between foliar density and foliar area injured by pathogens. Our results also showed a positive relationship between herbivory and pathogen damage, both being higher in sites with higher orchard cover. Kluth et al. (2002) found that insect herbivores had significantly increased the infection rate by pathogens in healthy plants after consuming infected leaves, suggesting that herbivores can carry spores and increase the possibility of fungal infections in healthy plants. This is in accordance with our results, where trees of *Q. castanea* and *Q. obtusata* present in locations with less forest cover than avocado orchards experience greater foliar damage by herbivorous insects, which could make them more susceptible to infections by pathogens in these sites.

#### *Patterns of foliar damage by herbivorous insects and pathogens*

We detected higher levels of foliar area injured by pathogenic fungi than herbivorous insects in hosts from the three different forest/avocado cover classes, increasing in locations with higher percentages of avocado orchards. Our findings are consistent with the described by Wang et al. (2021), who carried out a study in a landscape mosaic of riparian forest fragments of *Populus* species which are intermixed with different types of agricultural lands. They found that *P. laurifolia* and *P. alba* individuals had higher frequency of foliar injury produced by pathogenic fungus (44.88%) than foliar damage produced by herbivores (19.1%) in the small forest fragments. This could be explained by a low concentration of chemical defenses in these plants as a result of a synergistic effect between herbivorous insects and pathogenic fungi, which can modify the biochemical defense pathways of plants to their own benefit (McDowell & Simon 2008; Rostás et al. 2003; Zarate et al. 2007). The simultaneous co-occurrence of herbivorous insects and pathogenic fungus negatively affects plants, influencing different metabolic ways, decreasing plant performance, and thus, changing the structure of the plant population (Berger et al. 2008; Myers & Sarfraz 2017). Furthermore, simultaneous pathogens and insect herbivore attacks can not only affect host plant, but it also affects other subsequent attackers as a result of induced responses (Van Dijk et al. 2022), indicating that the impact of natural enemies does not always go in the same direction, having certain asymmetry in attacker's responses (Kaplan & Denno 2007).

*Relationships among foliar functional characters, foliar area damaged by herbivorous insects and foliar area injured by pathogens.*

We detected a positive association between leaf damage by herbivores and pathogen infection in all our study areas. This could indicate systemic susceptibility in both oak species, leading to increased infection by pathogens associated with increased damage by herbivores. Furthermore, it is known that the fungal infection can either increase or decrease the nutrient availability (e.g., amount and distribution), influencing herbivorous insects performance (Fernandez-Conradi et al. 2018). On the other hand, it has been proposed that the interaction between herbivorous insects and phytopathogenic fungi on the same host plant can be altered by variations in foliar functional characters of their host plants, affecting the defense against insect herbivores and phytopathogenic fungi (Castagneyrol et al. 2017). Some studies have indicated that slender leaves, which exhibit fewer structural and chemical complexity, but higher nutritional quality, tend to be more susceptible to fungal establishment in comparison with well-defended thick leaves (González-Teuber et al. 2019, 2021). This agrees with our results, where *Q. castanea* and *Q. obtusata* individuals present in the locations with higher percentage of avocado orchards display a positive correlation between foliar damage by chewing herbivorous insects and pathogenic fungus with foliar area, specific foliar area, and chlorophyll content.

Instead, we found a negative association among herbivory levels and pathogen injury with foliar thickness, corroborating what has been described by González-Teuber et al. (2021) and Onoda et al. (2011). Thus, our findings can be explained by the fact that leaves found in locations with more forest cover than orchard are thicker and, therefore, less palatable to herbivores, reducing their level of damage in those locations. Numerous studies have identified some foliar functional characters such as specific foliar area (Agrawal & Fishbein 2006; Ruiz-Carbayo et al. 2020), chlorophyll content and foliar thickness (Aguilar-Peralta et al. 2021; Costa et al. 2021) as the major drivers of intraspecific variation in insect herbivory and pathogen attack (Cornelissen et al. 2003). Moreover, in our case the foliar dry matter content showed a negative association with herbivory and pathogen damage. This fact can be explained due leaves with high levels of foliar dry matter content have a tendency to be hard, being more resistant to herbivory and pathogenic fungi attack (Blumenthal et al. 2020;

Jager et al. 2015; Pérez-Harguinegy et al. 2016). Our results suggest that physiological and morphological changes in leaf functional traits affect the population dynamics and the community structure of herbivorous insects and pathogenic fungi (Fonseca et al. 2000; González-Teuber et al. 2021; Poorter et al. 2004). Thus, our study provides evidence that foliar functional characters are essential regulators of tri-trophic interactions involving plants, herbivorous insects and pathogenic fungus (Schöb et al. 2013; Van Dijk et al. 2022).

## **6) CONCLUSIONS**

Our findings provide valuable information on the ecosystem functioning in temperate forests and agrosystems in Mexico, with evidence that fragmentation has a significant and possibly detrimental impact on *Q. castanea* and *Q. obtusata* fitness as avocado cover increases in relation to forests. These changes alter leaf functional traits and increase leaf damage by herbivores and pathogens. Our study is one of the first to elucidate the functional effects of land-use change from temperate forests to avocado orchards, specifically focusing on foliar characteristics of *Quercus* species and their interactions with herbivorous insects and pathogenic fungus. Therefore, landscape management based on functional trait data from local species is necessary to identify both the potential relative abundances of oaks, as well as monitor the ecosystem services provided by *Quercus* species in fragmented, environmentally deteriorated and transformed landscapes.

## **Acknowledgments**

Méndez-Solórzano is a doctoral student from the Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) and was supported by CONACyT (scholarship no. 732728). Cuevas-Reyes thanks the avocado producers for their permission to perform this study.

## 7) SUPPLEMENTARY MATERIAL

Co-occurrence of insect herbivores and foliar pathogens in oak species along a Mexican avocado agrosystems mosaic: the importance of leaf functional traits

María Isabel Méndez-Solórzano<sup>1</sup>, Yurixhi Maldonado-López<sup>2</sup>, Ken Oyama<sup>3</sup>, Mário M. Espírito-Santo<sup>4</sup>, Marcela Sofía Vaca-Sánchez<sup>3</sup>, Magno Augusto Zazá Borges<sup>4</sup>, Fagundes Marcílio<sup>4</sup>, Pablo Cuevas-Reyes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Ecología de Interacciones Bióticas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, C.P. 58030 Morelia, Michoacán, México.

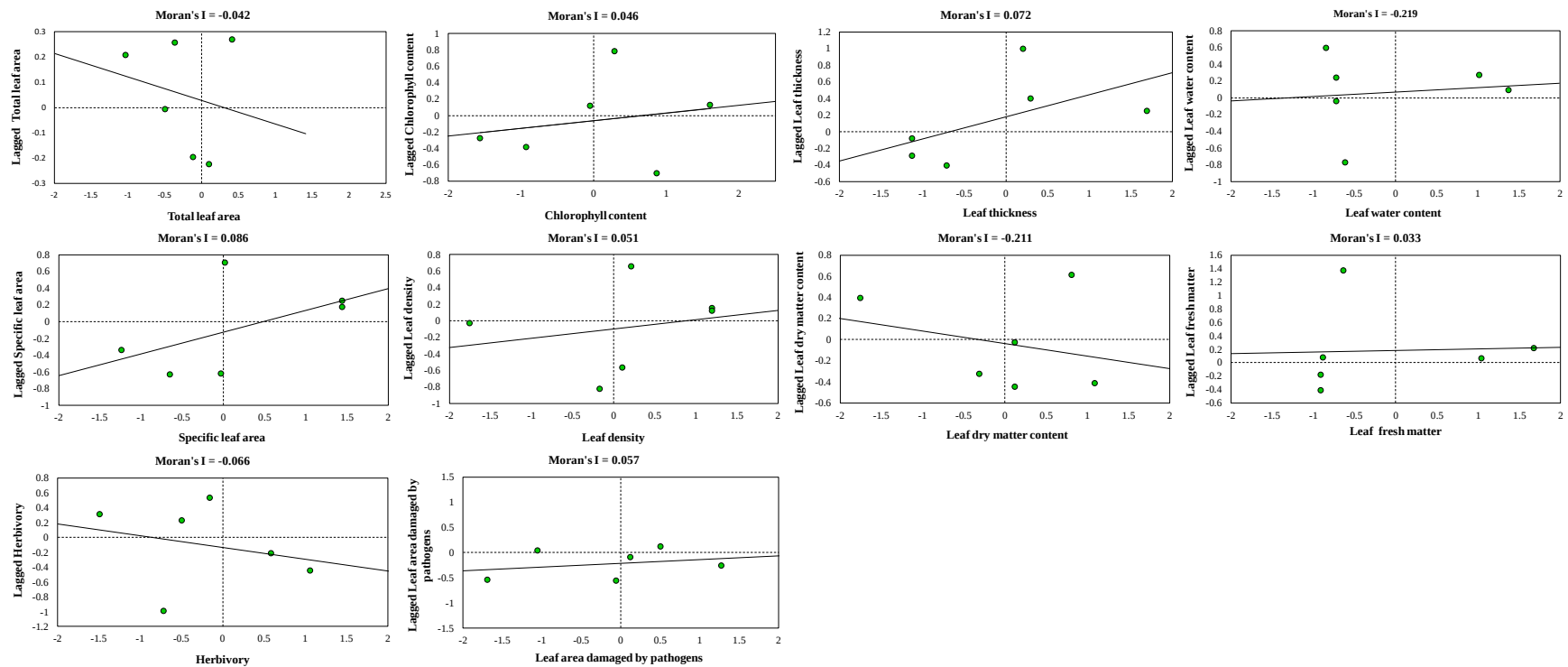
<sup>2</sup>Cátedras CONACYT-Instituto de Investigaciones Sobre los Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.

<sup>3</sup>Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad Morelia, Universidad Nacional Autónoma de México, Morelia, Michoacán, México.

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Uso dos Recursos Naturais, Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Montes Claros, 39401-089, Montes Claros, MG, Brazil.

\*Corresponding author [pcragalla@gmail.com](mailto:pcragalla@gmail.com)

Figure S1 Graphic representation of scatter plots of values of Moran index of each response variable analyzed in all study sites. The x-axis is represented by the original variable studied, the y-axis represents the spatially lagged variable, and the slope of the linear fit is the value of Moran's coefficient according to Bonada et al. (2012).



## B. CAPÍTULO II

Este artículo está publicado en la revista Diversity 2026, 18(2), 125; <https://doi.org/10.3390/d18020125>:

### **CULTIVABLE FOLIAR ENDOPHYTIC FUNGAL COMMUNITY IN ENDEMIC MEXICAN *QUERCUS* SPECIES ACROSS A FOREST–AVOCADO ORCHARD LANDSCAPE**

**María Isabel Méndez-Solórzano<sup>1</sup>, Ken Oyama<sup>2,\*</sup>, Pablo Cuevas-Reyes<sup>3</sup>, Yurixhi Maldonado-López<sup>4</sup>, Gerardo Vázquez-Marrufo<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup> Laboratorio de Conservación y Biotecnología Microbiana, Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Col. La Palma, Tarímbaro 58893, Michoacán, México; [isabel.mendez.solorzano@umich.mx](mailto:isabel.mendez.solorzano@umich.mx); [gerardo.marrufo@umich.mx](mailto:gerardo.marrufo@umich.mx)

<sup>2</sup> Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Morelia, Universidad Nacional Autónoma de México (ENES-Morelia, UNAM). Antigua Carretera a Pátzcuaro 8701, Ex-Hacienda de San José de la Huerta, 58190, Morelia, Michoacán, México; [kenoyama@enesmorelia.unam.mx](mailto:kenoyama@enesmorelia.unam.mx)

<sup>3</sup> Laboratorio de Ecología de Interacciones Bióticas, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Morelia 58030, Michoacán, México. [pcragalla@gmail.com](mailto:pcragalla@gmail.com)

<sup>4</sup> Cátedras CONACYT-Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Avenida San Juanito Itzicuaró SN, Nueva Esperanza, 58330, Michoacán, México; [yurixhi.maldonado@umich.mx](mailto:yurixhi.maldonado@umich.mx)

\* Correspondence: [kenoyama@enesmorelia.unam.mx](mailto:kenoyama@enesmorelia.unam.mx) (K. O.); [gerardo.marrufo@umich.mx](mailto:gerardo.marrufo@umich.mx) (G. V. M.)

## 1) ABSTRACT

Temperate oak forests are biodiversity-rich ecosystems, and Mexico is a significant center of species diversification for *Quercus*, with high endemism. In Michoacán (central Mexico), the rapid expansion of avocado cultivation has reduced oak forest cover and increased landscape fragmentation. Foliar endophytic fungi can contribute to host performance under biotic and abiotic stress, yet their diversity in Mexican endemic oaks and their response to land-use change remain poorly characterized. Here, we assessed the cultivable foliar endophytic fungal community of *Quercus castanea* and *Quercus obtusata* along a forest–avocado orchard cover gradient. We isolated 112 endophytic fungal strains from leaves of *Q. castanea* (n = 56) and *Q. obtusata* (n = 56). All isolates belonged to Ascomycota and were assigned to four classes, 10 orders, and 32 genera based on nrITS sequences and genus-level phylogenetic placement. The most abundant genera were *Nigrospora* (8%), *Xylaria* (7%), *Nodulisporium* (6%), and *Daldinia* (6%). Genus exclusivity patterns and Margalef's richness index indicated higher diversity in forest-dominated landscapes than in orchard-dominated sites. These results suggest that converting oak forests to avocado orchards may be associated with changes in the structure of cultivable foliar endophytic fungal communities of oak species. Further work combining culture-dependent and culture-independent approaches is needed to evaluate functional consequences for host health and resilience.

**Keywords:** *Quercus castanea*; *Quercus obtusata*; foliar endophytic fungi; cultivable fungi; land-use change; avocado orchards; endemic oaks

## 2) INTRODUCTION

Temperate forests are among the most widely distributed natural ecosystems, covering approximately 16–26% of the global forested area [1-3]. These ecosystems are ecologically significant for their high biodiversity and their role as the primary global association of pines (*Pinus* spp.) and oaks (*Quercus* spp.) [4]. In Mexico, temperate forests are the second most extensive vegetation type, covering 16.96% of the national territory [5], and host exceptional plant diversity, including 55 pine species and 161 oak species [6]. Beyond their floristic richness, these forests provide essential ecosystem services, including carbon sequestration, soil stabilization, water regulation, and habitat for a wide range of organisms [7].

Despite their ecological importance, temperate forests face growing threats from deforestation and land-use change linked to timber extraction, urban expansion, livestock grazing, and agricultural intensification. In Mexico, these pressures have intensified over the past few decades, resulting in substantial forest loss and fragmentation [8, 9]. These transformations alter landscape structure and microclimatic conditions, disrupt biogeochemical cycles, degrade soils, and lead to biodiversity loss across multiple trophic levels [10]. Although the effects of land-use change on vegetation structure and the diversity of vertebrates and invertebrates are increasingly documented, its consequences for microbial biodiversity, particularly plant-associated fungi, remain comparatively understudied.

In central Mexico, the state of Michoacán is among the regions most affected by forest degradation, driven mainly by the rapid expansion of avocado (*Persea americana* Mill.) plantations [11, 12]. Over the past eight years alone, avocado cultivation has resulted in the loss of approximately 1,343 hectares of temperate forest [9], driven primarily by export demand and favorable economic conditions [13]. Avocado plantations require climatic and edaphic conditions similar to those of temperate forests, intensifying competition for suitable land and accelerating forest conversion, particularly in Michoacán [14, 15]. These land-use changes not only fragment forest habitats but also alter ecological interactions among organisms, potentially affecting host-associated microbial communities [15].

The genus *Quercus* is a dominant and ecologically foundational component of temperate forests worldwide [16] and has a broad geographic distribution across the Northern Hemisphere [17, 18]. Mexico is the second-largest center of oak diversification worldwide, harboring approximately 161 of the ~450 described species, of which 109 are endemic [19, 20]. This high level of endemism confers exceptional conservation value to Mexican oak forests. Moreover, oaks are widely regarded as “super-hosts” for the extraordinary biological diversity they support, including epiphytic plants [21], arthropods [22-25], and a rich assemblage of microbial symbionts [26, 27]. Among these, endophytic fungi represent a remarkably diverse and ecologically relevant group.

Endophytic fungi colonize internal plant tissues without causing visible symptoms and exhibit broad taxonomic and functional diversity,

predominantly within the subkingdom Dikarya [28,29]. In *Quercus* species, foliar endophytic fungi have been shown to contribute to host fitness by enhancing resistance to pathogens, mediating responses to abiotic stress, and influencing nutrient cycling during leaf senescence [30-32]. Numerous studies have documented variation in oak endophytic fungal communities across geographic regions, climatic conditions, host species, phenological stages, and stress gradients [33-37]. However, despite the high diversity and endemism of Mexican oaks, the diversity of their associated endophytic fungi remains poorly characterized, particularly in relation to land-use change and agricultural expansion.

Addressing this knowledge gap is essential for understanding how forest-to-orchard conversion affects microbial biodiversity and, by extension, the ecological resilience of temperate forest ecosystems. Therefore, the objective of this study was to characterize the diversity of cultivable foliar endophytic fungi associated with *Quercus castanea* and *Quercus obtusata*, two endemic oak species of Mexico [20, 38]. Additionally, we evaluated how endophytic fungal diversity and community composition vary across landscapes with differing proportions of forest and avocado orchard cover. By integrating taxonomic, phylogenetic, and landscape-level analyses, this study provides new insights into the responses of oak-associated endophytic fungi to land-use change in a biodiversity hotspot.

### 3) MATERIALS AND METHODS

*Quercus castanea* belongs to the section Lobatae (red oaks) and has a wide geographic and altitudinal distribution in Mexico [20], with populations in the Sierra Madre Occidental, the Central Plateau, the Trans-Mexican Volcanic Belt, and the Sierra Madre del Sur [39]. Although *Quercus castanea* has a wide geographic and altitudinal distribution in Mexico, its natural range is restricted to the country and does not extend beyond its borders. Therefore, it is considered endemic to Mexico. It is a monoecious, wind-pollinated tree that reaches 10-18 meters in height. Adults produce flowers from March to June and mature acorns from October to December [38].

*Quercus obtusata* is an endemic Mexican species, among the most widely distributed, occurring throughout the western, central, southern, and southeastern regions of the country [40]. It belongs to the section *Quercus* (white oaks). It occurs between 620 and 2,800 meters above sea level, with a height range of 6 to 30 meters. It blooms in April and May and bears fruit from August to November [38].

Sampling was conducted in December 2021 at six sites with varying proportions of forest and orchard cover (Figure 1), as described in Pérez-Solache et al. [15]. Sites were categorized as forest-dominated ( $F > O$ ), mixed forest–orchard ( $F = O$ ), or orchard-dominated ( $F < O$ ), following the vegetation-cover approach used in the referenced landscape characterization. These mixed temperate forests are mainly composed of species from the families Asteraceae, Fabaceae, and Poaceae, with pines such as *Pinus montezumae*, *P. oocarpa*, *P. hartwegii*, *P. pringlei*, *P. pseudostrobus*, and *P. lawsoni*. Other common tree species include *Abies religiosa*, *Pseudotsuga menziesii*, *Juniperus deppeana*, *J. flaccida*, and several oak species (*Quercus magnoliifolia*, *Q. calophylla*, *Q. castanea*, *Q. laurina*, *Q. rugosa*, *Q. laeta*, *Q. crassipes*, *Q. obtusata* and *Q. crassifolia*) [20]. At each site, three adult trees of *Q. castanea* and three of *Q. obtusata*, at least 5 meters tall and 15 cm in diameter at breast height, were selected. From each tree, three undamaged leaves were collected with sterile scissors, at a height of between two and three meters above the ground, and immediately transported to the laboratory in a cooler with ice packs, placed in sterile plastic bags, for processing within 24 hours of collection.



**Figure 1.** Distribution map of sampling sites in the avocado-growing region of the state of Michoacán, Mexico.

For the isolation of endophytic fungi, Potato Dextrose Agar (PDA) medium (BD Difco™, Sparks, MD, USA) was prepared according to the manufacturer's instructions and sterilized in an autoclave at 15 lb/in<sup>2</sup> for 15 minutes. After cooling, amoxicillin/clavulanic acid was added to the medium at 0.005 g/L to suppress bacterial growth, and the mixture was then dispensed into 10 cm diameter Petri dishes.

Surface sterilization of the leaves was performed following the method of Kusari et al. [41], with modifications. The leaf tissues were thoroughly washed with running tap water, then with deionized water, to remove any adhering organic residues. The leaf surface was sterilized by sequential immersion in 5% (v/v) sodium hypochlorite for 3 minutes and 70% (v/v) ethanol for one minute. The sterilized leaves were rinsed three times in sterile double-distilled water for 30 seconds each to remove excess sterilization solutions from the surface. Finally, the leaves were dried by placing them on sterilized filter paper in a laminar flow hood. The *Q. obtusata* leaves were cut into approximately 20x20 mm fragments using a sterilized scalpel, with the blade sterilized by a flame from a burner. Because *Q. castanea* leaves are smaller, they were divided in half along the central vein, and each half was further subdivided into four segments with a sterilized scalpel. The surface-sterilized leaf fragments were evenly spread on the surface of PDA medium (four fragments per plate), with one half facing up and the other half with the underside facing the medium. The Petri dishes containing the inoculated medium were incubated at  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  in the dark until fungal colonies formed.

From the emerging colonies, mycelium fragments from the colony edge were collected with a 6-mm-diameter cork borer and inoculated into the center of a Petri dish containing PDA medium. For each initiated subculture, sampling and inoculation were repeated several times until a

morphologically homogeneous colony was observed. In this way, axenic cultures of each isolated strain were established. As a control for the surface sterilization process, the 'print technique' was used, in which several sterilized leaf fragments, prepared as previously described, were pressed multiple times onto the surface of the PDA medium and incubated without the leaf fragments under the same conditions as the cultures with the foliar tissue samples [42]. No fungal growth was observed on these control plates.

The classification of the isolated strains by colonial morphology followed Agostinelli et al. [43]. Briefly, macroscopic colony characteristics on PDA were considered, including shape, color, margin, elevation, texture, presence or absence of surface secretions, changes in the color of the culture medium, and growth rate at the isolation temperature (28 °C). When distinguishing between two colonies was difficult, mycelial observations were made using bright-field microscopy. Based on these characteristics, a strain was defined as a unique morphotype (MT) if it could not be grouped with any other strain.

During the study, each isolate in axenic culture was maintained by re-inoculation onto PDA medium. For long-term storage, several cylindrical plugs were taken from the edge of an actively growing colony on PDA medium at 28 °C using a 6-mm-diameter punch. Five mycelial plugs from each isolate were placed in cryovials (Corning®, Union City CA, USA) containing 10% glycerol (v/v) and stored at -80 °C.

DNA extraction was performed using the phenol-chloroform protocol on actively growing mycelial colonies on PDA medium at 28 °C. The recovered mycelium from the cultures was transferred to a 1.5 mL microcentrifuge tube with Lysing Matrix Y (MP Biomedicals®, Irvine CA, USA). Then, 400 µL of lysis buffer (0.5% w/v SDS, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 200 mM Tris-HCl, pH 8.5) was added, and the mixture was processed for cell disruption in a FastPrep-24 machine, shaking at 4 m/s for 40 seconds. The resulting lysate was centrifuged for 10 minutes at 1500 × g. The supernatant was recovered and transferred to a new tube, and an equal volume of phenol-chloroform (1:1 v/v) was added. The mixture was vortexed for 5 minutes. It was then centrifuged again as previously described, and the supernatant was transferred to a new tube, with an equal volume of cold isopropanol added. The mixture was gently mixed by inversion and incubated at -20 °C for 60 minutes. Afterward, the sample was centrifuged again for 10 minutes at 1500 × g, and the supernatant was discarded. The resulting pellet was washed with 300 µL of 70% ethanol and left to dry at room temperature. The DNA pellet was dissolved in 70 µL of sterile deionized water and stored at -20 °C for later use. The quality of the DNA was assessed using 1% agarose gels (w/v) stained with Sybr Safe (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) at a final concentration of 0.5 µg/mL.

Amplification of the ITS region of the Nuclear Ribosomal Unit (ITS1-5.8S-ITS2) by PCR was performed using primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') [44]. The PCR reaction was carried out in a total volume of 15 µL containing lysis buffer (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0,

MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM), 0.25 mM of each dNTP, 0.2 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), and 2.5 ng of DNA, with the final volume adjusted with sterile deionized water to 15 µL. PCR was performed in a Veriti™ thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City CA, USA) with the following conditions: initial denaturation at 95°C for 3 minutes, 35 cycles at 95°C for 1 minute, 52°C for 30 seconds, 72°C for 2 minutes, and a final extension at 72°C for 10 minutes. PCR products were verified by electrophoresis on a 2% agarose gel stained with Sybr Safe (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) and visualized under UV light. The concentration of each PCR product was determined with a Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad CA, USA). The PCR products were sent to Elim Biopharmaceuticals Inc. (Hayward CA, USA) for bidirectional sequencing. Electropherograms were reviewed in BioEdit [45] to assess sequence quality and manually edited to remove sequences with indeterminate positions at the ends. The ITS sequences obtained for each fungal isolate were deposited in GenBank. Accession numbers (PX884095 to PX884189) are provided in the Supplementary Table S1.

Each of the obtained sequences was compared with the curated database of the Internal Transcribed Spacer (ITS) region of fungi type and reference material from the National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn). When the similarity between a study sequence and a reference sequence was ≥99%, the sequences were considered congeneric [46]. Sequences with the highest similarity to those obtained in this work were selected to generate a FASTA file for each set of study sequences. Depending on the taxonomic group in which the BLASTn search placed each study sequence, additional sequences not present in the curated database were added, selected based on phylogenetic analyses of recent publications for each taxonomic group. This was done to obtain the most robust phylogenetic analysis possible for each identified genus. The sequences from the FASTA files obtained for each genus in the BLASTn search were aligned using the MAFFT v.7 server [47]. The best evolutionary model was inferred, and phylogenetic reconstruction using the Maximum Likelihood (ML) method was performed for each fungal genus on the IQ-TREE web server [48, 49]. The robustness of the internal branches was evaluated with 1,000 bootstrap replicates. The resulting phylogenetic trees were edited in iTOL [50].

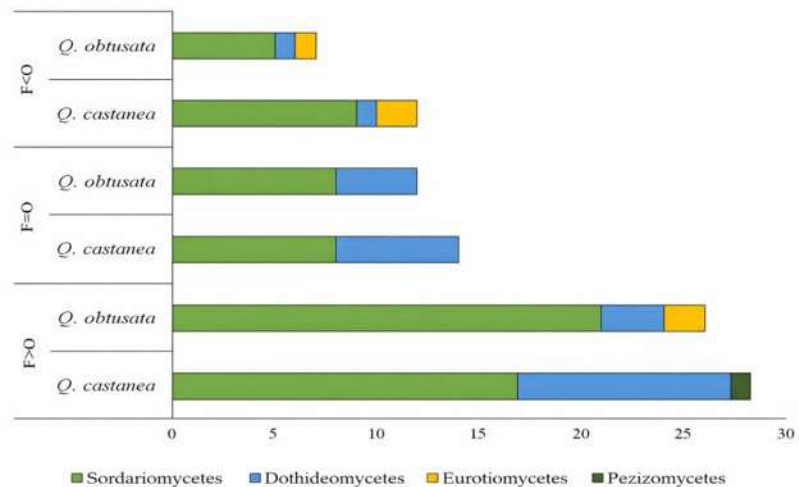
Diversity was evaluated at the genus level. Genus richness was assessed using the Margalef index ( $D_{mg} = (S - 1)/\ln(N)$ ), where *S* is the number of genera and *N* is the total number of isolates per sample. Diversity was measured using Shannon ( $H = -\sum P_i \ln P_i$ ) and Simpson ( $D = 1 - \sum P_i^2$ ) indices, where  $P_i = n_i/N$ . Evenness was evaluated using Pielou's index ( $J = H/\ln S$ ).

#### 4) RESULTS

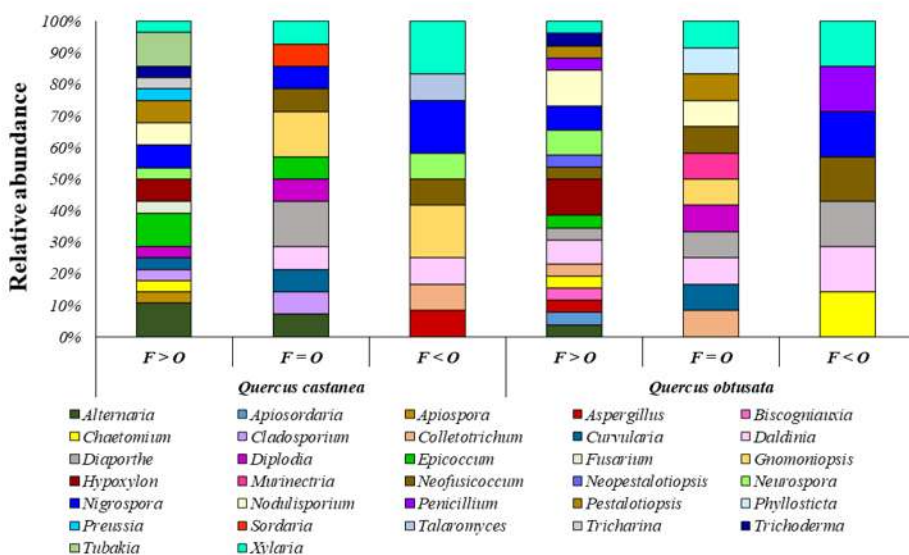
##### *Identification of foliar endophytic fungi isolated from Q. castanea and Q. obtusata*

A total of 112 cultivable foliar endophytic fungal strains were isolated from *Quercus castanea* (56 isolates) and *Quercus obtusata* (56 isolates) collected in avocado-growing regions of Michoacán, under vegetation-cover conditions ranging from forest-dominated sites to avocado orchards. Of the 112 isolates, 95 distinct morphotypes were selected for sequencing. The remaining 17 isolates were not sequenced because their macro- and microscopic characteristics were indistinguishable from those of isolates already included in the analysis. All isolates belonged to Ascomycota and were assigned to four classes (Dothideomycetes, Eurotiomycetes, Sordariomycetes, and Pezizomycetes), 10 orders (Botryosphaeriales, Capnodiales, Pleosporales, Eurotiales, Pezizales, Diaporthales, Glomerellales, Hypocreales, Sordariales, and Xylariales), and 32 genera, based on nrITS sequence comparisons and genus-specific phylogenetic placement.

Sordariomycetes was the most abundant class (68.68%), followed by Dothideomycetes (25.25%), Eurotiomycetes (5.05%), and Pezizomycetes (1.00%) (Figure 2). The relative abundances of genera across both oak species and vegetation-cover categories are shown in Figure 3. Of the 32 genera, 11 had relative abundances  $\leq 1\%$ . The most abundant genera were *Nigrospora* (8%), *Xylaria* (7%), *Nodulisporium* (6%), and *Daldinia* (6%).

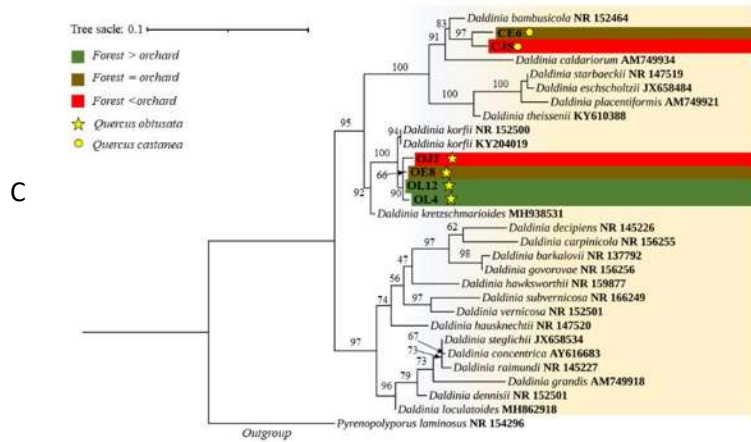
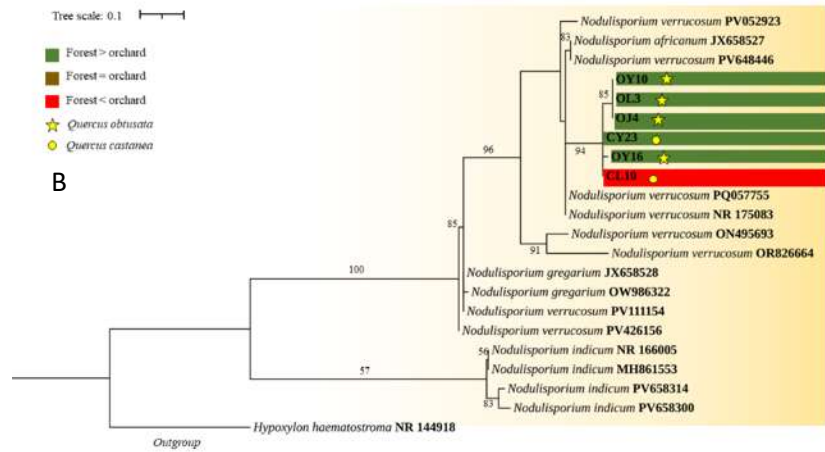
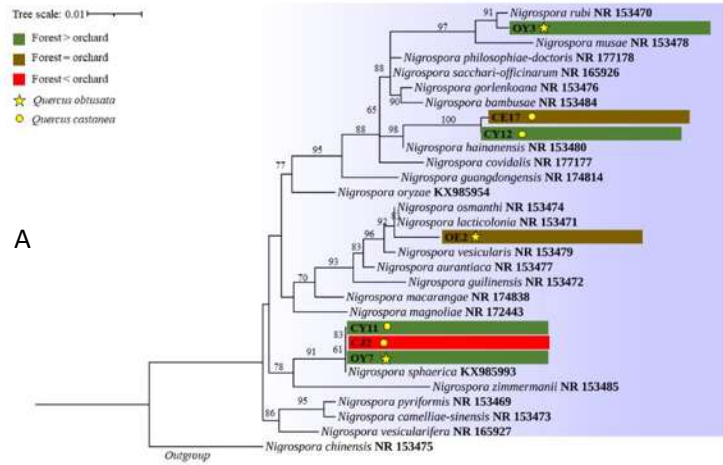


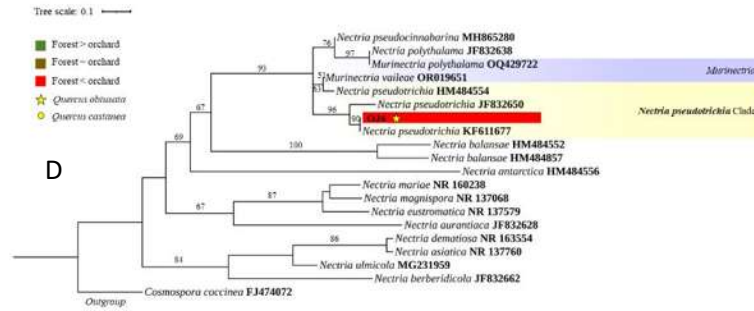
**Figure 2.** Distribution of endophytic foliar fungi isolated from *Q. castanea* and *Q. obtusata* at sites with varying proportions of forest and avocado orchard vegetation cover, according to the class level.



**Figure 3.** Relative abundance at the genus level of endophytic foliar fungi isolated from *Q. castanea* and *Q. obtusata* at sites with varying proportions of forest and avocado orchard vegetation cover.

Genus-specific phylogenetic reconstructions (31 trees, Figure 4 and Supplementary Figures S1-S27) enabled species-level identification for a subset of isolates (Supplementary Table S1) and provided a detailed assessment of intra-generic diversity. For example, *Nigrospora* isolates were distributed across four clades, three of which included strains assignable to *Nigrospora sphaerica* (Figure 4A). In contrast, *Nodulisporium* and *Daldinia* isolates did not form terminal clades that supported confident species-level identification (Figures 4B and 4C). In *Nectria*, one isolate was assigned to *Nectria pseudotrichia* (Figure 4D). Similar patterns of variable taxonomic resolution were observed across other genera (Supplementary Figures S1-S27). Therefore, subsequent diversity analyses were conducted at the genus level.

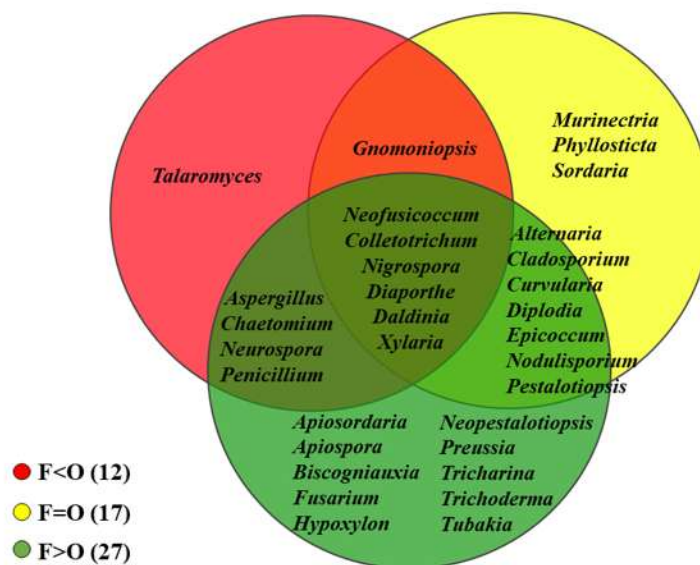




**Figure 4.** Examples of phylogenetic reconstructions of fungal strains from genera with higher and lower abundance in samples of *Q. castanea* and *Q. obtusata*. Phylogenetic trees of strains from the major genera *Nigrospora* (A, best-fit evolutionary model: TNe+I), *Nodulisporium* (B, best-fit evolutionary model: TIME+G4), and *Daldinia* (C, best-fit evolutionary model: TIME+G4), as well as the only strain from the genus *Nectria* (D, best-fit evolutionary model: TIME+I+G4), are shown. In the *Nectria* tree, the corresponding clades are shown at the ends of the terminal branches. All phylogenetic trees were constructed using the Maximum Likelihood (ML) criterion, with 1000 bootstrap iterations to generate the values shown at each bifurcation. For details, see Materials and Methods.

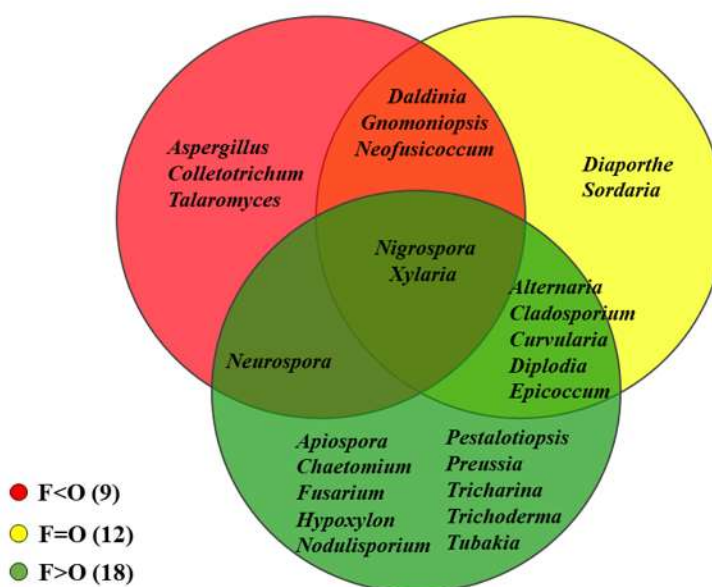
#### *Distribution of endophytic fungal genera across forest–orchard cover categories*

Across all samples, 27 genera were isolated from F>O sites, 17 from F=O sites, and 12 from F<O sites (Figure 5). Six genera (*Colletotrichum*, *Neofusicoccum*, *Nigrospora*, *Diaporthe*, *Daldinia*, and *Xylaria*) were shared among all categories. The F>O and F<O sites shared four genera, whereas F>O and F=O sites shared seven. One genus was shared between F=O and F<O sites. Ten genera were exclusive to F>O sites, three to F=O sites, and one to F<O sites.



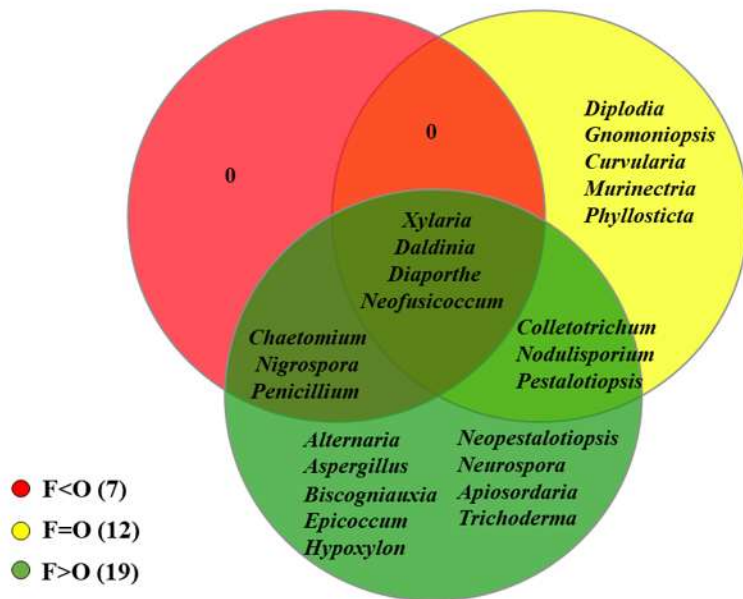
**Figure 5.** Venn diagram showing the distribution of endophytic foliar fungi isolated from *Q. castanea* and *Q. obtusata* across sites with varying proportions of forest and avocado orchard vegetation cover.

For *Q. castanea*, 25 genera were identified: 18 in F>O, 12 in F=O, and nine in F<O sites (Figure 6). *Nigrospora* and *Xylaria* were present across all categories. Ten genera were exclusive to F>O sites, whereas *Diaporthe* and *Sordaria* were detected only in F=O sites. *Aspergillus*, *Colletotrichum*, and *Talaromyces* were isolated exclusively from F<O sites.



**Figure 6.** Venn diagram showing the distribution of endophytic foliar fungi isolated from *Q. castanea* across sites with varying proportions of vegetation cover between forest and avocado orchard.

For *Q. obtusata*, 24 genera were identified: 19 in F>O, 12 in F=O, and seven in F<O sites (Figure 7). *Nigrospora*, *Chaetomium*, and *Penicillium* were shared between F>O and F<O sites, whereas *Colletotrichum*, *Nodulisporium*, and *Pestalotiopsis* were shared between F>O and F=O sites. No genera were shared exclusively between F=O and F<O sites. Four genera occurred across all categories, nine were exclusive to F>O sites, five to F=O sites, and none to F<O sites.



**Figure 7.** Venn diagram showing the distribution of endophytic foliar fungi isolated from *Q. obtusata* at sites with varying proportions of vegetation cover between forest and avocado orchard.

#### Richness and diversity indices

Genus richness and diversity were assessed using Margalef's index (Dmg), Shannon, Simpson, and Pielou's evenness (Table 1). Margalef's values for *Q. castanea* and *Q. obtusata* were the lowest at F<O sites (3.219 and 3.083), intermediate at F=O sites (4.168 and 4.427), and the highest at F>O sites (5.102 and 5.525), indicating the greatest genus richness in forest-dominated landscapes.

Shannon values ranged from 1.79 to 2.6, with the lowest at F=O sites for *Q. obtusata*. Simpson values exceeded 0.83 at all sites. Pielou's evenness was moderate to high (>0.5), reaching 0.821 at F>O sites for *Q. obtusata*.

**Table 1.** Analysis of the diversity of endophytic foliar fungi isolated from *Q. castanea* and *Q. obtusata* in sites with different proportions of forest cover and avocado orchard.

| Fungal Genera            | F>O                |                    | F=O                |                    | F<O                |                    |
|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                          | <i>Q. castanea</i> | <i>Q. obtusata</i> | <i>Q. castanea</i> | <i>Q. obtusata</i> | <i>Q. castanea</i> | <i>Q. obtusata</i> |
| <i>Alternaria</i>        | 1                  | -                  | 3                  | 1                  | -                  | 1                  |
| <i>Apiosordaria</i>      | 1                  | -                  | -                  | -                  | -                  | -                  |
| <i>Apiospora</i>         | 1                  | -                  | -                  | -                  | -                  | -                  |
| <i>Aspergillus</i>       | -                  | -                  | 1                  | 1                  | 1                  | -                  |
| <i>Biscogniauxia</i>     | -                  | 1                  | -                  | 1                  | -                  | -                  |
| <i>Chaetomium</i>        | 2                  | 1                  | 1                  | -                  | -                  | -                  |
| <i>Cladosporium</i>      | -                  | -                  | 1                  | -                  | -                  | -                  |
| <i>Colletotrichum</i>    | 2                  | 2                  | -                  | -                  | -                  | 1                  |
| <i>Curvularia</i>        | 1                  | -                  | 1                  | -                  | 1                  | -                  |
| <i>Daldinia</i>          | 2                  | 4                  | -                  | -                  | -                  | 1                  |
| <i>Diaporthe</i>         | -                  | 3                  | 1                  | 3                  | -                  | -                  |
| <i>Diplodia</i>          | -                  | 1                  | 1                  | -                  | 1                  | -                  |
| <i>Epicoccum</i>         | 2                  | -                  | 3                  | 1                  | 1                  | 2                  |
| <i>Fusarium</i>          | -                  | -                  | -                  | 1                  | -                  | -                  |
| <i>Gnomoniopsis</i>      | 1                  | 2                  | -                  | -                  | 2                  | -                  |
| <i>Hypoxyton</i>         | 1                  | 1                  | -                  | 3                  | -                  | -                  |
| <i>Murinectria</i>       | -                  | 1                  | -                  | -                  | -                  | -                  |
| <i>Neofusicoccum</i>     | 2                  | 3                  | 1                  | -                  | -                  | -                  |
| <i>Neopestalotiopsis</i> | -                  | -                  | -                  | -                  | -                  | 1                  |
| <i>Neurospora</i>        | 1                  | 1                  | 1                  | 1                  | -                  | -                  |
| <i>Nigrospora</i>        | 6                  | 1                  | -                  | 2                  | -                  | -                  |
| <i>Nodulisporium</i>     | 1                  | 3                  | -                  | 1                  | -                  | 1                  |
| <i>Penicillium</i>       | 1                  | 1                  | -                  | -                  | -                  | -                  |
| <i>Pestalotiopsis</i>    | -                  | 2                  | -                  | -                  | 1                  | -                  |
| <i>Phyllosticta</i>      | -                  | -                  | -                  | -                  | 1                  | -                  |
| <i>Preussia</i>          | 1                  | -                  | -                  | -                  | -                  | -                  |

|                           |           |           |           |           |          |          |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|
| <i>Sordaria</i>           | -         | 1         | -         | -         | -        | -        |
| <i>Talaromyces</i>        | 1         | -         | -         | -         | -        | -        |
| <i>Tricharina</i>         | 1         | -         | -         | -         | -        | -        |
| <i>Trichoderma</i>        | -         | -         | 1         | 1         | -        | -        |
| <i>Tubakia</i>            | 2         | -         | -         | 1         | -        | -        |
| <i>Xylaria</i>            | 3         | 3         | -         | -         | -        | 1        |
| <b>Total</b>              | <b>33</b> | <b>31</b> | <b>15</b> | <b>17</b> | <b>8</b> | <b>8</b> |
| Species richness (S)      | 20        | 17        | 11        | 12        | 7        | 7        |
| Margalef's richness (Dmg) | 5.434     | 4.659     | 3.693     | 3.883     | 2.885    | 2.885    |
| Shannon's index (H')      | 2.657     | 2.845     | 2.138     | 1.792     | 2.441    | 2.458    |
| Simpson's index (D)       | 0.922     | 0.935     | 0.875     | 0.833     | 0.908    | 0.911    |
| Pielou Evenness index (E) | 0.767     | 0.821     | 0.617     | 0.517     | 0.704    | 0.709    |

---

## 5) DISCUSSION

Endophytic foliar fungi can contribute to tree survival and adaptation, particularly under changing biotic and abiotic conditions [51, 52]. Across both host species, forest-dominated sites (F>O) consistently supported higher genus richness and more exclusive taxa than orchard-dominated sites (F<O), indicating that landscape context is a major predictor of cultivable foliar endophytic fungal diversity in this oak–avocado mosaic. Michoacán is a biodiversity-rich region and a reservoir of endemic species, yet it is experiencing a decline in temperate forest cover associated with avocado expansion [53]. In this study, we characterized the cultivable foliar endophytic fungal community of *Quercus castanea* and *Quercus obtusata*, two endemic Mexican oaks, across a forest–orchard vegetation-cover gradient.

Foliar endophytic fungal communities associated with *Q. castanea* and *Q. obtusata* were dominated by Ascomycota, a pattern consistently reported across oak species in temperate, Mediterranean, and subtropical regions [37, 54–56]. Studies of *Q. cerris*, *Q. pubescens*, and *Q. ilex* have similarly documented strong dominance of Sordariomycetes and Dothideomycetes in leaf-associated endophytic assemblages, suggesting these fungal classes are particularly well adapted to oak foliar tissues [36, 37, 57].

Twenty-six genera of foliar endophytic fungi were identified in *Q. castanea* and 24 in *Q. obtusata*, representing greater diversity than reported in previous studies of cultivable foliar endophytes in *Quercus* spp. For example, in *Q. gambelii*, eight genera and strains from three orders were identified, with 40 isolates from foliar tissue, all within Ascomycota [58]. A subsequent study on the same oak species, starting with 763 foliar endophyte isolates and using morphological grouping of vegetative mycelium colonies, identified 49 strains, representing only 11 fungal species [59]. In *Q. brantii*, only six genera and 23 strains were found, assigned only at the family level to Gnomoniaceae, without identifying the genera [56]. In healthy and deteriorated leaves of *Q. robur* and *Q. cerris* from northeastern Italy, strains from 13 endophytic fungal species were isolated and assigned to 5 and 7 genera, respectively [54]. In these same oak species, seven genera of foliar endophytic fungi were identified in *Q. cerris* and only 6 in *Q. robur* and *Q. pubescens*, also included in the study [34].

At the genus level, *Nigrospora* was the most abundant endophyte across both oak species and vegetation-cover categories evaluated in this study. To the best of our knowledge, the genus *Nigrospora* has not previously been reported as a foliar endophyte of *Quercus* species, though it has been reported in other tissues. In this context, *Nigrospora sphaerica* was isolated from annual shoots of *Q. robur* [60], whereas *N. oryzae* was isolated from branches of *Q. pyrenaica* and *Q. macranthera* [61, 62]. The high abundance and phylogenetic diversity of *Nigrospora* observed within *Q. castanea* and *Q. obtusata* suggest that this genus may be an essential functional component of these oak endophytic mycobiomes, potentially contributing to pathogen suppression or stress tolerance. The *Xylaria* and *Daldinia* genera have previously been associated with oak tissues. They are thought to play a role in the

decomposition of wood and leaf litter following host senescence while remaining endophytic throughout the host's life cycle [63, 64]. The phylogenetic clustering observed within *Daldinia* suggests the presence of taxa not currently represented in reference databases, reinforcing previous assertions that tree foliar fungal communities, particularly in under-sampled regions such as Mexico, harbor substantial undocumented diversity [65-67].

Although ITS-based phylogenetic analyses enabled species-level identification for some isolates, such as *Nigrospora sphaerica* and *Nectria pseudotrichia*, many oak-associated endophytes could not be confidently resolved beyond the genus level. The limitations of the ITS region as a unique marker for fungal identification stem from its intraspecific and intragenomic variability, low interspecific divergence, and incomplete taxonomic coverage, all of which complicate species delimitation in ecological studies [68-70]. These challenges are particularly pronounced in fungi associated with endemic plants or poorly studied ecosystems, where hidden diversity and new taxa remain to be discovered [71-73]. It has also been widely documented that fungal identification at the species level cannot rely solely on BLASTn to find the best matches. In contrast, multiple-alignment phylogenetic analysis correctly places the sequence in a clade, at least at the genus level. This is because BLAST searches can be misleading due to database errors and mislabeling, and because similarity-based identifications are not a substitute for phylogenetic inference when accuracy and precision are essential [68, 74-76].

Consequently, conducting diversity analyses at the genus level, as done in this study, is a robust and conservative approach widely used in oak endophyte research. The apparent presence of undescribed taxa further underscores the need for multilocus phylogenetic or metabarcoding frameworks for the oak species examined here.

Using a culture-dependent strategy in this study enabled the recovery of viable foliar endophytic fungi associated with *Q. castanea* and *Q. obtusata*, facilitating taxonomic identification, phylogenetic placement, and future functional analyses. Culture-based approaches remain particularly valuable in oak endophyte research because they provide living material for downstream studies of ecological function, host interactions, and potential biotechnological applications that cannot be achieved with sequence-based methods alone [35, 58, 74, 77]. Moreover, many of the dominant genera recovered here, such as *Nigrospora*, *Xylaria*, and *Daldinia*, are readily culturable and have been consistently reported in culture-based surveys of oak foliar endophytes, underscoring the ecological relevance of the detected taxa [62, 78-80].

However, it is essential to acknowledge the inherent limitations of culture-dependent methods. This approach likely underestimates total endophytic diversity, as fast-growing or sporulating fungi are overrepresented, whereas slow-growing, obligately biotrophic, or nutritionally fastidious taxa may remain undetected [35, 74, 81]. Across tree species, comparisons between culture-dependent and high-throughput

sequencing approaches have shown that only a subset of the endophytic community is recoverable in culture, with metabarcoding revealing additional lineages not detected by isolation techniques [81-83]. In some cases, although the cultivation approach detected lower fungal richness, the results for the stem were consistent with those for fungal community composition and richness. Consequently, the patterns reported here should be interpreted as reflecting the diversity and structure of the cultivable fraction of the foliar endophytic community rather than the full mycobiome.

Despite these limitations, the consistency of community patterns across hosts and vegetation-cover gradients suggests that culture-dependent data capture biologically meaningful responses of oak-associated endophytes to landscape modification. Integrative approaches that combine culture-based isolation with culture-independent sequencing will be essential for future studies to more fully characterize the diversity, dynamics, and functional roles of foliar endophytic fungi in the *Quercus* species examined here [83].

Patterns of genus sharing and richness indices indicate that endophytic fungal assemblages varied markedly along the forest–orchard vegetation-cover gradient, with sites dominated by forest cover (F>O) exhibiting higher genus richness and more exclusive taxa. This pattern aligns with findings from temperate and boreal forests across Europe, Asia, and North America, where structurally complex, less disturbed stands support more diverse endophytic communities than managed or fragmented landscapes [61, 84-87]. However, other studies report no differences in isolation rates or endophyte diversity between forest fragmentation levels or between declining and healthy trees [36, 43, 88, 89].

The reduced richness at orchard-dominated sites (F<O) suggests that land-use change linked to avocado cultivation may negatively affect oak endophytic communities. In forest systems, changes in canopy structure, humidity, temperature, and surrounding vegetation have been shown to influence endophyte colonization dynamics and community composition [61, 90, 91]. The intermediate diversity at F=O sites likely reflects transitional conditions in which both forest-associated oak endophytes and disturbance-tolerant taxa coexist, a pattern also reported in fragmented oak woodlands [87, 92].

Although *Q. castanea* and *Q. obtusata* shared several dominant genera, differences in community composition across vegetation-cover categories indicate that host identity shapes foliar endophytic assemblages. Host-specific patterns in endophytic fungi have been documented among oak species and are attributed to interspecific differences in leaf chemistry, phenology, and defensive compounds [34, 37, 85, 93-95]. By contrast, the consistent presence of *Nigrospora* and *Xylaria* across both hosts and at all coverage levels suggests that these genera may constitute a core foliar endophytic microbiome of Mexican oaks. Similar “core” assemblages have been proposed for European oak species, supporting the idea that specific fungal lineages maintain stable associations with *Quercus* hosts across broad environmental gradients [37,96].

Taken together, the results presented here demonstrate that forest cover is a critical determinant of foliar endophytic fungal diversity across the *Quercus* species studied. Given emerging evidence that oak endophytes contribute to host resilience, pathogen resistance, and ecosystem functioning [51, 52], the erosion of endophytic diversity in orchard-dominated landscapes may have long-term consequences for oak persistence in agroforestry mosaics. For example, agroforestry management of oak forests can increase insect-caused foliar damage [97]. Interactions between endophytic fungi on oak leaves and gall-forming or leaf-mining insects are complex, with positive, negative, and neutral effects reported depending on the oak species, the endophyte, and the insect [98]. Therefore, future work should evaluate how the composition of the endophytic fungal community in *Q. castanea* and *Q. obtusata* affects insects that can impact the tree's vitality.

Environmental changes can also trigger transitions from endophytic to phytopathogenic lifestyles in oak fungi, with interspecific variation in outcomes [35, 96, 99, 100]. These transitions are driven by multiple stressors that, together, can contribute to oak decline, underscoring the need for evaluation in the oak-avocado orchard ecosystem examined here. Additionally, various species of foliar endophytes in oaks can initiate leaf tissue decomposition after leaves senesce [58, 59]. By initiating decomposition immediately upon senescence, these fungi increase nutrient cycling efficiency, thereby benefiting biogeochemical cycles in the forest.

## 6) CONCLUSIONS

This study shows that *Quercus castanea* and *Q. obtusata*, two endemic Mexican oaks, harbor taxonomically diverse cultivable foliar endophytic fungal communities dominated by Ascomycota. Across the forest–orchard cover gradient, forest-dominated sites exhibited higher genus richness and more exclusive genera than orchard-dominated sites, indicating that forest cover is an essential predictor of foliar endophytic fungal diversity in oak–avocado landscapes. Maintaining native forest patches within agricultural matrices may therefore help conserve not only endemic oak populations but also their associated fungal biodiversity [43, 89]. Future studies integrating metabarcoding and functional assays will be essential to determine how these community shifts influence oak performance, resilience, and ecosystem processes.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/doi/s1>, Figures S1-S27: Phylogenetic trees based on ITS sequences of species in each genus; Table S1: Data of the ITS sequences from the endophytic fungal strains of *Q. castanea* and *Q. obtusata*.

**Author Contributions:** Conceptualization, P.C.R., K.O. and G.V.M.; methodology, M.I.M.S., P.C.R., Y.M.L. and G.V.M.; software, M.I.M.S. and G.V.M.; validation, K.O., P.C.R. and Y.M.L.; formal analysis, M.I.M.S., K.O. and G.V.M.; investigation, K.O., M.I.M.S., P.C.R. and G.V.M.; resources, K.O. and G.V.M.; data curation, K.O., P.C.R. and G.V.M.; writing—original draft preparation, M.I.M.S., K.O. and G.V.M.; writing—review and editing, K.O., P.C.R. and G.V.M.; visualization, M.I.M.S., Y.M.L. and G.V.M.; supervision, K.O., G.V.M.; project administration, P.C.R. and Y.M.L; funding acquisition, K.O. and P.C.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This project was supported by Secretaría de Desarrollo Institucional, UNAM.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The ITS sequences obtained for each fungal isolate were deposited in GenBank. Accession numbers (PX884095 to PX884189) are provided in the Supplementary Table S1.

**Acknowledgments:** Thanks are given to SECIHTI for the doctoral scholarship granted to M.I.M.S. (No. 732728).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

### Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

BLAST      Basic Local Alignment Search Tool

|      |                                                           |
|------|-----------------------------------------------------------|
| ITS  | Internal Transcribed Spacer of the Nuclear Ribosomal Unit |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information             |

## 7) SUPPLEMENTARY TABLE

Supplementary Table S1. Data of the ITS sequences from the endophytic fungal strains of *Q. castanea* and *Q. obtusata*.

| Oak species             | Fungal Strain Code | GenBank Accession Number | BLASTn Species                      | Sequence Identity (%) | Closest Sequence Accession Number | Phylogeny assignment                      |
|-------------------------|--------------------|--------------------------|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------|
| <i>Quercus castanea</i> | CY9                | PX884097                 | <i>Alternaria doliconidium</i>      | 99.8                  | NR_158361.1                       | <i>Alternaria gaisen</i>                  |
|                         | CC15               | PX884099                 | <i>Alternaria doliconidium</i>      | 100.0                 | NR_158361.1                       | <i>Alternaria sp.</i>                     |
|                         | CY6                | PX884096                 | <i>Alternaria destruens</i>         | 99.4                  | NR_137143.1                       | <i>Alternaria doliconidium</i>            |
|                         | CY18               | PX884098                 | <i>Alternaria destruens</i>         | 99.8                  | NR_137143.1                       | <i>Alternaria doliconidium</i>            |
|                         | CY24               | PX884100                 | <i>Apiospora intestini</i>          | 96.7                  | NR_154698.1                       | <i>Apiospora sp.</i>                      |
|                         | CE1                | PX884103                 | <i>Aspergillus fumigatus</i>        | 99.5                  | NR_121481.1                       | <i>Aspergillus sp. 1</i>                  |
|                         | CY25               | PX884107                 | <i>Chaetomium subaffine</i>         | 99.8                  | NR_144825.1                       | <i>Chaetomium sp.</i>                     |
|                         | CC9                | PX884108                 | <i>Cladosporium chasmanthicola</i>  | 99.8                  | NR_152307.1                       | <i>Cladosporium pseudocladosporioides</i> |
|                         | CE5                | PX884111                 | <i>Colletotrichum phyllanthi</i>    | 100.0                 | NR_111698.1                       | <i>Colletotrichum phyllanti</i>           |
|                         | CC8                | PX884112                 | <i>Curvularia lunata</i>            | 98.6                  | NR_138223.1                       | <i>Curvularia sp. 1</i>                   |
|                         | CY14               | PX884113                 | <i>Curvularia pseudobrachyspora</i> | 99.3                  | NR_164423.1                       | <i>Curvularia aerea</i>                   |
|                         | CE6                | PX884115                 | <i>Daldinia bambusicola</i>         | 94.1                  | NR_152464.1                       | <i>Daldinia sp. 1</i>                     |
|                         | CJ5                | PX884116                 | <i>Daldinia bambusicola</i>         | 93.8                  | NR_152464.1                       | <i>Daldinia sp. 2</i>                     |
|                         | CJ10               | PX884122                 | <i>Diaporthe caatingaensis</i>      | 98.0                  | NR_168159.1                       | <i>Diaporthe sp. 3</i>                    |
|                         | CJ9                | PX884123                 | <i>Diaporthe caatingaensis</i>      | 97.9                  | NR_168159.1                       | <i>Diaporthe sp. 2</i>                    |
|                         | CC4                | PX884125                 | <i>Diplodia corticola</i>           | 99.8                  | NR_111152.1                       | <i>Diplodia corticola</i>                 |
|                         | CL2                | PX884127                 | <i>Diplodia sapinea</i>             | 99.8                  | NR_152452.1                       | <i>Diplodia sp.</i>                       |
|                         | CL11               | PX884128                 | <i>Epicoccum dendrobii</i>          | 99.8                  | NR_158261.1                       | <i>Epicoccum dendrobii</i>                |
|                         | CY8                | PX884130                 | <i>Epicoccum italicum</i>           | 99.8                  | NR_158264.1                       | <i>Epicoccum italicum</i>                 |

|      |          |                                   |      |             |                              |
|------|----------|-----------------------------------|------|-------------|------------------------------|
| CY20 | PX884132 | <i>Epicoccum thailandicum</i>     | 99.2 | NR_152926.1 | <i>Epicoccum sp. 2</i>       |
| CC13 | PX884131 | <i>Epicoccum thailandicum</i>     | 99.2 | NR_152926.1 | <i>Epicoccum sp. 1</i>       |
| CL14 | PX884133 | <i>Fusarium inflexum</i>          | 98.8 | NR_152941.1 | <i>Fusarium cugenangense</i> |
| CJ6  | PX884137 | <i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>  | 93.7 | NR_166040.1 | <i>Gnomoniopsis sp. 2</i>    |
| CJ8  | PX884138 | <i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>  | 94.3 | NR_166040.1 | <i>Gnomoniopsis sp. 2</i>    |
| CE2  | PX884136 | <i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>  | 93.9 | NR_166040.1 | <i>Gnomoniopsis sp. 2</i>    |
| CE10 | PX884135 | <i>Gnomoniopsis paraclavulata</i> | 99.2 | NR_137003.1 | <i>Gnomoniopsis sp. 1</i>    |
| CL1  | PX884142 | <i>Hypoxyton griseobrunneum</i>   | 99.4 | NR_155184.1 | <i>Hypoxyton sp. 2</i>       |
| CY28 | PX884140 | <i>Hypoxyton fraxinophilum</i>    | 84.2 | NR_172224.1 | <i>Hypoxyton sp. 3</i>       |
| CE12 | PX884149 | <i>Neofusicoccum italicum</i>     | 99.6 | NR_168164.1 | <i>Neofusicoccum sp. 2</i>   |
| CJ7  | PX884145 | <i>Neofusicoccum italicum</i>     | 99.6 | NR_168164.1 | <i>Neofusicoccum sp. 1</i>   |
| CE14 | PX884156 | <i>Neurospora tetraspora</i>      | 99.1 | NR_077163.1 | <i>Neurospora sp. 1</i>      |
| CY5  | PX884154 | <i>Neurospora dictyophora</i>     | 98.5 | NR_163513.1 | <i>Neurospora sp. 2</i>      |
| CE17 | PX884157 | <i>Nigrospora hainanensis</i>     | 99.6 | NR_153480.1 | <i>Nigrospora sp. 2</i>      |
| CY12 | PX884158 | <i>Nigrospora hainanensis</i>     | 99.8 | NR_153480.1 | <i>Nigrospora sp. 2</i>      |
| CY11 | PX884159 | <i>Nigrospora magnoliae</i>       | 97.8 | NR_172443.1 | <i>Nigrospora sphaerica</i>  |
| CJ2  | PX884163 | <i>Nigrospora osmanthi</i>        | 99.6 | NR_153474.1 | <i>Nigrospora sphaerica</i>  |
| CY23 | PX884167 | <i>Nodulisporium verrucosum</i>   | 98.8 | NR_175083.1 | <i>Nodulisporium sp.</i>     |
| CL10 | PX884166 | <i>Nodulisporium verrucosum</i>   | 99.2 | NR_175083.1 | <i>Nodulisporium sp.</i>     |
| CL3  | PX884151 | <i>Pestalotiopsis parva</i>       | 99.6 | NR_145237.1 | <i>Pestalotiopsis sp. 1</i>  |

|                     |      |          |                                        |       |             |                                   |
|---------------------|------|----------|----------------------------------------|-------|-------------|-----------------------------------|
| Quercus<br>obtusata | CY16 | PX884174 | <i>Preussia persica</i>                | 98.3  | NR_137730.1 | <i>Preussia sp.</i>               |
|                     | CJ3  | PX884175 | <i>Sordaria equicola</i>               | 98.5  | NR_173047.1 | <i>Sordaria sp.</i>               |
|                     | CE16 | PX884176 | <i>Talaromyces adpressus</i>           | 99.4  | NR_171595.1 | <i>Talaromyces adpressus</i>      |
|                     | CY22 | PX884177 | <i>Tricharina praecox</i>              | 88.4  | NR_103690.1 | <i>Tricharina sp.</i>             |
|                     | CY7  | PX884179 | <i>Trichoderma rifaii</i>              | 99.6  | NR_137305.1 | <i>Trichoderma sp. 1</i>          |
|                     | CY13 | PX884180 | <i>Tubakia seoraksanensis</i>          | 98.6  | NR_165992.1 | <i>Tubakia suttoniana</i>         |
|                     | CL18 | PX884181 | <i>Tubakia seoraksanensis</i>          | 98.6  | NR_165992.1 | <i>Tubakia suttoniana</i>         |
|                     | CY15 | PX884182 | <i>Tubakia seoraksanensis</i>          | 97.5  | NR_165992.1 | <i>Tubakia sp.</i>                |
|                     | CJ4  | PX884183 | <i>Xylaria ellisii</i>                 | 89.3  | NR_172972.1 | <i>Xylaria sp. 1</i>              |
|                     | CL9  | PX884186 | <i>Xylaria wallichii</i>               | 94.3  | NR_184978.1 | <i>Xylaria sp. 3</i>              |
|                     | CE4  | PX884189 | <i>Xylaria wallichii</i>               | 93.9  | NR_184978.1 | <i>Xylaria sp. 4</i>              |
|                     | CE11 | PX884188 | <i>Xylaria wallichii</i>               | 94.2  | NR_184978.1 | <i>Xylaria sp. 4</i>              |
|                     | OY18 | PX884095 | <i>Alternaria destruens</i>            | 99.4  | NR_137143.1 | <i>Alternaria doliconidium</i>    |
|                     | OL11 | PX884101 | <i>Apiosordaria<br/>yaeyamensis</i>    | 94.94 | NR_175053.1 | <i>Cladorrhinum sp.</i>           |
|                     | OY9  | PX884102 | <i>Aspergillus<br/>aflatoxiformans</i> | 99.6  | NR_171606.1 | <i>Aspergillus sp. 2</i>          |
|                     | OY13 | PX884104 | <i>Biscogniauxia dendrobii</i>         | 91.3  | NR_172733.1 | <i>Biscogniauxia mediterranea</i> |
|                     | OE10 | PX884106 | <i>Chaetomium<br/>pseudoglobosum</i>   | 99.6  | NR_144854.1 | <i>Chaetomium pseudoglobosum</i>  |
|                     | OL7  | PX884105 | <i>Chaetomium nepalense</i>            | 98.2  | NR_159782.1 | <i>Chaetomium globosum</i>        |
|                     | OY19 | PX884110 | <i>Colletotrichum<br/>phyllanthi</i>   | 99.6  | NR_111698.1 | <i>Colletotrichum karsti</i>      |
|                     | OJ10 | PX884109 | <i>Colletotrichum<br/>cobbittiense</i> | 99.4  | NR_163538.1 | <i>Colletotrichum jiangxiense</i> |

|       |          |                                    |       |             |                               |
|-------|----------|------------------------------------|-------|-------------|-------------------------------|
| OC9-2 | PX884114 | <i>Curvularia pseudointermedia</i> | 96.38 | NR_170007.1 | <i>Curvularia</i> sp. 2       |
| OJ2   | PX884117 | <i>Daldinia korfii</i>             | 97.0  | NR_152500.1 | <i>Daldinia</i> sp. 4         |
| OE8   | PX884119 | <i>Daldinia korfii</i>             | 97.1  | NR_152500.1 | <i>Daldinia</i> sp. 3         |
| OL12  | PX884120 | <i>Daldinia korfii</i>             | 97.2  | NR_152500.1 | <i>Daldinia</i> sp. 5         |
| OL4   | PX884118 | <i>Daldinia korfii</i>             | 97.2  | NR_152500.1 | <i>Daldinia</i> sp. 5         |
| OJ1   | PX884124 | <i>Diaporthe caatingaensis</i>     | 98.0  | NR_168159.1 | <i>Diaporthe</i> sp. 3        |
| OY2   | PX884121 | <i>Diaporthe brasiliensis</i>      | 97.8  | NR_111844.1 | <i>Diaporthe</i> sp. 1        |
| OC2-2 | PX884126 | <i>Diplodia corticola</i>          | 99.8  | NR_111152.1 | <i>Diplodia corticola</i>     |
| OY21  | PX884129 | <i>Epicoccum thailandicum</i>      | 99.6  | NR_152926.1 | <i>Epicoccum catenisorum</i>  |
| OC1   | PX884134 | <i>Gnomoniopsis paraclavulata</i>  | 99.2  | NR_137003.1 | <i>Gnomoniopsis</i> sp. 1     |
| OY4   | PX884141 | <i>Hypoxyton blackburniae</i>      | 94.1  | NR_182618.1 | <i>Hypoxyton</i> sp. 1        |
| OY12  | PX884143 | <i>Hypoxyton blackburniae</i>      | 94.3  | NR_182618.1 | <i>Hypoxyton</i> sp. 1        |
| OY11  | PX884139 | <i>Hypoxyton fraxinophilum</i>     | 83.5  | NR_172224.1 | <i>Hypoxyton</i> sp. 3        |
| OJ6   | PX884144 | <i>Murinectria vaileae</i>         | 98.5  | NR_185823.1 | <i>Nectria pseudotrichia</i>  |
| OL6   | PX884148 | <i>Neofusicoccum italicum</i>      | 99.4  | NR_168164.1 | <i>Neofusicoccum</i> sp. 2    |
| OJ3   | PX884147 | <i>Neofusicoccum italicum</i>      | 99.6  | NR_168164.1 | <i>Neofusicoccum</i> sp. 2    |
| OE11  | PX884146 | <i>Neofusicoccum italicum</i>      | 100.0 | NR_168164.1 | <i>Neofusicoccum italicum</i> |
| OC9   | PX884152 | <i>Pestalotiopsis grevilleae</i>   | 99.3  | NR_147548.1 | <i>Pestalotiopsis</i> sp. 1   |
| OL14  | PX884153 | <i>Pestalotiopsis kenya</i>        | 99.6  | NR_147549.1 | <i>Pestalotiopsis</i> sp. 2   |
| OY22  | PX884150 | <i>Neopestalotiopsis cocois</i>    | 99.4  | NR_156312.1 | <i>Neopestalotiopsis</i> sp.  |
| OY5   | PX884155 | <i>Nurospora tetraspora</i>        | 99.1  | NR_077163.1 | <i>Neurospora</i> sp. 1       |
| OL8   | PX884162 | <i>Neurospora tetraspora</i>       | 99.1  | NR_077163.1 | <i>Neurospora</i> sp. 1       |
| OY3   | PX884164 | <i>Nigrospora rubi</i>             | 99.6  | NR_153470.1 | <i>Nigrospora</i> sp. 1       |
| OE2   | PX884161 | <i>Nigrospora osmanthi</i>         | 99.6  | NR_153474.1 | <i>Nigrospora</i> sp. 3       |

|      |          |                                  |      |             |                                  |
|------|----------|----------------------------------|------|-------------|----------------------------------|
| OY7  | PX884160 | <i>Nigrospora magnoliae</i>      | 97.7 | NR_172443.1 | <i>Nigrospora sphaerica</i>      |
| OY16 | PX884165 | <i>Nodulisporium verrucosum</i>  | 98.8 | NR_175083.1 | <i>Nodulisporium sp.</i>         |
| OY10 | PX884169 | <i>Nodulisporium verrucosum</i>  | 99.0 | NR_175083.1 | <i>Nodulisporium sp.</i>         |
| OL3  | PX884170 | <i>Nodulisporium verrucosum</i>  | 99.0 | NR_175083.1 | <i>Nodulisporium sp.</i>         |
| OJ4  | PX884168 | <i>Nodulisporium verrucosum</i>  | 99.0 | NR_175083.1 | <i>Nodulisporium sp.</i>         |
| OL10 | PX884172 | <i>Penicillium crustosum</i>     | 99.6 | NR_077153.1 | <i>Penicillium sp.2</i>          |
| OE6  | PX884171 | <i>Penicillium citrinum</i>      | 99.6 | NR_121224.1 | <i>Penicillium sp. 1</i>         |
| OC10 | PX884173 | <i>Phyllosticta capitalensis</i> | 99.7 | NR_144914.1 | <i>Phyllosticta capitalensis</i> |
| OY15 | PX884178 | <i>Trichoderma atroviride</i>    | 99.5 | NR_077207.1 | <i>Trichoderma sp. 2</i>         |
| OJ7  | PX884184 | <i>Xylaria ellisii</i>           | 89.4 | NR_172972.1 | <i>Xylaria sp. 2</i>             |
| OE1  | PX884187 | <i>Xylaria wallichii</i>         | 93.8 | NR_184978.1 | <i>Xylaria sp. 3</i>             |
| OY20 | PX884185 | <i>Xylaria wallichii</i>         | 93.8 | NR_184978.1 | <i>Xylaria sp. 4</i>             |

---

## 8) SUPPLEMENTARY FIGURES

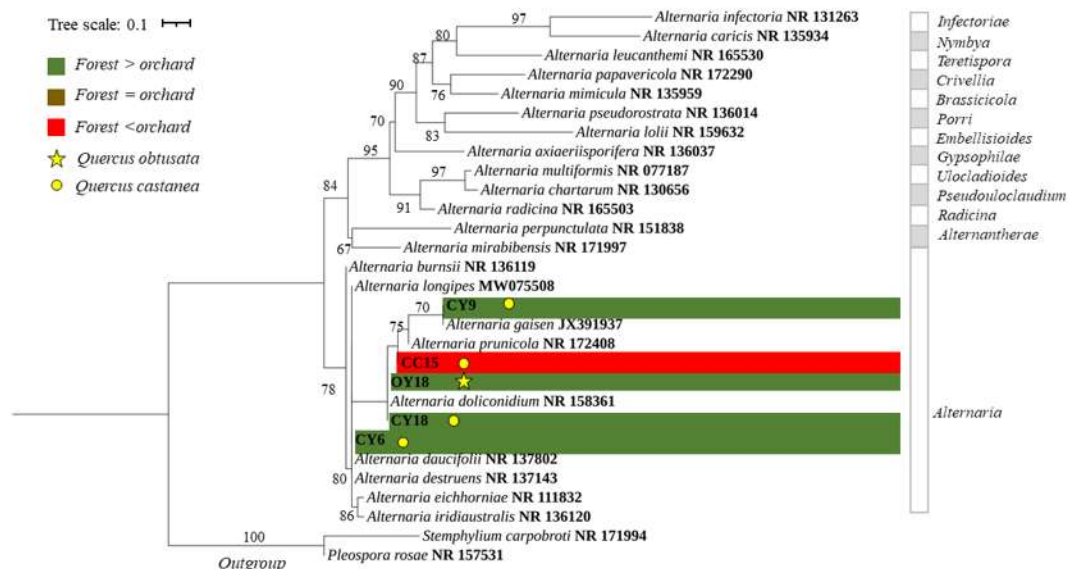


Figure S1. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species in the genus *Alternaria*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the TIMe+I+G4 evolutionary model. *Stemphylium carpobroti* (NR 171994) served as the outgroup. At the ends of the terminal branches, the corresponding sections of the genus are indicated. Bootstrap values of 50 or higher, obtained from 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

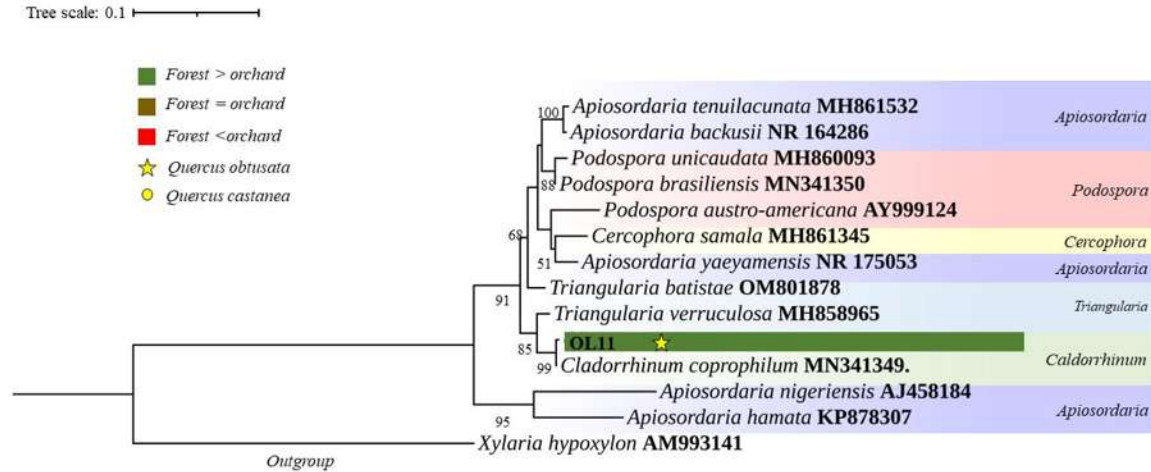


Figure S2. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species in the genus *Apiosordaria*. The tree was inferred using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the TIM2e+G4 evolutionary model. *Xylaria hypoxylon* (AM9931141) served as the outgroup. At the ends of the terminal branches, the corresponding sections of the genus are indicated. Bootstrap values of 50 or higher, obtained from 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

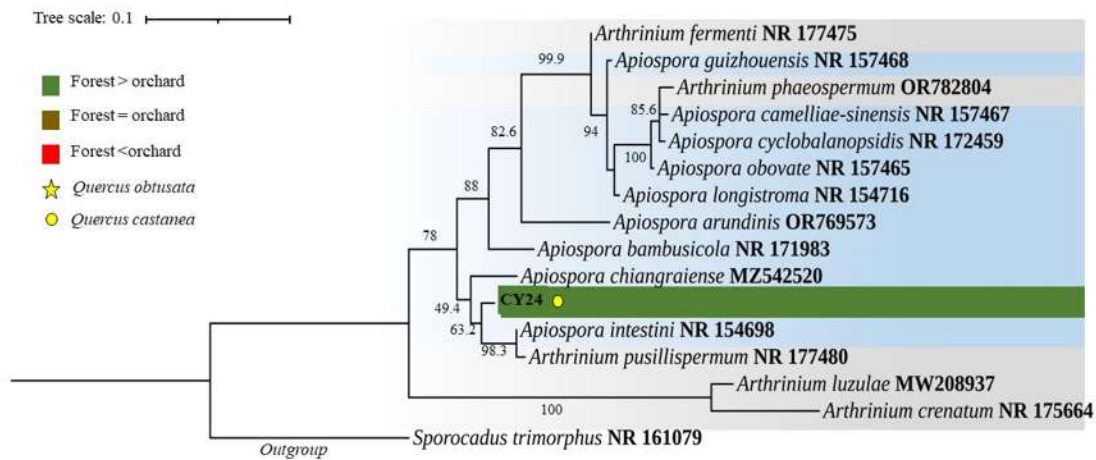


Figure S3. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species from the genera *Apiospora* and *Arthriniun*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the TNe+G4 evolutionary model. *Sporocadus trimorphus* (NR 161079) served as the outgroup. Bootstrap values of 50 or higher, obtained from 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

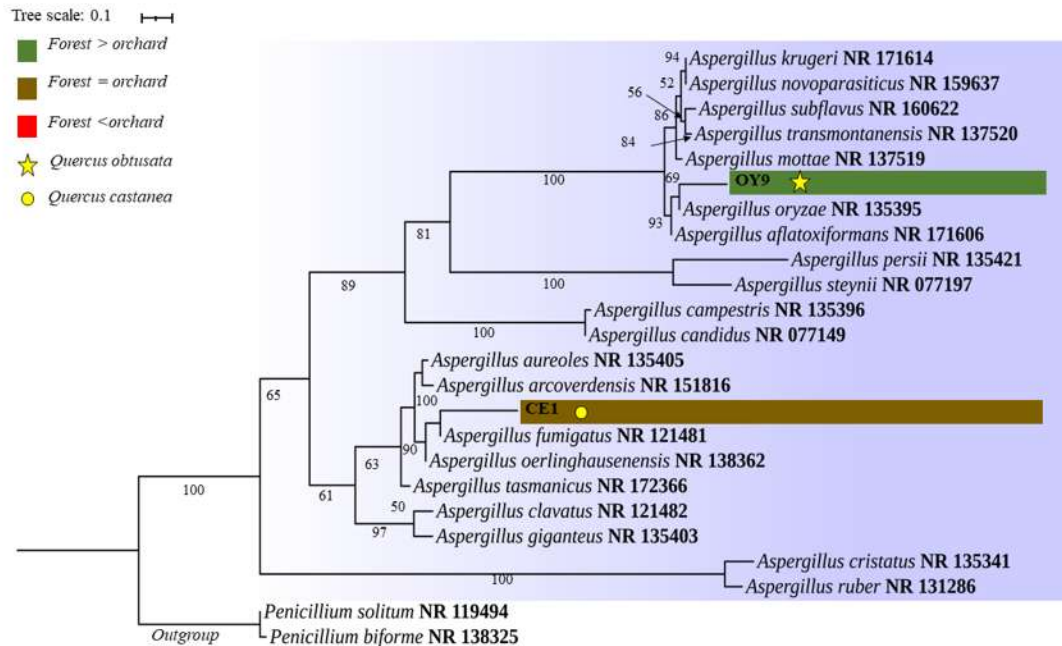


Figure S4. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species in the genus *Aspergillus*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the TNe+I+G4 evolutionary model. *Penicillium solitum* (NR 119494) and *Penicillium biforme* (NR 138325) served as the outgroup. Bootstrap values of 50 or higher, obtained from 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

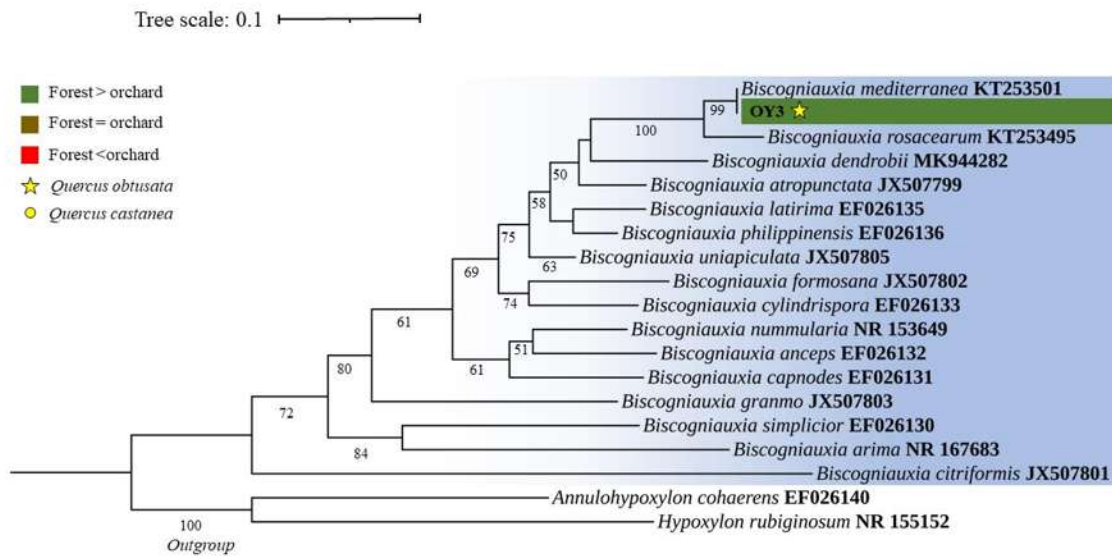


Figure S5. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species in the genus *Biscogniauxia*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the TNe+G4 evolutionary model. *Annulohypoxylon cohaerens* (EF026140) and *Hypoxylon rubiginosum* (NR 155152) served as the outgroup. Bootstrap values of 50 or higher, obtained from 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

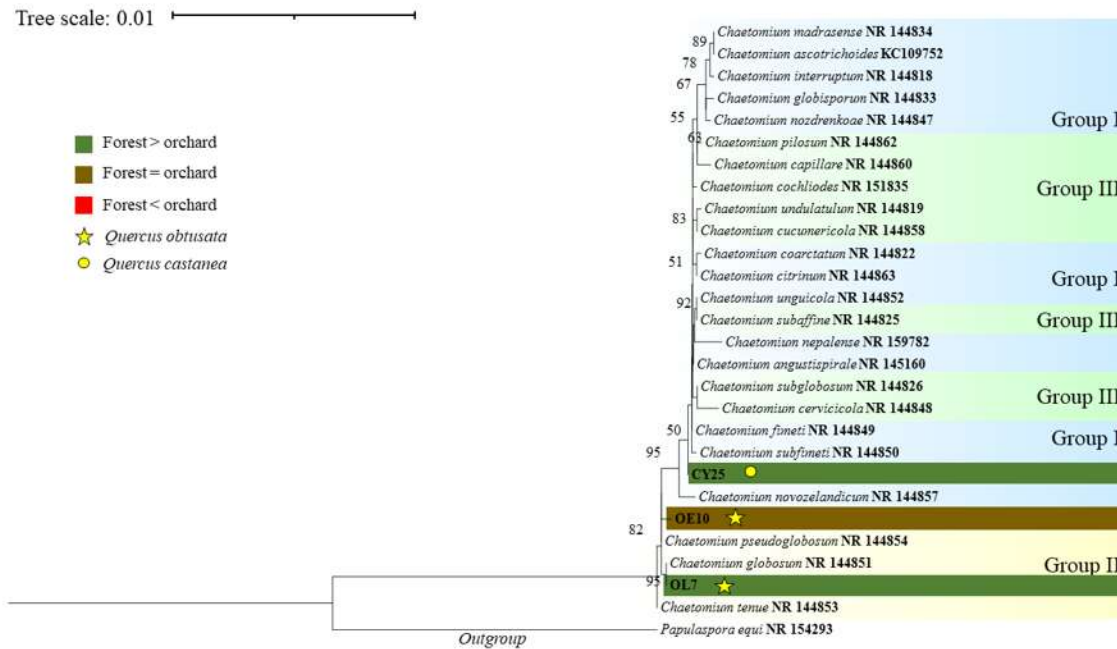


Figure S6. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species in the genus *Chaetomium*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the TNe+G4 evolutionary model. *Papulaspora equi* (NR 154293) served as the outgroup. At the ends of the terminal branches, the corresponding Groups of the genus are indicated. Bootstrap values of 50 or higher, obtained from 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

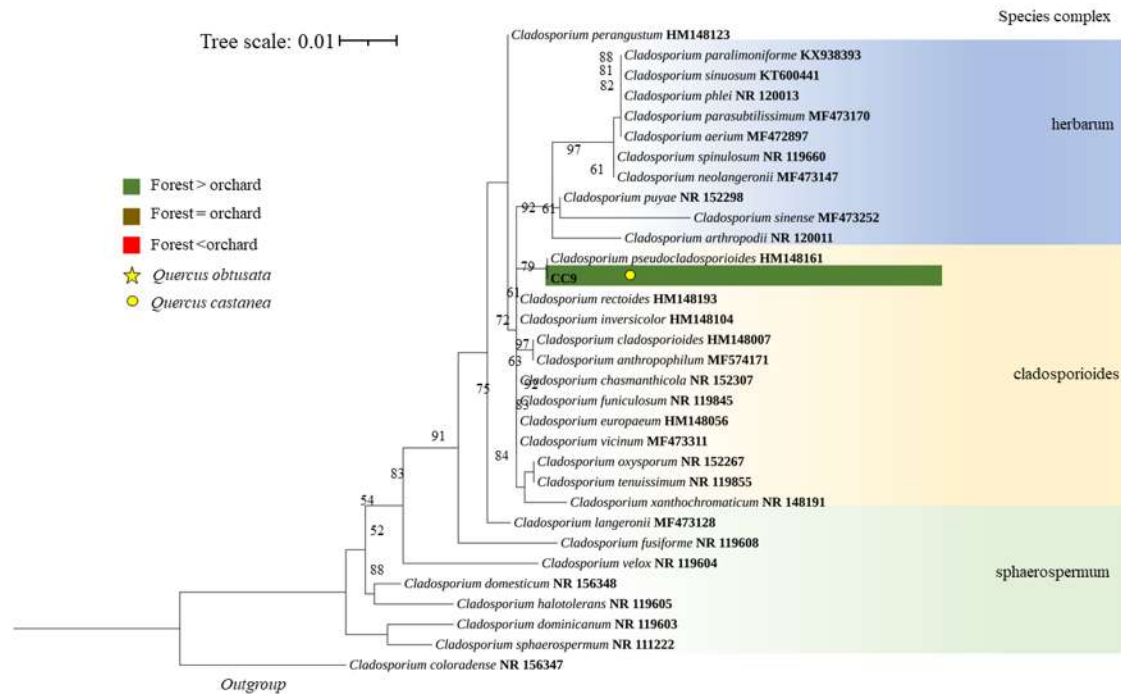


Figure S7. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species in the genus *Cladosporium*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the TNe+I+G4 evolutionary model. *Cladosporium coloradense* (NR 156347) served as the outgroup. At the ends of the terminal branches, the corresponding species complexes are indicated. Bootstrap values of 50 or higher, obtained from 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

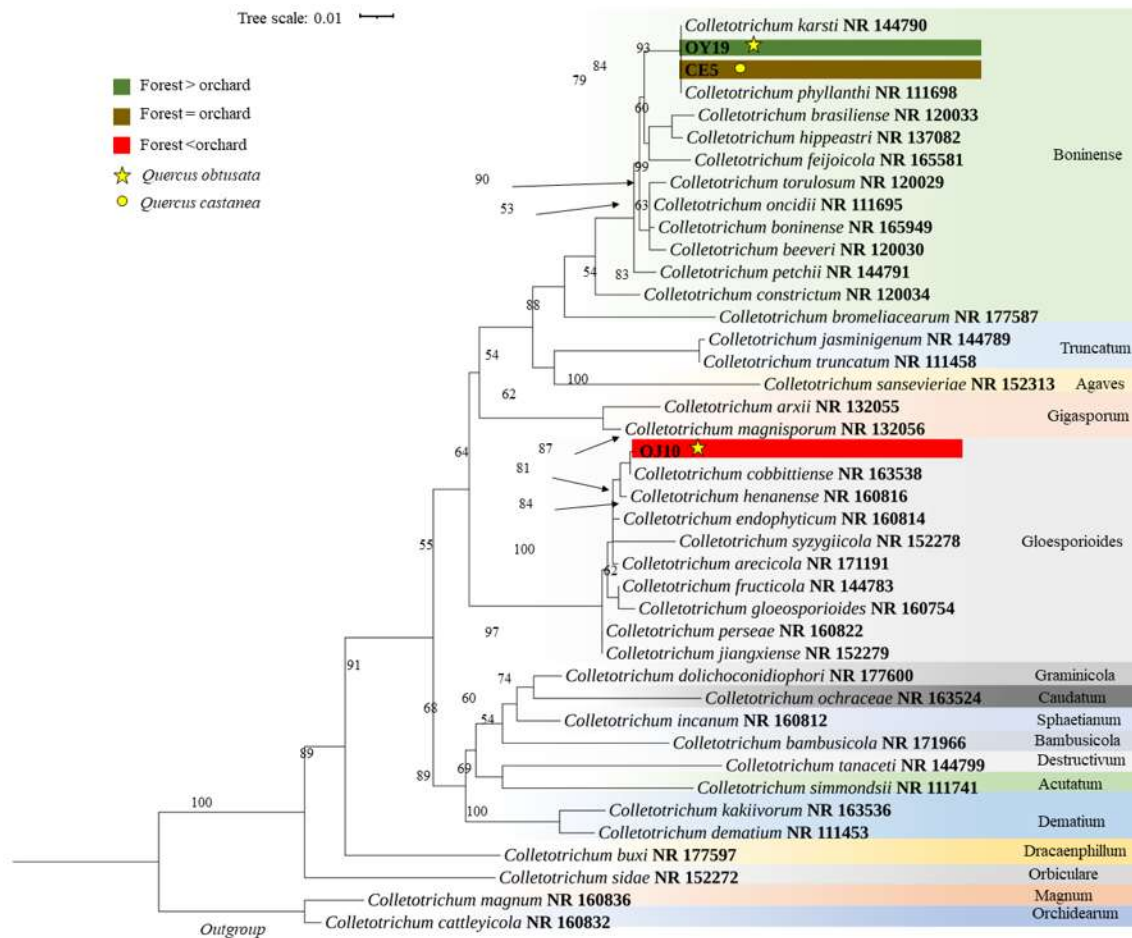


Figure S8. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species in the genus *Colletotrichum*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the SYM+I+G4 evolutionary model. *Colletotrichum magnum* (NR 160836) and *Colletotrichum cattleyicola* (NR 160832) served as the outgroup. At the ends of the terminal branches, the corresponding clades of the genus are indicated. Bootstrap values of 50 or higher, obtained from 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

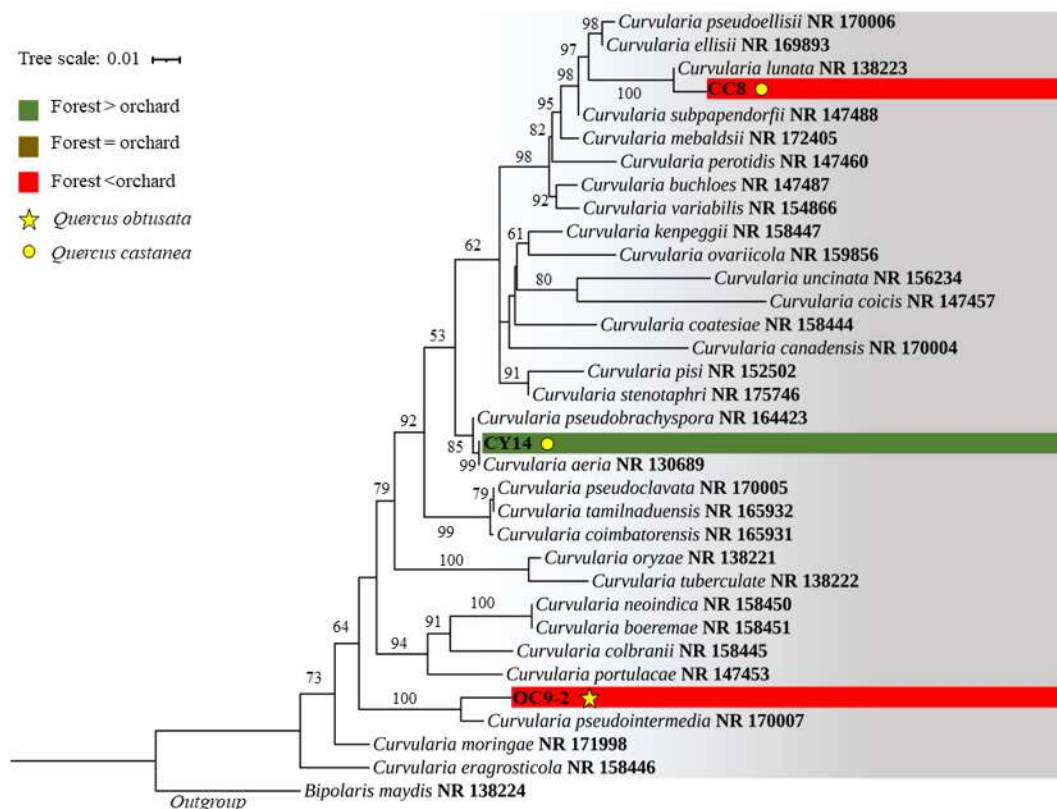


Figure S9. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species in the genus *Curvularia*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the TNe+I+G4 evolutionary model. *Bipolaris maydis* (NR 138224) served as the outgroup. Bootstrap values of 50 or higher, obtained from 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

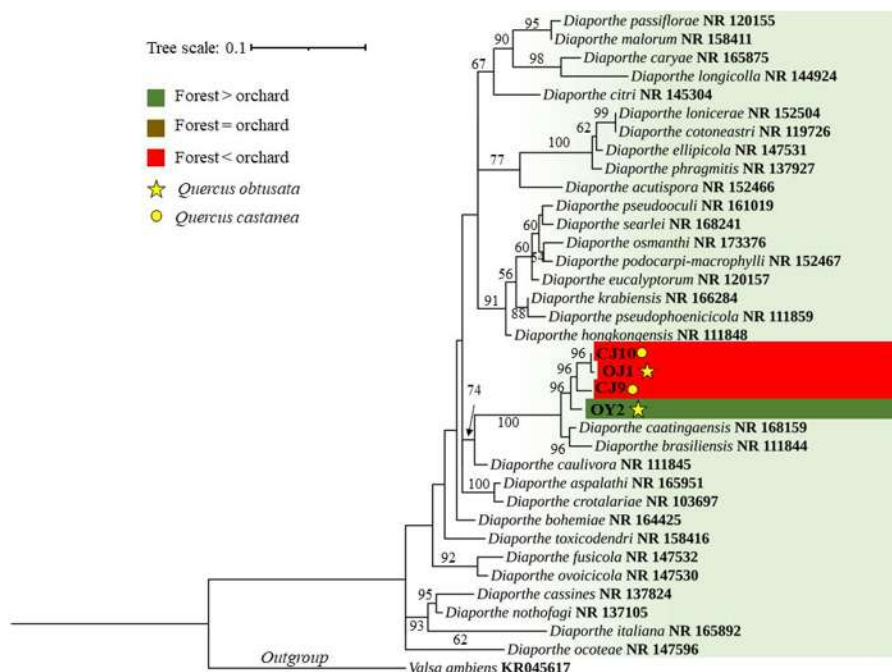


Figure S10. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species in the genus *Diaporthe*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the TIM2e+I+G4 evolutionary model. *Valsa ambiens* (KR045617) served as the outgroup. Bootstrap values of 50 or higher, based on 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

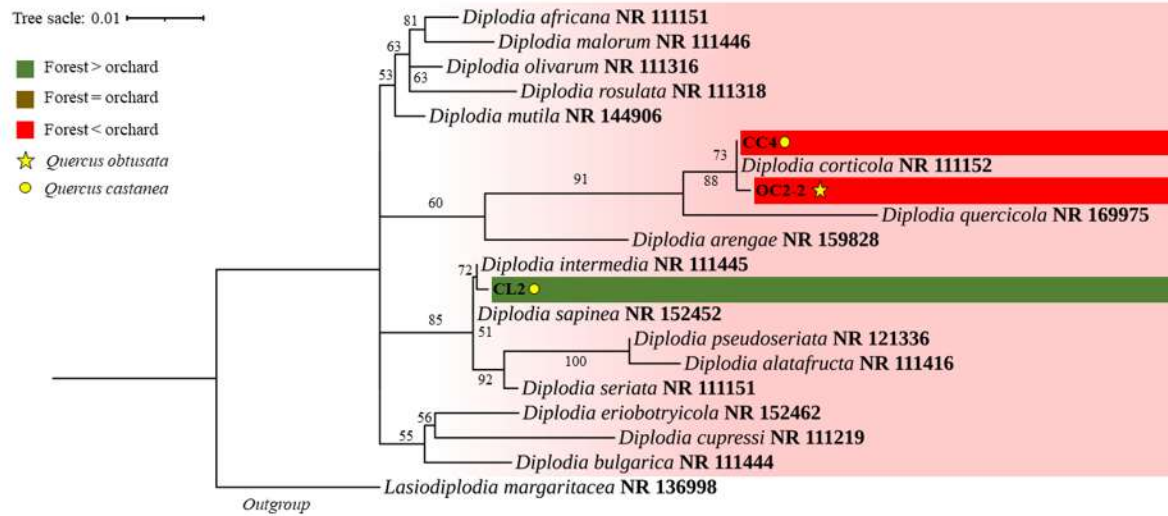


Figure S11. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species in the genus *Diplodia*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the K2P+I evolutionary model. *Lasiodiplodia margaritacea* (NR 136998) served as the outgroup. Bootstrap values of 50 or higher, based on 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

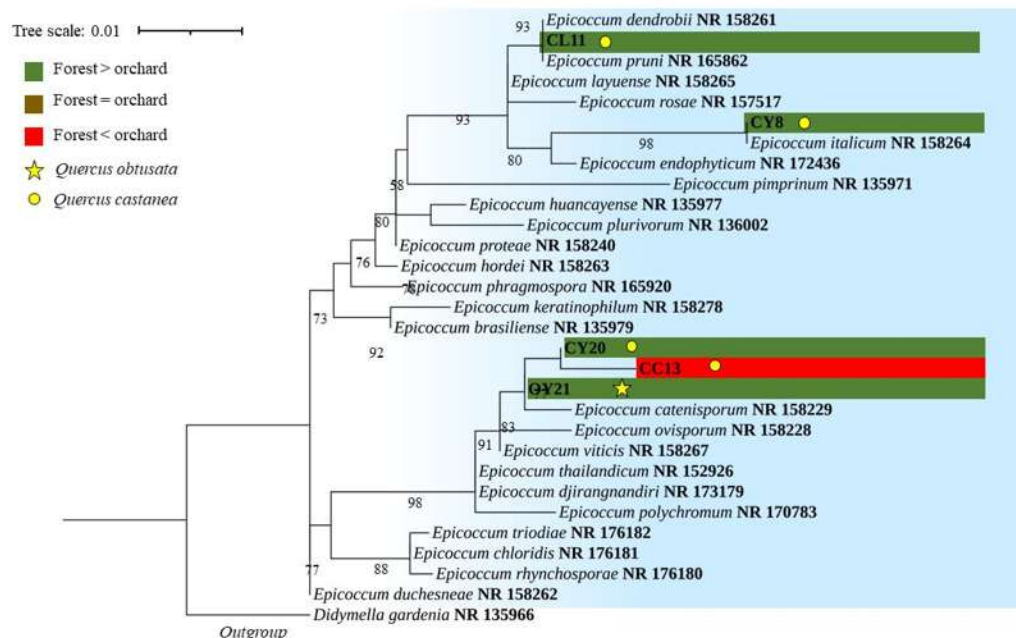


Figure S12. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species in the genus *Epicoccum*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the TNe+I evolutionary model. *Didymella gardenia* (NR 135966) served as the outgroup. Bootstrap values of 50 or higher, based on 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

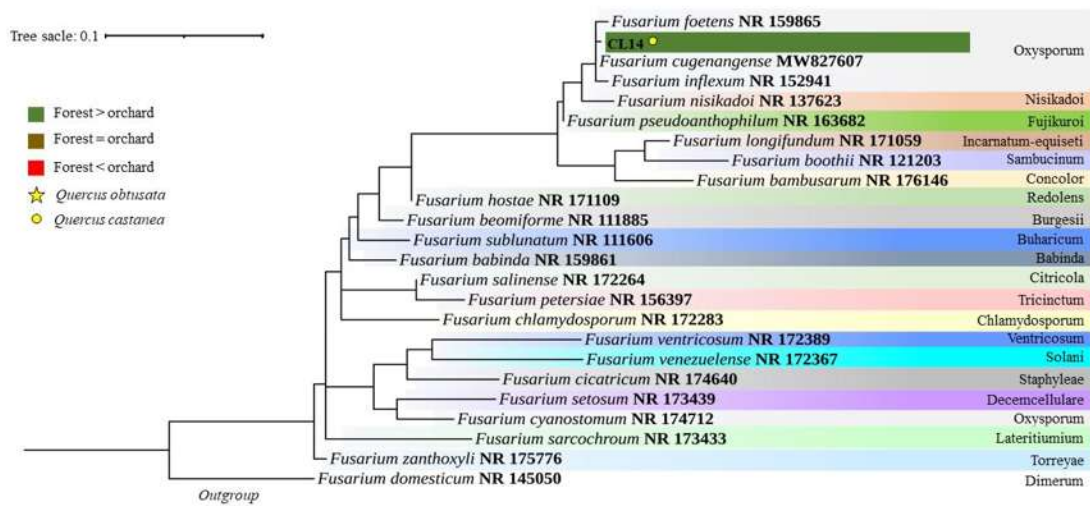


Figure S13. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species in the genus *Fusarium*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the TIM2e+I+G4 evolutionary model. *Fusarium domesticum* (NR 145050) served as the outgroup. Bootstrap values of 50 or higher, based on 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

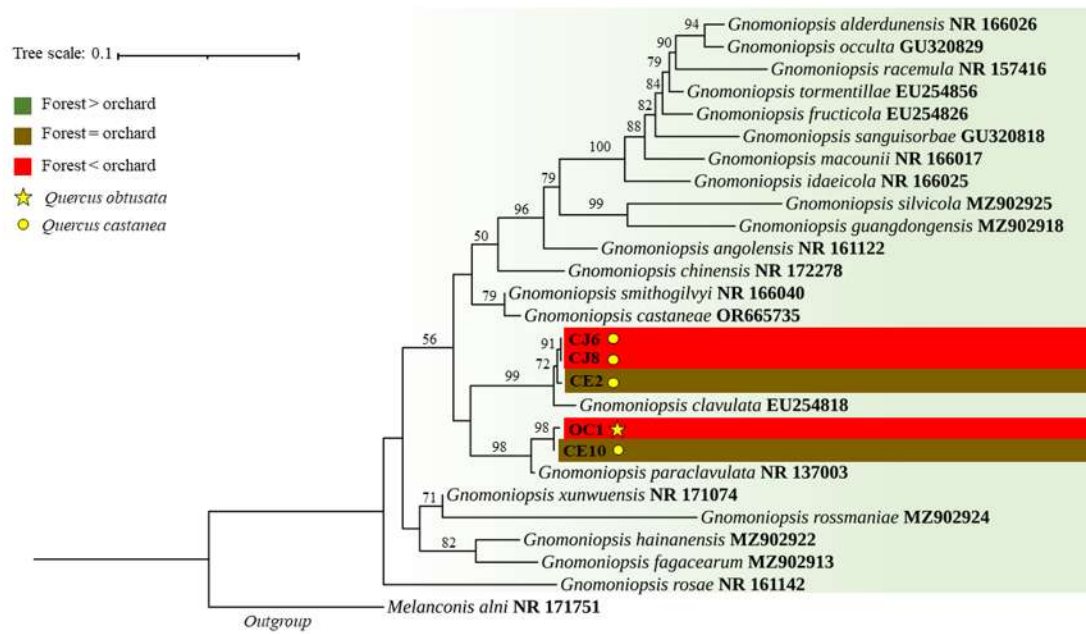


Figure S14. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species in the genus *Gnomoniopsis*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the TNe+I+G4 evolutionary model. *Melanconis alni* (NR 171751) served as the outgroup. Bootstrap values of 50 or higher, based on 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

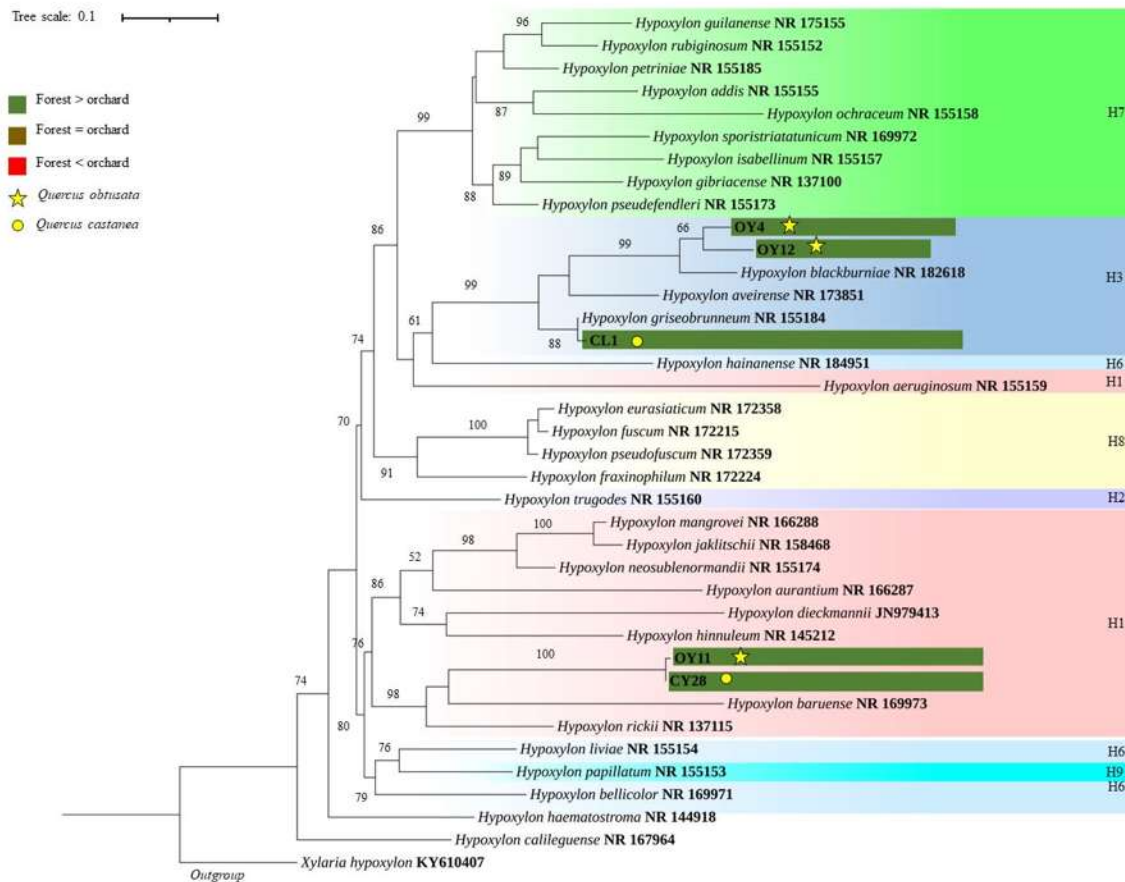


Figure S15. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species in the genus *Hypoxylon*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the SYM+I+G4 evolutionary model. *Xylaria hypoxylon* (KY610407) served as the outgroup. At the ends of the terminal branches, the corresponding subclades of the genus are indicated. Bootstrap values of 50 or higher, based on 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

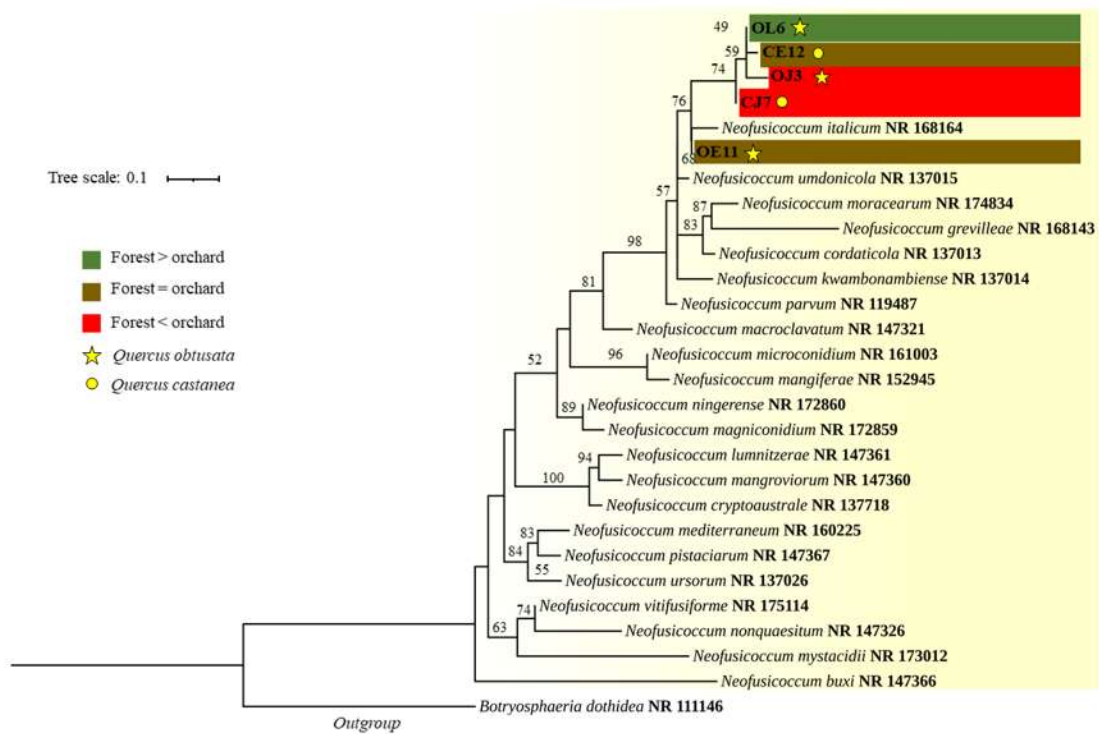


Figure S16. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species in the genus *Neofusicoccum*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the TIME+I+G4 evolutionary model. *Botryosphaeria dothidea* (NR 111146) served as the outgroup. Bootstrap values of 50 or higher, based on 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

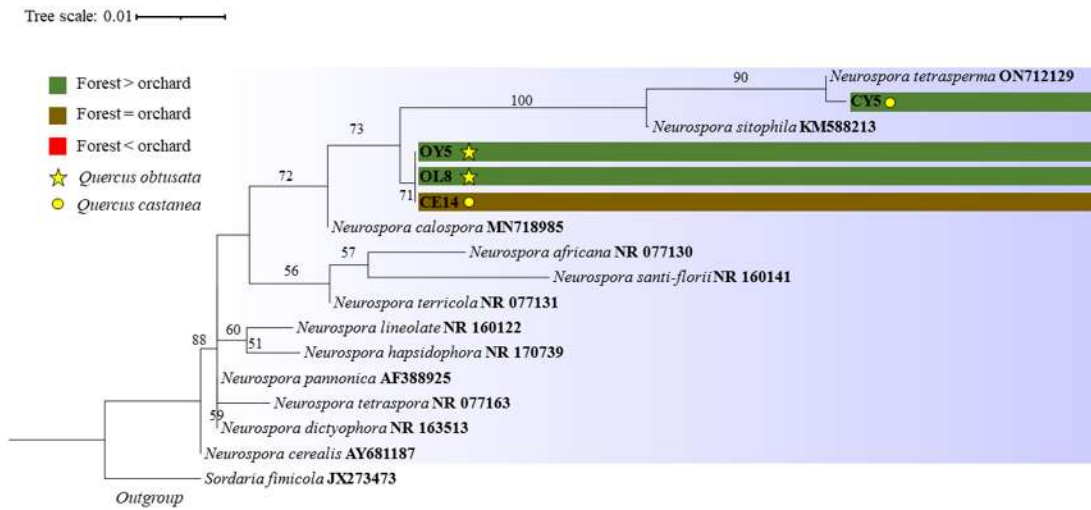


Figure S17. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species in the genus *Neurospora*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the K2P+I evolutionary model. *Sordaria fimicola* (NR JX273473) served as the outgroup. Bootstrap values of 50 or higher, based on 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

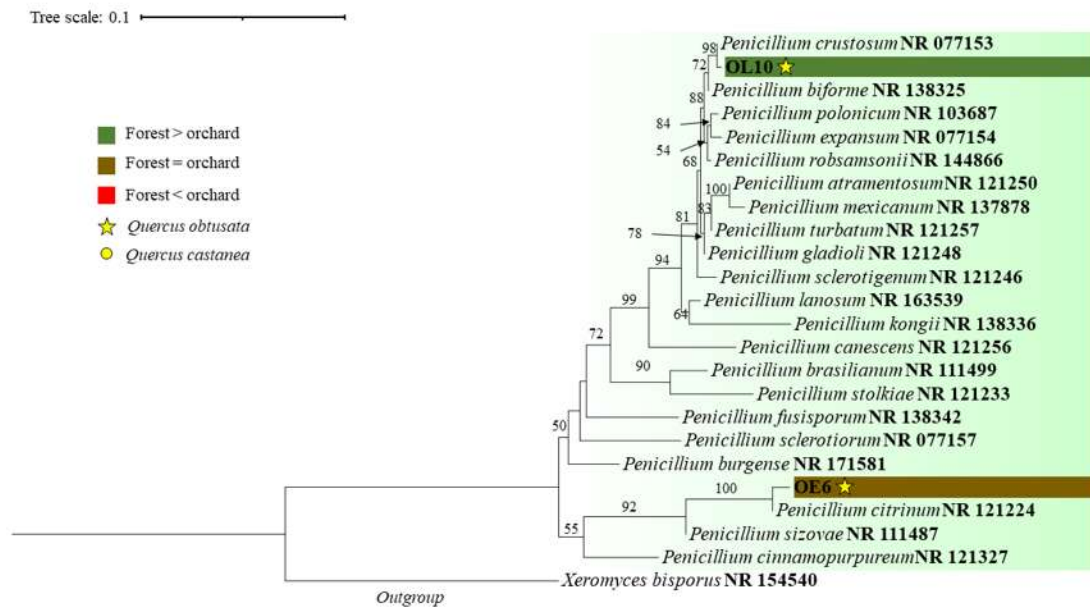


Figure S18. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species in the genus *Penicillium*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the evolutionary model TIN2e+I+G4. *Xeromyces bisporus* (NR 154540) served as the outgroup. Bootstrap values of 50 or higher, based on 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

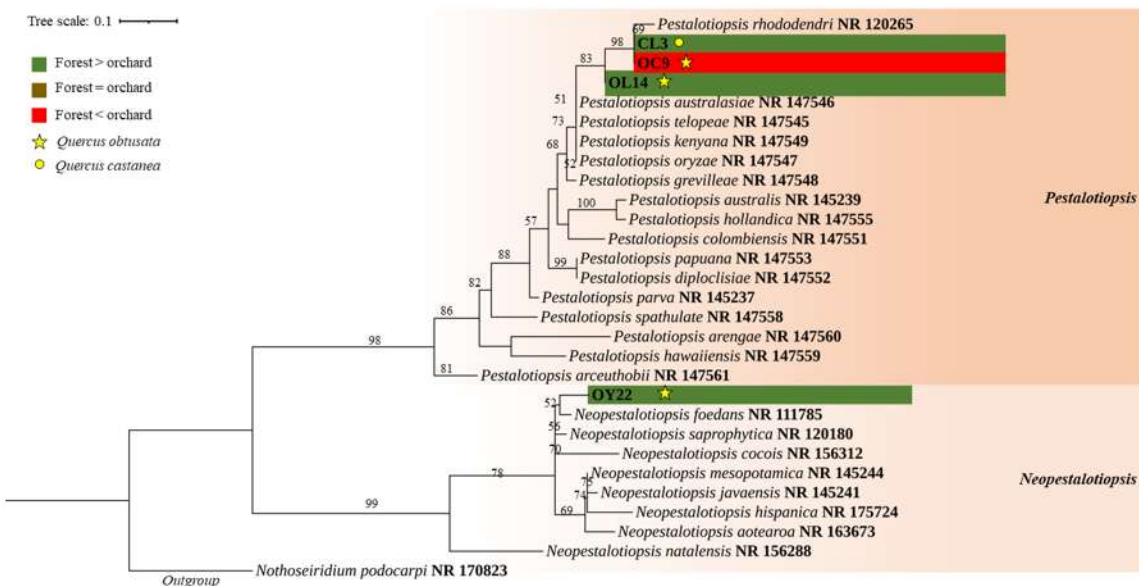


Figure S19. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species from the genera *Pestalotiopsis* and *Neopestalotiopsis*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the TIM3e+G4 evolutionary model. *Nothoseridium podocarpi* (NR 170823) served as the outgroup. Bootstrap values of 50 or higher, based on 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

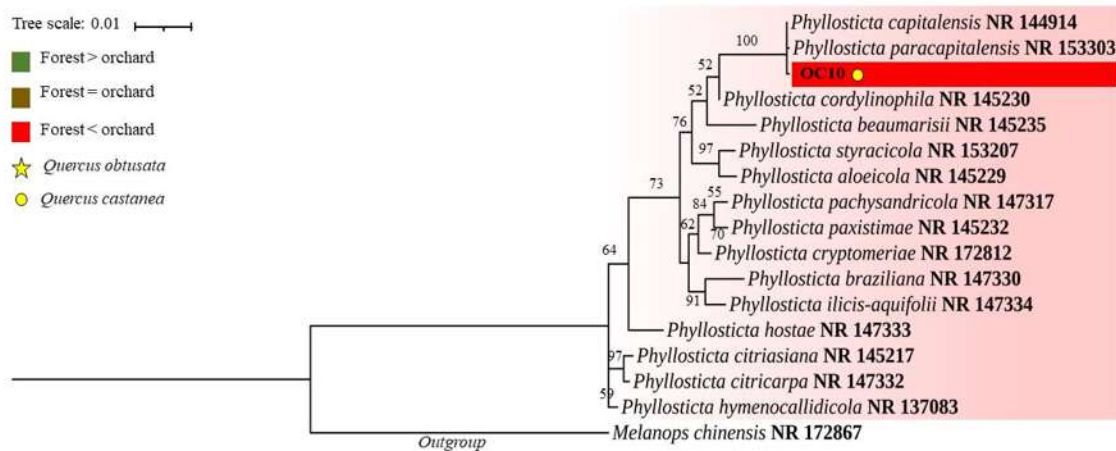


Figure S20. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species in the genus *Phyllosticta*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the TNe+I+G4 evolutionary model. *Melanops chinensis* (NR 172867) served as the outgroup. Bootstrap values of 50 or higher, based on 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

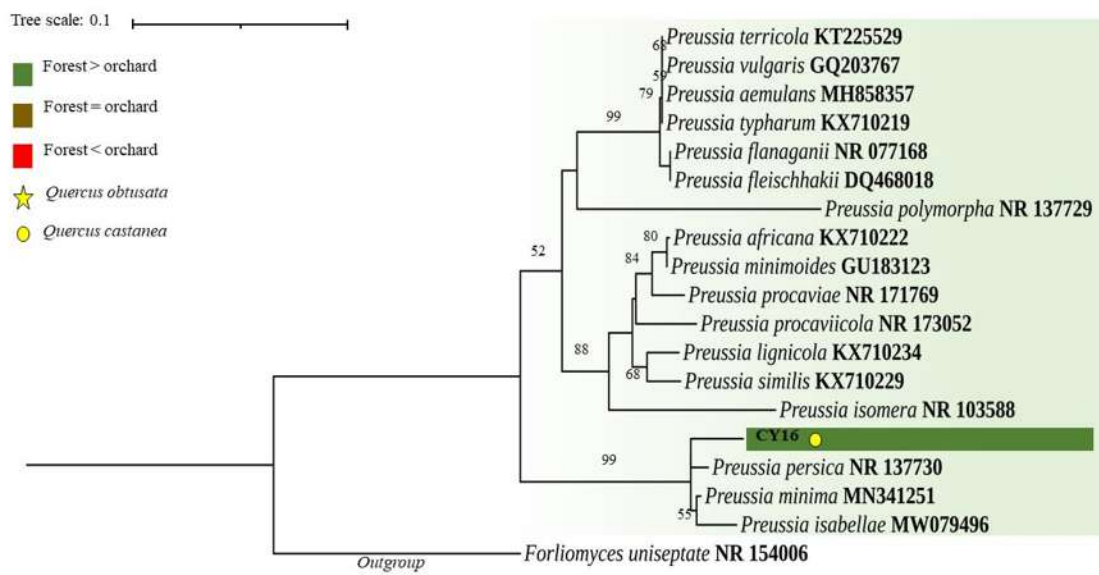


Figure S21. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species in the genus *Preussia*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the TNe+I+G4 evolutionary model. *Forliomyces uniseptate* (NR 154006) served as the outgroup. Bootstrap values of 50 or higher, based on 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

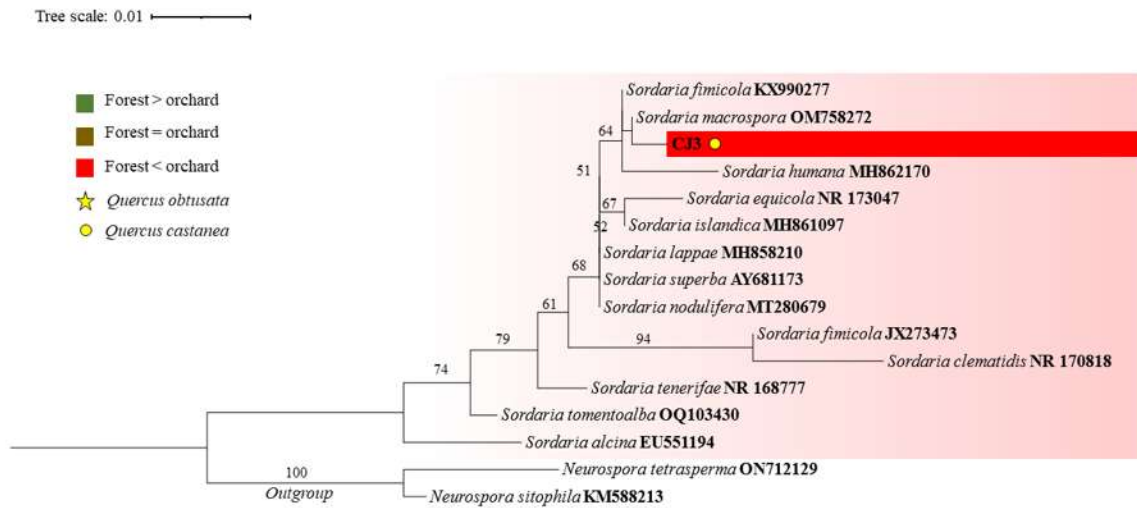


Figure S22. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species in the genus *Sordaria*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the TNe+G4 evolutionary model. *Neurospora sitophila* (KM588213) served as the outgroup. Bootstrap values of 50 or higher, based on 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

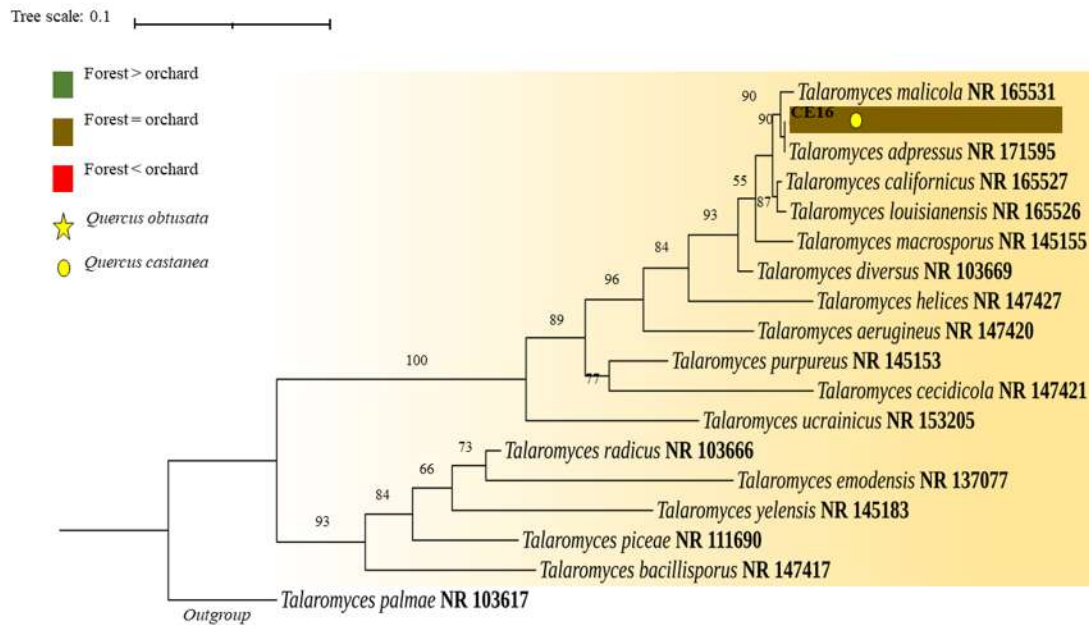


Figure S23. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species in the genus *Talaromyces*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the TNe+I+G4 evolutionary model. *Talaromyces palmae* (NR 103617) served as the outgroup. Bootstrap values of 50 or higher, based on 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

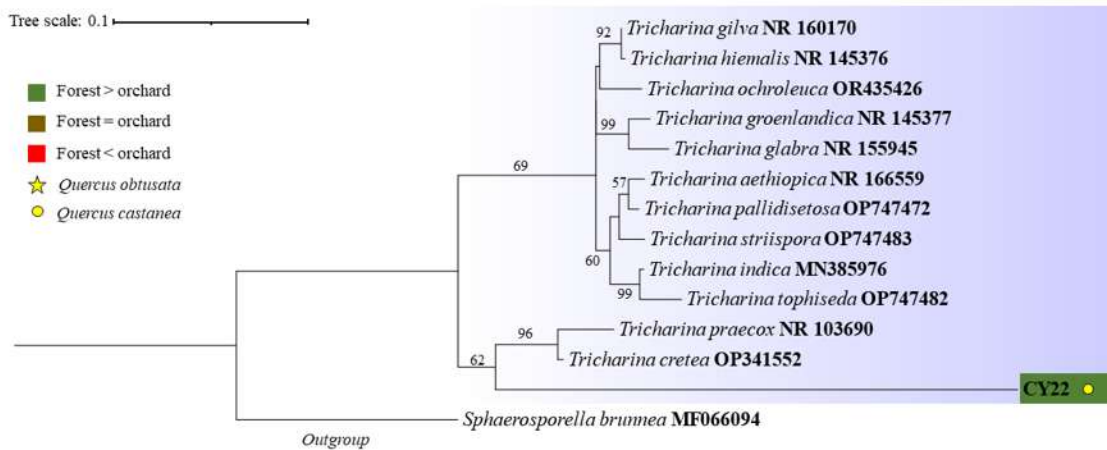


Figure S24. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species in the genus *Tricharina*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the TIM2e+I+G4 evolutionary model. *Sphaerosporella brunnea* (MF066094) served as the outgroup. Bootstrap values of 50 or higher, based on 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

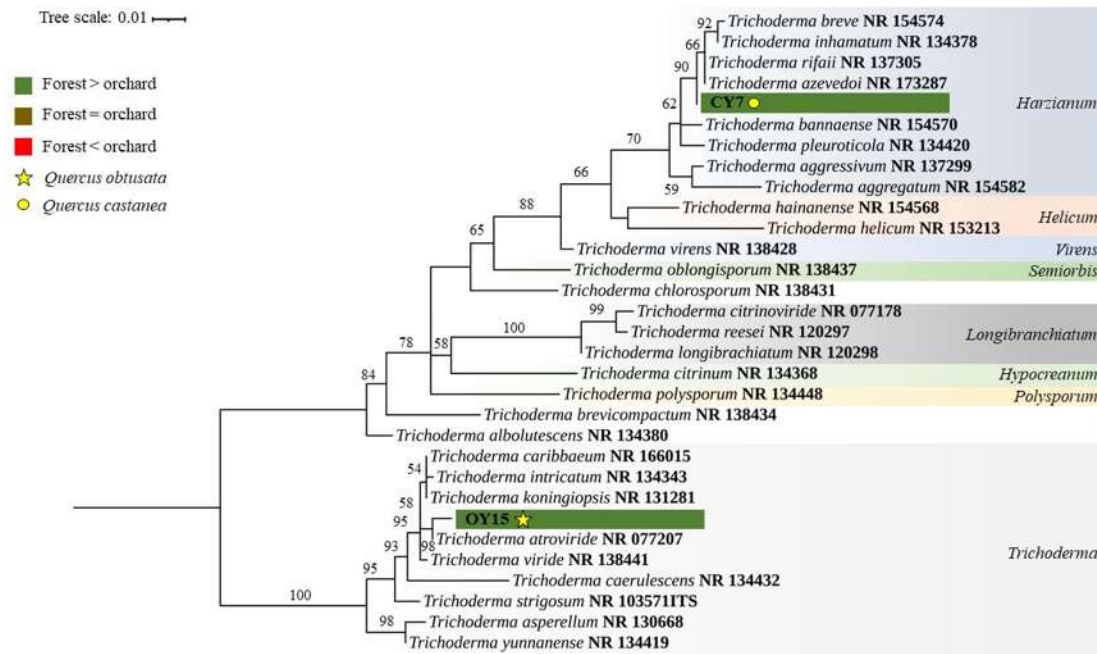


Figure S25. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species in the genus *Trichoderma*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the TIM2e+I+G4 evolutionary model. The different *Trichoderma* sections served as outgroups and are shown at the ends of the terminal branches. Bootstrap values of 50 or higher, based on 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

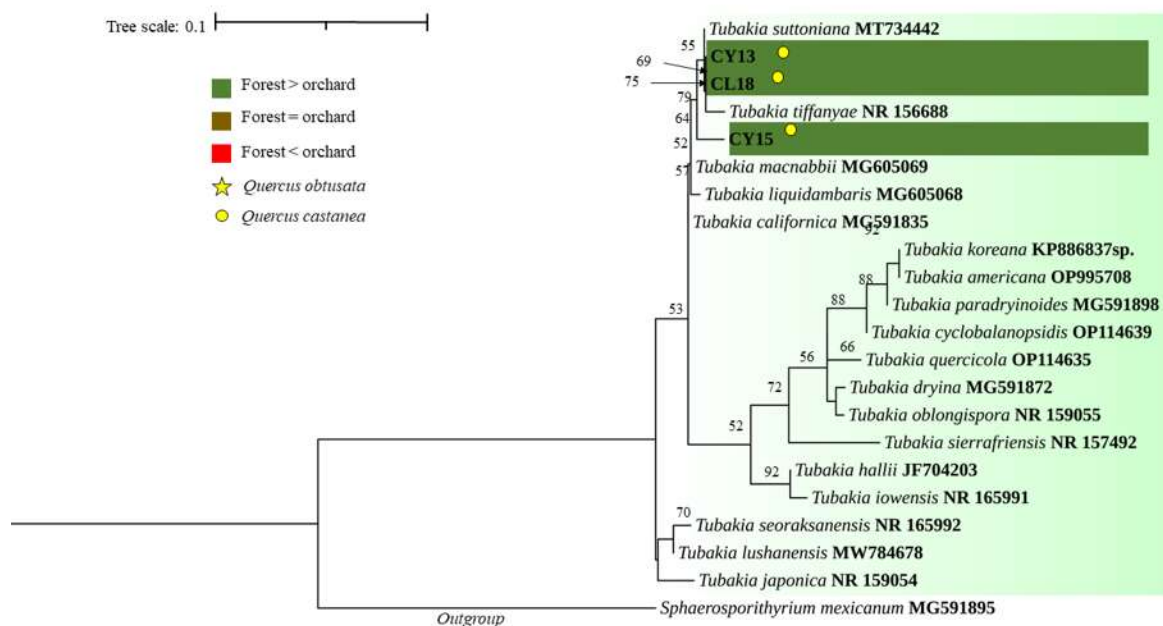


Figure S26. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species in the genus *Tubakya*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the TIM2e+I+G4 evolutionary model. *Sphaerosporithyrium mexicanum* (MG591895) served as the outgroup. Bootstrap values of 50 or higher, based on 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

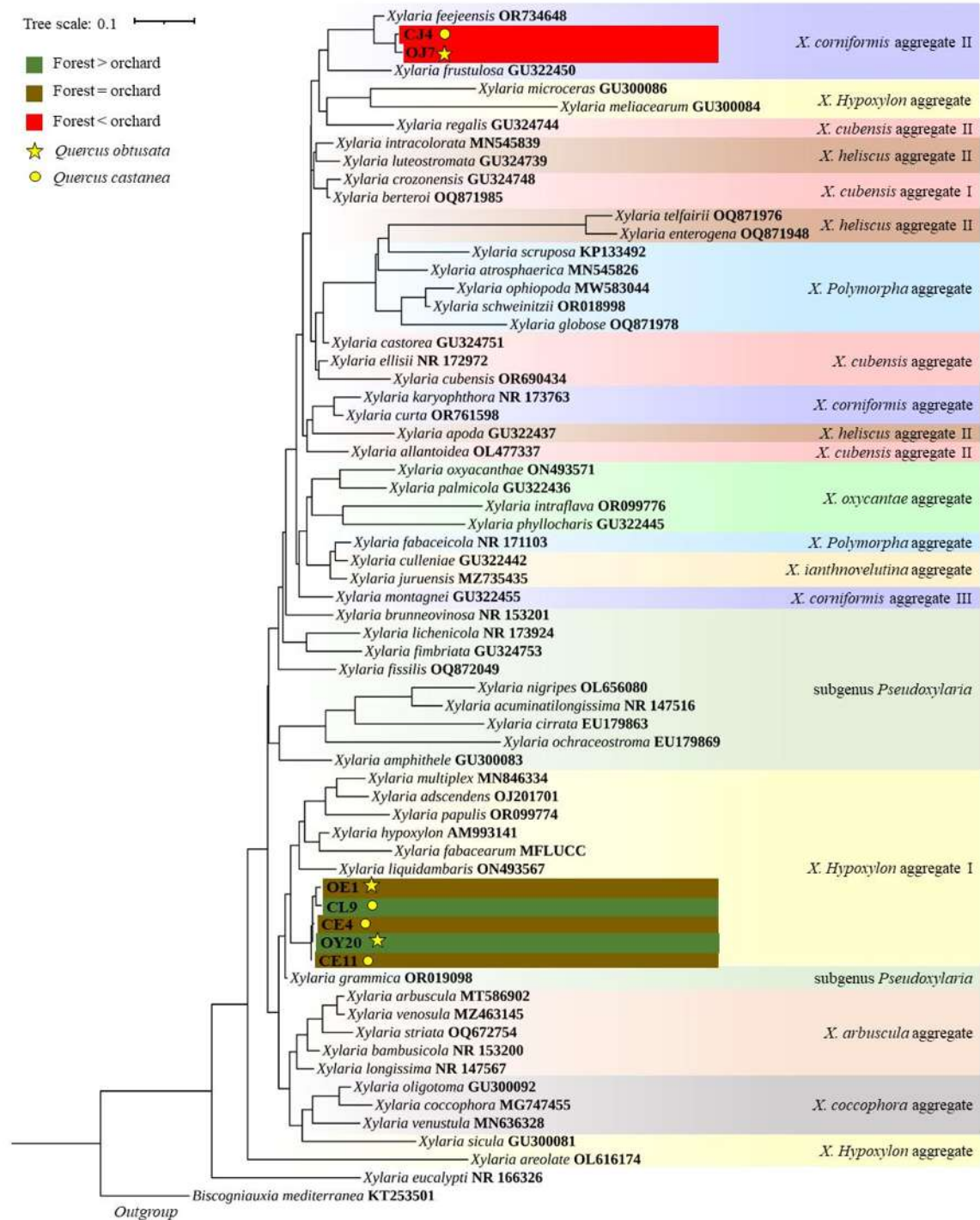


Figure S27. Phylogenetic tree based on ITS sequences of species in the genus *Xylaria*. The phylogenetic reconstruction was performed using the Maximum Likelihood (ML) criterion with the TIM2e+I+G4 evolutionary model. *Biscogniauxia mediterranea* (KT253501) served as the

outgroup. At the ends of the terminal branches, the corresponding aggregates of the genus are indicated. Bootstrap values of 50 or higher, based on 1000 iterations, are shown at each node. Isolates from this study are in bold.

### **C. CAPÍTULO III**

Diversidad y composición de hongos endófitos foliares mediante análisis de metabarcoding en encinos por cambio de uso de suelo en Michoacán

#### **1) RESUMEN**

Los bosques templados de México albergan una gran diversidad biológica, pero se encuentran amenazados por el cambio de uso del suelo, en particular en el estado de Michoacán, debido a la expansión de cultivos como el aguacate. En este estudio se evaluó la diversidad y la composición de hongos endófitos foliares en *Quercus castanea* y *Q. obtusata* a lo largo de un gradiente de cobertura forestal en una parte de la franja aguacatera de Michoacán, México. Se recolectaron hojas en seis sitios, con proporciones distintas entre el bosque y el huerto de aguacate. El ADN de las hojas de encino se extrajo y la región ITS1 se secuenció con la tecnología MiSeq de Illumina. Los datos se procesaron con DADA2 para generar variantes de secuencia (ASVs) y se realizaron análisis de diversidad alfa y beta, asignación de gremios funcionales, análisis de abundancia diferencial y de especies indicadoras. Los resultados mostraron que las comunidades estuvieron dominadas por Ascomycota. Aunque la diversidad alfa no difirió significativamente entre las coberturas de bosque, la composición de las comunidades fúngicas sí presentó diferencias significativas. Además, se identificó un mayor número de taxones indicadores en sitios con menor cobertura forestal, lo que sugiere que el cambio en el uso del suelo modula la estructura de estas comunidades microbianas.

#### **2) INTRODUCCIÓN**

Los bosques templados de México constituyen uno de los ecosistemas de mayor biodiversidad vegetal. No obstante, se encuentran entre los más amenazados por el cambio de uso del suelo y la fragmentación del bosque (Mas y González, 2015; Bonilla-Moheno y Aide, 2020). Particularmente en el estado de Michoacán, la transformación del paisaje asociada a la expansión de cultivos agrícolas ha provocado la pérdida de comunidades forestales, afectando directamente las interacciones ecológicas entre las plantas y sus comunidades asociadas (Mas *et al.*, 2017; Denvir, 2023).

Entre las comunidades menos visibles, pero más importantes, se encuentran los hongos endófitos. Estos organismos habitan en los órganos vegetales y, en algún momento de su vida, pueden colonizar los tejidos internos de la planta sin causar daño aparente a su hospedante (Petrini, 1991). Sin embargo, bajo diferentes condiciones ambientales, pueden formar asociaciones que van desde el mutualismo hasta el comensalismo y el parasitismo (Grabka *et al.*, 2022; Verma *et al.*, 2022). Los hongos endófitos se consideran cosmopolitas, ya que se han encontrado en todas las plantas hospederas estudiadas hasta ahora. Su importancia radica en los beneficios que confieren a su planta hospedera, pudiendo mejorar su resistencia al estrés abiótico, modular las defensas frente a herbívoros y patógenos, e influir en la productividad y la supervivencia (Rodríguez *et al.*, 2009; Hardoim *et al.*, 2015).

El análisis de la diversidad de hongos endófitos se ha realizado tradicionalmente mediante métodos de cultivo de estos microorganismos. Sin embargo, algunos hongos endófitos requieren condiciones especiales para su crecimiento y no es posible su reproducción en un medio de cultivo universal (Dos Reis *et al.*, 2022), lo cual puede llevar a subestimar su diversidad real (Arnold y Lutzoni, 2007). En la última década, el uso de métodos moleculares de alto rendimiento ha transformado el estudio de las comunidades microbianas (Thangavel *et al.*, 2025). Una de las técnicas utilizadas es el metabarcoding, que permite identificar de manera más eficiente los hongos de una muestra ambiental mediante la secuenciación de marcadores genéticos (Milazzo *et al.*, 2021). Se utiliza la región ITS (Internal Transcribed Spacer), aceptada como el "código de barras" universal para la identificación de hongos (Schoch *et al.*, 2012; Nilsson *et al.*, 2019).

Con ayuda del metabarcoding (o metagenómica de amplicones) se han podido describir comunidades microbianas y su sensibilidad a factores ambientales y antropogénicos (Faticov *et al.*, 2024). Por ejemplo, estudios recientes han documentado cómo los hongos endófitos responden al aclareo forestal (Liu *et al.*, 2024), a los gradientes de elevación (Zhang *et al.*, 2024) y latitudinales (Gaytán *et al.*, 2022), en distintos grupos de plantas. Sin embargo, hasta la fecha no existe información sobre cómo las comunidades de hongos endófitos foliares responden a la fragmentación forestal asociada al cambio de uso de suelo. En particular, los encinos mexicanos, por su importancia ecológica y su amplia distribución, constituyen un modelo adecuado para evaluar estas dinámicas (Valencia-A, 2004).

En este capítulo, se caracterizaron la diversidad y la composición de hongos endófitos foliares en dos especies de encino sometidas a distintos grados de perturbación por el cambio de uso del suelo, mediante análisis de metabarcoding. Buscamos verificar si el cambio de uso de suelo, de bosque a huerto de aguacate, afecta la riqueza y la estructura de las comunidades de hongos endófitos. Los resultados permitirán identificar grupos fúngicos sensibles o resilientes, así como aportar información clave sobre los impactos ecológicos menos visibles de la deforestación en Michoacán.

### **3) MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Muestreo y procesamiento de muestras**

Se muestrearon seis sitios distribuidos a lo largo de un gradiente de cambio en el uso del suelo en Michoacán, México. Tres sitios con mayor proporción de cobertura vegetal entre el bosque y el huerto de aguacate, y otros tres con menor proporción de cobertura de aguacate (Fig. 1). La clasificación de los sitios se realizó según se describe en Pérez-Solache *et al.* (2023). Se seleccionaron cuatro individuos de *Q. castanea* y cuatro de *Q. obtusata* en cada sitio, aplicando criterios de selección consistentes: árboles adultos con diámetro a la altura del pecho (DAP)  $\geq 10$ –20 cm, ausencia de daños visibles y separación mínima de  $\geq 30$  m entre individuos de una misma especie. Por individuo se recolectaron 10 hojas maduras y aparentemente sanas, preferentemente del tercio medio del dosel, evitando brotes muy jóvenes y hojas con herbivoría por insectos masticadores. La colecta se realizó en diciembre de 2021 bajo condiciones de clima templado.



Figura 1. Mapa de ubicación de los sitios de muestreo.

Las hojas se cortaron con tijeras esterilizadas y se manipularon con guantes de nitrilo estériles. Las muestras se colocaron en bolsas estériles etiquetadas con un esquema de trazabilidad (sitio–especie de encino–número de árbol–fecha). El material se mantuvo en hielera con gel refrigerante congelado ( $\sim 4^{\circ}\text{C}$ ), donde permaneció como máximo 3 días, y se trasladó al laboratorio para su congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para eliminar los microorganismos epífitos, las hojas se lavaron con agua estéril y se sometieron a desinfección secuencial con ayuda de la técnica reportada por Chi *et al.* (2019), con algunas modificaciones: etanol al 70% (1 min), hipoclorito de sodio al 1% (2 min) y etanol al 70% (30 s), seguida de tres enjuagues con agua estéril. Entre individuos se desinfectó el área de trabajo y los utensilios con etanol; además, se desinfectaron los guantes entre cada árbol. De cada árbol se formó una muestra compuesta (submuestras de 10 hojas; masa total de  $\sim 50$ – $100$  mg de tejido fresco). El tejido se maceró con nitrógeno líquido en un mortero y con un pistilo; ambos se lavaron y esterilizaron entre cada muestra mediante autoclave para prevenir la contaminación cruzada. Los homogenizados se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento molecular.

## Extracción de ADN y secuenciación

La extracción de ADN se realizó con el kit DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN), siguiendo el protocolo del fabricante. La calidad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y mediciones con un espectrofotómetro Nanodrop. Las muestras fueron enviadas a la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática (UUSMB-UNAM) para la amplificación de la región ITS1, entre los genes 18S y 5.8S del ADN ribosomal fúngico, usando los iniciadores ITS1-F (TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG) e ITS2 (GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG) reportados por Bellemain *et al.* (2010), ampliamente utilizados en estudios de códigos de barras fúngicos. Posteriormente, se secuenciaron en un equipo Illumina MiSeq con lecturas de  $2 \times 300$  pares de bases.

## Procesamiento bioinformático

Los archivos de secuenciación (FASTQ) fueron procesados en el software estadístico R (Versión 4.5.2) mediante el paquete DADA2 ITS (Callahan *et al.*, 2016), que incluyó los siguientes pasos: Importación de archivos FASTQ (lecturas directas e inversas), identificación y eliminación de secuencias cebadoras (primers), inspección de los perfiles de calidad de lecturas para el filtrado y recorte de secuencias utilizando umbrales de calidad Phred de 25. Después se estimaron las tasas de error y se procedió a la inferencia de variantes de secuencia (ASVs) y la fusión de lecturas pareadas. Las secuencias obtenidas fueron depuradas mediante la eliminación de quimeras y se generó una tabla de secuencias. La asignación taxonómica se realizó con ayuda de la base de datos UNITE v9.0 (Nilsson *et al.*, 2019), utilizando las funciones integradas en DADA2 ITS. La organización, manipulación, y análisis de los datos se llevaron a cabo con los paquetes phyloseq y Biostrings. La visualización de los resultados se realizó con ggplot. Se generaron tres tablas: (1) matriz de abundancia de ASVs por muestra, (2) tabla de taxonomía asignada para ASVs, y (3) tabla de metadatos ecológicos de cada muestra.

## Análisis estadístico

### Diversidad alfa y beta

La riqueza observada y los índices de diversidad de Shannon y de Simpson se calcularon para cada muestra utilizando el paquete *vegan* en el entorno estadístico R (Versión 4.5.2). Posteriormente, se estimaron los intervalos de confianza para cada nivel de cobertura forestal. Debido a que los datos no cumplieron los supuestos de normalidad, las diferencias entre sitios con mayor y menor cobertura forestal se evaluaron mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon de sumas de rangos. La diversidad beta se analizó a partir de una matriz de distancias de Bray-Curtis y se visualizó mediante un análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) con el paquete *vegan* (Oksanen *et al.*, 2025). Se realizaron análisis de PERMANOVA (función *adonis*) para determinar diferencias significativas en la composición de las comunidades entre sitios y entre especies de encino.

#### Análisis funcional por gremios ecológicos

Para inferir el posible papel ecológico de los hongos endófitos, se utilizó la base de datos FUNGuild (Nguyen *et al.*, 2016). El procesamiento, análisis y visualización de los datos se llevaron a cabo en el entorno R (Versión 4.5.2), utilizando los paquetes *dplyr*, *tidyr*, *vegan* y *ggplot2*. La tabla de taxonomía fue formateada y se ingresó a la herramienta para asignar a cada ASV un gremio funcional (por ejemplo, endófito, patógeno foliar, saprótrofo). Se consideraron únicamente las asignaciones con un nivel de confianza “probable” o “altamente probable”. Los resultados se guardaron en la tabla de abundancia para calcular la proporción relativa de cada gremio en cada muestra. Posteriormente, se comparó la distribución de gremios entre los sitios mediante pruebas de Kruskal-Wallis y se visualizó en gráficos de barras apiladas.

#### Análisis diferencial de abundancia

Para identificar géneros de hongos endófitos con abundancias diferenciales asociadas a los distintos niveles de cobertura forestal, se utilizó el entorno R (Versión 4.5.2) mediante el paquete DESeq2 (Love *et al.*, 2014), a partir de objetos generados con *phyloseq*. El procesamiento y la visualización de los resultados se realizaron con *dplyr*, *tidyr* y *ggplot2*. La cobertura forestal se empleó como variable explicativa principal y la especie de encino como cofactor. Las ASVs de baja abundancia se filtraron antes del análisis. Los resultados se ajustaron por FDR con el método de Benjamini-

Hochberg, y se consideraron significativos aquellos con  $p_{adj} < 0.05$ . Los valores de  $\log_2$  de Fold Change se visualizaron en un volcano plot para los ASVs más relevantes.

#### Análisis de especies indicadoras

Para identificar las especies asociadas significativamente a cada categoría de uso de suelo, se realizó un análisis de especies indicadoras con ayuda del método propuesto por Dufrêne y Legendre (1997). El valor indicador de una especie se calcula a partir de dos componentes: (1) su afinidad o especificidad (A), definida como la proporción de la abundancia total de la especie registrada en un grupo determinado, y (2) su fidelidad o frecuencia (B), que corresponde a la proporción de sitios del grupo en los que la especie está presente. El valor indicador se obtiene como el producto de ambos componentes ( $IndVal = A \times B \times 100$ ), de modo que alcanza su valor máximo (100) cuando una especie está presente en todos los sitios de un grupo y ausente en los demás. La significancia estadística de los valores indicadores se evaluó mediante una prueba de permutación de Monte Carlo con 999 permutaciones, comparando los valores observados con los esperados al azar. El análisis se realizó en el programa R (R Core Team, 2025), utilizando el paquete *indicspecies* (De Cáceres *et al.*, 2010) y la función *multipatt*.

## 4) RESULTADOS

La composición taxonómica de los hongos endófitos estuvo dominada por el filo Ascomycota en ambos tipos de sitio, seguida de Basidiomycota y de un porcentaje menor de secuencias no asignadas. En los sitios con mayor cobertura forestal, la proporción de Ascomycota fue mayor, con predominio de la clase Dothideomycetes, mientras que en los sitios con menor cobertura forestal se observó una representación relativamente mayor de Basidiomycota y de secuencias no asignadas (Fig. 2). Los análisis de diversidad alfa no mostraron diferencias significativas entre las diferentes proporciones de cobertura forestal (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Riqueza observada y diversidad de hongos endófitos foliares por muestra en sitios con mayor y menor cobertura forestal. Bosque mayor indica que son sitios con una proporción mayor de bosque que de huerto. Bosque menor indica que son sitios con proporciones menores de bosque que de huerto.

| Muestra | Cobertura    | Riqueza | Shannon  | Simpson   |
|---------|--------------|---------|----------|-----------|
| CE1PL   | Bosque menor | 146     | 3.85719  | 0.9606312 |
| CE2PL   | Bosque menor | 189     | 3.754148 | 0.9446577 |
| CJ1PS   | Bosque menor | 293     | 4.805263 | 0.9841528 |
| CJ3PS   | Bosque menor | 156     | 3.918075 | 0.9639011 |
| OD4PL   | Bosque menor | 14      | 2.331195 | 0.8858903 |
| OE4PL   | Bosque menor | 233     | 5.093131 | 0.9924621 |
| OJ1PS   | Bosque menor | 124     | 4.12891  | 0.9751681 |
| OJ4PS   | Bosque menor | 241     | 4.825834 | 0.9865823 |
| OL2PG   | Bosque mayor | 132     | 4.113948 | 0.9720118 |
| OY1PG   | Bosque mayor | 139     | 3.453016 | 0.9364975 |
| OY2PG   | Bosque mayor | 106     | 3.729445 | 0.9571224 |
| OY3PG   | Bosque mayor | 114     | 4.048578 | 0.9697938 |
| CL1PG   | Bosque mayor | 97      | 3.715748 | 0.9576794 |
| CL3PG   | Bosque mayor | 59      | 2.993264 | 0.9176967 |
| CL4PG   | Bosque mayor | 93      | 3.852559 | 0.9681061 |
| CY1PG   | Bosque mayor | 49      | 3.125758 | 0.9340261 |
| CY2PG   | Bosque mayor | 76      | 4.030501 | 0.9772305 |
| CY4PG   | Bosque mayor | 313     | 5.041424 | 0.9895753 |

Tabla 2. Riqueza observada y diversidad según las proporciones de cobertura vegetal entre bosque y huerto de aguacate. Los valores representan la mediana y los intervalos de confianza de cada

índice. Las diferencias entre coberturas se evaluaron mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Bosque mayor indica que son sitios con una proporción mayor de bosque que de huerto. Bosque menor indica que son sitios con proporciones menores de bosque que de huerto.

| Cobertura           | Riqueza             | Shannon          | Simpson          |
|---------------------|---------------------|------------------|------------------|
| Bosque mayor        | 101.5 (80.25–127.5) | 3.79 (3.52–4.04) | 0.96 (0.94–0.97) |
| Bosque menor        | 172.5 (140.5–235)   | 4.02 (3.83–4.81) | 0.97 (0.96–0.98) |
| <i>p</i> (Wilcoxon) | 0.06759907          | 0.2369852        | 0.4597559        |

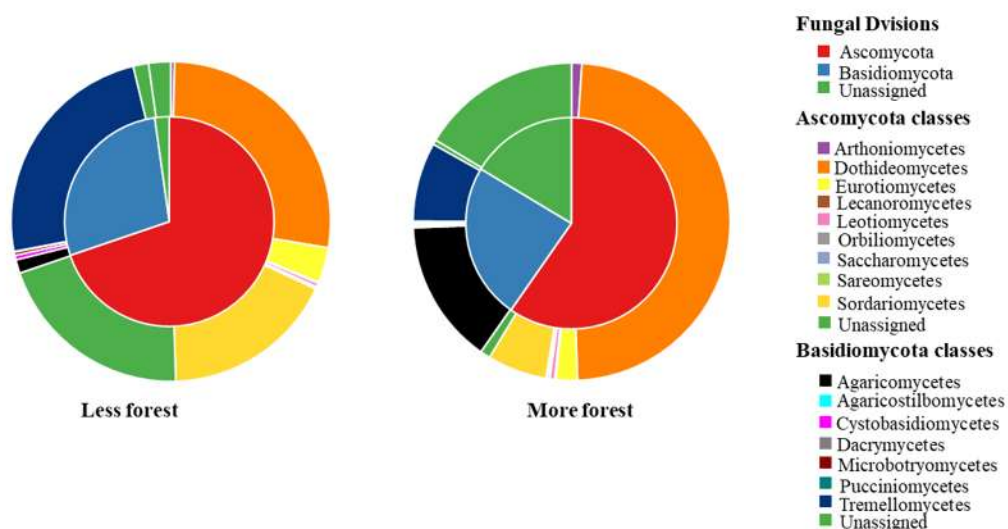


Figura 2. Composición taxonómica relativa de las comunidades de hongos endófitos foliares a nivel de filo y de clase en sitios con menor (less forest) y mayor (more forest) cobertura forestal. El círculo interno indica la abundancia relativa de divisiones fúngicas. El círculo externo muestra abundancia relativa a nivel de clase.

El análisis de diversidad beta basado en una ordenación NMDS (distancia Bray–Curtis) muestra una separación parcial entre las comunidades asociadas a los sitios con mayor y menor cobertura

forestal (Fig. 3). Aunque existe superposición entre ambos grupos, lo que sugiere cierta similitud en la composición, la separación de sus centroides indica una diferencia estructural entre ellos. Los resultados del análisis PERMANOVA ( $F = 2.05$ ,  $p = 0.021$ ,  $R^2 = 0.114$ ) confirman que estas diferencias son estadísticamente significativas; esto explica aproximadamente el 11% de la variación en la composición comunitaria.

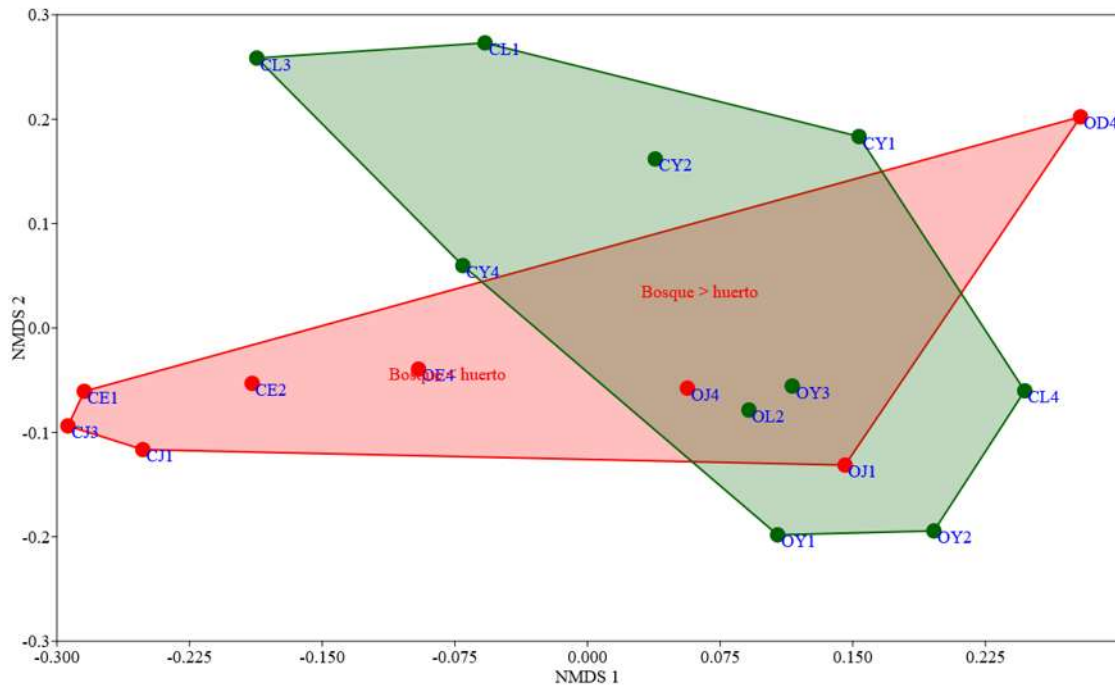


Figura 3. Análisis de NMDS (Bray-Curtis) de la composición de las comunidades de hongos endófitos foliares en sitios con cobertura forestal distinta. Bosque > huerto: mayor proporción de cobertura de bosque que de huerto, color verde. Bosque < huerto: menor proporción de cobertura de bosque que de huerto, color rojo. El nombre de la muestra está al lado de cada punto.

El análisis de distribución de grupos funcionales mostró una distribución similar en ambos tipos de sitio. El modo trófico predominante corresponde a los patótrofos-sapótrofos, que representan más del 60 % de la comunidad fúngica. Este grupo incluye especies capaces tanto de descomponer materia orgánica como de causar enfermedades, lo que sugiere una gran plasticidad ecológica. Le siguen los sapótrofos, que contribuyen a la descomposición y al reciclaje de nutrientes, y los patótrofos-sapótrofos-simbiótrofos, que combinan múltiples estrategias tróficas. Los patótrofos-simbiótrofos, patótrofos puros y simbiótrofos se encuentran en menor proporción (Fig. 4).

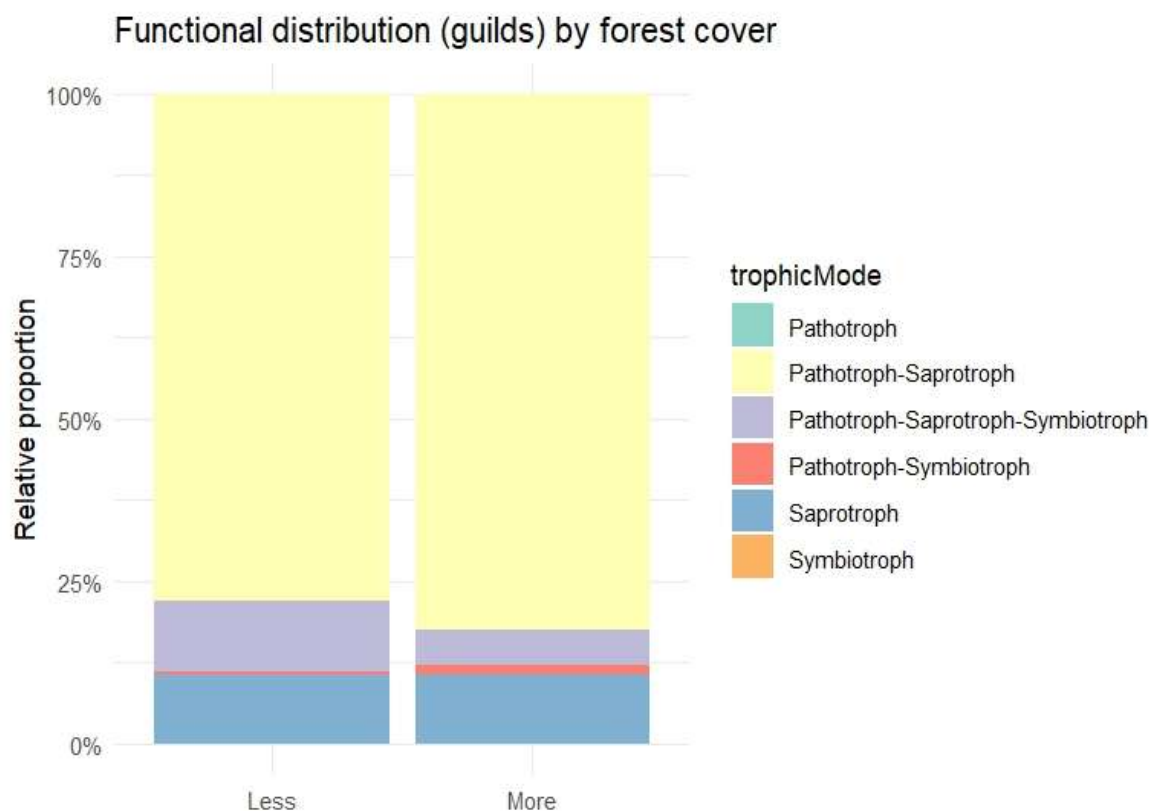


Figura 4. Distribución funcional de los gremios tróficos de hongos endófitos foliares en sitios con menor (Less) y mayor (More) cobertura forestal. Las barras apiladas representan la proporción relativa de cada modo trófico asignada a partir de la clasificación funcional.

El gráfico de volcán obtenido a partir del análisis DESeq2 muestra las diferencias en la abundancia de las unidades de secuencia de amplicón (ASVs) entre sitios con menor (Less) y mayor (More) proporción de cobertura forestal. La mayoría de los ASVs significativamente diferentes se encuentran hacia el lado positivo del eje de cambio de pliegue ( $\log_2$  Fold Change). En particular, las ASVs 186, 692, 569 y 342 destacan por valores muy altos de cambio de pliegue y por alta significancia estadística, lo que sugiere que estos taxones responden a condiciones de menor cobertura forestal. Por otro lado, solo la ASV570 mostró una mayor abundancia en los sitios con mayor proporción de bosque, lo que indica un menor número de taxones característicos de dichas condiciones (Fig. 5).

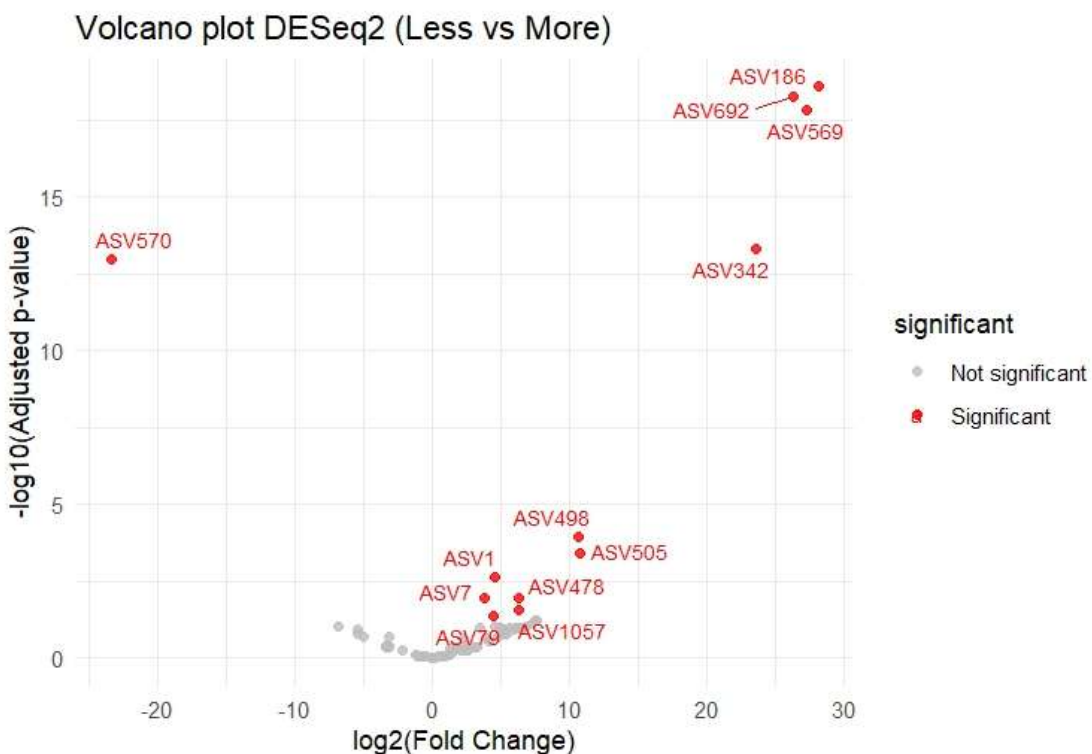


Figura 5. Gráfico de volcán del análisis DESeq2 que muestra ASVs diferencialmente abundantes entre sitios con menor y mayor cobertura forestal. Los ASVs significativos ( $p$  ajustado  $< 0.05$ ) se destacan en rojo.

El patrón observado revela una clara diferenciación en la composición fúngica entre ambos tipos de cobertura. Varias ASVs, como *Laetisaria lichenicola*, *Ascomycota* no clasificada y *Papulaspora bissyna*, se asocian principalmente con los sitios de baja cobertura forestal, mientras que otras, como *Parapyrenochaeta* no clasificada y algunos miembros de las familias Trichomeriaceae y Phaeosphaeriaceae, presentan mayor abundancia en los sitios de alta cobertura forestal (Fig. 6).

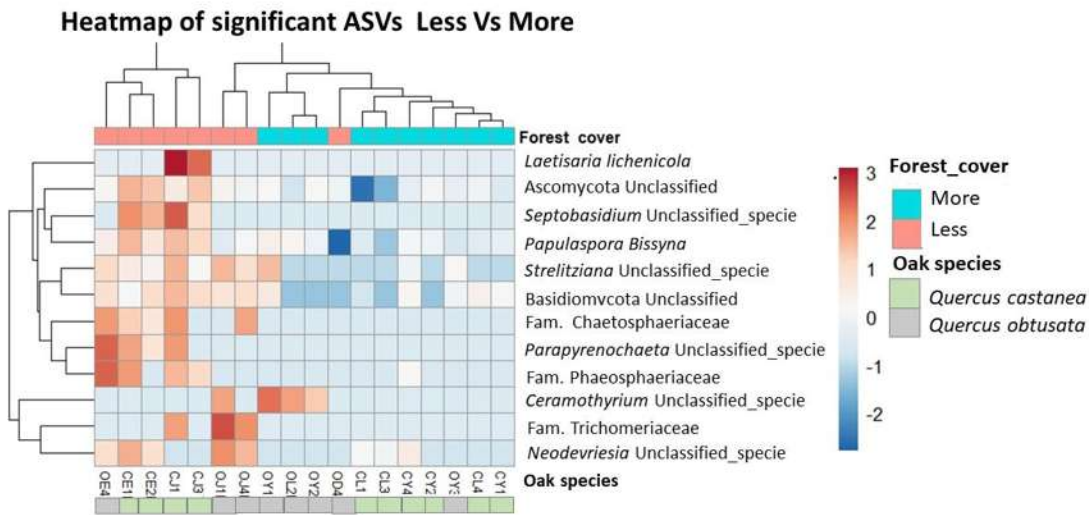


Figura 6. Mapa de calor de las ASVs más significativas de sitios con mayor y menor cobertura forestal.

El análisis de especies indicadoras (IndVal) a nivel de género reveló diferencias claras en la asociación de los taxones fúngicos con los sitios según la cobertura forestal (Fig. 7). Se identificaron varios géneros significativamente asociados a sitios con menor cobertura forestal, que presentaron valores elevados de IndVal ( $\approx 0.70$ – $0.85$ ). Algunos de estos taxones mostraron niveles de significancia altos ( $p < 0.01$ ), mientras que otros fueron significativos a  $p < 0.05$ . En contraste, un menor número de géneros se asoció significativamente con los sitios de mayor cobertura forestal, con valores de IndVal cercanos a  $0.70$ – $0.75$  y  $p < 0.05$ . En general, la mayoría de los taxones indicadores identificados correspondieron a ambientes con menor cobertura de bosque.

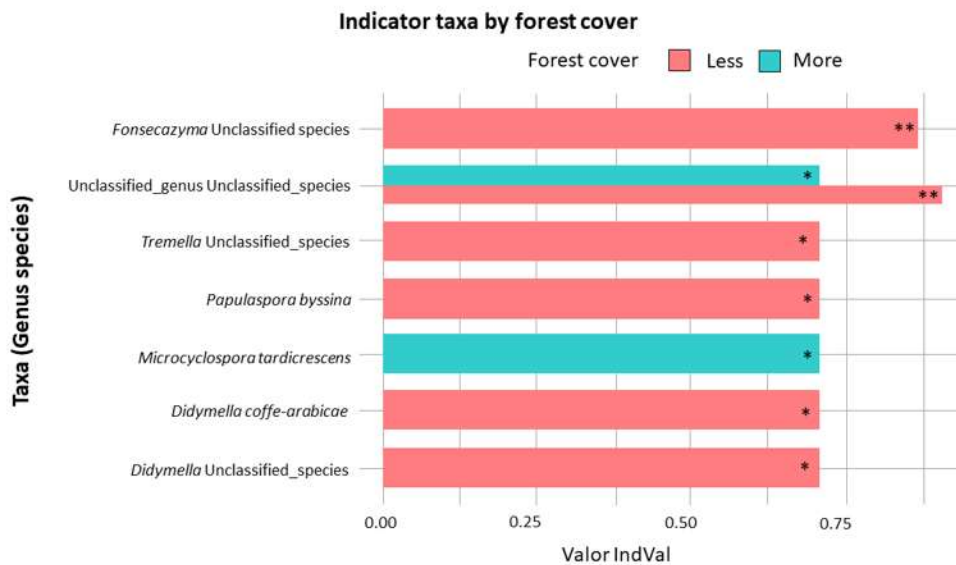


Figura 7. Análisis de especies indicadoras (IndVal) a nivel de género de comunidades de hongos endófitos foliares en sitios con cobertura forestal distinta.

## 5) DISCUSIÓN

En los últimos años, las técnicas de secuenciación masiva han revolucionado los estudios sobre la diversidad y la composición de las comunidades microbianas. En este trabajo, se utilizó el metabarcoding, una técnica de secuenciación masiva, para describir la diversidad y la composición de hongos endófitos foliares de encinos ubicados en sitios con diferentes niveles de cobertura entre el bosque y los huertos de aguacate.

La composición taxonómica de las comunidades de hongos endófitos foliares estuvo dominada por el filo Ascomycota en ambos tipos de cobertura forestal, seguida por Basidiomycota, un patrón ampliamente reportado en estudios sobre endófitos foliares de ecosistemas templados y tropicales (Arnold et al., 2007; Malarvizhi et al., 2023; Molina et al., 2025). La dominancia de Ascomycota refleja su elevada diversidad y su capacidad para colonizar tejidos foliares bajo una amplia gama de condiciones ambientales (Schoch et al., 2009; Wang et al., 2010; Rashmi et al., 2019). En el grupo de los Ascomycota, los Dothideomycetes fueron los más abundantes, especialmente en sitios con mayor cobertura de bosque que de huerto de aguacate, donde representaron más del 50% de la abundancia. Los Dothideomycetes incluyen numerosos endófitos persistentes, con ciclos de vida estrechamente ligados al hospedero y una alta capacidad para tolerar las defensas químicas foliares

(Ametrano et al., 2019; Hongsanant et al., 2020). En contraste, la mayor representación relativa de secuencias no asignadas en sitios con mayor cobertura forestal podría reflejar comunidades más dinámicas y menos estudiadas, influenciadas por condiciones ambientales asociadas a bosques con menor grado de perturbación (Eberly et al., 2024; Díez-Hernando et al., 2024).

Los análisis de diversidad alfa no mostraron diferencias significativas entre los tipos de cobertura forestal. Sin embargo, la diversidad beta, evaluada mediante NMDS con la distancia de Bray–Curtis, evidenció una separación parcial entre las comunidades fúngicas asociadas a sitios con mayor y menor cobertura forestal. Este resultado sugiere que, aunque la riqueza de ASVs se mantiene relativamente constante, la identidad de los taxones que componen estas comunidades varía entre los ambientes. Este desacoplamiento entre la diversidad alfa y la composición comunitaria ha sido documentado previamente en gradientes latitudinales (Gaytán et al., 2022), donde la pérdida o sustitución de especies no necesariamente se traduce en una reducción inmediata de la riqueza total. Aunque existe traslape entre grupos, la separación de sus centroides y los resultados del PERMANOVA indican diferencias estructurales estadísticamente significativas, que explican aproximadamente el 11 % de la variación total en la composición comunitaria. Este resultado es coherente con estudios de campo en los que múltiples factores bióticos y abióticos, incluidos el microclima, la identidad del hospedero y las características del paisaje, contribuyen a estructurar las comunidades (Peay et al., 2016; Jia et al., 2020).

El análisis funcional reveló una distribución similar de los grupos tróficos en ambos tipos de sitio, con predominio de patótrofos–sapótrofos, que representaron más del 60 % de la comunidad. Este resultado ha sido reportado previamente en otras especies de plantas, coincidiendo con nuestros hallazgos (Kaniyassery et al., 2024). Este grupo incluye taxones con alta plasticidad ecológica, capaces de transitar entre estilos de vida endofíticos, saprotróficos o patogénicos, según las condiciones del hospedero y del ambiente (Boddy, 2016; Bard et al., 2024; Martín y Tan, 2025). Su dominancia sugiere que los hongos endófitos foliares desempeñan un papel clave tanto en la dinámica de la salud vegetal como en los procesos de reciclaje de nutrientes tras la senescencia foliar, independientemente de la cobertura forestal.

Sin embargo, la diferenciación funcional se vuelve más evidente al analizar la abundancia diferencial de ASVs mediante DESeq2. El gráfico de volcán mostró que la mayoría de los ASVs significativamente diferenciados son más abundantes en los sitios con menor cobertura forestal, lo

que indica un claro sesgo hacia estos ambientes alterados. Taxones como *Laetisaria lichenicola* y *Papulaspora bissyna* han sido previamente asociados con ambientes perturbados, suelos agrícolas o condiciones de estrés para el hospedero, lo que sugiere un carácter oportunista o tolerante a la alteración (Grabka et al., 2022; Singh et al., 2023). Esta segregación sugiere que la pérdida de cobertura boscosa influye significativamente en la estructura taxonómica de las comunidades fúngicas, favoreciendo ciertos grupos oportunistas o tolerantes a la perturbación en ambientes más alterados, y promoviendo la presencia de taxones más especializados o sensibles en áreas mejor conservadas.

Por el contrario, el bajo número de ASVs enriquecidos en sitios con mayor cobertura forestal sugiere que los ambientes más conservados albergan comunidades más estables, pero menos dominadas por taxones altamente diferenciales. La mayor abundancia de grupos como Trichomeriaceae, Phaeosphaeriaceae y Parapyrenochaeta en estos sitios coincide con reportes que indican que muchos endófitos especializados presentan mayores requerimientos microambientales y menor tolerancia a la perturbación (Christian y Perlin, 2024; Saikkonen, 2024).

En los últimos años, la diversidad de hongos endófitos foliares se ha evaluado mediante técnicas de cultivo y de secuenciación de nueva generación, empleándolas como herramientas complementarias (Lahiri et al., 2021; Albuquerque et al., 2025). En este estudio, se obtuvieron 32 géneros de hongos endófitos foliares de encinos mediante cultivo (Capítulo II), mientras que el análisis de metabarcoding permitió detectar 169 géneros. Esta diferencia es consistente con lo reportado en otros trabajos, en los que el cultivo suele recuperar únicamente entre el 10 % y el 25 % de la diversidad detectada mediante metabarcoding. Ambas metodologías coincidieron en la detección de 12 géneros: *Cladosporium*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Pestalotiopsis*, *Diplodia*, *Aspergillus*, *Hypoxylon*, *Nigrospora*, *Alternaria*, *Preussia*, *Curvularia* y *Neofusicoccum*. El análisis de la fracción cultivable de los hongos endófitos foliares de *Q. castanea* y *Q. obtusata* reveló patrones consistentes a lo largo del gradiente de cobertura bosque-huerto. En términos generales, los sitios con mayor proporción forestal presentaron mayor riqueza de géneros, mayor número de taxones exclusivos y valores más altos en los estimadores de diversidad, mientras que los sitios dominados por huertos mostraron una reducción progresiva de la riqueza, aunque mantuvieron valores relativamente altos de equidad. Este patrón sugiere un proceso de filtrado ambiental asociado a la pérdida de cobertura forestal. En ecosistemas templados, la estructura del

dosel, la humedad relativa, la estabilidad térmica y la complejidad vertical del bosque influyen directamente en la colonización y la persistencia de endófitos foliares (Peay et al., 2016; Jia et al., 2020). Los sitios con mayor cobertura forestal probablemente ofrecen microambientes más estables y heterogéneos, lo que favorece la coexistencia de diversos linajes fúngicos con requerimientos ecológicos distintos. En contraste, los paisajes dominados por huertos presentan mayor exposición a la radiación solar, mayores fluctuaciones térmicas y alteraciones en la humedad, condiciones que pueden actuar como filtros que restringen la comunidad a taxones más tolerantes a la perturbación.

La evidencia indica que la fragmentación de bosque y la expansión de huertos de aguacate modifica la estructura de la comunidad de hongos endófitos foliares y reduce su complejidad taxonómica. Dado que los hongos endófitos pueden influir en la resistencia a herbívoros y patógenos, así como en la eficiencia del reciclaje de nutrientes, estos cambios podrían tener efectos indirectos sobre la salud de *Q. castanea* y *Q. obtusata* en paisajes agroforestales. En conjunto, estos resultados indican que la pérdida de cobertura forestal no implica necesariamente una disminución de la riqueza total de hongos endófitos foliares, pero sí promueve una reconfiguración de la composición taxonómica y funcional de estas comunidades. Este reemplazo favorece a taxones oportunistas o generalistas en ambientes más alterados, mientras que los sitios mejor conservados mantienen asociaciones potencialmente más especializadas. Esta reconfiguración implica que la fragmentación del bosque y la expansión de huertos de aguacate pueden alterar procesos clave, como la resistencia de los encinos frente a patógenos y herbívoros, así como el reciclaje de nutrientes. En conjunto, estos resultados aportan evidencia de que los cambios en el uso del suelo tienen consecuencias ecológicas no evidentes a simple vista, pero potencialmente críticas para la estabilidad de los ecosistemas en paisajes agroforestales.

## vii) DISCUSIÓN GENERAL

La expansión de los huertos de aguacate en el estado de Michoacán ha transformado el bosque templado en un mosaico de agroecosistemas, generando cambios no solo en la estructura del paisaje, sino también en los procesos ecológicos que regulan la fisiología vegetal, las interacciones bióticas y la dinámica de las comunidades asociadas (Pérez-Solache *et al.*, 2023; Vaca-Sánchez *et al.*, 2024; Prieto-Dueñas *et al.*, 2025). El presente estudio integró un enfoque multiescala para evaluar cómo el cambio de uso de suelo de bosque templado a huerto de aguacate en Michoacán modula los rasgos funcionales foliares de *Q. castanea* y *Q. obtusata*, los niveles de daño por herbívoros y patógenos, y la diversidad taxonómica y funcional de las comunidades de hongos endófitos foliares, tanto de especies cultivables como de especies detectadas mediante secuenciación de nueva generación.

Los rasgos funcionales foliares determinan la respuesta de las plantas ante variaciones ambientales y, por lo tanto, influyen en su aptitud y en sus interacciones ecológicas (Gong *et al.*, 2023). En ambas especies de encino aquí estudiadas, *Q. castanea* y *Q. obtusata*, los individuos localizados en sitios con mayor cobertura forestal mostraron mayor grosor, densidad y contenido de materia seca foliar, rasgos asociados con estrategias conservativas; mientras que en sitios dominados por huertos de aguacate predominaron rasgos adquisitivos como mayor área foliar, área foliar específica y contenido de clorofila. Este patrón concuerda con el marco conceptual del Leaf Economics Spectrum (Wright *et al.*, 2004), que propone un gradiente continuo entre estrategias conservativas y adquisitivas en función de la disponibilidad de recursos, y ha sido corroborado a nivel intraespecífico (Martin *et al.*, 2018; Hayes *et al.*, 2019). En ese sentido, Shi *et al.* (2026) encontraron una asociación entre especies arbóreas con rasgos adquisitivos y la nitrificación del suelo. En los sitios muestreados durante este estudio, se documentó una mayor disponibilidad de nutrientes, como nitrógeno, magnesio y fosfatos, en zonas con mayor proporción de huertos de aguacate (Vaca-Sánchez *et al.*, 2024). Esto probablemente está asociado con las prácticas de fertilización e irrigación del sistema agrícola, que favorecen el desarrollo de hojas más delgadas, con mayor contenido de clorofila y un crecimiento más vigoroso (Kimaro *et al.*, 2011; Isaac *et al.*, 2017). Esta mayor disponibilidad de nutrientes en sitios con mayor cobertura de huertos de aguacate podría explicar los atributos funcionales foliares observados en *Q. castanea* y *Q. obtusata*.

Estos cambios en los atributos funcionales foliares tuvieron consecuencias directas en las interacciones bióticas entre los insectos herbívoros y los patógenos foliares de las especies de

encinos estudiadas. Así, se registró un incremento del daño causado por herbívoros en sitios con mayor cobertura de huertos de aguacate. Este resultado respalda la hipótesis del vigor de la planta (*plant vigor hypothesis*) formulada por Price (1991), según la cual los insectos herbívoros prefieren tejidos de alta calidad y alto valor nutricional. Estudios previos han documentado niveles más altos de herbivoría a medida que aumenta la fragmentación forestal (Maldonado-López *et al.*, 2015; García-Jain *et al.*, 2022; Pérez-Solache *et al.*, 2023), un patrón consistente con los resultados aquí obtenidos. Asimismo, el análisis de regresión múltiple mostró asociaciones positivas entre la herbivoría y rasgos adquisitivos, como el área foliar, el área foliar específica, el contenido de clorofila y la masa fresca foliar, así como relaciones negativas con características de defensa, como el grosor foliar y el contenido de materia seca foliar. Estos resultados coinciden con estudios que identifican el área foliar específica y el grosor foliar como características que determinan la variación en los niveles de herbivoría entre diferentes especies (Cornelissen *et al.*, 2003; Agrawal y Fishbein, 2006; Ruiz-Carbayo *et al.*, 2020; Aguilar-Peralta *et al.*, 2021; Costa *et al.*, 2021). La relación negativa entre la herbivoría y los rasgos defensivos refuerza la idea de que las hojas estructuralmente más robustas constituyen una barrera física frente al consumo por insectos (Onoda *et al.*, 2011; González-Teuber *et al.*, 2021), sin embargo, falta realizar análisis de defensa metabólica.

Una explicación alternativa de los patrones observados de mayor herbivoría en sitios con mayor cobertura de huerto podría estar relacionada con cambios en las fuerzas de control “*top-down*” (Wang *et al.*, 2021). La fragmentación del bosque y la reducción de la cobertura forestal pueden provocar la pérdida o disminución de enemigos naturales, como depredadores y parasitoides, que regulan las poblaciones de insectos herbívoros (Murphy *et al.*, 2016; Slattery y Fenner, 2021). Debido a que los niveles tróficos superiores suelen presentar mayores requerimientos de hábitat, son más sensibles a la perturbación y tienden a ser más vulnerables a la pérdida y la fragmentación del bosque (Gravel *et al.*, 2011; Martinson y Fagan, 2014; Rossetti *et al.*, 2017). En consecuencia, la reducción de estas fuerzas de control biológico podría favorecer el incremento de la abundancia de insectos herbívoros en paisajes más fragmentados, contribuyendo así a los mayores niveles de daño foliar observados en los sitios dominados por huertos. De igual manera, se ha documentado previamente una disminución de la abundancia de depredadores y parasitoides en paisajes fragmentados, lo que favorece incrementos en las poblaciones de insectos herbívoros (Pfeifer *et al.*, 2017; García-Jain *et al.*, 2022). En este contexto, los paisajes dominados por huertos de

aguacate analizados en este trabajo podrían estar experimentando una disminución del control biológico natural, lo que contribuiría a los mayores niveles de herbivoría observados.

De manera consistente con los patrones de herbivoría, el daño causado por patógenos foliares en las especies de encino evaluadas también aumentó en los sitios con menor cobertura forestal. Este resultado concuerda con lo reportado por Pablo-Rodríguez *et al.* (2023), quienes señalan que la incidencia de enfermedades foliares responde a la configuración del paisaje y a la estructura de la vegetación, siendo mayor en parches más pequeños y con mayor densidad de bordes, donde las condiciones microambientales y el estrés del hospedero pueden favorecer la infección. De forma paralela, los modelos de regresión evidenciaron asociaciones positivas entre el daño por patógenos y rasgos adquisitivos, como mayor área foliar, mayor área foliar específica y mayor contenido de clorofila, así como relaciones negativas con el grosor y el contenido de materia seca foliar. Esto sugiere que las hojas más delgadas y con mayor área foliar específica no solo presentan una mayor calidad nutricional, sino que también son más vulnerables a la penetración y a la proliferación de hongos fitopatógenos. Se ha propuesto que el grosor y la densidad foliar actúan como barreras estructurales que limitan la invasión y el desarrollo de patógenos en el tejido mesófilo (Van Bael *et al.*, 2017; González-Teuber *et al.*, 2021). En consecuencia, es predecible una asociación negativa entre la densidad foliar y el área foliar dañada por patógenos, tal como se observó en este estudio para *Q. castanea* y *Q. obtusata*, lo que refuerza la idea de que los rasgos estructurales desempeñan un papel clave en la defensa física de las hojas frente a la infección por patógenos.

Un estudio a nivel subcontinental mostró que la fragmentación del hábitat y los bordes resultantes afectan los patrones de invasión de insectos y patógenos forestales (Guo *et al.*, 2018), que experimentan una mayor presión. En coincidencia con este y otros estudios, los resultados aquí obtenidos indican que, en los sitios con menor cobertura de bosque, existe mayor daño por patógenos foliares y por herbívoros masticadores (Guo *et al.*, 2018; Burgess *et al.*, 2022). Por otro lado, se ha reportado que las hojas con alto contenido de materia seca suelen ser más resistentes tanto a daños físicos como a los causados por patógenos (Jager *et al.*, 2015; Pérez-Harguinegy *et al.*, 2016; Blumenthal *et al.*, 2020). Esto podría ser otra explicación de por qué se observaron niveles más altos de daño en *Q. castanea* y *Q. obtusata*, tanto por insectos como por patógenos, en sitios con menor proporción de cobertura forestal. En cuanto al daño por patógenos, fue mayor que el de la herbivoría a lo largo del gradiente y aumentó en sitios con mayor cobertura de huertos. Este

patrón también ha sido reportado en mosaicos agrícolas-forestales (Wang *et al.*, 2021). Así, se sabe que las hojas de las plantas con mayor área foliar específica y paredes celulares más delgadas contienen más carbohidratos no estructurales, que son fácilmente accesibles y metabolizables por los hongos, lo que favorece el desarrollo de enfermedades patogénicas (Wang y Li, 2025). La asociación positiva entre la herbivoría y el daño por patógenos sugiere efectos sinérgicos, en los que los insectos pueden facilitar la infección fúngica al transportar esporas o al provocar heridas en el tejido (Kluth *et al.*, 2002). Además, las interacciones simultáneas entre herbívoros y patógenos pueden modificar las rutas bioquímicas defensivas de las plantas (Rostás *et al.*, 2003; Zarate *et al.*, 2007; McDowell y Simon, 2008), lo que afecta su desempeño (Berger *et al.*, 2008; Myers y Sarfraz, 2017).

En los últimos años, la diversidad de hongos endófitos foliares se ha evaluado mediante técnicas de cultivo y de secuenciación de nueva generación (metabarcoding), empleándolas como herramientas complementarias (Lahiri *et al.*, 2021; Albuquerque *et al.*, 2025). En este estudio, se obtuvieron 32 géneros de hongos endófitos foliares de encinos mediante cultivo, mientras que el análisis de metabarcoding permitió detectar 169 géneros. Esta diferencia es consistente con lo reportado en otros trabajos, en los que el cultivo suele recuperar únicamente entre el 10 % y el 25 % de la diversidad detectada mediante metabarcoding. A pesar de ello, ambas metodologías coincidieron en la detección de 12 géneros: *Cladosporium*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Pestalotiopsis*, *Diplodia*, *Aspergillus*, *Hypoxylon*, *Nigrospora*, *Alternaria*, *Preussia*, *Curvularia* y *Neofusicoccum*. El análisis de la fracción cultivable de los hongos endófitos foliares de *Q. castanea* y *Q. obtusata* reveló patrones consistentes a lo largo del gradiente de cobertura bosque-huerto. En términos generales, los sitios con mayor proporción forestal presentaron mayor riqueza de géneros, mayor número de taxones exclusivos y valores más altos en los estimadores de diversidad, mientras que los sitios dominados por huertos mostraron una reducción progresiva de la riqueza, aunque mantuvieron valores relativamente altos de equidad. Este patrón sugiere un proceso de filtrado ambiental asociado a la pérdida de cobertura forestal. En ecosistemas templados, la estructura del dosel, la humedad relativa, la estabilidad térmica y la complejidad vertical del bosque influyen directamente en la colonización y la persistencia de endófitos foliares (Peay *et al.*, 2016; Jia *et al.*, 2020). Los sitios con mayor cobertura forestal probablemente ofrecen microambientes más estables y heterogéneos, lo que favorece la coexistencia de diversos linajes fúngicos con diferentes requerimientos ecológicos. En contraste, los paisajes dominados por huertos presentan mayor

exposición a la radiación solar, mayores fluctuaciones térmicas y alteraciones en la humedad, condiciones que pueden actuar como filtros que restringen la comunidad a taxones más tolerantes a la perturbación.

La dominancia del filo Ascomycota en ambas especies hospederas coincide con numerosos estudios realizados en encinos de Europa, Asia y Norteamérica (Arnold *et al.*, 2007; Schoch *et al.*, 2009). La alta representación de clases como Dothideomycetes y Sordariomycetes refuerza la idea de que estos grupos poseen adaptaciones específicas para colonizar tejidos foliares, incluyendo la tolerancia a compuestos fenólicos y la capacidad de crecimiento endofítico prolongado (Gennaro *et al.*, 2003; Hagh-Doust *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2021). Sin embargo, aunque el patrón taxonómico general es congruente con estudios internacionales, la composición a nivel de género mostró particularidades regionales, lo que resalta la importancia de este estudio del mycobioma foliar en encinos mexicanos. Uno de los hallazgos más relevantes fue la elevada abundancia de *Nigrospora* en ambas especies de encino y en todas las categorías de cobertura. Aunque este género ha sido reportado en otros tejidos de encinos (Gonthier *et al.*, 2006; Martínez-Álvarez *et al.*, 2012; Ghasemi-Esfahlan *et al.*, 2019), su predominancia como endófito foliar en estas especies sugiere que podría formar parte de su microbioma núcleo. La consistencia de su presencia a lo largo del gradiente ambiental indica una amplia tolerancia ecológica y, posiblemente, una relación estable con el hospedero. Sin embargo, su función específica en estas interacciones no se ha estudiado y requiere una evaluación experimental para determinar si desempeña roles mutualistas, neutros o potencialmente patogénicos latentes. Asimismo, la presencia recurrente de géneros como *Xylaria* y *Daldinia* resulta interesante desde una perspectiva funcional. Estos taxones son conocidos por su capacidad de alternar entre estados endofíticos y saprotróficos, iniciando procesos de descomposición tras la senescencia foliar (Suwannasai *et al.*, 2023; Zmitrovich y Shishlyannikova, 2025). El hecho de que estos géneros de hongos también hayan sido reportados como saprófitos sugiere que los endófitos no solo participan en la dinámica de la salud foliar en vida, sino que también intervienen en el reciclaje de nutrientes tras la caída de hojas, contribuyendo a los ciclos biogeoquímicos del bosque. En este sentido, la reducción de la diversidad observada en sitios con menor cobertura forestal podría tener implicaciones no solo para la resistencia del hospedero, sino también para procesos ecosistémicos más amplios.

El efecto del hospedero sobre la estructura de la comunidad fúngica endófitica foliar también fue evidente, ya que *Q. castanea* mostró una mayor riqueza y diversidad que *Q. obtusata*, lo que sugiere que las características propias de cada especie influyen en la colonización y la estructuración de sus comunidades endofíticas. Estas diferencias podrían estar relacionadas con su pertenencia a linajes distintos dentro del género, ya que, mientras que *Q. castanea* forma parte de la sección Lobatae, que agrupa a los encinos rojos, *Q. obtusata* pertenece a la sección Quercus, en la que se encuentran los encinos blancos (Valencia-A, 2004; Arizaga *et al.*, 2009). En particular, se ha documentado una compleja variación en la producción de compuestos fenólicos individuales entre las especies del género *Quercus* (Burlacu *et al.*, 2020). Dado que los compuestos fenólicos desempeñan un papel central en la defensa química foliar y pueden modular la colonización microbiana (Kumar *et al.*, 2020), estas diferencias podrían contribuir a explicar la mayor riqueza observada en *Q. castanea* en comparación con *Q. obtusata*, al generar ambientes foliares con distintos niveles de defensa para los endófitos. Sin embargo, falta realizar estudios al respecto. Aunque el enfoque dependiente de cultivo probablemente subestima la diversidad total del microbioma, ofrece ventajas importantes, ya que permite recuperar organismos viables para análisis funcionales posteriores, evaluar su potencial como antagonistas frente a patógenos, su capacidad para producir metabolitos secundarios o su papel en la defensa inducida del hospedero. De este modo, los patrones observados no solo reflejan diferencias taxonómicas, sino que también constituyen una base para estudios experimentales que exploren el papel funcional de estas comunidades en la resiliencia de los encinos.

La reducción progresiva de la riqueza hacia sitios con menor cobertura forestal, acompañada de valores relativamente altos de equidad, sugiere comunidades más simples, pero estructuralmente equilibradas bajo condiciones de mayor perturbación. En contraste, los sitios con mayor cobertura forestal parecen funcionar como reservorios de diversidad, albergando tanto taxones comunes como linajes menos frecuentes o especializados. La mayor riqueza de sitios forestales coincide con estudios que muestran una mayor diversidad endofítica en bosques estructuralmente complejos y menos perturbados (Saikkonen *et al.*, 2007; Martínez-Álvarez *et al.*, 2012; U'Ren *et al.*, 2019; Diez-Hermano *et al.*, 2024). Además, en algunos estudios se ha reportado que cambios en el microclima, la humedad y la estructura del dosel influyen en la colonización y la composición comunitaria de hongos endófitos foliares (Peay *et al.*, 2016; Jia *et al.*, 2020; Browman y Arnold, 2021).

El metabarcoding confirmó la dominancia de Ascomycota y Dothideomycetes, especialmente en sitios con mayor cobertura forestal, un patrón también documentado en ecosistemas templados y tropicales (Arnold *et al.*, 2007; Malarvizhi *et al.*, 2023; Molina *et al.*, 2025). Aunque la diversidad alfa no difirió significativamente entre las coberturas, la diversidad beta mostró una separación parcial entre comunidades, con un 11 % de la variación explicada por el gradiente ambiental. Este desacoplamiento entre riqueza y composición ha sido reportado previamente en gradientes latitudinales (Gaytán *et al.*, 2022). El enriquecimiento de ASVs asociados a ambientes perturbados en sitios con menor cobertura forestal (Grabka *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2023) sugiere un proceso de filtrado ambiental que favorece taxones oportunistas. En contraste, los ambientes más conservados albergan comunidades potencialmente más especializadas (Christian *et al.*, 2023). La predominancia de patógenos - saprófitos (>60 %) en ambos tipos de sitio coincide con reportes previos (Kaniyassery *et al.*, 2024) y refleja la plasticidad ecológica de estos hongos (Boddy, 2016; Bard *et al.*, 2024; Martin y Tan, 2025), capaces de transitar entre estilos de vida endofítico, saprotrófico o patogénico. En conjunto, la evidencia indica que la fragmentación del bosque y la expansión de huertos de aguacate modifican la estructura de la comunidad de hongos endófitos foliares y reducen su complejidad taxonómica. Dado que los hongos endófitos pueden influir en la resistencia a herbívoros y patógenos, así como en la eficiencia del reciclaje de nutrientes, estos cambios podrían tener efectos indirectos sobre la salud de *Q. castanea* y *Q. obtusata* en paisajes agroforestales. Por lo tanto, la conservación de parches de bosque con alta cobertura podría ser crucial no solo para la biodiversidad macroscópica, sino también para la diversidad microbiana que sustenta procesos ecológicos fundamentales.

Al integrar los niveles de análisis del presente trabajo, se revela un patrón coherente. El cambio en el uso del suelo modifica la disponibilidad de recursos, lo que induce cambios en los rasgos funcionales foliares; a su vez, los rasgos alterados incrementan la susceptibilidad a herbívoros y patógenos (Figura D1). De manera simultánea, la comunidad endofítica de hongos se reestructura, favoreciendo taxones oportunistas en ambientes más alterados. Dado que los hongos endófitos foliares pueden contribuir a la resiliencia, la resistencia a patógenos y el funcionamiento ecosistémico (Terhonen *et al.*, 2019; Qin *et al.*, 2024), la erosión de su diversidad en paisajes dominados por huertos de aguacate podría tener consecuencias a largo plazo para la permanencia de *Q. castanea* y *Q. obtusata* en agroecosistemas y para la estabilidad de los remanentes de bosque templado en Michoacán. En conjunto, este estudio demuestra que los rasgos funcionales actúan

como ejes integradores que conectan los procesos fisiológicos con los patrones de daño y con la estructura del microbioma foliar. La respuesta de los encinos al cambio de uso de suelo es, por tanto, multidisciplinaria y refleja una reorganización ecológica integral que va más allá de la simple pérdida de cobertura forestal.

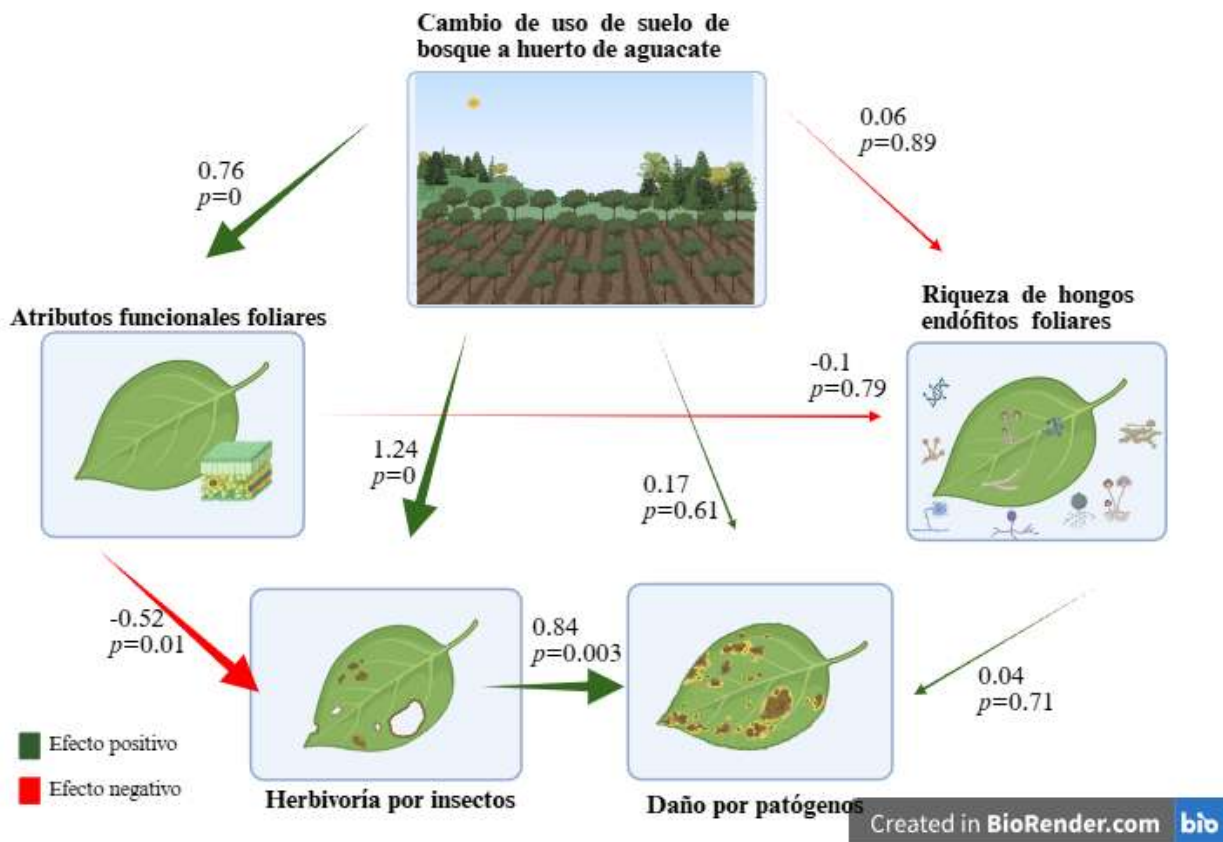


Figura 1D. Modelo de ecuaciones estructurales que muestra los efectos del cambio de uso de suelo de bosque a huerto de aguacate sobre los atributos funcionales foliares, la herbivoría por insectos, el daño por patógenos y la riqueza de hongos endófitos foliares. Las flechas verdes indican efectos positivos y las flechas rojas, efectos negativos. Los valores junto a cada flecha corresponden a los coeficientes estandarizados y los valores de  $p$  indican la significancia estadística de cada relación.

#### **viii) PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES**

En conjunto, los resultados de este estudio abren diversas líneas de investigación que permitirán comprender con mayor profundidad las consecuencias ecológicas del cambio de uso de suelo sobre los encinos y sus comunidades microbianas asociadas. En particular, resulta necesario profundizar en el papel funcional de los hongos endófitos foliares identificados, a fin de determinar si establecen interacciones mutualistas, comensales o patogénicas latentes con sus hospederos. Además, al contar con cepas aisladas de hongos endófitos de encinos, es posible realizar estudios experimentales que incluyan ensayos de inoculación, análisis metabolómicos o evaluaciones de resistencia inducida, lo que permitiría esclarecer si estas comunidades micológicas contribuyen a la defensa de las plantas frente a herbívoros y patógenos. Asimismo, sería relevante evaluar cómo las modificaciones observadas en la composición y diversidad del micobioma foliar influyen en procesos ecosistémicos más amplios, como la descomposición de la hojarasca y el reciclaje de nutrientes, considerando que varios de los taxones detectados pueden alternar entre estados endofíticos y saprotróficos. Por otra parte, estudios a largo plazo permitirían determinar si los cambios en los rasgos funcionales foliares y el incremento del daño por herbívoros y patógenos afectan la aptitud, el crecimiento o la regeneración de *Q. castanea* y *Q. obtusata* en paisajes fragmentados. De igual manera, futuras investigaciones podrían integrar análisis de redes tróficas para evaluar el papel de depredadores y parasitoides en la regulación de insectos herbívoros, lo que permitiría comprender mejor los efectos de las fuerzas de control “top-down” en mosaicos agroforestales. Finalmente, los resultados obtenidos aquí resaltan la importancia de conservar los remanentes de bosque templado dentro de paisajes dominados por huertos de aguacate, ya que estos parches no solo funcionan como reservorios de biodiversidad vegetal y faunística, sino también de diversidad microbiana asociada, que desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de procesos ecológicos y en la resiliencia de los ecosistemas forestales.

### **ix) CONCLUSIONES FINALES**

1. El cambio de uso de suelo de bosque a huerto de aguacate en Michoacán modifica la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas asociados a *Q. castanea* y *Q. obtusata*.
2. Los rasgos funcionales foliares responden al gradiente de cobertura forestal mostrando estrategias conservativas en sitios con mayor cobertura de bosque y adquisitivas en ambientes dominados por huertos de aguacate, asociados a una mayor disponibilidad de recursos.
3. Los ambientes perturbados aumentan la susceptibilidad de *Q. castanea* y *Q. obtusata* a herbívoros y patógenos.
4. La riqueza total de hongos endófitos puede mantenerse, pero su composición taxonómica y funcional cambia.

#### x) BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Agostinelli, M.; Cleary, M.; Martin, J.A.; Albrechtsen, B.R.; Witzell, J. 2018. Pedunculate oaks (*Quercus robur* L.) differing in vitality as reservoirs for fungal biodiversity. *Front. Microbiol.* 9, 1758.
- Agrawal, A. A., Fishbein, M. 2006. Plant defense syndromes. *Ecology* 87: 132–149.
- Agrios G.N. 2005. *Plant pathol.* Elsevier.
- Aguilar-Peralta, J. S., Maldonado-López, Y., Espírito-Santo, M. M., Reyes-Chilpa, R., Oyama, K., Fagundes, M., Ávila-Cabadilla, L. D., Álvarez-Añorve, M. Y., Vaca-Sánchez, M. S., Cuevas-Reyes, P. 2021. Contrasting successional stages lead to intra- and interspecific differences in leaf functional traits and herbivory levels in a Mexican tropical dry forest. *European Journal of Forest Research* 141: 225–239.
- Albuquerque, A., Patanita, M., Ribeiro, J. A., Campos, M. D., Santos, F., Monteiro, T., Basaloco, M., Félix, M. D. R. 2025. Metabarcoding analysis reveals microbial diversity and potential soilborne pathogens associated with almond dieback and decline. *Plants* 14(15): 2309.
- Alidadi, A., Kowsari, M., Javan-Nikkhah, M., Jouzani, G. S., Rastaghi, M. E. 2019. New pathogenic and endophytic fungal species associated with Persian oak in Iran. *European Journal of Plant Pathology* 155 (3): 1017–1032.
- Arias, F., Montoya, C., Velásquez, O. 2018. Dinámica del mercado mundial de aguacate. *Revista Virtual Universidad Católica del Norte* (55): 22–35.
- Arizaga, S. 2009. Manual de la biodiversidad de encinos michoacanos. *Instituto Nacional de Ecología*.
- Arizaga, S.; Martínez-Cruz, J.; Salcedo-Cabrales, M.; Bello-González, M.A. Manual de la biodiversidad de encinos michoacanos; *Instituto Nacional de Ecología*: México City, México, 2009; ISBN 978-968-817-921-5.
- Arnold JP, Fonseca C.R. 2011. Herbivory, pathogens, and epiphylls in araucaria forest and ecologically-managed tree monocultures. *For. Ecol. Manage.* 262, 1041–1046.

- Arnold, A. E., Lewis, L. C. 2005. Ecology and evolution of fungal endophytes, and their roles against insects. *Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution*. Oxford University Press, New York. pp. 74–96.
- Arnold, A.E. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: Progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biol. Rev.* 21, 51–66.
- Arnold, A.E.; Lutzoni, F. 2007. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*. 88, 541–549.
- Backs, J. R., Ashley, M. V. 2021. *Quercus* conservation genetics and genomics: Past, present, and future. *Forests* 12: 882.
- Barbosa-Reséndiz, A.; Valenzuela, R.; Sánchez-Flores, M.; Bautista-Hernández, S.; Cobos-Villagrán, A.; Pérez-Valdespino, A.; Espinoza-Mellado, M.R.; Martínez-Pineda, M.; Raymundo, T. 2020. El género *Daldinia* (Sordariomycetes, Ascomycota) en México. *Acta Bot. Mex.* 127, e1600.
- Barbour, M. A., Rodriguez-Cabal, M. A., Wu, E. T., Julkunen-Tiitto, R., Ritland, C. E., Miscampbell, A. E., Jules, E. S., Crutsinger, G. M. 2015. Multiple plant traits shape the genetic basis of herbivore community assembly. *Functional Ecology* 29 (8): 995–1006.
- Bard, N. W., Cronk, Q. C., Davies, T. J. 2024. Fungal endophytes can modulate plant invasion. *Biological Reviews* 99(5): 1652–1671.
- Barsimantov, J., Navia Antezana, J. 2012. Forest cover change and land tenure change in Mexico's avocado region: Is community forestry related to reduced deforestation for high value crops. *Applied Geography* 32 (2): 844–853.
- Benítez-Malvido, J., Lemus-Albor, A. 2005. The seedling community of tropical rain forest edges and its interaction with herbivores and pathogens. *Biotropica* 37 (2): 301–313.
- Berger, U., Pion, C., Schiffrers, K., Grimm, V. 2008. Competition among plants: concepts, individual-based modelling approaches, and a proposal for a future research strategy. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 9(3–4): 121–135.

- Biere, A., Bennett, A. E. 2013. Three-way interactions between plants, microbes and insects. *Functional Ecology* 27 (3): 567–573.
- Blumenthal, D. M., Mueller, K. E., Kray, J. A., Ocheltree, T. W., Augustine, D. J., Wilcox, K. R. 2020. Traits link drought resistance with herbivore defence and plant economics in semi-arid grasslands: The central roles of phenology and leaf dry matter content. *Journal of Ecology* 108(6): 2336–2351.
- Boddy, L. 2016. Pathogens of autotrophs. En *The fungi. Academic Press*. pp. 245–292.
- Bonilla-Moheno, M., Aide, T. M. 2020. Beyond deforestation: Land cover transitions in Mexico. *Agricultural Systems* 178: 102734.
- Bowman, E. A., Arnold, A. E. 2021. Drivers and implications of distance decay differ for ectomycorrhizal and foliar endophytic fungi across an anciently fragmented landscape. *The ISME Journal* 15(12): 3437–3454.
- Bradshaw, M.J.; Aime, M.C.; Rokas, A.; Maust, A.; Moparthy, S.; Jellings, K.; Pane, A.M.; Hendricks, D.; Pandey, B.; Li, Y.; Pfister, D.H. 2023. Extensive intragenomic variation in the internal transcribed spacer region of fungi. *iScience* , 26, 107317.
- Bravo-Espinosa, M.; Mendoza, M.E.; Carlón Allende, T.; Medina, L.; Sáenz-Reyes, J.T.; Páez, R. 2012. Effects of converting forest to avocado orchards on topsoil properties in the Trans-Mexican Volcanic System, Mexico. *Land Degrad. Dev.* 25, 452–467.
- Brown, S. 2003. Finalizing Avoided-Deforestation Project Baselines. *Final Report for the US Agency for International Development*: 55.
- Bruschi, P., Grossoni, P., Bussotti, F. 2003. Within- and among-tree variation in leaf morphology of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. natural populations. *Trees - Structure and Function* 17 (2): 164–172.
- Burgess, T. I., Oliva, J., Sapsford, S. J., Sakalidis, M. L., Balocchi, F., Paap, T. 2022. Anthropogenic disturbances and the emergence of native diseases: a threat to forest health. *Current Forestry Reports* 8(2): 111–123.

- Burlacu, E., Nisca, A., Tanase, C. 2020. A comprehensive review of phytochemistry and biological activities of *Quercus* species. *Forests* 11(9): 904.
- Carluccio, G.; Benigno, A.; Panzavolta, T.; Vergine, M.; De Bellis, L.; Luvisi, A.; Moricca, S. 2025. Understanding oak decline in Europe: Ecological factors, symptoms, causative agents, and management strategies. *Plant Dis.* 109, 1805-1823.
- Castagneyrol B, Bonal D, Damien M, Jactel H, Meredieu C, Muiruri EW, Barbaro L (2017) Bottom-up and top-down effects of tree species diversity on leaf insect herbivory. *Ecol. Evol.* 7, 3520–3531.
- Castro-Navarro, J., Sahagún-Sánchez, F. J., Reyes-Hernández, H. 2017. Dinámica de fragmentación en la Sierra Madre Oriental y su impacto sobre la distribución potencial de la avifauna. *Madera y bosques* 23 (2): 99–117.
- CEDRSSA. 2015. Situación actual del sistema producto aguacate. *Dirección de estudios sobre soberanía alimentaria y nueva ruralidad*. Estados Unidos Mexicanos.
- Chávez-León, G., Tapia Vargas, L. M., Bravo Espinoza, M., Sáenz Reyes, J. T., Muñoz Flores, H. J., Vidales Fernández, I., Larios Guzmán, A., Rentería Ánima, J. B., Villaseñor Ramírez, F. J., Sánchez Pérez, J. de la luz, Alcántar Rocillo, J. J., Mendoza Cantú, M. 2012. Impacto del cambio de uso de suelo forestal a huertos de aguacate. En: Intergovernmental Panel on Climate Change (Ed.), *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis*. Cambridge University Press. 13 (9): 1–30.
- Cho, K., Goldstein, B., Gounaridis, D., Newell, J. P. 2021. Where does your guacamole come from? Detecting deforestation associated with the exports of avocados from Mexico to the United States. *Journal of Environmental Management* 278: 111482.
- Christian, N., Perlin, M. H. 2024. Plant-endophyte communication: Scaling from molecular mechanisms to ecological outcomes. *Mycologia* 116(2): 227–250.
- Cohen, S.D. 2004,. Endophytic-host selectivity of *Discula umbrinella* on *Quercus alba* and *Quercus rubra* characterized by infection, pathogenicity and mycelial compatibility. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 713-721.

- Collado, J., Platas, G., Peláez, F. 2000. Host specificity in fungal endophytic populations of *Quercus ilex* and *Quercus faginea* from central Spain. *Nova Hedwigia* 71: 421–430.
- Collado, J.; Platas, G.; González, I.; Peláez, F. Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytol.* 1999, 144, 525–532.
- Collinge, D.B.; Jensen, B.; Jørgensen, H.J. 2022. Fungal endophytes in plants and their relationship to plant disease. *Curr. Opin. Microbiol.* 69, 102177.
- Cornelissen, J. H. C., Cerabolini, B., Castro-Díez, P., Villar-Salvador, P., Montserrat-Martí, G., Puyravaud, J. P., Maestro, M., Werger, M. J. A., Aerts, R. 2003. Functional traits of woody plants: Correspondence of species rankings between field adults and laboratory-grown seedlings? *Journal of Vegetation Science* 14: 311–322.
- Costa Santos, A. C., Rejane de Almeida, W., Maldonado-López, Y., Cuevas-Reyes, P., Santo, J. C. 2021. Variation in the co-occurrence of pathogen and herbivores between ontogenetic stages of *Miconia albicans*. *Trees – Structure and Function* 35: 1001–1011.
- Costa, D., Lopes, T., Díaz, J., Baptista, P., Lino-Neto, T. 2025. Natural endophyte reduces disease severity in cork oak caused by *Biscogniauxia mediterranea* and *Diplodia corticola* under different watering regimes. *Discover Plants* 2: 193.
- Cuevas-Reyes P, Canché-Delgado A, Maldonado-López Y, Fernandes GW, Oyama K, González-Rodríguez A (2018) Patterns of herbivory and leaf morphology in two Mexican hybrid oak complexes: importance of fluctuating asymmetry as indicator of environmental stress in hybrid plants. *Ecol. Indic.* 90, 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.03.009>
- Cuevas-Reyes, P., Gilberti, L., González-Rodríguez, A., Fernandes, G. W. 2013. Patterns of herbivory and fluctuating asymmetry in *Solanum lycocarpum* St. Hill (Solanaceae) along an urban gradient in Brazil. *Ecological Indicators* 24: 557–561.
- Cunningham, R. B., Lindenmayer, D. B., Crane, M., Michael, D. R., Barton, P. S., Gibbons, P., Okada, S., Ikin, K., Stein, J. A. 2014. The law of diminishing returns: woodland birds respond to native vegetation cover at multiple spatial scales and over time. *Diversity and Distributions* 20 (1): 59–71.

- Dascălu CG, Cozma CD 2009 The principal components analysis-method to reduce the collinearity in multiple linear regression model; application in medical studies. *In International Conference on Multivariate Analysis and Its Application in Science and Engineering*, 140-145.
- Davis, E.L.; Weatherhead, E.; Koide, R.T. 2023. The potential saprotrophic capacity of foliar endophytic fungi from *Quercus gambelii*. *Fungal Ecol.* 62, 101221.
- Denk, T., Grimm, G. W., Manos, P. S., Deng, M., Hipp, A. L. 2017. An updated infrageneric classification of the oaks: Review of previous taxonomic schemes and synthesis of evolutionary patterns. En: *Oaks Physiological Ecology: Exploring the Functional Diversity of Genus Quercus L.*; Gil-Pelegrín, E., Peguero-Pina, J., Sancho-Knapik, D., Eds.; Springer: Cham, Switzerland: 13–38.
- Denvir A, Arima E Y., González-Rodríguez A., Young K. R. 2021. Ecological and human dimensions of avocado expansion in México: Towards supply-chain sustainability. *Ambio*.
- Denvir, A. Avocado expansion and the threat of forest loss in Michoacán, Mexico under climate change scenarios. *Appl. Geogr.* 2023, 151, 102856.
- Denvir, A., Arima, E. Y., González-Rodríguez, A., Young, K. R. 2021. Ecological and human dimensions of avocado expansion in México: Towards supply-chain sustainability. *Ambio* 51(1): 152-166.
- Diez Hermano, S., Poveda Arias, J., Benito Delgado, Á., Peix, Á., Martín Pinto, P., Díez Casero, J. J. 2024. Soil mycobiome and forest endophytic fungi: Is there a relationship between them? *Forest Ecology and Management* 562: 121924.
- Diez-Hermano, S.; Ahmad, F.; Niño-Sánchez, J.; Benito, Á.; Hidalgo, E.; Escudero, L.M.; Morel, W.A.; Díez, J.J. 2022. Health condition and mycobiome diversity in Mediterranean tree species. *Front. For. Glob. Change* 5, 1056980.
- Dirzo Domínguez. 1995. Mesoamerican tropical dry forests. *Seasonally dry tropical forests*.
- Dissanayake, A.J.; Purahong, W.; Wubet, T.; Hyde, K.D.; Zhang, W.; Xu, H.; Zhang, G.; Fu, C.; Liu, M.; Xing, Q.; et al. 2018. Direct comparison of culture-dependent and culture-

- independent molecular approaches reveals the diversity of fungal endophytic communities in stems of grapevine (*Vitis vinifera*). *Fungal Divers.* 90, 85–107.
- Dos Reis, J. B. A., Lorenzi, A. S., do Vale, H. M. M. 2022. Methods used for the study of endophytic fungi: a review on methodologies and challenges, and associated tips. *Archives of Microbiology* 204 (11): 675.
- Fahrig, L., Arroyo-Rodríguez, V., Bennett, J. R., Boucher-Lalonde, V., Cazetta, E., Currie, D. J., Eigenbrod, F., Ford, A. T., Harrison, S. P., Jaeger, J. A. G., Koper, N., Martin, A. E., Martin, J. L., Metzger, J. P., Morrison, P., Rhodes, J. R., Saunders, D. A., Simberloff, D., Smith, A. C., Tischendorf, L., Vellend, M., Watling, J. I. 2019. Is habitat fragmentation bad for biodiversity? *Biological Conservation* 230: 179–186.
- FAO, UNEP. 2020. The State of the World's Forests 2020: Forests, Biodiversity and People. *FAO: Rome, Italy.*
- Faticov, M., Amorim, J. H., Abdelfattah, A., van Dijk, L. J., Carvalho, A. C., Laforest-Lapointe, I., Tack, A. J. 2024. Local climate, air quality and leaf litter cover shape foliar fungal communities on an urban tree. *Ambio* 53 (11): 1673–1685.
- Fernandez-Conradi P., Jactel H., Robin C, Tack A. J. M, Castagnéyrol B. 2018. Fungi reduce preference and performance of insect herbivores on challenged plants. *Ecology.* 99, 300–311.
- Ferus, P., Barta, M., Konôpková, J. 2019. Endophytic fungus *Beauveria bassiana* can enhance drought tolerance in red oak seedlings. *Trees* 33: 1179–1186.
- Fisher, P. J., Petrini, O., Petrini, L. E., Sutton, B. C. 1994. Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. from England, Majorca and Switzerland. *New Phytologist* 127 (1): 133–137.
- Fonseca, C. R., Overton, J. M. C., Collins, B., Westoby, M. 2000. Shifts in trait combinations along rainfall and phosphorus gradients. *Journal of Ecology* 88: 964–977.
- Fontúrbel, F. E., Murúa, M. M. 2014. Microevolutionary effects of habitat fragmentation on plant-animal interactions. *Advances in Ecology* 2014: 1–7.

- Fu W.J., Jiang P.K., Zhou G.M., Zhao K. L. 2014. Using Moran's I and GIS to study the spatial pattern of forest litter carbon density in a subtropical region of southeastern China. *Biogeosciences*, 11(8), 2401-2409.
- Galicia, L., Potvin, C., Messier, C. 2015. Maintaining the high diversity of pine and oak species in Mexican temperate forests: A new management approach combining functional zoning and ecosystem adaptability. *Canadian Journal of Forest Research* 45: 1358–1368.
- Galicia, L., Zarco-Arista, A. E. 2014. Multiple ecosystem services, possible trade-offs and synergies in a temperate forest ecosystem in Mexico: A review. *International Journal of Biodiversity Science, Ecosystem Services & Management* 10: 275–288.
- Ganley, R.J.; Brunsfeld, S.J.; Newcombe, G. A. community of unknown, endophytic fungi in western white pine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 10107-10112.
- García-Guzmán G., Trejo I., Sánchez-Coronado M. E. 2016. Foliar diseases in a seasonal tropical dry forest: Impacts of habitat fragmentation. *For Ecol Manag*, 369, 126-134.
- García-Guzmán, O. M.; Garibay-Orijel, R.; Hernández, E.; Arellano-Torres, E.; Oyama, K. 2017. World-wide meta-analysis of *Quercus* forests ectomycorrhizal fungi diversity reveals southwestern Mexico as a hotspot. *Mycorrhiza* 2017, 27, 811-822.
- García-Jain, S. E., Maldonado-López, Y., Oyama, K., Fagundes, M., de Faria, M. L., Espírito-Santo, M. M., Cuevas-Reyes, P. 2022. Effects of forest fragmentation on plant quality, leaf morphology and herbivory of *Quercus deserticola*: is fluctuating asymmetry a good indicator of environmental stress? *Trees* 36(2): 553–567.
- García-Jain, S. E., Maldonado-López, Y., Oyama, K., López-Maldonado, M. C., Fagundes, M., Lopes de Faria, M., Espírito-Santo, M. M., Vaca-Sánchez, M. S., Cuevas-Reyes, P. 2023. Guild-dependent effects of forest fragmentation in canopy arthropod diversity associated to *Quercus deserticola*. *European Journal of Forest Research* 142 (1): 2017–230.
- Gaytán, Á., Abdelfattah, A., Faticov, M., Moreira, X., Castagneyrol, B., Van Halder, I., De Frenne, P., Meeussen, C., Timmermans, B. G. H., Ten Hoopen, J. P. J. G., Rasmussen, P.U., Bos, N., Jaatinen, R., Pulkkinen, P., Söderlund, S., Gotthard, K., Pawlowski, K., Tack, A. J.

2022. Changes in the foliar fungal community between oak leaf flushes along a latitudinal gradient in Europe. *Journal of Biogeography* 49(12): 2269–2280.
- Gennaro, M.; Gonthier, P.; Nicolotti, G. 2003. Fungal endophytic communities in healthy and declining *Quercus robur* L. and *Q. cerris* L. trees in Northern Italy. *Phytopathology* 151: 529–534.
- Ghasemi-Esfahalan, S., Khodaei, S., Karimi, K., Tavakoli, M., Pertot, I., Arzanlou, M. 2019. Biodiversity study of endophytic fungi associated with two *Quercus* species in Iran. *Forest systems* 28(1): e003–e003.
- Gong, H., Song, W., Wang, J., Wang, X., Ji, Y., Zhang, X., Gao, J. 2023. Climate factors affect forest biomass allocation by altering soil nutrient availability and leaf traits. *Journal of Integrative Plant Biology* 65(10): 2292–2303.
- Gonthier, P.; Gennaro, M.; Nicolotti, G. 2006. Effects of water stress on the endophytic mycobiota of *Quercus robur*. *Fungal Diversity* (21): 69–80.
- González-Teuber M., Vilo C., Guevara-Araya M.J., Salgado-Luarte C., Gianoli E. 2019. Leaf resistance traits influence endophytic fungi colonization and community composition in a South American temperate rainforest. *J. Ecol.* 108, 1019–1029.
- González-Teuber, M., Palma-Onetto, V., Aguilera-Sammaritano, J., Mithöfer, A. 2021. Roles of leaf functional traits in fungal endophyte colonization: Potential implications for host-pathogen interactions. *Journal of Ecology* 109: 3972–3987.
- González-Teuber, M., Vilo, C., Guevara-Araya, M. J., Salgado-Luarte, C., Gianoli, E. 2020. Leaf resistance traits influence endophytic fungi colonization and community composition in a South American temperate rainforest. *Journal of Ecology* 108 (3): 1019–1029.
- Gowtham, H. G., Hema, P., Murali, M., Shilpa, N., Nataraj, K., Basavaraj, G. L., Singh, S. B., Aiyaz, M., Udayashankar, A. C., Amruthesh, K. N. 2024. Fungal endophytes as mitigators against biotic and abiotic stresses in crop plants. *Journal of Fungi* 10 (2): 116.
- Grabka, R., d'Entremont, T. W., Adams, S. J., Walker, A. K., Tanney, J. B., Abbasi, P. A., Ali, S. 2022. Fungal endophytes and their role in agricultural plant protection against pests and pathogens. *Plants* 11 (3): 384.

- Gravel, D., Massol, F., Canard, E., Mouillot, D., Mouquet, N. 2011. Trophic theory of island biogeography. *Ecology letters* 14(10): 1010-1016.
- Guerra A., Rodriguez-Navarro A.B., González Á.F., Romanek C.S., Alvarez-Lloret P., Pierce G.J. 2010. Life-history traits of the giant squid *Architeuthis dux* revealed from stable isotope signatures recorded in beaks. *ICES J. Mar. Sci.* 67(7), 1425-1431
- Guo, Q., Riitters, K. H., Potter, K. M. 2018. A subcontinental analysis of forest fragmentation effects on insect and disease invasion. *Forests* 9(12): 744.
- Haddad, N. M., Brudvig, L. A., Clobert, J., Davies, K. F., Gonzalez, A., Holt, R. D., Lovejoy, T. E., Sexton, J. O., Austin, M. P., Collins, C. D., Cook, W. M., Damschen, E. I., Ewers, R. M., Foster, B. L., Jenkins, C. N., King, A. J., Laurance, W. F., Levey, D. J., Margules, C. R., Melbourne, B. A., Nicholls, A. O., Orrock, J. L., Song, D. X., Townshend, J. R. 2015. Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. *Science Advances* 1: 1-9.
- Hagh-Doust, N.; Akbarinia, M.; Safaie, N.; Yousefzadeh, H.; Bálint, M. 2017. Community analysis of Persian oak fungal microbiome under dust storm conditions. *Fungal Ecology* 29: 1-9.
- Hall, T. BioEdit version 7.0.0; Distributed by the author: Raleigh, NC, USA, 2004.
- Hauser, T. P., Christensen, S., Heimes, C., Kiær, L. P. 2013. Combined effects of arthropod herbivores and phytopathogens on plant performance. *Functional Ecology* 27: 623-632.
- Hayes, F. J., Buchanan, S. W., Coleman, B., Gordon, A. M., Reich, P. B., Thevathasan, N. V., Wright, I. J., Martin, A. 2019. Intraspecific variation in soy across the leaf economics spectrum. *Annals of Botany* 123(1): 107-120.
- Herrera-Arroyo, M.L.; Sork, V.L.; González-Rodríguez, A.; Rocha-Ramírez, V.; Vega, E.; Oyama, K. 2013. Seed-mediated connectivity among fragmented populations of *Quercus castanea* (Fagaceae) in a Mexican landscape. *Am. J. Bot.* 100, 1663-1671.
- Hipp, A. L., Manos, P. S., González-Rodríguez, A., Hahn, M., Kaproth, M., McVay, J. D., Valencia-Ávalos, S., Cavender-Bares, J. 2018. Sympatric parallel diversification of major oak clades in the Americas and the origins of Mexican species diversity. *New Phytology*

- Hoffman, M.; Gunatilaka, M.; Ong, J.; Shimabukuro, M.; Arnold, A.E. 2008. Molecular analysis reveals a distinctive fungal endophyte community associated with foliage of montane oaks in southeastern Arizona. *J. Ariz.-Nev. Acad. Sci.* 40, 91-100.
- INEGI. 2019. *Cultivos perennes*. Superficie. Aguacate (Hectáreas), Estados Unidos Mexicanos.
- INEGI. Cuentas de los Ecosistemas de México. Resultados del Proyecto Natural Capital Accounting and Valuation of Ecosystem Services (NCAVES); *INEGI*: Mexico City, Mexico, 2021; p. 258.
- Isaac, M. E., Cerda, R., Rapidel, B., Martin, A. R., Dickinson, A. K., Sibelet, N. 2018. Farmer perception and utilization of leaf functional traits in managing agroecosystems. *Journal of Applied Ecology* 55(1): 69–80.
- Jager, M. M., Richardson, S. J., Bellingham, P. J., Clearwater, M. J., Laughlin, D. C. 2015. Soil fertility induces coordinated responses of multiple independent functional traits. *Journal of Ecology* 103: 374–385.
- Jia, Q., Qu, J., Mu, H., Sun, H., Wu, C. 2020. Foliar endophytic fungi: diversity in species and functions in forest ecosystems. *Symbiosis* 80 (2): 103–132.
- Jin, W., Peng, L., Zhang, X., Sun, H., Yuan, Z. 2019. Effects of endophytic and ectomycorrhizal basidiomycetes on *Quercus virginiana* seedling growth and nutrient absorption. *Journal of Sustainable Forestry*. 38: 457–470.
- Jin, W.; Peng, L.; Zhang, X.; Sun, H.; Yuan, Z. Effects of endophytic and ectomycorrhizal basidiomycetes on *Quercus virginiana* seedling growth and nutrient absorption. *J. Sustain. For.* 2019, 38, 457-470.
- Kaniyassery, A., Sathish, S. B., Thorat, S. A., Murali, T. S., Rao, M. R., Muthusamy, A. 2024. Deciphering the dynamics and trophic mode distribution of the leaf spot-associated fungal community of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Phytopathology Research* 6(1): 59.
- Kaplan I., Denno R.F. 2007. Interspecific interactions in phytophagous insects revisited: a quantitative assessment of competition theory. *Ecol. Lett.* 10, 977-994.

- Karimzadeh, S.; Safaie, N.; Mojerlou, S.; Ebrahimi, L. Identity and diversity of culturable endophytic fungi associated with *Capparis spinosa* L. in Iran. *Sci. Rep.* 2025, 15, 41502.
- Katoh, K.; Rozewicki, J.; Yamada, K.D. MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.* 2019, 20, 1160–1166.
- Kauserud, H. ITS alchemy: On the use of ITS as a DNA marker in fungal ecology. *Fungal Ecol.* 2023, 65, 101274.
- Keenan, R. J., Reams, G. A., Achard, F., de Freitas, J. V., Grainger, A., Lindquist, E. 2015. Dynamics of global forest area: Results from the FAO Global Forest Resources Assessment 2015. *Forest Ecology and Management* 352: 9–20.
- Kimaro, A. A., Isaac, M. E., Chamshama, S. A. O. 2011. Carbon pools in tree biomass and soils under rotational woodlot systems in eastern Tanzania. En Carbon Sequestration Potential of Agroforestry Systems: Opportunities and Challenges Dordrecht: *Springer Netherlands*. pp. 129–143.
- Klooster, D., Masera, O. 2000. Community forest management in Mexico: carbon mitigation and biodiversity conservation through rural development. *Global Environmental Change* 10 (4): 259–272.
- Kluth, S., Kruess, A., Tschamntke, T. 2002. Insects as vectors of plant pathogens: Mutualistic and antagonistic interactions. *Oecologia* 133: 193–199.
- Köhler, M.; Castro Sánchez-Bermejo, P.; Hahn, G.; Ferlian, O.; Eisenhauer, N.; Wubet, T.; Haider, S.; Bruehlheide, H. Foliar endophytic fungal communities are driven by leaf traits-Evidence from a temperate tree diversity experiment. *Ecol. Evol.* 2025, 15, e71691.
- Koide, R. T., Ricks, K. D., Davis, E. R. 2017. Climate and dispersal influence the structure of leaf fungal endophyte communities of *Quercus gambelii* in the eastern Great Basin, USA. *Fungal Ecology* 30: 19–28.
- Kumar, S., Abedin, M. M., Singh, A. K., Das, S. 2020. Role of phenolic compounds in plant-defensive mechanisms. En Plant phenolics in sustainable agriculture: volume 1. Singapore: *Springer Singapore*. pp. 517–532.

- Kuppler, J., Albert, C. H., Ames, G. M., Armbruster, W. S., Boenisch, G., Boucher, F. C., Campbell, D. R., Carneiro, L. T., Chacón-Madrigal, E., Enquist, B. J., Fonseca, C. R., Gómez, J. M., Guisan, A., Higuchi, P., Karger, D. N., Kattge, J., Kleyer, M., Kraft, N. J. B., Larue-Kontić, A. A. C., Junker, R. R. 2020. Global gradients in intraspecific variation in vegetative and floral traits are partially associated with climate and species richness. *Global Ecology and Biogeography* 29 (6): 992–1007.
- Kusari, S.; Lamshöft, M.; Zühlke, S.; Spiteller, M. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. *J. Nat. Prod.* 2008, 71, 159–162.
- Kusi, J., Karsai, I. 2020. Plastic leaf morphology in three species of *Quercus*: The more exposed leaves are smaller, more lobated and denser. *Plant Species Biology* 35 (1): 24–37.
- Lahiri, A., Murphy, B. R., Hodkinson, T. R. 2021. Assessing genotypic and environmental effects on endophyte communities of *Fraxinus* (Ash) using culture dependent and independent DNA sequencing. *Journal of Fungi* 7(7): 565.
- Lara-De La Cruz, L. I., García-Oliva, F., Oyama, K., González-Rodríguez, A. 2020. Association of functional trait variation of *Quercus castanea* with temperature and water availability gradients at the landscape level. *Botanical Sciences* 98 (1): 16–27.
- Latorre-Cárdenas, M.C.; González-Rodríguez, A.; Godínez-Gómez, O.; Arima, E.Y.; Young, K.R.; Denvir, A.; García-Oliva, F.; Ghilardi, A. 2023. Estimating fragmentation and connectivity patterns of the temperate forest in an avocado-dominated landscape to propose conservation strategies. *Land* 12, 631.
- Laurance, W. F. 2004. Forest-climate interactions in fragmented tropical landscapes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 359 (1443): 345–352.
- Lavorel, S., Grigulis, K., Lamarque, P., Colace, M. P., Garden, D., Girel, J., Pellet, G., Douzet, R. 2011. Using plant functional traits to understand the landscape distribution of multiple ecosystem services. *Journal of Ecology* 99: 135–147.
- Lawson, S.P.; Christian, N.; Abbot, P. Comparative analysis of the biodiversity of fungal endophytes in insect-induced galls and surrounding foliar tissue. *Fungal Divers.* 2014, 66, 89–97.

- Legarreta-Miranda, C. K., Prieto-Amparán, J. A., Villarreal-Guerrero, F., Morales-Nieto, C. R., Pinedo-Álvarez, A. 2021. Long-term land-use/land-cover change increased the landscape heterogeneity of a fragmented temperate forest in Mexico. *Forests* 12: 1099.
- Letunic, I.; Bork, P. 2021. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* , 49, W293-W296.
- Li, N., Dong, K. 2025. Fungal Communities in Various Environments. *Journal of Fungi* 11 (8): 560.
- Liao, C.; Doilom, M.; Jeewon, R.; Hyde, K.D.; Manawasinghe, I.S.; Chethana, K.W.T.; Balasuriya, A.; Thakshila, S.A.D.; Luo, M.; Mapook, A.; et al. 2025. Challenges and update on fungal endophytes: Classification, definition, diversity, ecology, evolution and functions. *Fungal Divers.* 131, 301-367.
- Linaldeddu, B.T.; Sirca, C.; Spano, D.; Franceschini, A. 2011. Variation of endophytic cork oak-associated fungal communities in relation to plant health and water stress. *For. Pathol.*, 41, 193-201.
- Liu, B., Li, C., Zhao, X., Zhang, C., He, X., Qu, L., Zhang, N. 2024. Contrasting patterns of fungal and bacterial endophytes inhabiting temperate tree leaves in response to thinning. *Journal of Fungi* 10 (7): 470.
- Liu, J., Wilson, M., Hu, G., Liu, J., Wu, J., Yu, M. 2018. How does habitat fragmentation affect the biodiversity and ecosystem functioning relationship? *Landscape Ecology* 33 (3): 341–352.
- Liu, X., Xu, G., Wu, Y., Ma, L., Gao, J., Zhang, Y., Liu, P. 2017. Leaf characters of *Ulmus elongata* in fragmented habitats: Implications for conservation. *Acta Ecologica Sinica* 37 (5): 346–353.
- Lücking, R.; Aime, M.C.; Robbertse, B.; Miller, A.N.; Ariyawansa, H.A.; Aoki, T.; Cardinali, G.; Crous, P.W.; Druzhinina, I.S.; Geiser, D.M.; et al. 2020. Unambiguous identification of fungi: Where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding? *IMA Fungus* 11, 14.

- Malarvizhi, K., Murali, T. S., Kumaresan, V. 2023. Fungal endophytes of crop plants: diversity, stress tolerance and biocontrol potential. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 33(1): 67.
- Maldonado-López Y, de Araújo WS, González-Rodríguez A, Oyama K, Fagundes M, Diaz-Castelazo C, Sánchez-Echeverría K, Borges M, Pérez-López G, Cuevas-Reyes P. 2022. Quantitative trophic networks of insect gallers and their parasitoids in the hybrid oak complex *Quercus magnoliifolia* x *Quercus resinosa*. *API*. 16(6), 631-643.
- Maldonado-López, Y., Cuevas-Reyes, P., González-Rodríguez, A., Pérez-López, G., Acosta-Gómez, C., Oyama, K. 2015. Relationships among plant genetics, phytochemistry and herbivory patterns in *Quercus castanea* across a fragmented landscape. *Ecological Research*. 30: 133–143.
- Maldonado-López, Y., Cuevas-Reyes, P., Oyama, K. 2016. Diversity of gall wasps (Hymenoptera: Cynipidae) associated with oak trees (Fagaceae: *Quercus*) in a fragmented landscape in Mexico. *Arthropod-Plant Interactions* 10 (1): 29–39.
- Maney, C., Sassen, M., Hill, S. L. 2022. Modelling biodiversity responses to land use in areas of cocoa cultivation. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 324: 107712.
- Manos, P. S., Hipp, A. L. 2021. An updated infrageneric classification of the North American oaks (*Quercus* subgenus *Quercus*). *Forests* 12: 786.
- Martin, A. R., Hale, C. E., Cerabolini, B. E., Cornelissen, J. H., Craine, J., Gough WA, Kattge, J., Tirona, C. K. F. 2018. Inter-and intraspecific variation in leaf economic traits in wheat and maize.  *AoB Plants* 10(1).
- Martin, F., Tan, H. 2025. Saprotrophy-to-symbiosis continuum in fungi. *Current Biology* 35(11): R469-R475.
- Martínez-Álvarez, P.; Rodríguez-Ceinos, S.; Martín-García, J.; Díez, J.J. 2012. Monitoring endophyte populations in pine plantations and native oak forests in northern Spain. *For. Syst.* 21, 373-382.

- Martínez-Meléndez, N., Ramírez-Marcial, N., García-Franco, J. G., Cach-Pérez, M. J., Martínez-Zurimendi, P. 2022. Importance of *Quercus* spp. for diversity and biomass of vascular epiphytes in a managed pine–oak forest in southern Mexico. *Forest Ecosystems* 9: 100034.
- Martinson, H. M., Fagan, W. F. 2014. Trophic disruption: A meta-analysis of how habitat fragmentation affects resource consumption in terrestrial arthropod systems. *Ecology letters* 17(9): 1178–1189.
- Mas, J. F., González, R. 2015. Mexican land use and land cover data: Recent advances and future challenges. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* 67 (2): 299–315.
- Mas, J. F., Lemoine-Rodríguez, R., González, R., López-Sánchez, J., Piña-Garduño, A., Herrera-Flores, E. 2017. Evaluación de las tasas de deforestación en Michoacán a escala detallada mediante un método híbrido de clasificación de imágenes SPOT. *Madera y Bosques* 23 (2): 119–131.
- Mas, J. F., Velázquez, A., Díaz, J. R., Mayorga, R., Alcántara, C., Castro, R., Fernández, T. 2002. Monitoreo de los cambios de cobertura en México. *Memorias del II Seminario Latinoamericano de Geografía Física* (Disco Compacto): 24–27.
- Matsumura, E., Fukuda, K. 2013. A comparison of fungal endophytic community diversity in tree leaves of rural and urban temperate forests of Kanto district, eastern Japan. *Fungal Biology* 117: 191–201.
- McDowell, J. M., Simon, S. A. 2008. Molecular diversity at the plant–pathogen interface. *Developmental & Comparative Immunology* 32(7): 736–744.
- Menkis, A., Redr, D., Bengtsson, V., Hedin, J., Niklasson, M., Nordén, B., Dahlberg, A. 2022. Endophytes dominate fungal communities in six-year-old veteranisation wounds in living oak trunks. *Fungal Ecology* 59: 101020.
- Milazzo, C., Zulak, K. G., Muria-Gonzalez, M. J., Jones, D., Power, M., Bransgrove, K., Bunce, M., Lopez-Ruiz, F. J. 2021. High-throughput metabarcoding characterizes fungal endophyte diversity in the phyllosphere of a barley crop. *Phytobiomes Journal* 5 (3): 316–325.

- Molina Sánchez, A., Delgado, P., González-Rodríguez, A., González, C., Gómez-Tagle Rojas, A. F., Lopez-Toledo, L. 2019. Spatio-temporal approach for identification of critical conservation areas: a case study with two pine species from a threatened temperate forest in Mexico. *Biodiversity and Conservation* 28 (7): 1863–1883.
- Molina, L., Rajchenberg, M., Pildain, M. B., Aime, M. C. 2025. Seasonal Turnover and Functional Structure of the Foliar Mycobiota in a Gondwanan Temperate Forest Keystone Tree. *Journal of Fungi* 11(11): 795.
- Morales-Vargas, A. T., López-Ramírez, V., Álvarez-Mejía, C., Vázquez-Martínez, J. 2024. Endophytic fungi for crops adaptation to abiotic stresses. *Microorganisms* 12 (7): 1357.
- Moricca, S., Ginetti, B., Ragazzi, A. 2012. Species- and organ-specificity in endophytes colonizing healthy and declining Mediterranean oaks. *Phytopathologia Mediterranea*. 51: 587–598.
- Moricca, S., Ragazzi, A. 2008. Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: A lesson from *Discula quercina*. *Phytopathology* 98: 380–386.
- Moricca, S.; Ginetti, B.; Ragazzi, A. Species- and organ-specificity in endophytes colonizing healthy and declining Mediterranean oaks. *Phytopathol. Mediterr.* 2012, 51, 587-598.
- Murphy, S. M., Battocletti, A. H., Tinghitella, R. M., Wimp, G. M., Ries, L. 2016. Complex community and evolutionary responses to habitat fragmentation and habitat edges: what can we learn from insect science? *Current Opinion in Insect Science* 14: 61–65.
- Myers, J. H., Sarfraz, R. M. 2017. Impacts of insect herbivores on plant populations. *Annual review of entomology* 62: 207–230.
- Neinavaz E, Skidmore AK, Darvishzadeh R (2020) Effects of prediction accuracy of the proportion of vegetation cover on land surface emissivity and temperature using the NDVI threshold method. *Int. J. Appl. Earth Obs. Geoinf.* 85, 101984.
- Ngubane, N. P., Dreyer, L. L., Slippers, B., Kemler, M., Witfeld, F., Begerow, D., Brachmann, A., Roets, F. 2023. Land use change rather than surrounding vegetation affects fungal endophyte assemblages in the African wild olive. *Landscape Ecology* 38(12): 3153–3171.

- Nguyen, L.T.; Schmidt, H.A.; von Haeseler, A.; Minh, B.Q. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 2015, 32, 268–274.
- Nguyen, M. H., Shin, K. C., Lee, J. K. 2021. Fungal community analyses of endophytic fungi from two oak species, *Quercus mongolica* and *Q. serrata*, in Korea. *Mycobiology* 49: 385–395.
- Nguyen, M.H.; Yong, J.H.; Sung, H.J.; Lee, J.K. 2020. Screening of endophytic fungal isolates against *Raffaelea quercus-mongolicae* causing oak wilt disease in Korea. *Mycobiology* 48, 484–494.
- Nickerson, M.N.; Moore, L.P.; U'Ren, J.M. 2023. The impact of polyphenolic compounds on the in vitro growth of oak-associated foliar endophytic and saprotrophic fungi. *Fungal Ecol.* 62, 101226.
- Niinemets, Ü. 2015. Is there a species spectrum within the world-wide leaf economics spectrum? Major variations in leaf functional traits in the Mediterranean sclerophyll *Quercus ilex*. *New Phytologist* 205(1): 79–96.
- Nilsson, R. H., Larsson, K. H., Taylor, A. F. S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F. O., Tedersoo, L., Saar, I., Kõljalg, U., Abarenkov, K. 2019. The UNITE database for molecular identification of fungi: Handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research* 47(D1): D259–D264.
- Ohgushi, T., Craig, T. P., Price, P. W. 2007. Ecological communities: Plant mediation in indirect interaction webs. *Cambridge University Press*.
- Onoda, Y., Westoby, M., Adler, P. B., Choong, A. M. F., Clissold, F. J., Cornelissen, J. H. C., Díaz, S., Dominy, N. J., Elgart, A., Enrico, L., Fine, P. V. A., Howard, J. J., Jalili, A., Kitajima, K., Kurokawa, H., McArthur, C., Lucas, P. W., Markesteijn, L., Pérez-Harguindeguy, N., Poorter, L., Richards, L., Santiago, L. S., Sosinski, E. E., Van Bael, S. A., Warton, D. I., Wright, I. J., Wright, S. J., Yamashita, N. 2011. Global patterns of leaf mechanical properties. *Ecology Letters* 14(3): 301–312.

- Oono, R.; Lefèvre, E.; Simha, A.; Lutzoni, F. A 2015. comparison of the community diversity of foliar fungal endophytes between seedling and adult loblolly pines (*Pinus taeda*). *Fungal Biol.* , 119, 917-928.
- Osono, T.; Tateno, O.; Masuya, H. 2013. Diversity and ubiquity of xylariaceous endophytes in live and dead leaves of temperate forest trees. *Mycoscience*. 54, 54-61.
- Pablo-Rodríguez, J. L., Bravo-Monzón, Á. E., Montiel-González, C., Benítez-Malvido, J., Álvarez-Betancourt, S., Ramírez-Sánchez, O., Oyama, K., Arena-Ortiz, M. L., Álvarez-Añorve, Y., Ávila-Cabadilla, L. D. 2023. Linking anthropogenic landscape perturbation to herbivory and pathogen leaf damage in tropical tree communities. *Plants* 12(22): 3839.
- Pascual-Alvarado, E.; Nieves-Aldrey, J.L.; Castillejos Lemus, D.E.; Cuevas-Reyes, P.; Oyama, K. 2017. Diversity of galls induced by wasps (Hymenoptera: *Cynipidae*, *Cynipini*) associated with oaks (Fagaceae: *Quercus*) in Mexico. *Bot. Sci.* 2017, 95, 461-472.
- Peay, K. G., Kennedy, P. G., Talbot, J. M. 2016. Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. *Nature Reviews Microbiology* 14(7): 434-447
- Pereira, P.F.; Lourenço, R.; Lopes, C.; Oliveira, A.; Ribeiro-Silva, J.; Rabaça, J.E.; Pinto-Correia, T.; Figueiredo, D.; Mira, A.; Marques, J.T. 2019. The influence of management and environmental factors on insect attack on cork oak canopy. *For. Ecol. Manag.* 453, 117582.
- Pérez-Harguinegy, N., Díaz, S., Garnier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P., Bret-Harte, M. S., Cornwell, W. K., Craine, J. M., Gurvich, D. E., Urcelay, C., Veneklaas, E. J., Reich, P. B., Poorter, L., Wright, I. J., Ray, P., Enrico, L., Pausas, J. G., De Vos, A. C., Buchmann, N., Funes, G., Quétier, F., Hodgson, J. G., Thompson, K., Morgan, H. D., Steege, H., Van Der Heijden, M. G. A., Sack, L., Blonder, B., Poschlod, P., Vaieretti, M. V., Conti, G., Staver, A. C., Aquino, S., Cornelissen, J. H. C. 2016. New handbook for standardized measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany* 64: 715–716.
- Pérez-Solache, A., Vaca-Sánchez, M., Maldonado-López, Y., Lopes de Faria, M., Zazá Borges, M. A., Fagunes, M., Oyama, K., Méndez-Solórzano, M. I., Aguilar-Peralta, J. S., Hernández-Guzmán, R., Cuevas-Reyes, P. 2023. Changes in land use of temperate forests associated

to avocado production in Mexico: Impacts on soil properties, plant traits, and insect-plant interactions. *Agricultural Systems* 204.

- Pfeifer, M., Lefebvre, V., Peres, C. A., Banks-Leite, C., Wearn, O. R., Marsh, C. J. M., Butchart, S. H., Arroyo-Rodríguez, V., Barlow, J., Cerezo, A., Cisneros, L., D'Cruze, N., Faria, D., Hadley, A., Harris, S. M., Klingbeil, B. T., Kormann, U., Lens, L., Medina-Rangel, G. F., Morante-Filho, J. C., Olivier, P., Peters, S. L., Pidgeon, A., Ribeiro, D. B., Scherber, C., Schneider-Maunoury, L., Struebig, M., Urbina-Cardona, N., Watling, J. I., Willig, M. R., Wood, E. M., Ewers, R. M. 2017. Creation of forest edges has a global impact on forest vertebrates. *Nature* 551(7679): 187–191.
- Poorter, L., Van De Plassche, M., Willems, S., Boot, R. G. A. 2004. Leaf traits and herbivory rates of tropical tree species differing in successional status. *Plant Biology* 6: 746–754.
- Porras-Alfaro, A.; Bayman, P. 2011. Hidden fungi, emergent properties: Endophytes and microbiomes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 291-315.
- Postiglione, A.; Prigioniero, A.; Zuzolo, D.; Tartaglia, M.; Scarano, P.; Maisto, M.; Ranauda, M.A.; Sciarrillo, R.; Thijs, S.; Vangronsveld, J.; Guarino, C. 2022. *Quercus ilex* phyllosphere microbiome environmental-driven structure and composition shifts in a Mediterranean context. *Plants* 11, 3528.
- Price, P.W. 1991. The plant vigor hypothesis and herbivore attack. *Oikos* 62: 244-251.
- Prieto-Dueñas, I. S., Cuevas-Reyes, P., Vaca-Sánchez, M. S., Oyama, K., Santos de Araujo, W., Zazá Borges, M. A., Fagundes, M., Wilson Fernandes, G., Maldonado-López, Y. 2025. Tri-trophic networks of oak gall-inducing insects and their parasitoids in Mexican avocado agroecosystems: Forest coverage and local climatic variables importance. *Ecological Complexity* 63: 101133.
- Qin, L., Xiao, Z., Ming, A., Teng, J., Zhu, H., Qin, J., Liang, Z. 2024. Soil phosphorus cycling microbial functional genes of monoculture and mixed plantations of native tree species in subtropical China. *Frontiers in Microbiology* 15: 1419645.

- Ragazzi, A., Moricca, S., Capretti, P., Dellavalle, I., Turco, E. 2003. Differences in composition of endophytic mycobiota in twigs and leaves of healthy and declining *Quercus* species in Italy. *Forest Pathology* 33: 31–38.
- Raja, H.A.; Miller, A.N.; Pearce, C.J.; Oberlies, N.H. 2017. Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community. *J. Nat. Prod.* 80, 756–770.
- Ramírez-Mejía, D., Levers, C., Kolb, M., Ghilardi, A., Godínez-Gómez, O., Mas, J. F. 2024. Mapping spatiotemporal patterns of avocado expansion and land-use intensity in central Mexico and their effects on landscape connectivity. *Environmental Research Letters* 19: 124090.
- Ramírez-Valiente JA, Cavender-Bares J. 2017. Evolutionary trade-offs between drought resistance mechanisms across a precipitation gradient in a seasonally dry tropical oak (*Quercus oleoides*). *Tree Physiol.* 37, 889–901.
- Rasband W.S. 2016. ImageJ 1.50 i. US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. URL: <https://imagej.nih.gov/ij>.
- Ratnadass, A. y Deguine, J. P. 2020. Three-way interactions between crop plants, phytopathogenic fungi, and mirid bugs. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 40: 46.
- Riitters, K., Wickham, J., Costanza, J. K., Vogt, P. 2016. A global evaluation of forest interior area dynamics using tree cover data from 2000 to 2012. *Landscape Ecology* 31: 137–148.
- Rodriguez, R.J. White, J.F., Jr. Arnold, A.E. Redman, A.R. 2009 Fungal endophytes: Diversity and functional roles. *New Phytologist* 182: 314–330.
- Romero-Rangel, S.; Rojas-Zenteno, E.C. 2019. Aspectos taxonómicos de la morfología floral masculina de *Quercus* (Fagaceae) en México. *Polibotánica* 48, 13–27.
- Rosales-Castillo, J.A.; Oyama, K.; Vázquez-Garcidueñas, M.S.; Aguilar-Romero, R.; García-Oliva, F.; Vázquez-Marrufo, G. 2018. Fungal community and ligninolytic enzyme activities in *Quercus deserticola* Trel. litter from forest fragments with increasing levels of disturbance. *Forests* 9, 11.

- Rossetti, M. R., Tscharnkte, T., Aguilar, R., Batáry, P. 2017. Responses of insect herbivores and herbivory to habitat fragmentation: a hierarchical meta-analysis. *Ecology Letters* 20: 264–272.
- Rostás, M., Simon, M., Hilker, M. 2003. Ecological cross-effects of induced plant responses towards herbivores and phytopathogenic fungi. *Basic and Applied Ecology* 4: 43–62.
- Ruiz-Carbayo, H., Pino, J., Bonal, R., James, P. M. A., Hampe, A., Molowny-Horas, R., Espelta, J. M. 2020. Insect herbivory in novel *Quercus ilex* L. forests: the role of landscape attributes, forest composition, and host traits. *Annals of Forest Science* 77.
- SAGARPA 2017. Aguacate mexicano. *Planeación agrícola Nacional 2017–20230*. Estados Unidos Mexicanos.
- Saikkonen, K. 2007. Forest structure and fungal endophytes. *Fungal biology reviews* 21(2-3): 67–74.
- SAS Institute JMP®, Version 2008, Inc., Cary, NC, USA ISBN 978–1–59994–924–6
- Schöb, C., Armas, C., Guler, M., Prieto, I. y Pugnaire, F. I. 2013. Variability in functional traits mediates plant interactions along stress gradients. *Journal of Ecology* 101: 753–762.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spunge, J. L., Levesque, C. A., White, M. M. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(16): 6241–6246.
- Schoch, C. L., Sung, G., López-Giráldez, F., Townsend, J. P., Miadlikowska, J. P., Hofstetter, V., Robbertse, B., Matheny, J. P., Kauff, F., Wang, Z., Gueidan, C., Andrie, R. M., Trippe, K., Ciuffetti, L. M., Wynns, A., Fraker, E., Hodkinson, B. P., Bonito, G., Groenewald, J. Z., Arzanlou, M., de Hoog, G. S., Crous, P. W., Hewitt, D., Pfister, D. H., Peterson, K., Gryzenhout, M., Wingfield, M. J., Aptroot, A., Suh, S., Blackwell, M., Hillis, D. M., Griffith, G. W., Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., Lumbsch, H. T., Lücking, R., Büdel, B., Rauhut, A., Diederich, P., Ertz, D., Geiser, D. M., Hosaka, K., Inderbitzin, P., Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., Mostert, L., O'Donnell, Harrie Sipman, K., Rogers, J. D., Shoemaker, R. A., Sugiyama, J., Summerbell, R. C., Untereiner, W.,

- Johnston, P. R., Stenroos, S., Zuccaro, A., Dyer, P.S., Crittenden, P. D., Cole, M. S., Hansen, K., Trappe, J. M., Yahr, R., Lutzoni, F., Spatafora, J. W. 2009. The Ascomycota Tree of Life: A Phylum-wide Phylogeny Clarifies the Origin and Evolution of Fundamental Reproductive and Ecological Traits. *Systematic Biology* 58(2): 224–239.
- Schulz, B.; Guzke, S.; Dammann, U. 1998. Endophyte-host interactions. II. Defining symbiosis of the endophyte-host interaction. *Symbiosis* 25, 213-227.
- Shi, X., Shao, Y., Yang, Z., Brearley, F. Q., Lucas-Borja, M. E., Feng, D., Shao, Y., Wang, J. 2026. The leaf economics spectrum drives soil nitrification in subtropical forests. *Journal of Plant Ecology* rtag003.
- Shimrah T., Lungleng P., Devi A.R., Sarma K., Varah F., Khuman Y.S. 2022. Spatio-temporal assessment on land use and land cover (LULC) and forest fragmentation in shifting agroecosystem landscape in Ukhrul district of Manipur, Northeast India. *Environ. Monit. Assess.* 194, 14.
- Singh, B. K., Delgado-Baquerizo, M., Egidio, E., Guirado, E., Leach, J. E., Liu, H., Trivedi, P. 2023. Climate change impacts on plant pathogens, food security and paths forward. *Nature Reviews Microbiology* 21(10): 640–656.
- Singh, S. P., Zobel, D. B. 2025. Pine–oak type: A unique resilient global system with high potential for nature-based solutions. *Ecological Indicators* 175: 113536.
- Slattery, Z., Fenner, R. 2021. Spatial analysis of the drivers, characteristics, and effects of forest fragmentation. *Sustainability* 13(6): 3246.
- Solórzano, J.V.; Mas, J.F.; Ramírez-Mejía, D.; Gallardo-Cruz, J.A. 2025. Long-term trajectory analysis of avocado orchards in the avocado belt, Mexico. *Land* 14, 1792.
- Stevens MT, Brown SC, Bothwell HM, Bryant JP (2016) Biogeography of Alaska paper birch (*Betula neoalaskana*): latitudinal patterns in chemical defense and plant architecture. *Ecology*, 97, 494-502.
- Stokes ME, Davis CS, Koch GG (2012) Categorical Data Analysis Using SAS. SAS institute.

- Suwannasai, N., Sangvichien, E., Phosri, C., McCloskey, S., Wangsawat, N., Thamvithayakorn, P., Ruchikachom, N., Thienhirun, S., Mekkamol, S., Sihanonth, P., Whalley, M. A., Whalley, A. J. S. 2023. Exploring the Xylariaceae and its relatives. *Botanical Studies* 64(1): 15.
- Terhonen, E., Blumenstein, K., Kovalchuk, A., Asiegbu, F. O. 2019. Forest tree microbiomes and associated fungal endophytes: Functional roles and impact on forest health. *Forests* 10(1): 42.
- Thangavel, M., Sneha, M. J. X., Mani, I., Surendrababu, A., Rajapriya, P., Arulselvan, P., Alarfaj, A. A., Thangavelu, I., Pandi, M. 2025. Diversity of Endophytic Fungi in Plant Species: Traditional vs. High-Throughput Sequencing Approaches. *Chemistry & Biodiversity* e202402792.
- Trifinopoulos, J., Nguyen, L.T.; von Haeseler, A.; Minh, B.Q. 2016. W-IQ-TREE: A fast online phylogenetic tool for maximum-likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* 44, W232-W235.
- Tuff, K. T., Tuff, T., Davies, K. F. 2016. A framework for integrating thermal biology into fragmentation research. *Ecology Letters* 19(4): 361–374.
- U'ren, J. M., Dalling, J. W., Gallery, R. E., Maddison, D. R., Davis, E. C., Gibson, C. M., & Arnold, A. E. 2009. Diversity and evolutionary origins of fungi associated with seeds of a neotropical pioneer tree: a case study for analysing fungal environmental samples. *Mycological Research* 113(4): 432-449.
- U'Ren, J.M.; Lutzoni, F.; Miadlikowska, J.; Zimmerman, N.B.; Carbone, I.; May, G.; Arnold, A.E. 2019. Host availability drives distributions of fungal endophytes in the imperilled boreal realm. *Nat. Ecol. Evol.* , 3, 1430-1437.
- Vaca-Sánchez, M. S., Espírito-Santo, M. M., Maldonado-López, Y., Oyama, K., Pérez-Solache, A., Lopes de Faria, M., Zazá Borges, M. A., Fernandes, G. W., Cuevas-Reyes, P. 2024. Functional leaf-trait variability and herbivory in oaks along a Mexican avocado agrosystem mosaic. *Flora*, 310: 152437.
- Vaca-Sánchez, M.S.; Maldonado-López, Y.; Oyama, K.; Delgado, G.; Aguilar-Peralta, J.S.; Zazá Borges, M.A.; Lopes de Faria, M.; Fagundes, M.; López-Maldonado, M.C.; Cuevas-Reyes,

- P. 2023. Changes in herbivory patterns and insect herbivore assemblages associated to canopy of *Quercus laurina*: Importance of oak species diversity and foliar chemical defense. *Trees*, 37, 699–715.
- Valencia-A, S. 2004. Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 75: 33–53.
- Van Bael, S., Estrada, C., Arnold, A. E. 2017. Chapter 6: foliar endophyte communities and leaf traits in tropical trees. *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA. pp. 79–94.
- Van Dijk LJA, Ehrlén J, Tack AJM (2020) The timing and asymmetry of plant-pathogen-insect interactions: Plant-pathogen-insect interactions. *Proc. R. Soc. B.* 287(1935), 20201303.
- van Dijk, L. J. A., Moreira, X., Barr, A. E., Abdala-Roberts, L., Castagneyrol, B., Faticov, M., Hardwick, B., ten Hoopen, J. P. J. G., de la Mata, R., Pires, R. M., Roslin, T., Schigel, D. S., Timmermans, B. G. H., Tack, A. J. M. 2022. Urbanization affects oak–pathogen interactions across spatial scales. *Ecography* 2022(1).
- Vanneste, T., Valdés, A., Verheyen, K., Perring, M. P., Bernhardt-Römermann, M., Andrieu, E., Brunet, J., Cousins, S. A. O., Deconchat, M., De Smedt, P., Diekmann, M., Ehrmann, S., Heinken, T., Henny, M., Kolb, A., Lenoir, J., Liira, J., Naaf, T., Paal, T. De Frenne, P. 2019. Functional trait variation of forest understorey plant communities across Europe. *Basic and Applied Ecology* 34: 1–14.
- Verma, A., Shameem, N., Jatav, H. S., Sathyanarayana, E., Parray, J. A., Poczar, P. Sayyed, R. Z. 2022. Fungal endophytes to combat biotic and abiotic stresses for climate-smart and sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science* 13: 953836.
- Viljur, M. L., Abella, S. R., Adámek, M., Alencar, J. B. R., Barber, N. A., Beudert, B., Chao, A., Chergui, B., Choi, C. Y., Cleary, D. F. R., Davis, T. S., Dechnik-Vázquez, Y. A. et al. 2022. The effect of natural disturbances on forest biodiversity: An ecological synthesis. *Biological Reviews* 97: 1930–1947.

- Villanueva Tomas, J. A., Zepeda Anaya, J. A. 2018. La Producción de Aguacate en el Estado de Michoacán y sus efectos en los índices de pobreza, el cambio del uso de suelo y la migración. *Revista Mexicana Sobre Desarrollo Local* 2: 1–12.
- Viscosi, V. 2015. Geometric morphometrics and leaf phenotypic plasticity: Assessing fluctuating asymmetry and allometry in European white oaks (*Quercus*). *Botanical Journal of the Linnean Society* 179(2): 335–348.
- Wang, B., Li, L. 2025. Forest loss increases foliar insect and pathogen damage on poplar trees in natural riparian forests. *Frontiers in Plant Science* 16: 1508665.
- Wang, B., Tian, C., Liang, Y. 2021. Mixed effects of landscape structure, tree diversity and stand's relative position on insect and pathogen damage in riparian poplar forests. *Forest Ecology and Management* 479: 118555.
- Wang, M.; Liu, F.; Crous, P.W.; Cai, L. 2017. Phylogenetic reassessment of *Nigrospora*: Ubiquitous endophytes, plant and human pathogens. *Persoonia* 39, 118–142.
- Weatherhead, E.; Davis, E.L.; Koide, R.T. 2022. Many foliar endophytic fungi of *Quercus gambelii* are capable of psychrotolerant saprotrophic growth. *PLoS ONE* 17, e0275845.
- White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.J.W.T.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylo-genetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*; Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 1990; pp. 315–322.
- Wijayawardene, N.N.; Bahram, M.; Sanchez-Castro, I.; Dai, D.Q.; Ariyawansa, K.G.; Jayalal, U.; Suwannarach, N.; Tedersoo, L. 2021. Current insight into culture-dependent and culture-independent methods in discovering ascomycetous taxa. *J. Fungi* 7, 703.
- Willing, C.E.; Pierroz, G.; Guzman, A.; Anderegg, L.D.; Gao, C.; Coleman-Derr, D.; Taylor, J.W.; Bruns, T.D.; Dawson, T.E. Keep your friends close: Host compartmentalisation of microbial communities facilitates decoupling from effects of habitat fragmentation. *Ecol. Lett.* 2021, 24, 2674–2686.
- Wright, I. J., Reich, P. B., Westoby, M., Ackerly, D. D., Baruch, Z., Bongers, F., Cavender-Bares, J., Chapin, T., Cornelissen, J. H. C., Diemer, M., Flexas, J., Garnier, E., Groom, P. K.,

- Gulias, J., Hikosaka, K., Lamont, B. B., Lee, T., Lee, W., Lusk, C., Midgley, J. J., Navas, M. L., Niinemets, Ü., Oleksyn, J., Osada, N., Poorter, H., Poot, P., Prior, L., Pyankov, V. I., Roumet, C., Thomas, S. C., Tjoelker, M. G., Veneklaas, E. J., Villar, R. 2004. The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* 428(6985): 821-827.
- Yadav, G.; Meena, M. Unveiling the hidden culturable endophytic fungal diversity in aerial vegetative parts of *Wrightia tinctoria* (Roxb.) R. Br. of southern Aravalli hills. *Sci. Rep.* 2025, 15, 29378.
- Young, K.R.; Arima, E.Y.; Denvir, A.; García-Oliva, F.; González-Rodríguez, A.; Latorre-Cárdenas, M.C.; Valdivia-Ramírez, O.M.; Torres, R. 2025. Coupling effects of Mexican avocado production with demand in the United States: A social-ecological perspective on sustainability concerns. *J. Lat. Am. Geogr.* 24, 141-152.
- Yuan, Z.L.; Zhang, C.L.; Lin, F.C.; Kubicek, C.P. 2010. Identity, diversity, and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in the roots of rare wild rice (*Oryza granulata*) from a nature reserve in Yunnan, China. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1642-1652.
- Zambrano, J., Cordeiro, N. J., Garzon-Lopez, C., Yeager, L., Fortunel, C., Ndangalasi, H. J., Beckman, N. G. 2020. Investigating the direct and indirect effects of forest fragmentation on plant functional diversity. *PLoS One* 15: 1-16.
- Zarate, S. I., Kempema, L. A., Walling, L. L. 2007. Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. *Plant physiology* 143(2): 866-875.
- Zhang, R., Zhou, X. L., Yang, L., Long, B., Shen, S. K. 2024. Composition and Assembly of the Endophytic Fungal Community of Alpine *Rhododendron* Hosts Along Elevation Gradients. *Phytobiomes Journal* 8(3): 236-247.
- Zimmerman, N.B.; Vitousek, P.M. Fungal endophyte communities reflect environmental structuring across a Hawaiian land-scape. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012, 109, 13022-13027.
- Ziv, Y., Davidowitz, G. 2019. When landscape ecology meets physiology: Effects of habitat fragmentation on resource allocation trade-offs. *Frontiers in Ecology and Evolution* 7: 137.

Zmitrovich, I. V., Shishlyannikova, A. B. 2025. Xylosaprotrophic fungi associated with *Quercus robur* within the northeastern part of its range (Central and Northwestern Regions of Russia). *Biology Bulletin Reviews* 15

Zmitrovich, I.V.; Shishlyannikova, A.B. 2025. Xylosaprotrophic fungi associated with *Quercus robur* within the northeastern part of its range. *Biol. Bull. Rev.* , 15, 572-589.

# HONGOS ENDÓFITOS: LOS ALIADOS OCULTOS DE LAS PLANTAS

<sup>1</sup>María Isabel Méndez - Solórzano, <sup>2</sup>Yurixhi Maldonado - López,  
<sup>1</sup>Pablo Cuevas - Reyes.

<sup>1</sup>Laboratorio de Ecología de Interacciones Bióticas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

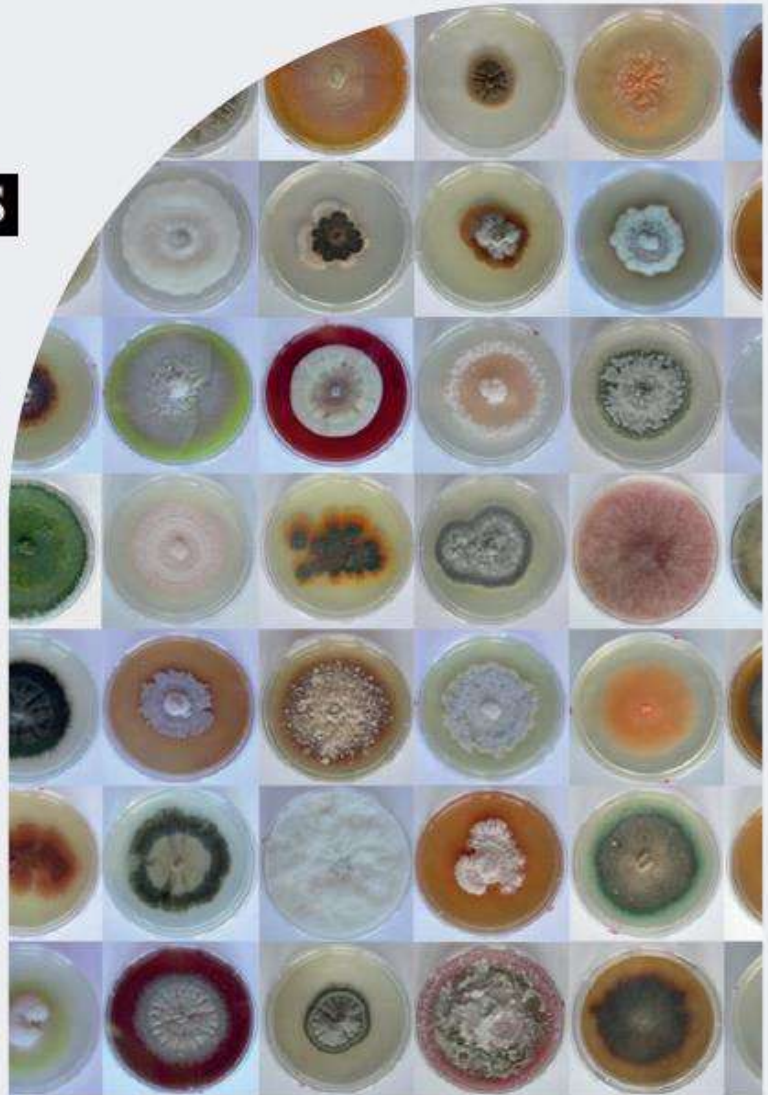
<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Contacto: [Isabel.mendez.solorzano@umich.mx](mailto:Isabel.mendez.solorzano@umich.mx)

# HONGOS ENDÓFITOS: LOS ALIADOS OCULTOS DE LAS PLANTAS

Los hongos endófitos desempeñan un papel crucial en los ecosistemas al establecer una relación con las plantas, y su uso en la agricultura promueve prácticas más sustentables, al reducir el uso de pesticidas y fertilizantes. La investigación y aplicación de estos hongos abrirá nuevos caminos tanto en la agricultura sostenible como en la conservación de la biodiversidad.

Palabras clave: endófitos, plantas, simbiosis



## ALIADOS OCULTOS

En la inmensa biodiversidad, donde la vida puede encontrarse en una asombrosa variedad de formas, hay seres diminutos que, a pesar de pasar desapercibidos ante nuestros ojos, desempeñan un papel fundamental en los ecosistemas, como son los **hongos endófitos** (Fig. 1). Estos organismos son aliados ocultos de las plantas, que colonizan espacios entre células, tejidos o incluso entre órganos como raíces, tallos, hojas o semillas. Los hongos endófitos mantienen una relación simbiótica (relación que beneficia a ambos organismos), que les brinda beneficios para su crecimiento y supervivencia, donde los hongos obtienen refugio y nutrientes de la planta, mientras que la planta recibe una variedad de beneficios [1, 2].

# HONGOS ENDÓFITOS AYUDANDO A SUS PLANTAS HOSPEDERAS



Figura 1. Hongo endófito aislado de encino (*Quercus*) visto al microscopio (100x). Autoría propia.

Una de las más grandes contribuciones de estos hongos es la resistencia que brindan a las plantas frente a distintas amenazas [2]. Por ejemplo, los hongos endófitos producen compuestos químicos que hacen más resistentes a las plantas frente a las enfermedades infecciosas, como el género *Trichoderma*, que inhibe el crecimiento de patógenos en el tomate (*Solanum Lycopersicum*). Además, los hongos endófitos en condiciones adversas como sequía o acumulación excesiva de sales en el suelo brindan protección a las plantas. Por ejemplo, el género *Trichoderma* produce enzimas capaces de reducir el estrés por alta salinidad y sequía en plantas de haba, jitomate, alfalfa y mostaza china [3].

Estas relaciones simbióticas son especialmente relevantes en la agricultura, donde el uso de hongos endófitos reduce el uso de pesticidas y fertilizantes químicos. Por ejemplo, la aplicación mediante aspersión de *Trichoderma atroviride* en plantas, protege pequeñas fisuras o heridas, ya que al penetrar a la planta puede combatir a los patógenos presentes como *Botrytis* y *Cylindrocarpon*, causantes de enfermedades como el moho gris [4]. De igual manera, se ha descubierto que algunos hongos endófitos tienen la capacidad de descomponer contaminantes presentes en el suelo, como *Metarhizium robertsii* que puede reducir la presencia de mercurio en raíces de plantas y en cuerpos de agua [5].



Figura 2: Cepas de hongos endófitos aislados de *Quercus castanea* y *Quercus obtusata* del estado de Michoacán. Autoría propia.

Estos hongos también estimulan el crecimiento al producir hormonas de crecimiento, como *Trichoderma harzianum*, el cual secreta auxinas (hormonas de crecimiento) que incrementan el desarrollo de las raíces. Así mismo, liberan enzimas que descomponen la materia orgánica del suelo, facilitando el acceso de la planta a los nutrientes esenciales y promoviendo un crecimiento saludable y sostenible en la agricultura [4]. Esto no solo permite aumentar los rendimientos en el campo, sino que también reduce la dependencia de los agroquímicos.

## DIVERSIDAD DE HONGOS ENDÓFITOS

A medida que se avanza en el estudio de los hongos endófitos, se muestra evidencia de la asombrosa diversidad que albergan (Fig. 2). Se estima que existen millones de especies de hongos endófitos, de los cuales, un gran porcentaje no han sido descritas ni nombradas aún. Cada planta alberga una comunidad única de hongos endófitos, los cuales pasan desapercibidos al ojo humano. Su composición depende de la especie de planta, sus etapas de desarrollo, de las interacciones biológicas con otros organismos como bacterias, otros hongos y el entorno. Esta diversidad representa una fuente inagotable de posibilidades para la exploración de nuevas aplicaciones biotecnológicas como control biológico o biofertilizantes [7].





Figura 3. Hojas de Quercus castanea con lesiones causadas por el hongo endófito Diplodia corticola, aislado en laboratorio. Autoría propia.

## HONGO ENDÓFITO: ¿UNA AMENAZA PARA LAS PLANTAS?

En situaciones de estrés o desequilibrio, algunos hongos endófitos pueden perder su estado de simbiosis y volverse patógenos. Por ejemplo, algunos de los daños más comunes presentados en el aguacate son la pudrición de raíces ocasionada por el hongo *Phytophthora cinnamomi*, y la marchitez causada por *Verticillium sp.* Otros hongos son responsables de enfermedades como la roña (*Sphaceloma perseae*), la antracnosis de fruto (*Glomerella cingulata*) y la aparición de manchas en la hoja y el fruto (*Pseudocercospora purpurea*) [8]. Todos estos hongos causan daños visibles a la planta hospedadora (Fig. 3), como pudrición de las ramas y del fruto, llegando incluso a provocar la muerte de la planta.

## PERO... ¿QUÉ PROVOCA QUE UN HONGO SIMBIONTE SE COMPORTE COMO PATÓGENO?

No todos los hongos endófitos tienen el potencial de volverse patógenos y la transición de un hongo simbiote a patógeno es un proceso gradual y complejo. Los cambios en el ambiente, como el aumento de temperatura y humedad, pueden alterar su relación simbiótica con los hongos endófitos, llevándolos a actuar como patógenos. Por ejemplo, el hongo *Diplodia mutila*, que normalmente coexiste de manera inofensiva en la palma barrigona (*Iriartea deltoidea*), se vuelve patógeno si aumentas la intensidad de luz, causando la muerte celular en los sitios de infección de la planta [6].

Otro factor es el cambio en el sistema inmune o en la composición química de la planta; como el hongo *Epichloë festucae*, que normalmente es benéfico para especies de pastos, pero puede volverse dañino si la planta produce más compuestos fenólicos de lo normal. Incluso, cuando un hongo endófito cambia de una especie de planta hospedera a otra especie de planta, puede convertirse en patógeno, como es el caso de *Fusarium oxysporum*, que es simbionte en girasoles, pero perjudicial en ciertas variedades de tomate. Finalmente, la presencia de otros organismos como bacterias en la misma planta influyen la relación entre el hongo endófito y su hospedador. Por ejemplo, el hongo endófito *Beauveria bassiana* induce la resistencia del limón (*Citrus limon*) a la chinche asiática de los cítricos (*Diaphorina citri*) [9].

## CONCLUSIÓN

Aunque los hongos endófitos desempeñan un papel crucial en los ecosistemas, su estudio y aplicación práctica aún se encuentran en una etapa temprana. Los científicos continúan investigando y descubriendo nuevas especies, descubriendo los mecanismos de su relación simbiótica con las plantas y explorando sus aplicaciones potenciales en la agricultura, la medicina y otras áreas. El conocimiento que adquirimos sobre estos aliados ocultos de las plantas nos brinda la oportunidad de aprovechar su potencial de manera responsable y sostenible. A través de su relación simbiótica, fortalecen la resistencia de las plantas, estimulan su crecimiento, su desarrollo, y ofrecen un tesoro de compuestos bioactivos con propiedades medicinales. Su importancia en los ecosistemas y su potencial en diversas aplicaciones hacen de los hongos endófitos un fascinante objeto de estudio. Al comprender mejor esta relación simbiótica, podemos aprovechar el poder de estos pequeños organismos para promover una agricultura más sostenible, desarrollar nuevos tratamientos médicos y conservar la biodiversidad de nuestro planeta. Los hongos endófitos nos recuerdan la increíble complejidad y la interconexión de la naturaleza, invitándonos a explorar y apreciar la vida microscópica que sustenta nuestra existencia.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Garay Serrano, E., Cruz Esteban S., & Castro Jiménez A.M.J. (2024, 08 de abril) Los hongos invisibles en las plantas. INECOL. <http://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/component/content/article/17-ciencia-hoy/1476-los-hongos-invisibles-en-las-plantas>
2. Sánchez-Fernández, R.E., Sánchez-Ortiz, B.L., Sandoval-Espinosa, Y.K., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez M.C., & Macías-Rubalcava M.L., (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 16(2): pp. 132-146.
3. Mollaei, S., Khanebarndaz, O., Garami-Khashal, Z., & Ebadi, M. (2019). Molecular identification and phytochemical screening of endophytic fungi isolated from *Lithospermum officinale* L. roots: A new source of shikonin. *Phytochemistry*, 168: pp. 112-116. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112116>.
4. Stracquandano, C., Quiles, J. M., Meca, G., & Cacciola, S. O. (2020). Antifungal activity of bioactive metabolites produced by *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma atroviride* in liquid medium. *Journal of Fungi*, 6(4): pp. 263-281. <https://doi.org/10.3390/jof6040263>.
5. Liao, X., Lovett, B., Fang, W., & St Leger, R. J. (2017). *Metarhizium robertsii* produces indole-3-acetic acid, which promotes root growth in *Arabidopsis* and enhances virulence to insects. *Microbiology*, 163(7): pp. 980-991. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000494>.
6. Mahamedi, A. E., Phillips, A. J., Lopes, A., Djellid, Y., Arkam, M., Eichmeier, A., ... & Benraf-Tebbal, A. (2020). Diversity, distribution and host association of Botryosphaeriaceae

species causing oak decline across different forest ecosystems in Algeria. *European Journal of Plant Pathology*, 158: pp. 745-765. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02116-4>

7. Rana, K.L., Kour, D., Sheikh, I., Yadav, N., Yadav, A.N., Kumar, V., Singh, B.P., Dhaliwal, H.S. & Saxena, A.K., (2019). Biodiversity of Endophytic Fungi from Diverse Niches and Their Biotechnological Applications. *Fungal Biology*, 6: pp. 105-144. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-03589-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-03589-1_6)
8. Shetty, K. G., Rivadeneira, D. V., Jayachandran, K., & Walker, D. M. (2016). Isolation and molecular characterization of the fungal endophytic microbiome from conventionally and organically grown avocado trees in South Florida. *Mycological progress*, 15: pp. 977-986. <https://doi.org/10.1007/s11557-016-1219-3>.
9. Greenfield, M., Gómez-Jiménez, M. I., Ortiz, V., Vega, F. E., Kramer, M., & Parsa, S. (2016). *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. *Biological Control*, 95: pp. 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.002>

# María Isabel Méndez Solórzano

## Efecto del cambio de uso de suelo en la fisiología e interacciones ecológicas foliares de especies de encinos en Mi...

 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

### Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::3117:588057159

Fecha de entrega

8 may 2026, 11:23 a.m. GMT-6

Fecha de descarga

8 may 2026, 11:32 a.m. GMT-6

Nombre del archivo

Efecto del cambio de uso de suelo en la fisiología e interacciones ecológicas foliares de especies ....pdf

Tamaño del archivo

9.4 MB

164 páginas

29.928 palabras

169.793 caracteres

# 23% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

## Filtrado desde el informe

- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

## Fuentes principales

- 21%  Fuentes de Internet
- 21%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

## Marcas de integridad

### N.º de alertas de integridad para revisión

-  **Caracteres reemplazados**  
46 caracteres sospechosos en N.º de páginas  
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.
-  **Texto oculto**  
55 caracteres sospechosos en N.º de página  
El texto es alterado para mezclarse con el fondo blanco del documento.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

# Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

• Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo. • Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias. • Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento. • Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

| Datos del manuscrito que se presenta a revisión |                                                                                                                              |                                                                                        |
|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Programa educativo                              | Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, opción Conservación y Manejo de Recursos Naturales.              |                                                                                        |
| Título del trabajo                              | “Efecto del cambio de uso de suelo en la fisiología e interacciones ecológicas foliares de especies de encinos en Michoacán” |                                                                                        |
|                                                 | Nombre                                                                                                                       | Correo electrónico                                                                     |
| Autor/es                                        | M. en C. María Isabel Méndez Solórzano                                                                                       | <a href="mailto:isabel.mendez.solorzano@umich.mx">isabel.mendez.solorzano@umich.mx</a> |
| Director                                        | DR. Gerardo Vázquez Marrufo                                                                                                  | <a href="mailto:gerardo.marrufo@umich.mx">gerardo.marrufo@umich.mx</a>                 |
| Codirector                                      |                                                                                                                              |                                                                                        |
| Coordinador del programa                        | DR. Rodolfo Pérez Rodríguez                                                                                                  | <a href="mailto:doc.ciencias.biologicas@umich.mx">doc.ciencias.biologicas@umich.mx</a> |

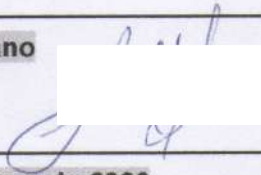
| Uso de Inteligencia Artificial |             |                                                                                   |
|--------------------------------|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Rubro                          | Uso (sí/no) | Descripción                                                                       |
| Asistencia en la redacción     | si          | Se utilizó Chat GPT para revisar gramática y agregar conectores en algunas ideas. |

## Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



| Uso de Inteligencia Artificial             |             |                                                                        |
|--------------------------------------------|-------------|------------------------------------------------------------------------|
| Rubro                                      | Uso (sí/no) | Descripción                                                            |
| Traducción al español                      | no          |                                                                        |
| Traducción a otra lengua                   | si          | Se utilizó Grammarly (Beta) para revisar los textos en inglés          |
| Revisión y corrección de estilo            | si          | Corrección de gramática y que el texto tuviera coherencia.             |
| Análisis de datos                          | si          | Revisión y ajuste de Scripts para realizar análisis estadísticos en R. |
| Búsqueda y organización de información     | no          |                                                                        |
| Formateo de las referencias bibliográficas | no          |                                                                        |
| Generación de contenido multimedia         | no          |                                                                        |
| Otro                                       | no          |                                                                        |

|                              |                                                                                                                  |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Datos del solicitante</b> |                                                                                                                  |
| <b>Nombre y firma</b>        | María Isabel Méndez Solórzano  |
| <b>Lugar y fecha</b>         | Morelia Michoacán, 06 de mayo de 2026                                                                            |