

UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA



“Determinación mediante aislamiento y purificación de hongos potencialmente micorrízicos en las raíces de seis especies de orquídeas en el cantón Gualaceo, provincia del Azuay”

Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de
Bioquímico Farmacéutico.

AUTORAS:

Mónica Patricia Cando Naula
C.I. 0105104095
María Verónica Cárdenas Pugo
C.I. 0105276984

DIRECTORA:

Blga. María Elisa Durán López
C.I. 0104249958

ASESORA:

Dra. Raffaella Ansaloni.
C.I. 0103969432

CUENCA- ECUADOR

2017

RESUMEN

La relación simbiótica entre hongos y raíces de orquídeas es de gran importancia en la nutrición y germinación de sus semillas. Aunque los hongos micorrízicos están presentes en casi todas partes del mundo, ciertas actividades humanas, como la deforestación y expansión de la frontera agrícola, pueden dar lugar a suelos o sustratos desprovistos de hongos beneficiosos o disminuir su abundancia. En ausencia o deficiencia de estos hongos micorrízicos, la germinación y crecimiento de las plantas podrían verse seriamente afectados. El objetivo de esta investigación fue aislar y purificar hongos potencialmente micorrízicos presentes en las raíces de seis especies de orquídeas nativas del Cantón Gualaceo, provincia del Azuay. El muestreo se realizó en los meses de julio y agosto del 2016, en la parroquia Remigio Crespo Toral (Gulag) en las orillas del Río San Francisco a una altura de 2.525 msnm. Las especies de orquídeas con las que se trabajaron fueron: *Pleurothallis angustipetala*, *Elleanthus oliganthus*, *Trichoceros anteniferum*, *Oncidium aureum*, *Pleurothallis gramínea*, *Epidendrum secundum*. Se siguió la metodología propuesta por Zettler (2013), para el procesamiento de las muestras y posterior aislamiento de las colonias. Se recolectaron 10 fragmentos de raíces con una longitud comprendida entre 5 – 10 cm. El muestreo se realizó por duplicado. Se logró aislar y purificar seis hongos potencialmente micorrízicos pertenecientes al género *Tulasnella*. El mayor porcentaje de este tipo de hongos fue aislado de raíces pertenecientes a las especies *Pleurothallis angustipetala*, *Pleurothallis gramínea* y *Epidendrum secundum*. La identificación de los hongos aislados será confirmada por amplificación y secuenciación de regiones específicas del ADN fúngico, lo cual corresponde a la siguiente fase dentro del proyecto “Estudio de la relación simbiótica orquídea-micorriza en la provincia del Azuay, Ecuador” que se realiza en el orquideario de la Universidad de Cuenca.

Palabras claves: micorriza, orquídea, relación simbiótica, cultivo de hongos, Gualaceo.

ABSTRACT

The symbiotic relationship between fungus and orchid's roots is of great importance for the nutrition and germination of these plants. Although mycorrhizal fungi occur almost everywhere in the world, human activities such as deforestation and agricultural frontier expansion, can result in soils or substrates lacking a beneficial fungi population or decreased fungi abundance. In the absence or deficiency of these mycorrhizal fungi, the plants growth could be inadequate. The aim of this research was to isolate and purify potentially mycorrhizal fungi present in roots of six native orchids species of Canton Gualaceo, province of Azuay. The sampling was performed in July and August 2016, in the Remigio Crespo Toral parish (Gulag) at the banks of the San Francisco River, 2.525 meters above the sea level (m.a.s.l). The orchids species used in this work were: *Pleurothallis angustipetala*, *Elleanthus oliganthus*, *Trichoceros anteniferum*, *Oncidium aureum*, *Pleurothallis gramínea*, *Epidendrum secundum*. Sample processing and subsequent colonies isolation was performed following the methodology proposed by Zettler (2013). Ten root fragments were collected, which length varied between 5 – 10 cm. The sampling was performed in duplicate. It was possible to isolate and purify six potentially mycorrhizal fungi belonging to the genus *Tulasnella*. The highest percentage of these kind of fungi were isolated from roots belonging to the species *Pleurothallis angustipetala*, *Pleurothallis gramínea* and *Epidendrum secundum*. The identification of the isolated fungi will be confirmed by the amplification and sequencing of specific DNA regions, which is the next step in the project "Study of the symbiotic orchid-mycorrhiza relationship in the province of Azuay, Ecuador" carried out in the orchid garden of the University of Cuenca.

Key words: Mycorrhiza, orchid, symbiotic relationship, fungal culture, Gualaceo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
ÍNDICE DE CONTENIDOS	4
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
CLÁUSULAS DE DERECHO DE AUTOR.....	9
CLÁUSULAS DE PROPIEDAD INTELECTUAL.....	11
DEDICATORIA	13
AGRADECIMIENTOS.....	15
INTRODUCCIÓN	16
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS GENERAL Y ESPECIFICOS.....	18
Objetivo General	18
Objetivos Específicos.....	18
CAPÍTULO I.....	19
1. ORQUÍDEAS.....	19
1.1. Generalidades de las orquídeas.....	19
1.2. Importancia de las orquídeas	20
1.3. Distribución de las orquídeas en el Ecuador	21
1.4. Ciclo vegetativo	21
1.5. Descripción de especies recolectas	22
1.5.1. <i>Oncidium aureum</i>	22
1.5.2. <i>Epidendrum secundum</i>	23
1.5.3. <i>Elleanthus oliganthus</i>	24
1.5.4. <i>Trichoceros anteniferum</i>	25
1.5.5. <i>Pleurothallis</i> sp.	25
2. MICORRIZAS.....	27
2.1. Generalidades	27
2.2. Clases de micorrizas	27
2.3. Beneficio de las micorrizas en el ecosistema	28
2.4. Relación orquídea micorriza.....	29
2.5. Identificación de la forma - género <i>Rhizoctonia</i>	30



7. Conclusiones	62
8. Recomendaciones	63
9. BIBLIOGRAFÍA Y OTRA PRODUCCIÓN CIENTÍFICA CITADA	64
10. ANEXOS	71
Anexo 1. Fotos de las especies de orquídeas recolectas.	71
Anexo 2. Medio FIM (Fungi Isolation Medium):	73
Anexo 3. Medio PDA (Agar Dextrosa-Papa):	73
Anexo 4. Resultado de la observacion microscopica de pelotones.	73
10.1. GLOSARIO	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Recolección de las raíces.	34
Tabla 2. Ejemplo del código (2M10A).	38
Tabla 3. Preparación de las raíces y aislamiento del hongo en el medio FIM.	36
Tabla 4. Aislamiento de los hongos en medio PDA.	39
Tabla 5. Procedimiento para el Microcultivo.	41
Tabla 6. Procedimiento para la identificación de hongos descartados.	42
Tabla 7. Resultados de siembra en medio FIM.	44
Tabla 8. Resultados de replante en medio PDA.	48
Tabla 9. Identificación macroscópica y microscópica de los hongos descartados.....	53
Tabla 10. Colonias seleccionadas para el microcultivo.	55
Tabla 11. Resultados de la observación macroscópica y microscópica de las colonias seleccionadas en medio PDA.	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes de la flor de orquídea.	19
Figura 2. Partes de la raíz de la orquídea.	22
Figura 3. <i>Oncidium aureum</i>	23
Figura 4. <i>Epidendrum secundum</i>	24
Figura 5. <i>Elleanthus oliganthus</i>	24
Figura 6. <i>Trichoceros anteniferum</i>	25
Figura 7. <i>Pleurothallis angustipetala</i>	26
Figura 8. <i>Pleurothallis gramínea</i>	26
Figura 9. Corte transversal de la raíz de orquídeas. (a) Velamen, (b) córtex donde se observan los pelotones 40X, (c) pelotones.	30
Figura 10. Células moniloides. (a) Células uninucleadas, (b) células binucleadas.	31
Figura 11. Mapa del sitio del muestreo.	33
Figura 12. Fragmentos de la raíz.	36
Figura 13. Porcentaje de fragmentos totales sembrados en medio FIM y sus resultado.	45
Figura 14. Porcentaje de crecimiento de colonias aisladas de las seis especies de orquídeas en medio de cultivo FIM.	46
Figura 15. Porcentaje de fragmentos totales sembrados en medio PDA y sus resultados.	49
Figura 16. Porcentaje de colonias aisladas en medio PDA de las seis especies de orquídeas.	50
Figura 17. Porcentaje de fragmentos (A, B, C) seleccionados para microcultivo.	51
Figura 18. Porcentaje de cajas seleccionadas para microcultivo de cada especie.	52

CLÁUSULAS DE DERECHO DE AUTOR



Universidad de Cuenca
Cláusula de derechos de autor

Mónica Patricia Cando Naula, autora de la tesis **“Determinación mediante aislamiento y purificación de hongos potencialmente micorrízicos en las raíces de seis especies de orquídeas en el cantón Gualaceo, provincia del Azuay”**, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciera de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 18 de enero de 2017



Mónica Patricia Cando Naula

C.I: 0105104095



Universidad de Cuenca
Cláusula de derechos de autor

María Verónica Cárdenas Pugo, autora de la tesis “**Determinación mediante aislamiento y purificación de hongos potencialmente micorrizicos en las raíces de seis especies de orquídeas en el cantón Gualaceo, provincia del Azuay**”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 18 de enero de 2017



María Verónica Cárdenas Pugo

C.I: 0105276984



CLÁUSULAS DE PROPIEDAD INTELECTUAL.



Universidad de Cuenca
Cláusula de propiedad intelectual

Mónica Patricia Cando Naula, autora de la tesis “**Determinación mediante aislamiento y purificación de hongos potencialmente micorrizicos en las raíces de seis especies de orquídeas en el cantón Gualaceo, provincia del Azuay**”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 18 de enero de 2017

Mónica Patricia Cando Naula

C.I: 0105104095



María Verónica Cárdenas Pugo, autora de la tesis “**Determinación mediante aislamiento y purificación de hongos potencialmente micorrízicos en las raíces de seis especies de orquídeas en el cantón Gualaceo, provincia del Azuay**”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 18 de enero de 2017

María Verónica Cárdenas Pugo

C.I: 0105276984

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación va dedicado a Dios y a la Virgen Santísima, por regalarme el don de la vida, guiarme y cuidarme a lo largo de este camino universitario.

A mis padres Marcelo y María Rosa, quienes con su esfuerzo, amistad y cariño me brindaron su apoyo incondicional para el término de la carrera. Gracias por sus enseñanzas que me ayudaron a superar cualquier obstáculo en mi vida.

A mis hermanos, Adriana, Paúl, Lourdes, Diego y María Soledad, gracias por su apoyo, amistad, porque siempre me llenan de alegría y me impulsan a salir adelante.

A mi familia, tías y primos, por haberme siempre apoyado en todo lo que podían.

A mis abuelitos, quienes desde el cielo me siguen cuidando y brindando su apoyo.

A todos mis amigos, por estar siempre en los momentos más difíciles, por todas esas palabras de apoyo para salir adelante y por todos esos momentos compartidos.

A mis profesores, gracias por la paciente, los conocimientos compartidos durante toda la carrera universitaria.

Gracias a todos que formaron parte de mi vida de una u otra forma. ¡Soy muy Bendecida!

Mónica Cando N.

DEDICATORIA

Este trabajo de titulación va dedicado a Dios y la Virgen por darme sabiduría y haberme guiado a lo largo de mi carrera universitaria.

A mis padres Manuel y Celia por ser mi pilar fundamental, por brindarme su apoyo, estar a mi lado en todo momento y ser mi inspiración para salir adelante, ya que con su esfuerzo logré culminar mis estudios.

A mis hermanos Xavier y Christian por estar conmigo alentándome a pesar de los problemas que hemos pasado.

A mi primo Juan, por siempre estar a mi lado.

A mi sobrina Adamaris que con sus ocurrencias me ha dado ánimos para lograr esta meta.

A mis amigos y compañera de tesis. Gracias a todos usted por creer en mí.

Verónica Cárdenas P.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la sabiduría, entendimiento y la fuerza que nos permitió alcanzar este objetivo en nuestras vidas.

De manera especial a nuestra tutora Blga. María Elisa Durán quién compartió su tiempo, conocimientos y nos supo orientar con mucha dedicación, esmero y paciencia en la realización de este trabajo.

Al Dr. Lawrence W. Zettler por ayudarnos con sus conocimientos en ésta área de estudio.

A la Dra. Raffaella Ansaloni por habernos dado la oportunidad de realizar este trabajo de investigación en el orquideario de la Universidad de Cuenca.

A la Bqf. Mónica Narváez por su amistad, apoyo y cooperación en el desarrollo de este trabajo de tesis.

Al Señor Servando Morocho por brindarnos sus conocimientos y ayudarnos al reconocimiento y recolección de las especies de orquídeas.

Al Dr. Rodrigo Caroca por brindarnos su valioso tiempo y conocimientos en las revisiones de este trabajo de investigación.

Al Dr. Geovanny Larriva y al tesista Santiago Romero por brindarnos todas las facilidades para la realización de esta tesis.

A todos los profesores quienes nos guiaron a lo largo de nuestra carrera. Gracias a todos por la confianza, el apoyo brindado y por sus valiosas colaboraciones en el desarrollo de este trabajo.

Mónica y Verónica

INTRODUCCIÓN

En octubre del 2013, Ecuador fue declarado como el “País de las Orquídeas”, bajo un Decreto Ejecutivo que se emitió para reconocer la riqueza del territorio en cuanto a esta familia botánica. Ecuador es un país mega diverso, tiene más especies de orquídeas que cualquier otro país a nivel mundial. (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2015). Existen alrededor de 4.200 especies de orquídeas, de las cuáles 1.300 son especies endémicas (Ministerio del Ambiente Ecuador, 2013). La provincia del Azuay tiene registradas 147 especies de orquídeas endémicas (Endara, 2009).

La pérdida de hábitat provocada por la deforestación, constituye uno de problemas más importantes para la pérdida de biodiversidad, debido a que no solo se pierden orquídeas sino también diversos microorganismos que habitan en el suelo, así como diversos polinizadores, que son indispensables para el equilibrio del ecosistema (Narrea, 2012).

Estudios realizados en el Ecuador por Bräulete (2012) con apoyo del Ministerio del Ambiente del Ecuador (M.A.E.), indican que en el país existen altas tasas de deforestación equivalente a 198.092 ha/año. La superficie forestal ha sido remplazada por cultivos, pastos y plantaciones exóticas como pino y eucalipto, afectando el hábitat natural de las orquídeas.

En la última década debido a la presión demográfica, la destrucción del bosque Andino ha sido más acelerada, ocasionando casi su desaparición, se calcula que por lo menos el 97% de bosques andinos del Ecuador han desaparecido, poniendo en peligro de extinción varias de sus especies (Merecí & Suqui, 2014). Según Endara (2009), Ecuador es el segundo país con una de las tasas más elevadas de deforestación de América del Sur. Por estas razones las orquídeas se encuentran catalogadas como amenazadas dentro del CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres).

Otro problema para la conservación de las orquídeas radica en su limitada capacidad de germinación, debido a que presentan una deficiente reserva

nutritiva para el embrión, siendo dependientes de un hongo micorrízico generalmente del género-forma *Rhizoctonia* (Noval *et al.*, 1999; Narrea, 2012). Los hongos micorrízicos son cruciales para la recuperación y restauración de los ecosistemas degradados, aumentando la tasa de supervivencia, y mejorando el crecimiento de sus hospederos, actuando como degradadores de materia orgánica (Pomagualli, 2015).

Es necesaria la búsqueda de estrategias que permitan la conservación *ex situ* y la propagación de las orquídeas. En nuestro país existen pocos estudios que brinden más información acerca de la relación simbiótica hongo – raíz de orquídea, evitando una adecuada conservación de las mismas (Rivas *et al.*, 1998; Merecí & Suqui, 2014; Pomagualli, 2015).

Por la diversidad de orquídeas en el Ecuador, el Cantón Gualaceo, constituye el lugar propicio para la realización del muestreo. Nuestro propósito fue aislar y purificar hongos potencialmente micorrízicos de orquídeas nativas de la provincia de Azuay, cuyas cepas servirán para estudios posteriores, permitiendo en un futuro la conservación *ex situ* de las orquídeas.

HIPÓTESIS

Es posible aislar y purificar hongos potencialmente micorrízicos de las raíces de seis especies de orquídeas nativas recolectadas en el Cantón Gualaceo, provincia del Azuay, a una altura de 2.525 msnm.

OBJETIVOS GENERAL Y ESPECIFICOS.

Objetivo General

- Determinar la presencia de hongos potencialmente micorrízicos de las raíces de seis especies de orquídeas nativas del Cantón Gualaceo, provincia del Azuay.

Objetivos Específicos

- Identificar seis especies de orquídeas nativas del Cantón Gualaceo.
- Aislar y purificar hongos potencialmente micorrízicos de seis especies de orquídeas, en medios de cultivos seleccionados.
- Identificar morfológicamente las colonias purificadas, usando claves de identificación en la literatura.

CAPÍTULO I

1. ORQUÍDEAS

1.1. Generalidades de las orquídeas

La familia de las orquídeas es la más abundante entre las plantas con flores, representan alrededor del 10% de la flora mundial con 30.000 especies descritas (Meisel & Woodward, 2005).

Las orquídeas se encuentran distribuidas por casi todas las regiones del planeta, excepto en los desiertos extremos y en las tierras persistentemente heladas. Pueden encontrarse en las ramas de árboles (epífitas), sobre rocas (litofitas) y en el suelo (terrestres) (Rivas *et al.*, 1998).

Las orquídeas tienen flores con formas complejas (Figura 1). Sus interacciones ecológicas son específicas con los agentes polinizadores y con los hongos que las colonizan, formando micorrizas (Córdova, 2003).

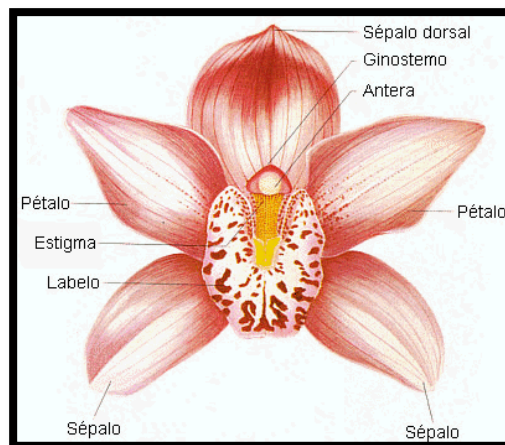


Figura 1. Partes de la flor de orquídea.

Fuente: Acosta, 2015.

Las orquídeas poseen un sistema de reproducción que es influenciado y dependiente de las condiciones ambientales existentes. Son el único grupo de plantas que utilizan constantemente a los hongos como un medio alternativo para la obtención de energía (Rivas *et al.*, 1998). El hongo obtiene agua y minerales para él mismo y para el embrión, luego, la semilla germinada

comparte azúcares de la fotosíntesis con el hongo (Yépez, 2003). La especie de hongo depende de la especie de orquídea (Meisel & Woodward, 2005). Las semillas de orquídeas son diminutas y contienen reservas escasas de alimentos, por tanto, es difícil para éstas propagarse en un medio silvestre. Estas semillas no germinan en el medio natural a menos que sean infectadas por un hongo micorrízico, el mismo que abastece a las plantas jóvenes con azúcares y nutrientes que necesitan hasta que sean lo suficientemente desarrolladas para fabricar su propio alimento (Reuters, 2006). El proceso de crecimiento de las hojas y raíces se va dando simultáneamente y se produce gracias a la asociación simbiótica con hongos del género *Rhizoctonia* que invaden la semilla (Rivas *et al.*, 1998; Reuters, 2006).

1.2. Importancia de las orquídeas

Las orquídeas al tener una gran variedad de flores, son de gran importancia en el ecosistema al atraer diversos polinizadores. Si las orquídeas desaparecieran, miles de especies polinizadoras estarían en peligro de extinción, y si estos polinizadores se extinguen las plantas no podrían reproducirse, afectando de manera irreversible el ecosistema (Noval *et al.*, 1999; Alomía, 2014).

Las orquídeas no sólo son plantas atrayentes por su belleza, sino también por su gran importancia a nivel económico, al ser una de las plantas más cotizadas a nivel mundial haciéndolas más vulnerables al saqueo para su venta ilegal (Narrea, 2012; Torres, 2012).

Las orquídeas también tienen usos medicinales y comestibles, por ejemplo la especie *Prostechea michuacana* es usada para contrarrestar padecimientos renales e infecciones de las vías urinarias (Cervantes, 2008; Vega *et al.*, 2015).

Ecuador tiene alrededor de 1.300 especies de orquídeas endémicas. La tercera parte de estas orquídeas están en peligro de extinción, debido a la destrucción de 75% de los bosques montanos (Meisel & Woodward, 2005).

1.3. Distribución de las orquídeas en el Ecuador

A nivel mundial existe alrededor de 30 mil especies de orquídeas y se calcula que Ecuador presenta alrededor del 14% del total de estas especies a escala mundial (McKendrick, 2000). Existen más de 4.200 especies de orquídeas conocidas, de las cuales 1.300 son especies endémicas (Ministerio del Ambiente Ecuador, 2013). Las orquídeas se encuentran en todos los pisos altitudinales comprendidos entre 0 y 4.500 msnm (Rivas *et al.*, 1998). El 8 % del total de las especies de orquídeas habitan en elevaciones inferiores a los 300 metros, el 18% en elevaciones superiores a los 3.000 metros, mientras que el 73% de las especies de orquídeas se encuentra entre los 300 y 3.000 metros de altura (Calaway & Escobar, 1998).

Con respecto a las orquídeas endémicas del Ecuador, la mayor cantidad se encuentran entre los 1.500 - 3.000 msnm, sobre todo en los bosques montano bajos y de neblina montanos (Endara, 2009).

1.4. Ciclo vegetativo

Las orquídeas durante su crecimiento pueden tener un desarrollo monopodial o simpondial. En el primer caso su crecimiento se presenta por el eje principal, en cuyo ápice se halla el punto de crecimiento vegetativo. En el desarrollo simpondial el crecimiento es lateral y su crecimiento continúa por el desarrollo de nuevos brotes próximos (Nauray, 2013).

Las especies de orquídeas pueden subsistir durante épocas desfavorables del año por presentar pseudotubérculos o rizomas (Figura 2). Las orquídeas protegen sus yemas bajo la superficie del suelo. La yema al activarse se alarga alcanzando la superficie del suelo, produce una roseta de hojas y a su vez aparecen las primeras raíces. Las raíces establecen una simbiosis con los hongos del suelo generalmente del género *Rhizoctonia* (Velasco & Beltrán, 2008; Nauray, 2013).

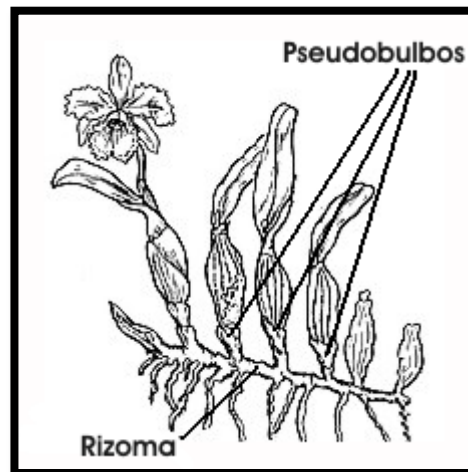


Figura 2. Partes de la raíz de la orquídea. Fuente: Velasco, 2008.

Las yemas siguen produciendo nuevas hojas por aproximadamente dos meses, una yema produce una raíz que al poco tiempo atraviesa el catáfilo. Esta raíz engruesa y se transforma en un tubérculo radical, el cual almacena sustancias constituyentes y energéticas. La mayoría de las especies de orquídeas se desarrolla entre los meses de marzo y mayo. Al florecer la orquídea es polinizada y se inicia el desarrollo de las semillas en el interior de los ovarios (Velasco & Beltrán, 2008).

1.5. Descripción de especies recolectas

1.5.1. *Oncidium aureum*

Etimología: del latín *aureus*: Dorado-amarillo, en referencia a la coloración del labio.

Descripción: *Oncidium aureum* (Figura 3), está ampliamente distribuida y con frecuencia forma grandes colonias. La especie es muy variable en forma y tamaño de sus pseudobulbos y hojas, así como el tamaño, la forma y el color de las flores. El labio siempre es amarillo, pero los sépalos y pétalos puede ser de color oliva-verde o teñido de color rojizo-púrpura. *Oncidium aureum* crece de

forma terrestre, sobre todo en la hierba en terrenos altos, frescos, lugares húmedos por la niebla después de los mediodías (Königer, 2005).



Figura 3. *Oncidium aureum*.

Fotografía: Mónica Cando y Verónica Cárdenas.

1.5.2. *Epidendrum secundum*

Etimología: del griego *epi*: sobre y *dendrom*: árbol, que hace referencia al hábitat usual de la mayoría de sus especies.

Descripción: las especies de este género pueden ser epífitas o terrestres. Existe alrededor de mil especies y se pueden encontrar en todo el continente Americano. Crecen en una amplia gama de hábitat, así como en una variedad de altitudes. *Epidendrum secundum* (Figura 4), forma densas matas, tallos frondosos de más de un metro de altura y sus hojas miden hasta 15 cm de largo. La inflorescencia mide de 1-2 cm de ancho, éstas varían de color verde amarillo a púrpura. La floración es durante todo el año, siendo más frecuente al final del verano (Richart, 2002).



Figura 4. *Epidendrum secundum*.

Fotografía: Mónica Cando y Verónica Cárdenas.

1.5.3. *Elleanthus oliganthus*

Etimología: Del griego *elle*: Helen y *anthos*: flor

Descripción: *Elleanthus oliganthus* (Figura 5), presenta tallos delgados, hojas fuertemente nervadas, flores pequeñas alrededor de 1.5 cm de ancho, los sépalos y pétalos libres, el labio sacciforme en la base (Pridgeon, 1992). Muchas de las especies son epífitas, pero algunas también pueden ser terrestres. La falta de pseudobulbos hace que la planta viva en los bosques húmedos a muy húmedos (Calaway & Escobar, 1998).



Figura 5. *Elleanthus oliganthus*.

Fotografía: Mónica Cando y Verónica Cárdenas.

1.5.4. *Trichoceros anteniferum*

Etimología: Del griego *tricho*: pelo y *cheilos*: labio

Descripción: *Trichoceros anteniferum* (Figura 6), se caracteriza por presentar rizomas alargados entre pseudobulbos con hojas planas y labio de tres lóbulos. Las flores alcanzan dos centímetros de diámetro. Los sépalos y pétalos son de color verde con rayas de color marrón rojizo, el labio es de color marrón rojizo y a menudo verdoso hacia el ápice. Los lóbulos laterales del labio son estrechos y alargados de color rojo-marrón (Calaway, 2003).



Figura 6. *Trichoceros anteniferum*.

Fotografía: Mónica Cando y Verónica Cárdenas.

1.5.5. *Pleurothallis* sp.

Etimología: Del griego *pleuron*: costilla y del *thallos*: lanzamiento

Descripción: Son epifitas o terrestres, crecen desde el nivel del mar hasta los 3.500 msnm. Se caracteriza por la falta de pseudobulbos, los tallos secundarios surgen de los rizomas y suelen tener una sola hoja que varía mucho en tamaño y apariencia. La inflorescencia es generalmente terminal y puede tener varias flores o una sola flor. La polinización se realiza por pequeñas moscas comúnmente de los géneros *Lycoria*, *Bradesia* o *Drosophila* (Calaway, 2003). En esta investigación se trabajó con *Pleurothallis angustipetala* (Figura 7) y *Pleurothallis gramínea* (Figura 8).

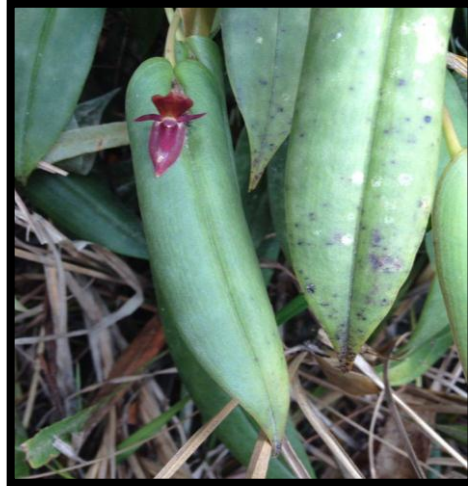


Figura 7. *Pleurothallis angustipetala*.

Fotografía: Mónica Cando y Verónica Cárdenas.



Figura 8. *Pleurothallis gramínea*.

Fotografía: Mónica Cando y Verónica Cárdenas

2. MICORRIZAS

2.1. Generalidades

Las micorrizas son asociaciones simbióticas mutualistas entre ciertos hongos del suelo y las raíces de una planta (Gómez *et al.*, 2007). En 1885, Frank propuso el término micorriza que significa “hongo-raíz”, para definir asociaciones simbióticas. Éstas asociaciones incluyen dos o más organismos que viven conjuntamente, que no son patógenos y que se encuentran entre raíces de plantas y micelios de hongos para beneficio mutuo (Nauray, 2013). En la actualidad, el concepto “micorriza” incluye también aquellas asociaciones simbióticas hongo-planta que no se establecen en raíces, sino en otros órganos de contacto especializados para el intercambio de nutrientes como las plantas aclorofílicas y en otras plantas inferiores carentes de verdaderas raíces (García, 2009).

2.2. Clases de micorrizas

Las micorrizas se clasifican en: micorrizas arbusculares (endomycorrizas) y sus formas derivadas, además ectomicorrizas y micorrizas de orquídeas. La forma más primitiva y la más frecuente son las micorrizas arbusculares (más del 60% de las especies vegetales) (Barriuso *et al.*, 2014).

La endomicorriza o micorriza arbuscular, está formada por zigomicetos que colonizan intracelularmente la corteza de la raíz, a través de estructuras especializadas denominadas arbuscúlos, que actúan como órganos de intercambio de nutrimentos entre la célula vegetal y el huésped (Gómez *et al.*, 2007). Existen dos tipos de endomicorrizas, el grupo más común se distingue por presentar hifas aseptadas, vesículas y estructuras ramificadas que le confieren el nombre de micorrizas vesículo-arbusculares. Aproximadamente 90% de las dicotiledóneas y la mayoría de las monocotiledóneas presentan este tipo de micorrizas (Córdova, 2003). El otro tipo de endomicorrizas, está constituido por hongos con hifas septadas, que invaden las células de la raíz sin romper la membrana plasmática y crecen dentro de la célula formando estructuras globosas conocidas como pelotones (Molina, 2012; Alomía, 2014).

Las hifas de las ectomicorrizas presentan una relación con el hongo puramente externa, en donde, el hongo no penetra en las células de la raíz pero forma una estructura llamada manto o vaina, la cual envuelve la raíz. Los hongos capaces de formar este tipo de asociación son *Basidiomycotina*, *Ascomycotina*, y raramente a los *Zygomycotina* (Etayo, 1998).

Las micorrizas de orquídeas son asociaciones que penetran las células de las raíces en ovillos de hifas (pelotones). Generalmente son *Basidiomycota* en alianza con el género *Rhizoctonia* (Barriuso *et al.*, 2014).

2.3. Beneficio de las micorrizas en el ecosistema

Las micorrizas se pueden encontrar en todos los ecosistemas terrestres. La presencia de ésta simbiosis garantiza la salud de la planta hospedera y la calidad del suelo (Vega, 2011).

Las micorrizas son de gran importancia para la estructura y conservación del suelo, mediante el efecto aglutinante de las hifas externas. Estas hifas crecen a través de la matriz del suelo, constituyendo una estructura a modo de red que sostiene a las partículas, favoreciendo a la formación de agregados (Mckendrick, 2000). Además, las hifas de los hongos formadores de micorrizas arbusculares pueden producir grandes cantidades de Glomalina. La Glomalina es una glicoproteína no soluble en agua, cuya función es ser estructuradora del suelo y que se forma a partir de un reservorio de carbono (Vega, 2011; Barriuso *et al.*, 2014).

Las hifas de los hongos micorrízicos aumentan la capacidad de absorción de la raíz, debido a que se extienden más allá de la zona rizosférica. De esta manera, se permite una mejor transferencia de agua y nutrientes tales como fósforo, nitrógeno, azufre, potasio, calcio, zinc, hierro, cobre y carbono (Camargo *et al.*, 2012).

De acuerdo a Silvera (2000), Córdova (2003) y Camargo *et al.* (2012), las micorrizas además de facilitarle a la planta la adquisición y absorción de agua y nutrientes proporciona otros beneficios como:

- La protección ante el ataque de parásitos, hongos patógenos y nemátodos.
- El aumento de su resistencia a la herbivoría.
- Influyen en la producción de sustancias defensivas por parte de la misma planta.
- Limitación de la absorción de metales pesados tóxicos como el zinc y el cadmio que son alojados en sus hifas.

2.4. Relación orquídea micorriza

Para la familia Orchidaceae, las micorrizas son un requerimiento fundamental, al menos en los primeros estadios de la planta, para el establecimiento en diferentes sustratos. En las semillas es determinante para iniciar los procesos de germinación, debido a que son extremadamente pequeñas (0,4 – 1,25 mm de largo y 0,08-0,27 mm de ancho), además contienen bajos niveles de proteínas, lípidos, azúcares y granos de almidón que no son suficientes para iniciar los procesos de germinación por sí solas (Ordoñez *et al.*, 2012).

El porcentaje de germinación de las semillas de orquídeas es muy bajo, sólo 10 o 15 semillas germinan de un total de un millón y una o dos lleguen a ser plantas adultas después de dos o tres años. La germinación de semillas de orquídeas no sólo depende de condiciones como el calor, humedad y aireación sino también de las micorrizas (Ordoñez *et al.*, 2016).

Todas las orquídeas requieren de hongos para la germinación de sus semillas. Estos hongos pertenecen a los Basidiomicetos del grupo de *Rhizoctonia*, que incluye hongos de los géneros *Thanatephorus*, *Ceratobasidium*, *Sebacina* y *Tulasnella* (Otero *et al.*, 2003). Ésta dependencia se asocia con las mínimas cantidades de nutrientes almacenados en las diminutas semillas de las orquídeas (Mosquera, 2010; McCormick & Jacquemyn, 2013).

En las células corticales de las raíces, el hongo origina una estructura denominada pelotón (Figura 9). Los pelotones son estructuras características de estas micorrizas y se encuentran ubicados en la corteza de las raíces. Son estructuras miceliales que ocupan el espacio intracelular causando el desplazamiento de los organelos (Mosquera, 2010).

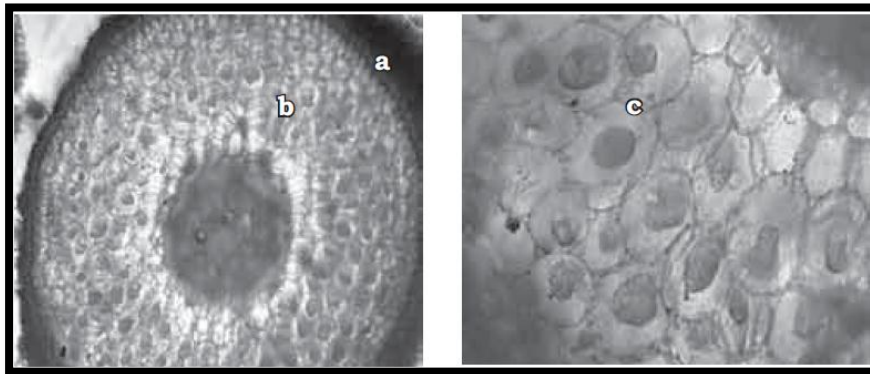


Figura 9. Corte transversal de la raíz de orquídeas. (a) Velamen, (b) córtex donde se observan los pelotones 40X, (c) pelotones.

Fuente: Mosquera, 2010.

Durante la lisis o digestión, la hifa se transforma en una estructura desorganizada y sus paredes empiezan a adelgazarse, formando una masa irregular, ayudando de esta manera a la transferencia de nutrientes. Todos estos procesos de colonización, lisis y transferencia de nutrientes producen el crecimiento vegetal permitiendo un suministro continuo de nutrientes (Ordoñez *et al.*, 2012).

2.5. Identificación de la forma - género *Rhizoctonia*

Rhizoctonia es un hongo fitopatógeno de distribución mundial que ocasiona pérdidas en la mayoría de las plantas anuales que se desarrollan dentro o sobre el suelo (Ordoñez *et al.*, 2012). Sin embargo, para la familia Orchidaceae es un agente formador de micorrizas, los hongos asociados a orquídeas presentan muy bajos índices de patogenicidad para el resto de los cultivos (Mosquera, 2010).

Una característica de clasificación para el género-forma *Rhizoctonia* es el número de núcleos en las células de hifas jóvenes, las mismas que pueden ser uni-, bi- o multinucleadas. La mayoría son binucleadas en su fase sexual (teleomorfo) en los géneros *Ceratobasidium* y *Tulasnella*, son menos frecuentes las multinucleadas cuyo teleomorfo se expresa en *Thanatephorus* (Mosquera, 2010).

El género-forma *Rhizoctonia* en su fase asexual (anamorfo) presenta un micelio estéril blanco en colonias jóvenes (1-10 días) y se torna amarillo o de color café claro en colonias de más de 20 días. En esta fase las células son largas y ramificadas, en ángulo recto con respecto a la hifa principal (Noval *et al.*, 1999). Sin embargo, el micelio generalmente no presenta caracteres diferenciales suficientes que permitan su identificación a nivel específico (Ordoñez *et al.*, 2012; Hoyos & Rodríguez, 2013).

El hongo produce ramilletes de células cortas y anchas de forma oval o triangular, denominadas células monilioides (Figura 10), de las cuales se pueden desarrollar pequeños esclerocios. La fase sexual (teleomorfo) que corresponde a *Rhizoctonia* incluye los géneros *Ceratobasidium*, *Tulasnella*, *Sebacina* y *Thanatephorus*, los cuales pueden diferenciarse por sus estructuras reproductivas conformadas por los basidiocarpos donde se producen las basidiosporas (Noval *et al.*, 1999; Mosquera, 2010).

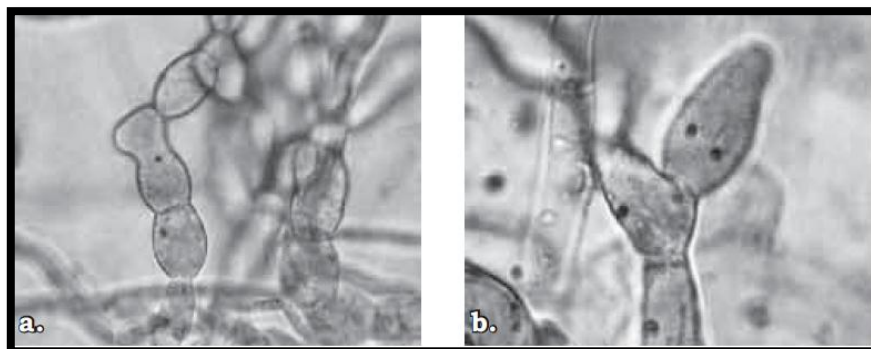


Figura 10. Células monilioides. (a) Células uninucleadas, (b) células binucleadas. Fuente: Mosquera, 2010.

3. Medios de Cultivo empleados.

3.1. Medio FIM (Fungi Isolation Medium)

El medio FIM (Anexo 2), es empleado para el aislamiento de hongos provenientes de las raíces de orquídeas. Contiene sales como nitrato de sodio, cloruro de potasio, fosfato ácido de potasio y sulfato de magnesio, todas éstas, junto al extracto de levadura son indispensables como estimuladores del crecimiento. La sacarosa es usada como fuente de energía. El medio también contiene estreptomicina usado como profilaxis contra la contaminación bacteriana. Los componentes usados en este medio proporcionan los nutrientes necesarios para que el hongo pueda crecer y ser aislado (Cajamarca, 2008; Mondino, 2009). El pH 6,8 acelera el crecimiento de los hongos (Pereira *et al.*, 2007)

3.2. Medio PDA (Agar Dextrosa-Papa)

El medio PDA (Anexo 3), es usado para el aislamiento, purificación y mantenimiento de colonias de hongos. Tiene la infusión de papa como fuente de almidón y la dextrosa que son la base para el crecimiento de hongos. El pH de 5,6 evita el crecimiento de las bacterias y es óptimo para el desarrollo de los hongos (Narrea, 2006; Mondino, 2009).

CAPÍTULO II

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Área de Estudio

El área de estudio está ubicada en la parroquia Remigio Crespo Toral (Gulag) en las orillas del Río San Francisco en el Cantón Gualaceo, provincia del Azuay a una altura de 2.525 msnm (Figura 11). Los puntos de recolección de las especies de orquídeas fueron georreferenciadas (UTM X: 751252; Y: 9678654, Zona 17M) (Figura 11), siendo estas especies: *Pleurothallis angustipetala*, *Elleanthus oliganthus*, *Trichoceros anteniferum*, *Oncidium aureum*, *Pleurothallis gramínea*, *Epidendrum secundum* (Anexo 1).

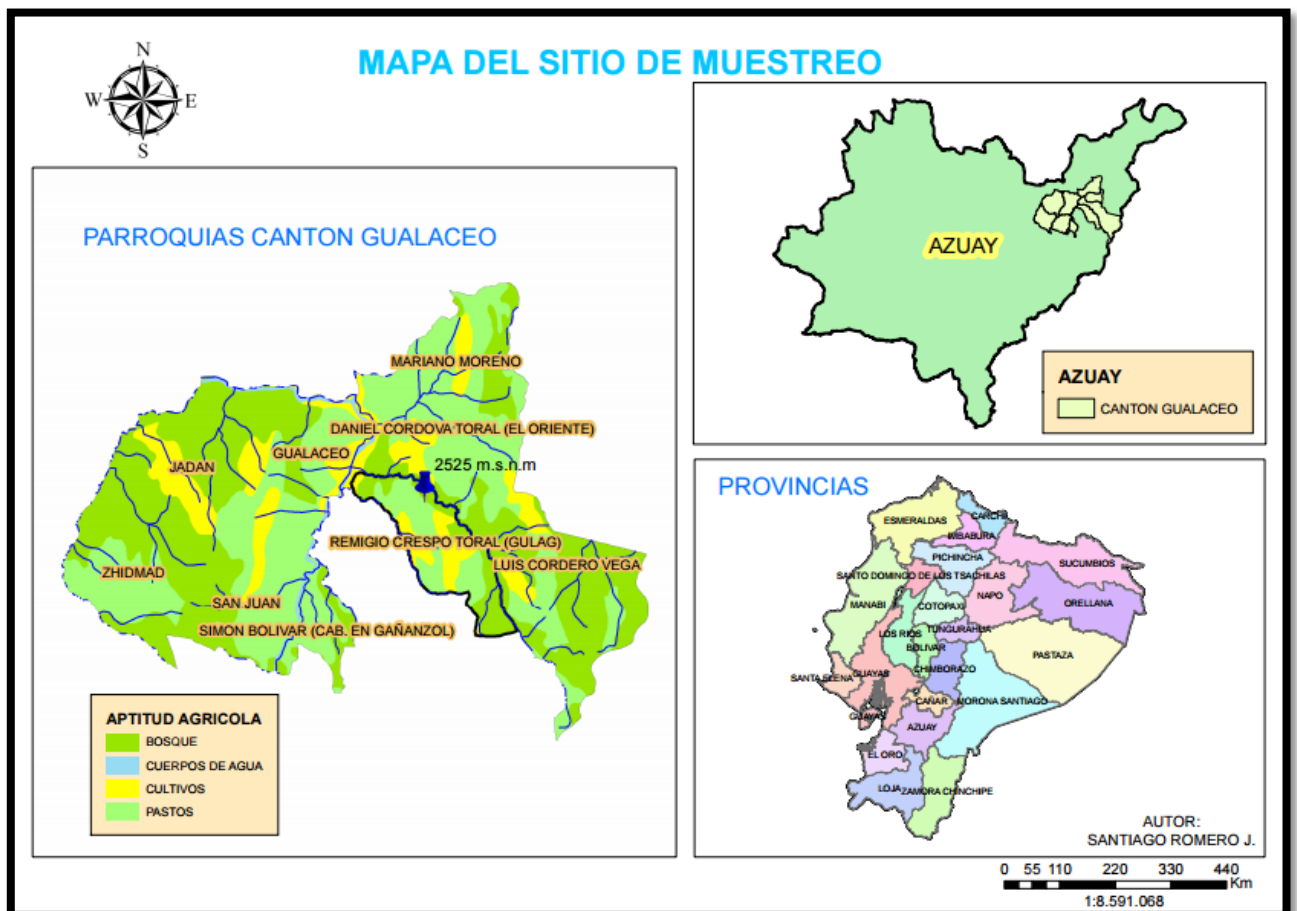


Figura 11. Mapa del sitio del muestreo.

Elaborado por: Santiago Romero J.

4.2. Métodos




Para la investigación se emplearon métodos de recolección de raíces, siembra, y aislamiento de hongos propuestos por Zettler *et al*, (2013). Se estudiaron fragmentos de raíces de seis especies nativas diferentes de orquídeas terrestres. El tamaño de la muestra correspondió a 10 fragmentos de raíces de una longitud de 5 -10 cm por especie. Se trabajó por duplicado, obteniendo un número total de 120 fragmentos de raíces. Esta investigación es un trabajo de tipo experimental.

4.2.1. Recolección de raíces de orquídeas terrestres

Las recolecciones de las raíces se realizaron en los meses de julio y agosto del 2016. Las especies estudiadas se indican en el apartado 4.1. Se seleccionaron raíces de color amarillento u opaco característico de raíces jóvenes, para poder encontrar la mayor cantidad de pelotones de hongos micorrízicos (Zhu *et al.*, 2008; Zettler *et al.*, 2013). Se retiró la tierra alrededor de la planta hasta dejar expuestas las raíces, las cuales se cortaron utilizando un bisturí. Las muestras recolectadas fueron etiquetadas con su nombre científico o nombre tradicional. Éstas fueron trasladadas al laboratorio para ser procesadas. En la tabla 1 se pueden observar los pasos descritos.

Tabla 1. Recolección de las raíces.

<p>Paso 1 : Cavar alrededor de las raíces de la planta de orquídeas.</p>	
--	--

<p>Paso 2: Selección y medición de la raíz.</p>	
<p>Paso 3: Con un bisturí proceder a cortar.</p>	
<p>Paso 4: Etiquetar y Llevar al laboratorio para su análisis posterior.</p>	

Elaborado por: Mónica Cando y Verónica Cárdenas.

4.2.2. Preparación de las raíces y aislamiento del hongo en el medio FIM.

Para la desinfección de las raíces se procedió a lavarlas con agua corriente, luego se sumergieron por diez minutos en una solución preparada con 5ml de cloro más 5 ml de alcohol al 85% en 90 ml de agua. Finalmente, se transfirieron las raíces lavadas y desinfectadas a una caja Petri estéril.

En la cámara de flujo laminar y con un bisturí se dividió a la raíz en tres partes, parte inicial más próxima a los bulbos (A), media (B), y final (C) (Figura 12), cada una de ellas con un centímetro de longitud. Los fragmentos fueron colocados en diferentes cajas Petri estériles.

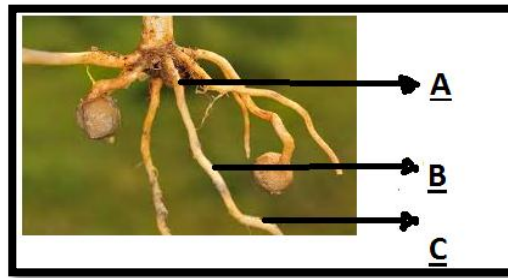




Figura 12. Fragmentos de la raíz.



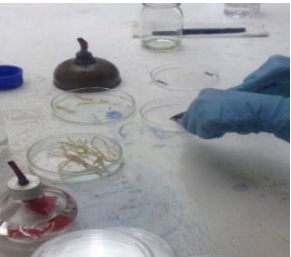

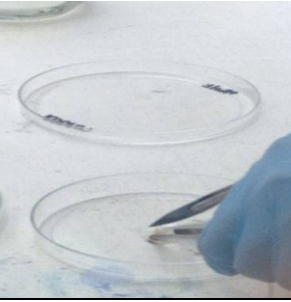

En cada caja Petri se colocó una gota de agua estéril, en donde se picó la raíz con un bisturí en fracciones muy pequeñas, con el objetivo de exponer los pelotones presentes.

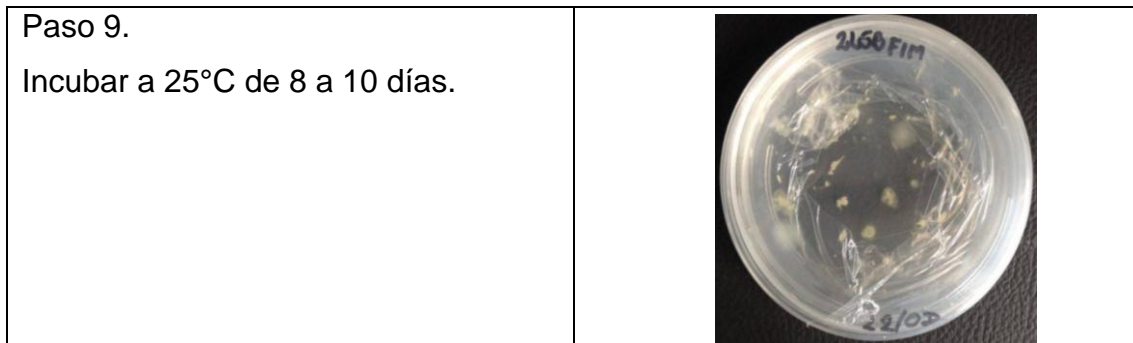
Fuente: Gamarra, 2014.

En cada una de las cajas con las raíces picadas se vertió el Medio FIM. Se incubó a 25°C de ocho a diez días. Tanto la preparación de las raíces como su posterior cultivo en medio FIM, deben realizarse el mismo día. Este procedimiento se puede observar en la tabla 2.

Tabla 2. Preparación de las raíces y aislamiento del hongo en el medio FIM.

<p>Paso 1. Lavar las raíces en agua corriente.</p>	
<p>Paso 2. Preparar solución con 5ml de cloro más 5 ml de alcohol al 85% en 90 ml de agua, y dejar a las raíces por 10 min.</p>	

<p>Paso 3. Transferir a una caja Petri las raíces lavadas y desinfectadas.</p>	
<p>Paso 4. Preparación de la cámara de flujo.</p>	
<p>Paso 5. Con un bisturí cortar la raíz en fragmentos de 1 cm y colocar cada fragmento en una caja diferente.</p>	
<p>Paso 6. Colocar una gota de agua estéril.</p>	
<p>Paso 7. Picar la raíz con un bisturí en fracciones muy pequeñas.</p>	
<p>Paso 8. Verter directamente el medio FIM.</p>	



Elaborado por: Mónica Cando y Verónica Cárdenas.

Para el etiquetado de las cajas sembradas se asignó códigos que correspondieron: el número uno para las cajas con la muestra y el número dos para las cajas que contenían la repetición; la inicial del nombre científico de la orquídea o su denominación tradicional; el número de raíz recolectada (como se colectaron 10 raíces por especie, se les asignaron números del 1-10) y al fragmento de la raíz utilizada (A, B ó C), como se observa en la tabla 3.

Tabla 3. Ejemplo del código (2M10A).

Código	Denominación
2	Repetición
M	<i>Trichoceros anteniferum</i>
10	Número de raíz recolectada
A	Fragmento de la raíz utilizada

Elaborado por: Mónica Cando y Verónica Cárdenas.

La revisión de los cultivos fue periódica y se realizó un registro escrito y fotográfico. Para el análisis de los resultados en medio FIM se consideraron tres categorías: 1) cajas con colonias para el replante en medio PDA, seleccionadas según características de color de las colonias revisadas en la literatura; 2) cajas con colonias contaminadas por levaduras y 3) cajas sin crecimiento.


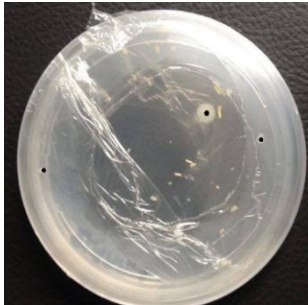

4.2.3. Observación de pelotones.



Después de aproximadamente cuatro días de incubación, se procedió a la observación de pelotones de cada una de las cajas sembradas en medio FIM, a través del lente de 10x del microscopio óptico. Ver Anexo 4.

4.2.4. Aislamiento de los hongos en medio PDA (Agar Dextrosa-Papa).

Después de ocho a diez días de incubación se observó macroscópicamente el crecimiento de colonias en medio FIM. Las colonias que tuvieron un crecimiento adecuado fueron repicadas en medio PDA para su mantenimiento. Las cajas se etiquetaron de la manera anteriormente descrita y se incubaron a 25°C por cuatro a seis días aproximadamente. Este proceso se observa en la tabla 4.

Tabla 2. Aislamiento de los hongos en medio PDA.

<p>Paso 1. Observación macroscópica de crecimiento en cajas con medio FIM.</p>	
<p>Paso 2. Señalar las colonias que se replantó.</p>	
<p>Paso 3. Cortar un fragmento de colonia aproximadamente de 1mm x 1mm con un bisturí.</p>	

<p>Paso 4. Colocar dicho pedazo en medio PDA.</p>	
<p>Paso 5. Etiquetar e incubar de cuatro a seis días a 25°C.</p>	

Elaborado por: Mónica Cando y Verónica Cárdenas.


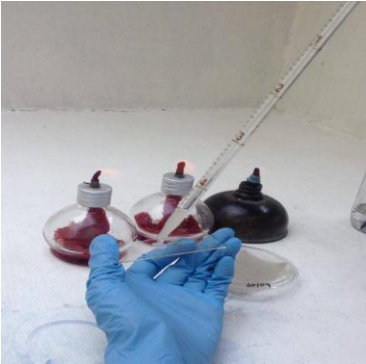


Para el análisis de los resultados en medio PDA se consideraron tres categorías: 1) cajas seleccionadas para el microcultivo por cumplir con dichas características (colonias blancas cremosas en medio PDA); 2) cajas con colonias contaminadas por levaduras y 3) cajas descartadas debido a que el color de las colonias no correspondieron a las características revisadas en la literatura (Zettler *et al.*, 2013).

4.2.5. Microcultivo

Para el microcultivo se seleccionaron colonias en medio PDA, con revisión previa en la literatura (Zettler *et al.*, 2013). Se colocaron tres gotas de medio PDA en una lámina portaobjetos, para luego sembrar la colonia seleccionada y cubrirla con una lámina cubreobjetos. Este cultivo se colocó en una caja Petri, sobre papel humedecido, previamente tratado con luz UV. Se incubó a 25°C alrededor de ocho días, con revisión periódica. Este procedimiento se puede observar en la tabla 5.

Para este análisis se clasificaron cajas basándose en: 1) la especie de la orquídea; 2) fragmento analizado y 3) color de la colonia, tomando una caja de cada grupo, obteniendo un total de ocho cajas para realizar el microcultivo, como se puede observar en la sección de resultados.

Tabla 3. Procedimiento para el Microcultivo.

<p>Paso 1. En el fondo de una caja Petri colocar un pedazo de papel filtro humedecido con agua estéril.</p>	
<p>Paso 2. Con ayuda de una pipeta colocar 3 gotas del medio PDA en porta objetos. Dejar solidificar.</p>	
<p>Paso 3 Sembrar el hongo seleccionado y colocar un cubre objetos.</p>	
<p>Paso 4. Dejar incubar a 25 °C.</p>	



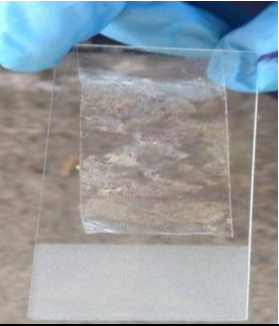
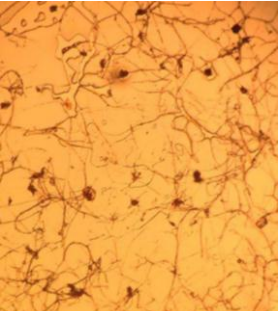
Elaborado por: Mónica Cando y Verónica Cárdenas.

4.2.6. Prueba de identificación de los hongos descartados.

Esta prueba fue realizada para confirmar que las cajas con colonias descartadas (categoría 2), no se trataban de hongos potencialmente

micorrízicos. Las colonias que tuvieron características macroscópicas semejantes se agruparon y de ellas se tomó una muestra para la identificación. Con un pedazo de cinta adhesiva se extrajo una muestra superficial de micelio, la misma que se colocó sobre una lámina portaobjetos y se observó al microscopio con el lente de 40x. El procedimiento se observa en la tabla 6.

Tabla 4. Procedimiento para la identificación de hongos descartados.

<p>Paso 1. Tomar una caja descartada.</p>	 A petri dish containing a brownish, textured fungal colony on a solid medium. The dish has handwritten text: "PDA - 20/07/16" and "ESA".
<p>Paso 2. Presionar un pedazo de cinta en la colonia.</p>	 A person wearing blue nitrile gloves is pressing a piece of clear adhesive tape onto the surface of the fungal colony in the petri dish.
<p>Paso 3. Pegar la cinta en una lámina portaobjetos.</p>	 The piece of clear adhesive tape, now containing a small amount of the fungal material, is being held by the gloved hand over a clear glass microscope slide.
<p>Paso 4. Observar al microscopio con lente de 40x.</p>	 A microscopic view showing a dense network of thin, brown, branching hyphae against a light orange background.

Elaborado por: Mónica Cando y Verónica Cárdenas.

CAPITULO III

5. Resultados

5.1. Resultados de la siembra en medio FIM

En medio FIM se obtuvo un total de 360 cajas sembradas, correspondiendo a 60 cajas por especie (20 cajas del fragmento A, 20 cajas del B y 20 cajas del C). Estos resultados se pueden observar en la tabla 7.

Pleurothallis angustipetala: 41 cajas con colonias para ser replantadas en medio PDA, 12 correspondieron al fragmento A, 15 al fragmento B y 14 al fragmento C.

Elleanthus oliganthus: 41 cajas para ser replantadas en medio PDA, 11 fueron del fragmento A, 15 del fragmento B y 15 del fragmento C.

Trichoceros anteniferum: 40 cajas, 16 pertenecientes al fragmento A, 11 al fragmento B y 13 al fragmento C.

Oncidium aureum: 34 cajas, 10 fragmentos del A y B, respectivamente y 14 del fragmento C.

Pleurothallis gramínea: 43 cajas, con 15 fragmentos del A y B, respectivamente y 13 del fragmento C.

Epidendrum secundum: 46 cajas, 12 correspondieron al fragmento A, 18 al fragmento B y 16 al fragmento C.

Tabla 5. Resultados de siembra en medio FIM.

Nombre de la especie / Fragmento	Número de fragmentos de raíz sembrados en medio FIM	Número de cajas sin crecimiento	Número de cajas con colonias contaminadas	Número de cajas con colonias replantadas en medio PDA
<i>Pleurothallis angustipetala</i>				
Fragmento A	20	4	4	12
Fragmento B	20	3	2	15
Fragmento C	20	2	4	14
<i>Elleanthus oliganthus</i>				
Fragmento A	20	0	9	11
Fragmento B	20	1	4	15
Fragmento C	20	1	4	15
<i>Trichoceros anteniferum</i>				
Fragmento A	20	2	2	16
Fragmento B	20	1	8	11
Fragmento C	20	2	5	13
<i>Oncidium aureum</i>				
Fragmento A	20	1	9	10
Fragmento B	20	2	8	10
Fragmento C	20	1	5	14
<i>Pleurothallis gramínea</i>				
Fragmento A	20	4	1	15
Fragmento B	20	3	2	15
Fragmento C	20	3	4	13
<i>Epidendrum secundum</i>				
Fragmento A	20	3	5	12
Fragmento B	20	1	1	18
Fragmento C	20	4	0	16

Elaborado por: Mónica Cando y Verónica Cárdenas.

5.1.1. Resultados de crecimiento de los fragmentos (A, B y C) de las raíces de las seis especies de orquídeas en medio FIM.

Con respecto al número total de fragmentos (n=360) de las seis especies de orquídeas: las cajas seleccionadas para el replante en medio PDA constituyeron en promedio alrededor del 68% del total de los fragmentos sembrados. El fragmento C presentó el mayor porcentaje (71%), el fragmento B (70%) y el fragmento A el menor porcentaje (63%). Todas las especies de orquídeas presentaron cajas con colonias que se replantaron a medio PDA en un porcentaje mayor al 50%.

Todas las cajas con cultivos contaminados por levaduras representaron en promedio alrededor del 21%, en donde el fragmento A presentó el mayor porcentaje de contaminación (25%), el fragmento B (21%) y el fragmento C el menor porcentaje (18%).

Las cajas sin crecimiento presentaron en promedio alrededor del 11% del total de fragmentos sembrados (fragmento A 12%, el fragmento C 11% y el fragmento B 9%). Todos estos resultados se observan en la Figura 13.

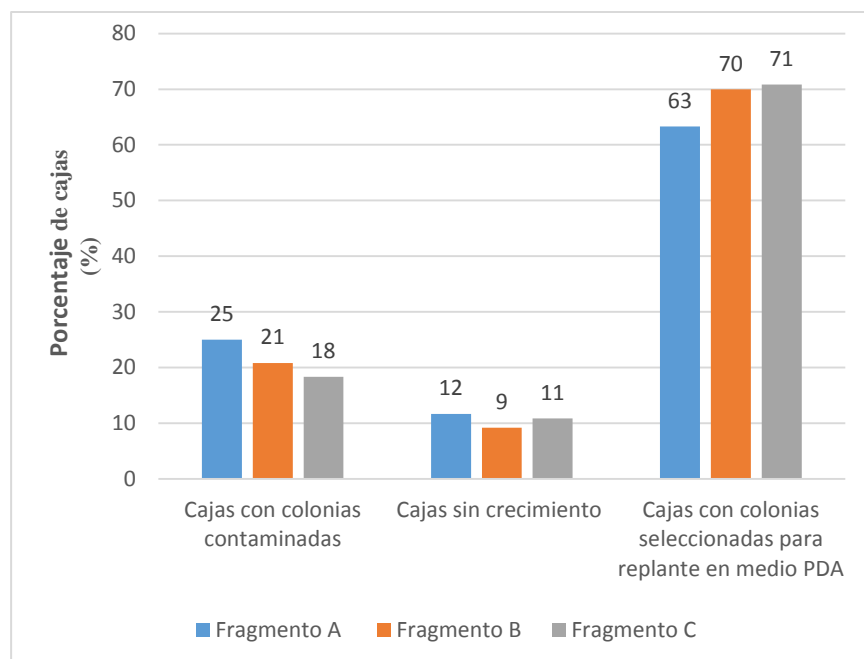


Figura 13. Porcentaje de fragmentos totales sembrados en medio FIM y sus resultados. Elaborado por: Mónica Cando y Verónica Cárdenas.

5.1.2. Resultados de crecimiento de las raíces de las seis especies de orquídeas en medio FIM.

En la Figura 14 se observa los resultados que abarcan los tres fragmentos de cada especie.

De las seis especies de orquídeas analizadas, la especie *Epidendrum secundum* obtuvo el mayor porcentaje de cajas con colonias seleccionadas para el replante en medio PDA (77%) y *Oncidium aureum* el menor porcentaje (57%).

Oncidium aureum presentó el mayor porcentaje de contaminación (37%), mientras que *Epidendrum secundum* el menor porcentaje (10%). El contaminante de las seis especies fueron las levaduras.

Pleurothallis gramínea presentó el mayor porcentaje de cajas sin crecimiento (17%) y *Elleanthus oliganthus* el menor porcentaje (3%).

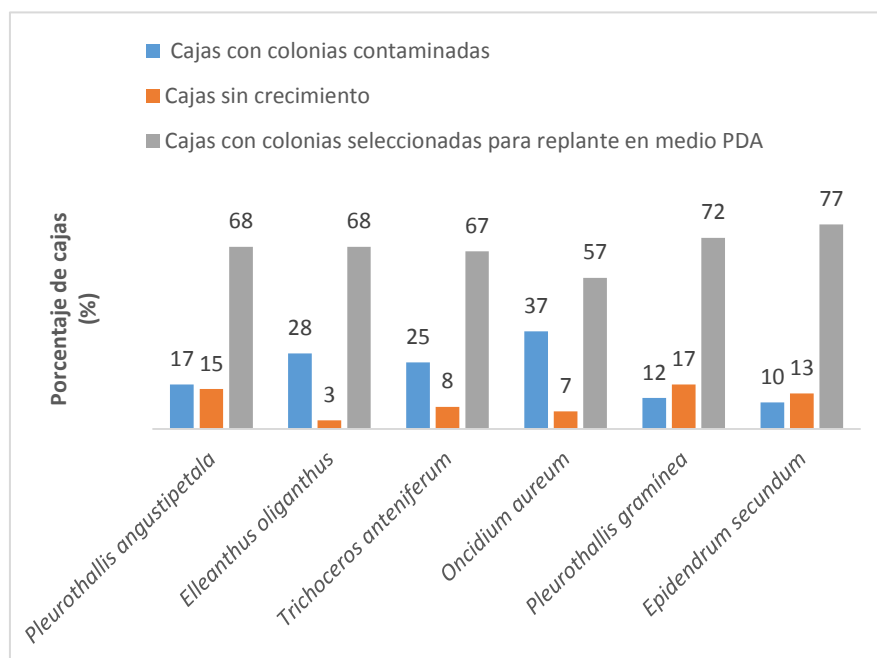


Figura 14. Porcentaje de crecimiento de colonias aisladas de las seis especies de orquídeas en medio de cultivo FIM.

Realizado por: Mónica Cando y Verónica Cárdenas.

5.2. Resultados del replante en medio PDA.

En medio PDA se trabajó con un total de 245 (68%) cajas seleccionadas, estos resultados se observan en la tabla 8.

De la especie *Pleurothallis angustipetala*, se obtuvieron cuatro cajas con colonias seleccionadas para microcultivo de las cuales una perteneció al fragmento A, dos al fragmento B y una del fragmento C. En la especie *Elleanthus oliganthus* se obtuvo una caja seleccionada para microcultivo que correspondió al fragmento C. *Trichoceros anteniferum* presentó dos cajas, una al fragmento B y una al fragmento C. *Oncidium aureum* tuvo una caja perteneciente al fragmento C. *Pleurothallis gramínea* con seis cajas, una del fragmento A, dos del fragmento B y tres del fragmento C. *Epidendrum secundum* presentó seis cajas, dos al fragmento B y cuatro al fragmento C.

Tabla 6. Resultados de replante en medio PDA.

Nombre de la especie / Fragmentos	Número de colonias sembrados en medio PDA	Número de cajas con colonias contaminadas	Número de cajas descartadas	Número de cajas con colonias seleccionadas para microcultivo
<i>Pleurothallis angustipetala</i>				
Fragmento A	12	2	9	1
Fragmento B	15	3	10	2
Fragmento C	14	4	9	1
<i>Elleanthus oliganthus</i>				
Fragmento A	11	3	8	0
Fragmento B	15	1	14	0
Fragmento C	15	1	13	1
<i>Trichoceros anteniferum</i>				
Fragmento A	16	5	11	0
Fragmento B	11	2	8	1
Fragmento C	13	4	8	1
<i>Oncidium aureum</i>				
Fragmento A	10	3	7	0
Fragmento B	10	2	8	0
Fragmento C	14	4	9	1
<i>Pleurothallis gramínea</i>				
Fragmento A	15	4	10	1
Fragmento B	15	1	12	2
Fragmento C	13	1	9	3
<i>Epidendrum secundum</i>				
Fragmento A	12	4	8	0
Fragmento B	18	6	10	2
Fragmento C	16	4	8	4

Elaborado por: Mónica Cando y Verónica Cárdenas.

5.2.1. Resultados de crecimiento de los fragmentos (A, B y C) de las raíces de las seis especies de orquídeas en medio PDA.

Con respecto al número total de cajas con colonias replantadas (n=245) (68%), las cajas con colonias seleccionadas para el microcultivo se encuentran en promedio alrededor del 8% (A=3%, B= 8% y C=13%).

Todas las cajas con colonias contaminadas por levaduras presentaron un porcentaje similar entre sí, con un promedio del 22% (A=27%, B= 18% y C=21%).

Las cajas descartadas representaron en promedio del 70% (A=70%, B= 74% y C=66%) del total de fragmentos de las seis especies de orquídeas. Todos estos resultados se pueden observar en la Figura 15.

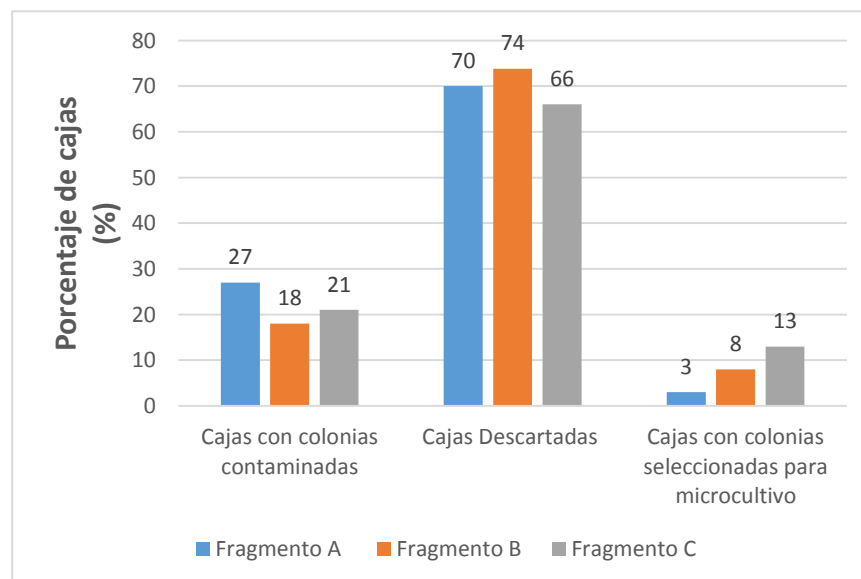


Figura 15. Porcentaje de fragmentos totales sembrados en medio PDA y sus resultados.

Elaborado por: Mónica Cando y Verónica Cárdenas.

5.2.2. Resultados de crecimiento de las raíces de las seis especies de orquídeas en medio PDA.

En la Figura 16 se observa de manera global los resultados que incluyen los tres fragmentos de cada especie.

De las seis especies de orquídeas analizadas, las especies *Elleanthus oliganthus* y *Oncidium aureum* obtuvieron el menor porcentaje de cajas con colonias seleccionadas para el microcultivo (3%).

Epidendrum secundum tuvo el mayor porcentaje de contaminación (30%), mientras que *Elleanthus oliganthus* el menor porcentaje (12%), siendo el contaminante de las seis especies las levaduras.

Elleanthus oliganthus presentó el mayor porcentaje de cajas descartadas (85%), en cambio *Epidendrum secundum* el menor porcentaje (57%).

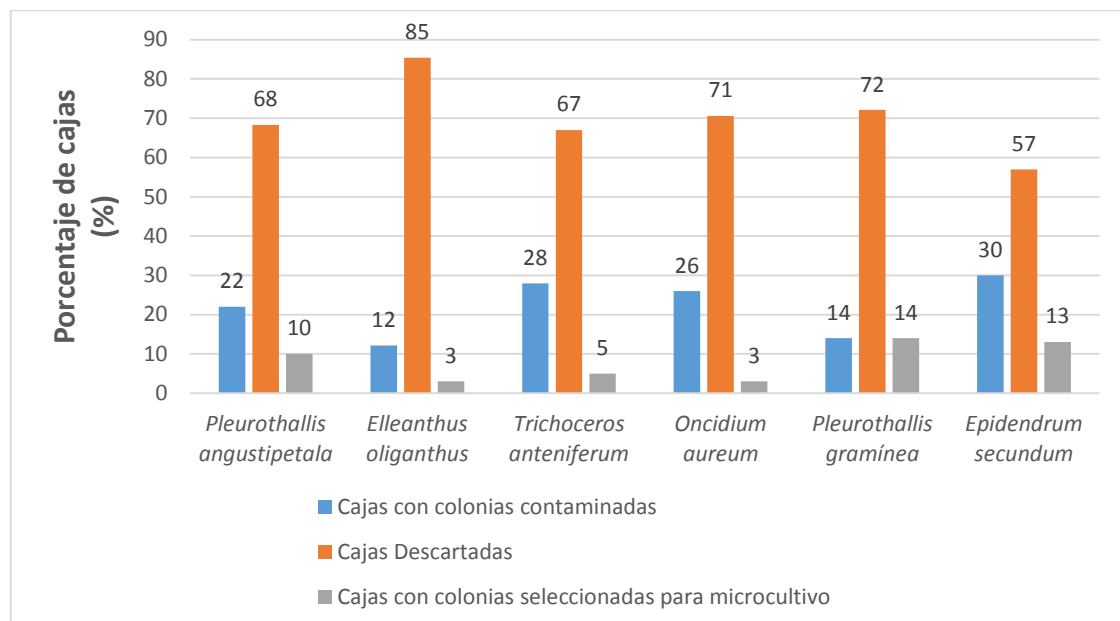


Figura 16. Porcentaje de colonias aisladas en medio PDA de las seis especies de orquídeas.

Elaborado por: Mónica Cando y Verónica Cárdenas.

5.2.3. Resultados de crecimiento de los fragmentos (A, B, C) seleccionados para la prueba de microcultivo.

Del total de cajas con colonias seleccionadas para el microcultivo (n=20) (8%), el fragmento C con 11 cajas presentó el mayor porcentaje (55%). El fragmento B con 7 cajas (35%) y el fragmento A con dos cajas el menor porcentaje (10%). Estos resultados se observan en la Figura 17.

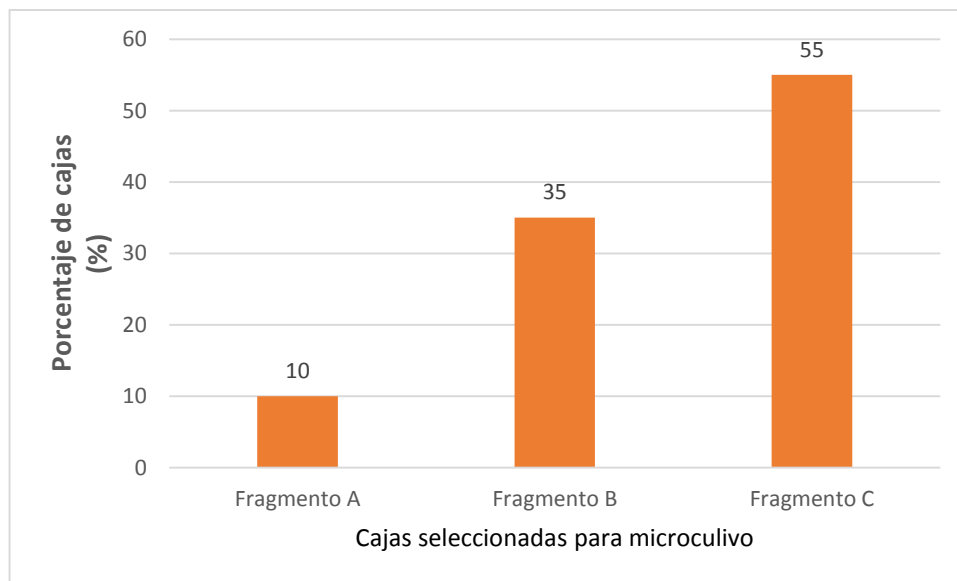


Figura 17. Porcentaje de fragmentos (A, B, C) seleccionados para microcultivo.

Elaborado por: Mónica Cando y Verónica Cárdenas.

5.2.4. Resultados de las colonias seleccionadas para microcultivo de las seis especies de orquideas.

En la Figura 18 se puede observar los resultados de crecimiento de las colonias seleccionadas para micricultivo que incluye los tres fragmentos sembrados:

De las cajas con colonias seleccionadas para el microcultivo (n=20) (8%), las especies que presentaron mayor porcentaje de crecimiento fueron: *Epidendrum secundum* con seis cajas (30%), *Pleurothallis angustipetala*, con cuatro cajas (20%) y *Pleurothallis gramínea* con seis cajas (30 %).

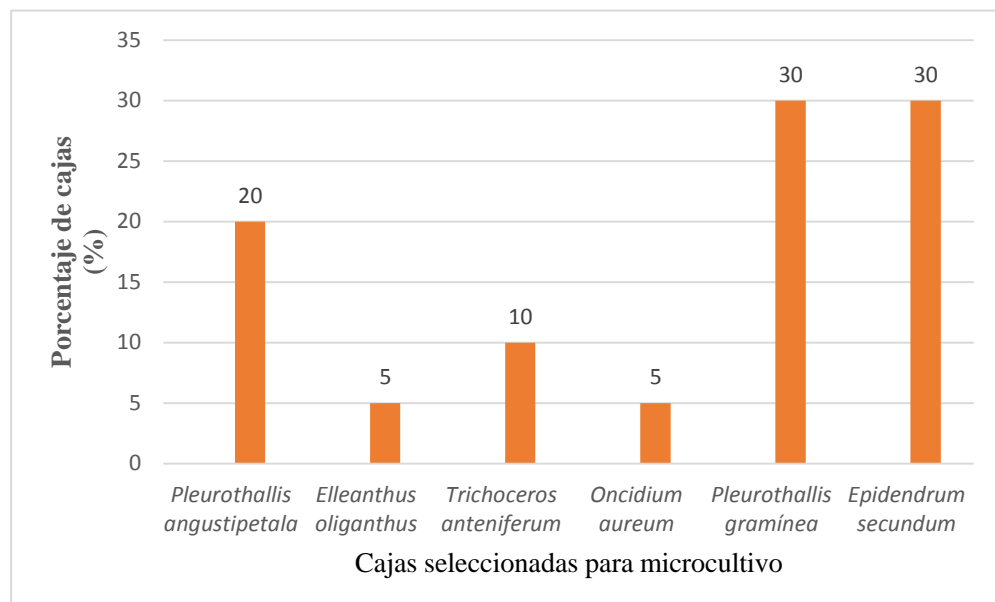



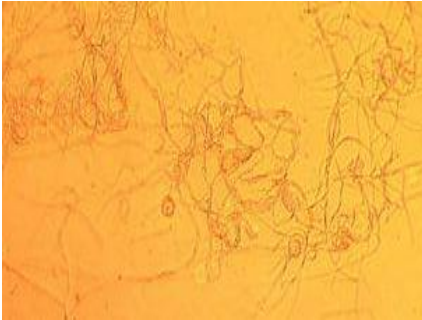

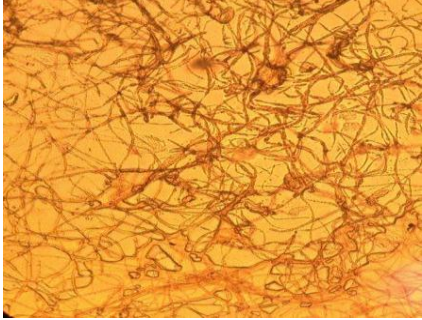
Figura 18. Porcentaje de cajas seleccionadas para microcultivo de cada especie.

Elaborado por: Mónica Cando y Verónica Cárdenas.

5.3. Resultados de la prueba de identificación de las colonias con hongos descartadas.

En la tabla 9 se especifica los resultados de la probable identificación micro y macroscópica de los hongos descartados que se basó en Gilman (1963). A Las colonias de hongos no identificadas se les designó como microbiota del suelo, debido a que las especies de orquídeas recolectadas fueron terrestres.

Tabla 7. Identificación macroscópica y microscópica de los hongos descartados.

Colonias descartadas	Observación microscópica 40x.	Probable identificación del hongo.
		<i>Nigrospora</i> sp. (Pioli, 2015).
		Género no identificado Microbiota del suelo.



		<p><i>Mucor</i> sp.</p>
		<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
		<p><i>Aspergillus</i> sp.</p>
		<p><i>Penicillium</i> sp.</p>



		Género no identificado Microbiota del suelo.
--	--	---

Elaborado por: Mónica Cando y Verónica Cárdenas.

5.4. Resultados del Microcultivo

Para la prueba de microcultivo se clasificaron las cajas con colonias seleccionadas en grupos, los mismos que se pueden observar en la tabla 10.


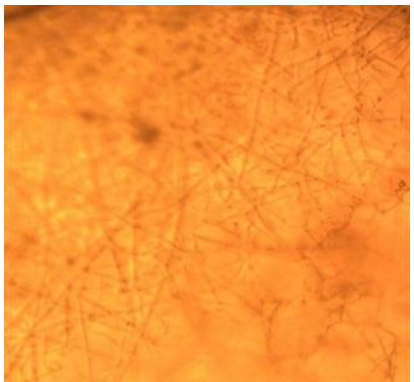
Tabla 8. Colonias seleccionadas para el microcultivo.

Especie de la orquídea	Códigos	Cajas con colonias seleccionadas para el microcultivo	Cajas con colonias potencialmente micorrizicas
<i>Trichoceros anteniferum</i>	1M10C, 1M7B	1M7B	1M7B
<i>Epidendrum secundum</i>	1L4C, 1L6C, 2L2C, 1L2C, 1L10B, 1L7B.	1L10B, 1L7B	1L7B
<i>Elleanthus oliganthus</i>	2E5C	2E5C	2E5C
<i>Pleurothallis angustipetala.</i>	1P2C, 2P3B, 2P7A, 2P7B.	1P2C, 2P3B	1P2C
<i>Pleurothallis gramínea</i>	1PG2C, 1PG4C, 1PG5C, 1PG7A, 1PG8B, 1PG4B.	1PG4C	1PG4C
<i>Oncidium aureum</i>	1U5C	1U5C	1U5C

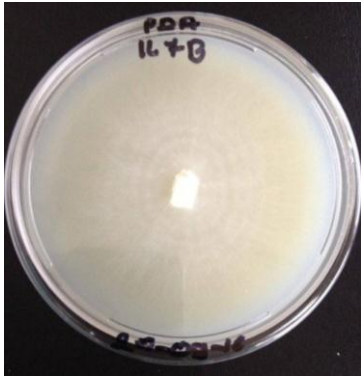

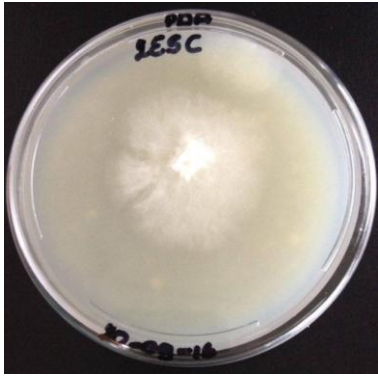
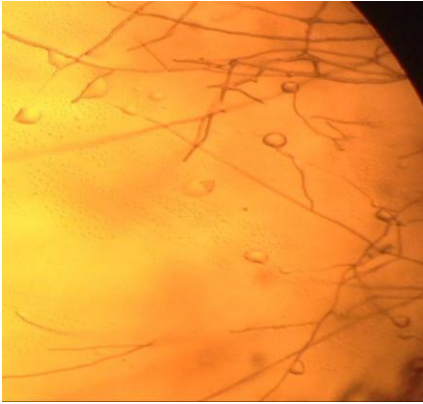
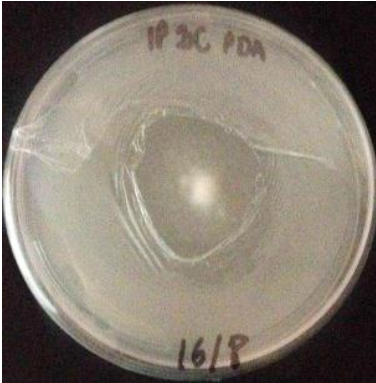

Elaborado por: Mónica Cando y Verónica Cárdenas

Se pidió la colaboración del Dr. Lawrence W. Zettler un experto en el campo de micorrizas del Illinois College en Estados Unidos, quien identificó micro y macroscópicamente las cajas con colonias que pueden ser potencialmente micorrízicas. De las ocho cajas analizadas, seis cajas fueron identificadas como *Tulasnella*, mientras que dos cajas fueron descartadas (*Pleurothallis angustipetala*: 2P3B; *Epidendrum secundum*: 1L10B), debido a que sus características microscópicas no correspondieron al género *Rhizoctonia* siendo posiblemente *Pestalotia* sp. Todos estos resultados se pueden observar en la tabla 11.

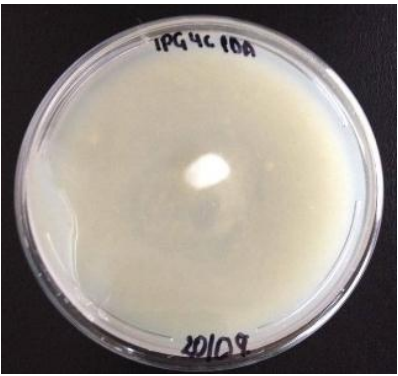

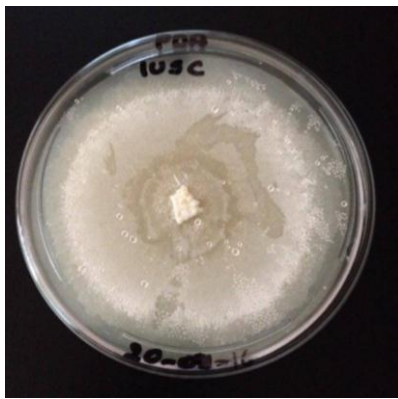
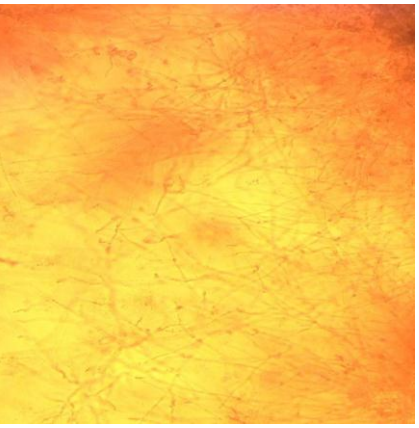


Tabla 9. Resultados de la observación macroscópica y microscópica de las colonias seleccionadas en medio PDA.

Nombre de la orquidea / Código	Foto de la colonia	Foto del microcultivo 40x	Características
<i>Trichoceros anteniferum</i> Código: 1M7B			Macroscópica: Colonia grande blanca algodonosa. Microscópica: Hifas septadas con ángulos de 90°. Género probable: <i>Tulasnella</i> sp.





<p><i>Epidendrum secundum</i> Código: 1L7B</p>			<p>Macroscopica: Colonia grande blanca cremosa con borde definido.</p> <p>Microscopica: Hifas septadas con ángulos de 45°. Género probable: <i>Tulasnella</i> sp.</p>
<p><i>Elleanthus oliganthus</i> Código: 2E5C</p>			<p>Macroscopica: Colonia grande blanca algodosa con borde definido.</p> <p>Microscopica: Hifas con ángulos de 45°. Género probable: <i>Tulasnella</i> sp.</p>
<p><i>Pleurothallis angustipetala</i> Código: 1P2C</p>			<p>Macroscopica: Colonia pequeña blanca algodosa</p> <p>Microscopica: Hifas septadas con ángulos de 45°. Género probable: <i>Tulasnella</i> sp.</p>



<p><i>Pleurothallis</i> <i>gramínea</i> Código: 1PG4C</p>			<p>Macroscópica: Colonia pequeña blanca algodosa</p> <p>Microscópica: Hifas septadas con ángulos de 45°.</p> <p>Género probable: <i>Tulasnella</i> sp.</p>
<p><i>Oncidium</i> <i>aureum</i> Código: 1U5C</p>			<p>Macroscópica: Colonia pequeña blanca algodosa</p> <p>Microscópica: Hifas septadas con ángulos de 45°.</p> <p>Género probable: <i>Tulasnella</i> sp.</p>
<p><i>Pleurothallis</i> <i>angustipetala</i> Código: 2P3B</p>			<p>Macroscópica: Colonia grande blanca algodosa en forma de roseta, con bordes definidos.</p> <p>Microscópica: Hifas hialinas, septadas, ramificadas (Lezcano, 2010).</p> <p>Género probable: <i>Pestalotia</i> sp.</p>



<p><i>Epidendrum secundum</i> Código:1L10 B</p>			<p>Macroscópica: Colonia grande blanca algodosa en forma de roseta, con bordes definidos.</p> <p>Microscópica: Hifas hialinas, septadas, ramificadas (Lezcano, 2010).</p> <p>Género probable: <i>Pestalotia sp.</i></p>
---	---	--	--

Elaborado por: Mónica Cando y Verónica Cárdenas.

6. Discusiones

En este proyecto de titulación se trabajó con raíces jóvenes de orquídeas, encontrándose seis hongos potencialmente micorrízicos de las especies recolectadas. Estudios han demostrado una mayor proporción de hongos micorrízicos en este tipo de raíces (Zhu *et al.*, 2008; Zettler *et al.*, 2013), siendo éstas adecuadas para aislar hongos micorrízicos.

Las raíces de orquídeas fueron recolectadas en el cantón Gualaceo, provincia del Azuay a 2.525 msnm. En este piso altitudinal están la mayoría de orquídeas endémicas del Ecuador (Endara, 2009), sin embargo no se ha podido confirmar si existe una posible relación entre el nivel altitudinal y la presencia de hongos micorrízicos (Guzmán & Moreno, 2014).

Mediante revisión bibliográfica se comparó las características de las colonias pertenecientes al género *Rhizoctonia* con nuestras colonias. Además, de aislar hongos potencialmente micorrízicos se encontraron varios tipos de hongos perteneciente a la microbiota de suelo debido a que se trataron de orquídeas terrestres, como es el caso de *Penicillium sp.*, *Mucor sp.*, *Aspergillus sp.* Estos

resultados coincidieron con el estudio de Zettler *et al.* (2013), quienes a más de aislar *Tulasnella irregularis* de las raíces de la especie *Encyclia tampensis*, identificaron también una diversidad de hongos endofíticos, la mayoría de las cuales fueron posteriormente identificados como saprofitos comunes (*Pestalotia*).

En este estudio las especies de orquídeas *Epidendrum secundum*, *Pleurothallis angustipetala* y *Pleurothallis gramínea* fueron las especies con mayor porcentaje de hongos potencialmente micorrízicos aislados. En Ecuador los géneros de orquídeas más comunes son *Pleurothallis* y *Epidendrum* (Malacatus, 2010). Existen estudios donde se evidencia la presencia de hongos micorrízicos en estos géneros (Suárez *et al.*, 2008; Hoyos & Rodríguez, 2013; Guzmán & Moreno, 2014), considerando a éstas dos especies como las más idóneas para el aislamiento de hongos micorrízicos.

De los tres fragmentos analizados en esta investigación (A zona más próxima los bulbos, B zona intermedia y C ápice), el mayor porcentaje (55%) de hongos potencialmente micorrízicos se encontró en el ápice de la raíz. La posible razón es porque en ésta zona existe una mayor absorción de agua y nutrientes, beneficiándose así tanto la raíz como el hongo (Quintero, 2012). A medida que va madurando, ésta se alarga y pierde la capacidad de absorción (Hoyos & Rodríguez, 2013), disminuyéndose así la probabilidad de encontrar hongos micorrízicos en los demás fragmentos. El ápice se encuentra lubricado por mucílago, el cuál facilita el avance de la raíz a través del suelo (Dubrovsky & Shishkova 2007), incrementándose el contacto de los hongos micorrízicos con la raíz de la planta de orquídea. Sin embargo, no existe información sobre que sección de la raíz presenta una mayor cantidad de hongos micorrízicos (Zettler *et al.*, 2013; Ordoñez *et al.*, 2015; Suárez *et al.*, 2016).

En este estudio los hongos potencialmente micorrízicos aislados correspondieron al género *Tulasnella* sp. Este resultado concuerda con el

estudio de Suárez *et al.* (2016), quienes lo reportaron como el más frecuente en Ecuador. Este género es considerado como el más importante en la simbiosis de micorrizas de orquídeas (Martos *et al.*, 2012).

En este estudio no se evidenció la presencia de otros hongos micorrízicos pertenecientes al género *Rhizoctonia*. En Ecuador no existen reportes de la presencia del género *Ceratobasidium* (Mosquera *et al.*, 2010; Suárez *et al.*, 2006), además Suárez *et al.* (2016) reportó al género *Sebacina* como poco frecuente en este país, mientras que en otros países como Puerto Rico, Cuba y Brasil se ha evidenciado una mayor presencia de hongos pertenecientes al género *Ceratobasidium*.

Debido a que las características macroscópicas y microscópicas de las colonias aisladas eran muy similares entre sí, se presentaron dificultades en la identificación de los hongos potencialmente micorrízicos, por lo tanto para que su identificación sea mas precisa las colonias deberán ser analizadas molecularmente, como lo a descrito Suárez *et al.* (2006), Mosquera *et al.* (2010), Zettler *et al.* (2013), Ordoñez *et al.* (2015).

Los hongos micorrízicos son indispensables para el desarrollo de las orquídeas, tanto en la etapa de germinación como en la etapa adulta (Otero *et al.*, 2003; Dearnaley, 2007). Esta condición es la base para entender la importancia de nuestra investigación, la cual contribuirá en el proyecto "Estudio de la relación simbiótica orquídea-micorriza en la provincia del Azuay, Ecuador", además de tener un mayor conocimiento sobre la simbiosis hongo-raíz de orquídea.

7. Conclusiones

La metodología descrita por Zettler (2013) fue apropiada, ya que los hongos potencialmente micorrízicos lograron crecer y desarrollarse de manera adecuada, mostrando colonias definidas y con características microscópicas propias al género *Rhizoctonia*.

En esta investigación se aislaron seis colonias de hongos potencialmente micorrízicos, recolectados a una altura de 2.525 msnm, en el cantón Gualaceo, provincia del Azuay.

El mayor número de hongos potencialmente micorrízicos fueron aislados de las raíces de *Pleurothallis angustipetala*, *Pleurothallis gramínea* y *Epidendrum secundum*.

De los tres fragmentos analizados de las raíces de orquídeas (A zona mas próxima a los bulbos, B zona intermedia y C ápice de la raíz), el ápice presentó el mayor número de hongos potencialmente micorrízicos.

Los hongos potencialmente micorrízicos aislados en este estudio presentan características morfológicas que sugieren pertenecer al género-forma *Rhizoctonia (Tulasnella sp.)*, por presentar hifas septadas, medianamente gruesas y dispuestas en un ángulo de 45° o 90 °.

Los resultados obtenidos de esta investigación son satisfactorios, debido a que las seis colonias de hongos potencialmente micorrízicos aislados y purificados constituyen un primer paso para continuar con el proyecto "Estudio de la relación simbiótica orquídea-micorriza en la provincia del Azuay, Ecuador". En una segunda fase, estos hongos serán analizados molecularmente para confirmar que pertenezcan al género *Tulasnella*. Una vez identificados, serán evaluados para la germinación de semillas de orquídeas.

Este proyecto de investigación se plantea con la necesidad de buscar futuras estrategias de conservación *ex situ* para las orquídeas, además estos hongos aislados servirán para la creación de un banco de hongos micorrízicos de la provincia del Azuay.

8. Recomendaciones

Es indispensable georreferenciar los puntos de muestreo en futuros estudios.

La recolección de la raíz, su lavado, desinfección y siembra en medio FIM se debe realizar el mismo día para disminuir posibles contaminaciones y evitar que se pierda la viabilidad del hongo.

Dado el grado de dificultad para aislar hongos micorrízicos se recomienda trabajar con una mayor cantidad de raíces de orquídeas pertenecientes a los géneros *Epidendrum* y *Pleurothallis*, además de analizar los fragmentos B y C de las raíces, de esta manera se podrá obtener una mayor cantidad de dichos hongos.

Para confirmar que estos hongos sean micorrízicos es necesario realizar un análisis molecular.

9. BIBLIOGRAFÍA Y OTRA PRODUCCIÓN CIENTÍFICA CITADA

Acosta, A. (2015). Orquídeas: colores y formas diferentes para todos los gustos.

Alomía Aguirre, Y. A. (2014). Hongos micorrízicos en *Vanilla* sp.(Orchidaceae) y su potencial para la germinación de semillas (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).

Barriuso Vargas, J. J., Martín Santafé, M., Solis Hidalgo, K., & Sánchez Durán, S. (2014). Las micorrizas en los sistemas agro-forestales: la trufa como ejemplo.

Braulete, G. (2012). Análisis de las posiciones de Ecuador en relación a la iniciativa redd (reduccion de emisiones pordeforestación y degradación) después de copenhague. Obtenido de Universidad Andina Simon Bolivar.

Cajamarca. (2008). Medios De Cultivo Y Pruebas Bioquímica. Perú. <http://es.slideshare.net/roberchavez/medios-de-cultivo-y-pruebas-bioquimica-presentation>.

Camargo-Ricalde, S., Montaña, N., De la Rosa, C., & Montaña, S. (2012). Micorrizas: Una gran unión debajo del suelo. Revista digital universitaria, 13(7), 3-19.

Calaway, D., & Escobar, R. (1998). Orquídeas nativas del Ecuador, volumen 1, editorial Colina, Florida, 1998, ISBN 958-638-096-3.

Calaway, D., (2003). Native Ecuadorian Orchids, volumen 4, Dodson Trust, Florida, 2003, ISBN: 9978-42-943-3.

Cervantes, R. 2008. Evaluación farmacológica de *Prosthechea michuacana* (*Orchidaceae*), especie de potencial agrónomo. Tesis de Maestría en Ciencias. CIIDIR-IPN Unidad Oaxaca. Oaxaca, Oaxaca. 58 p.

Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre CITES., (2013). Principios fundamentales. Obtenido de <https://cites.org/esp/disc/text.php#II>.

Córdova, Y. (2003). Evaluación de seis substratos y Mycoraló durante la aclimatación de vitroplántulas de la orquídea *Rhyncholaelia digbyana*.

Dearnaley, J. D. (2007). Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza*, 17(6), 475-486.

De La Noval, B. M., Oria, A., Casadesus, L., & Gómez, M. (1999). Aislamiento, caracterización e inoculación con endomicorrizas orquídeales en especies de orquídeas. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5(2), 149-152.

Dubrovsky, J. G., Shishkova, S. (2007). Enigmas de la raíz: la parte oculta de la planta. Departamento de biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) México.

Endara, L. (2009). Orquídeas endémicas del Ecuador. Retrieved from Patrones generales de endemismo: <http://flmnh.ufl.edu/ecuadororchids/SNAP.htm>.

Etayo, M. L. (1998). Estudio de las ectomicorrizas en una trufera cultivada situada en Olóriz (Navarra).

Gamarra, R. (2014). Orquídea Ibéricas. <http://www.orquideasibericas.info/features>.

García, M. H. (2009). Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. In *Anales del Jardín Botánico de Madrid* (Vol. 66, No. 1, pp. 133-144). Real Jardín Botánico.

Gilman (1963), *Manual de los hongos del suelo*, México, Segunda edición, Ed. Continental, S.A.

Gómez, L. I. A., Portugal, V. O., Arriaga, M. R., & Alonso, R. C. (2015). Micorrizas arbusculares. *CIENCIA ergo-sum*, 14(3), 300-306.

Guzmán Salinas, N. A., & Moreno Coronado, B. J. (2014). Efecto de la altitud en la composición y riqueza de hongos Micorrízicos de orquídeas epífitas en bosques montano altos del sur del Ecuador.

Hoyos Carrera, L. R., & Rodríguez Cabrera, A. D. (2013). Aislamiento de micorrizas en seis especies de orquídeas nativas de Ecuador para la elaboración de un biofertilizante potencialmente útil en rusticación de orquídeas.

Königer, (2005), *Oncidium*, Tomo II, pag. 28.

Lezcano, J. C., Martínez, B., & Alonso, O. (2010). Caracterización cultural y morfológica e identificación de 12 aislamientos fungosos de semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú. *Pastos y Forrajes*, 33(1), 1-1.

Malacatus, E., & Alejandro, J. (2010). Recolección de orquídeas en el cantón Zamora Chinchipe y adaptación en el jardín botánico "Reinaldo Espinosa".

Martos, F., Muñoz, F., Pailler, T., Kottke, I., Gonneau, C., & SELOSSE, M. A. (2012). The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. *Molecular Ecology*, 21(20), 5098-5109.

McCormick, M. K., & Jacquemyn, H. (2013). What constrains the distribution of orchid populations? *New Phytologist*, 202(2), 392-400.

McKendrick, S. (2000). Manual para la germinación in vitro de orquídeas. Ceiba Fundación para la Conservación Tropical. Universidad San Francisco de Quito.

Meisel, J. E., & Woodward, C. L. (2005). Andean orchid conservation and the role of private lands: A case study from Ecuador. *Selbyana*, 49-57.

Merecí Guamán, J. V., & Suqui Velásquez, A. M. (2014). Efecto de la deforestación sobre las propiedades físico-químicas de los suelos de la microcuenca del río Zhurucay.

Ministerio del Ambiente M.A.E., (2015). MAE regula comercialización de orquídeas. Recuperado el 19 de 05 de 2016, de <http://www.ambiente.gob.ec/mae-regula-comercializacion-de-orquideas/>.

Molina, F. A. (2012). Aislamiento, caracterización y efecto de la inoculación de endomicorrizas orquideales sobre dos especies híbridas en el noroccidente de Pichincha (Mindo y Pacto) (Doctoral dissertation, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias).

Mondino, P. (2009). Preparación de medios de cultivo. Curso: "Métodos en fitopatología".

http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursometodosfito/03-Medios_de_cultivos.pdf

Mosquera-Espinosa, A. T., Bayman, P., & Otero, J. T. (2010). *Ceratobasidium* como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia. *Acta Agronómica*, 59(3), 316-326.

Mosquera Espinosa, A. T. (2010). Evaluación del efecto biocontrolador de *Rhizoctonia* de orquídeas sobre *Rhizoctonia solani* Kühn patógeno del suelo en

arroz (*Oryza sativa* L.) (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira).

Nauray, W. (2013). Manual de orquídeas identificación y origen, Perú. Ministerio del Ambiente del Perú. Pag 21-23.

Narrea-Cango, M. (2006). Evaluación de medios de cultivo en la producción de conidias y crecimiento diametral de cuatro cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria brongniartii* (Saccardo). Revista peruana de entomología, 45.

Noval, B. M., Oria, A., Casadesus, L., & Gómez, M. (1999). Aislamiento, caracterización e inoculación con endomicorrizas orquídeales en especies de orquídeas. Revista Chapingo Serie Horticultura, 5(2), 149-152.

Ordoñez, N. F., Díez, M. C., & Otero, J. T. (2012). La vanilla y los hongos formadores de micorrizas. Orquideología, 29(1), 56.

Ordoñez, S. L., Zhunio, P., Priscila, D., Salazar, J. M., & Peña Tapia, D. F. (2016). Especificidad del hongo micorrizico (*Rhizoctonia* sp.) en *Phalaenopsis* sp., *Cymbidium* sp., *Trichoceros antenifer*, *Oncidium excavatum*, y *Cyrtochilum* sp.

Otero, J. T., Bayman, P., & Ackerman, J. D. (2003). Variación en germinación simbiótica entre semillas de *Tolumnia variegata* y entre hongos micorrízicos. Lankesteriana, 3(2).

Pereira, G., Herrera, J., Machuca, A., & Sánchez, M. (2007). Efecto del pH sobre el crecimiento in vitro de hongos ectomicorrícicos recolectados de plantaciones de *Pinus radiata*. Bosque (Valdivia), 28(3), 215-219.

Pioli (2015), Calidad Sanitaria de semillas, Área Biodiversidad Vegetal y Microbiana, Universidad Nacional de Rosario (UNR).

- Pomagualli, P., & Fabián, M. (2015). Estudio de las micorrizas asociadas a *Miconia bracteolata* Bonpl. en el bosque de ceja andina sector Guangra, parroquia Achupallas, cantón Alausí, provincia de Chimborazo.
- Pridgeon, A. (1992). *The illustrated encyclopedia of orchids*. Timber Press, Inc.
- REDLIST (2016), *Elleanthus oliganthus*, Guiding conservation for 50 years, <http://www.iucnredlist.org/details/44392307/0>.
- Reuters T. *Revista Científica del Jardín Botánico Lankester*,. (2006). Obtenido de Universidad de Costa Rica : <http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/lankesteriana>.
- Richart A. (2002), *Botanica's, Orchids over 1.200 species listed*, Ed. Laurel Glen Publishing, pag. 256.
- Rivas, M., Warner, J., & Bermúdez, M. (1998). Presencia de micorrizas en orquídeas de un jardín botánico neotropical. *Revista de biología tropical*, 46(2), 211-216.
- Silvera, G. A. (2000). Cultivo de orquídeas en climas tropicales.
- Suárez, J. P., Weiß, M., Abele, A., Garnica, S., Oberwinkler, F., & Kottke, I. (2006). Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycological research*, 110(11), 1257-1270.
- Suárez, J. P., Weiß, M., Abele, A., Oberwinkler, F., & Kottke, I. (2008). Members of Sebaciniales subgroup B form mycorrhizae with epiphytic orchids in a neotropical mountain rain forest. *Mycological Progress*, 7(2), 75-85.
- Suárez, J. P., & Kottke, I. (2016). Main fungal partners and different levels of specificity of orchid mycorrhizae in the tropical mountain forests of Ecuador. *Lankesteriana*, 16(2).

Torres, Q. (2012). Caracterización molecular de micorrizas de orquídeas del género *Teagueia* spp. Obtenido de Universidad Particular de Loja.

Vega, H., Mó, E., Cetzal, W., (2015). Usos tradicionales y medicinales de la orquídea matasequía (*Prosthechea michuacana*) en Honduras.

Vega, M. (2011). Microorganismos funcionales del suelo. Su papel en el manejo ecológico de los secanos. Departamento de protección vegetal. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias.

Velasco, L. & Beltrán, M. (2008). Orquídeas del Parque Natural Sierra de Grazalema. 2da Edición. Pag 60-79.




Zettler, L. W., Poulter, S. B., McDonald, K. I., & Stewart, S. L. (2007). Conservation-driven propagation of an epiphytic orchid (*Epidendrum nocturnum*) with a mycorrhizal fungus. *HortScience*, 42(1), 135-139.

Zettler, L. W. (2013). Seed propagation of the epiphytic green fly orchid *epidendrum conopseum* R. Brown, using it is endophytic fungus. Obtenido de The Illinois College.


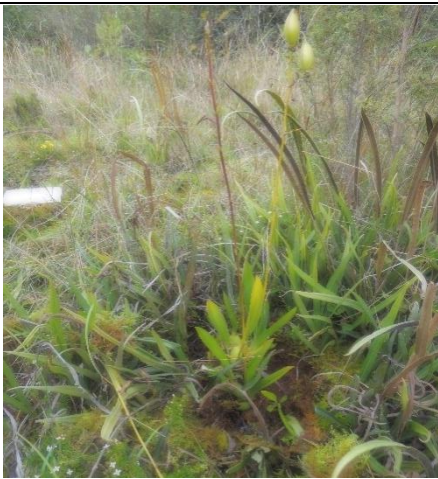

Zhu, G. S., Yu, Z. N., Gui, Y., & Liu, Z. Y. (2008). A novel technique for isolating orchid mycorrhizal fungi. *Fungal Divers*, 33, 123-137.

10. ANEXOS

Anexo 1. Fotos de las especies de orquídeas recolectadas.

<p><i>Trichoceros anteniferum</i> Código: M</p>	
<p><i>Epidendrum secundum</i> Código: L</p>	
<p><i>Pleurothallis angustipetala</i> Código: P</p>	



<p><i>Elleanthus oliganthus.</i> Código: E</p>	
<p><i>Oncidium aureum.</i> Código: U</p>	
<p><i>Pleurothallis gramínea.</i> Código: PG</p>	

Elaborado por: Mónica Cando y Verónica Cárdenas.

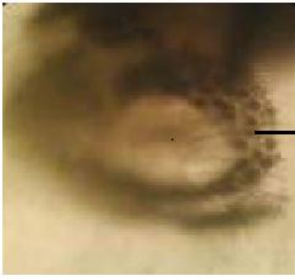
Anexo 2. Medio FIM (Fungi Isolation Medium):

Nitrato de sodio.....0,3 gr
 Cloruro de potasio.....0,1 gr
 Fosfato acido de potasio.....0,2 gr
 Sulfato de magnesio.....0,1 gr
 Extracto de levadura.....0,1 gr
 Azúcar.....2,5 gr
 Agar.....8 gr
 Estreptomicina.....0,5ml
 Agua normal.....1000ml
 Llevar a pH 6,8 Se prepara una solución madre de estreptomicina con 2,67 gr de la misma en 200ml de agua.

Anexo 3. Medio PDA (Agar Dextrosa-Papa):

Agar.....20gr
 Puré de papa.....10gr
 Glucosa.....20gr
 Agua destilada.....1000ml
 Calibrar pH a 5,6 hervir por un minuto y pasar a los frascos y esterilizar.

Anexo 4. Resultado de la observacion microscopica de pelotones.

Posible pelotón	10x
<i>Pleurothallis gramínea</i> Código: 1PG4C	

Elaborado por: Mónica Cando y Verónica Cárdenas.

10.1. GLOSARIO

Aglutinante: sustancia usualmente líquida, que se usa para disolver o desleír las sustancias que componen los pigmentos, por ejemplo, agua en la acuarela y acrílico, aceite de linaza para el óleo, etc.

Catáfilo: Cada una de las hojas simples con apariencia de escamas, sirven de protección a una yema foliar o floral.

Esclerocio: estructura que se desprenden y permanecen en dormancia hasta que se den las condiciones favorables para el desarrollo de un nuevo micelio.

Fotosíntesis: proceso en donde la energía de la luz del sol se transforma en energía química a partir de CO₂, minerales y agua.

Hongos endófitos: aquellos hongos que habitan en plantas sin causar síntomas aparentes de enfermedad.

Labio o Labelo: es el elemento más llamativo de la flor de una orquídea. Es esta parte de la flor la que más frecuentemente tiene la función de actuar como atractivo o indicador para el polinizador o servir como pista de aterrizaje.

Micelio: es la masa de hifas que constituye el cuerpo vegetativo de un hongo. Los micelios reproductores crecen hacia la superficie externa del medio y son los encargados de formar los orgánulos reproductores (endosporios) para la formación de nuevos micelios.

Organelos: son diferentes estructuras contenidas en el citoplasma de las células, principalmente las eucariotas, que tienen una forma determinada. La célula procariota carece de la mayor parte de los orgánulos.

Pétalos: pueden ser de formas y tamaños muy variados, en muy pocos casos son más grandes que el labelo.

Pseudobulbo: órgano de almacenamiento que deriva de parte de un tallo entre dos nódulos de hojas. Se aplica a la familia de las Orquídeas (Orchidaceae), específicamente a cierto grupo de Orquídeas epífitas.

Tubérculo radical: tipo de órgano subterráneo que tiene como función el almacenamiento de reservas.

Rizoma: tallo subterráneo con varias yemas que crecen de forma horizontal emitiendo raíces y brotes herbáceos de sus nudos. Los rizomas crecen indefinidamente.

Rizosfera: es la parte del suelo inmediata a las raíces vivas y que está bajo la directa influencia de éstas.

Sacciforme: dicese de la estructura u órgano que tiene forma de saco.

Sépalos: forman el círculo más exterior en la flor de una orquídea y se pueden observar en el exterior de un botón floral. Éstos pueden ser similares o completamente distintos a los pétalos en lo que a forma y tamaño se refiere. Su color es por lo general verdoso aunque en numerosos casos están coloreados de forma similar a los pétalos o incluso ser de colores más vistosos que ellos.

Simbiosis: asociación de individuos animales o vegetales de diferentes especies, en la que ambos asociados sacan provecho de la vida en común.

Teleomorfo: estadio reproductivo sexual (*morfo*), típicamente desarrolla un cuerpo de fructificación.

Yema floral: órgano complejo semejante a un botón escamoso, a partir de las cuales se desarrollarán hojas y flores.