

UCUENCA

Facultad de Ciencias Químicas
Carrera de Ingeniería Ambiental

“Aislamiento de hongos potencialmente micorrízicos
presentes en tres especies de orquídeas epífitas nativas del cantón de Gualaceo,
Azuay, Ecuador”

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Ingeniera
Ambiental

Autoras:

Evelyn Lizeth Chamba Valarezo

CI: 1150176137

Correo electrónico: gemeevy@gmail.com

María Gabriela Palacios Padrón

CI: 0106821051

Correo electrónico: gabypalacios848@gmail.com

Tutora:

Blga. María Elisa Durán López MSc.

CI:0106821051

Asesora:

Bqf. Mónica Alexandra Narváez Vera

CI:0104715297

Cuenca, Ecuador

08-agosto-2022

Resumen:

En este estudio se aislaron 19 cepas de potenciales hongos formadores de micorriza (HFM) del sistema radicular de tres especies de orquídeas nativas en el Bosque Protector Aguarongo: *Cyrtorchilum* sp, *Odontoglossum pardinum* y *Pleurothallis* sp. Las muestras de raíces fueron recolectadas en la estación lluviosa en un rango de altitud entre 3183-3218 m s.n.m. El procesamiento de las muestras y posterior aislamiento de las colonias se realizó considerando diferentes criterios que permiten una mayor probabilidad de presencia de HFM. Se recolectaron 20 fragmentos de raíces por especie, obteniéndose 60 muestras considerando tres secciones radiculares: basal (A), media (B) y apical (C). Se empleó el medio de cultivo Fungi Insolation Medium para evaluar el crecimiento de las colonias de potenciales HFM que posteriormente fueron seleccionadas, aisladas y purificadas en medio Papa Dextrosa Agar. Los cultivos viables y libres de contaminación se sometieron a una evaluación macroscópica y microscópica para identificar características morfológicas que permitan definirlos como colonias de potenciales HFM. Aunque se observaron mayor cantidad de pelotones de la sección A (basal) de la raíz, la mayor cantidad de cepas de posibles HFM resultaron de la sección B (media). Finalmente, se logró el aislamiento de tres posibles géneros de hongos micorrízicos: *Ceratobasidium*, *Tullasnella* y *Sebacina*, siendo el primero el posible género más abundante entre las cepas aisladas. La mayor cantidad de potenciales HFM fueron aislados de la epífita *Odontoglossum pardinum*. Los resultados de esta investigación permitirán impulsar un banco de especies de hongos potencialmente micorrízicos útiles para mejorar los protocolos de propagación simbiótica de orquídeas.

Palabras claves: Orquídeas epífitas. Aislamiento. Micorrizas. Caracterización Morfológica.

Abstract:

In this study, 19 strains of potential mycorrhizal fungi (MF) were isolated from the root system of three native orchid species in the Aguarongo Protected Forest: *Cyrtochilum* sp, *Odontoglossum pardinum* and *Pleurothallis* sp. Root samples were collected during the rainy season at an altitude range between 3183-3218 m a.s.l. The processing of the samples and subsequent isolation of the colonies was carried out considering different criteria that allow a higher probability of the presence of MF. Sixty samples were obtained by collecting 20 root fragments per species three root sections: basal (A), middle (B) and apical (C). Fungi Insolation Medium was used to evaluate the growth of potential MF colonies, which were then selected, isolated and purified on Potato Dextrose Agar medium. Viable and contamination-free cultures were subjected to a macroscopic and microscopic evaluation to identify morphological characteristics that define them as potential MF colonies. Although a greater number of pelotons were observed from section A (basal) of the root, the greatest number of potential MF strains resulted from section B (middle). Finally, the isolation of three possible genera of mycorrhizal fungi was achieved: *Ceratobasidium*, *Tullasnella* and *Sebacina*, the first being the most abundant possible genus among the isolated strains. The greatest number of potential MF were isolated from the epiphyte *Odontoglossum pardinum*. The results of this research will allow the promotion of a potentially mycorrhizal fungal species bank, useful for improving orchid symbiotic propagation protocols.

Keywords: Epiphytic orchids. Isolation. Mycorrhizae. Morphological characterization.

Tabla de Contenido

INTRODUCCIÓN	11
OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS	16
Objetivo General	16
Objetivos específicos	16
CAPÍTULO I	17
1. ORQUÍDEAS.....	17
1.1. Generalidades de las orquídeas	17
1.2. Distribución global de las orquídeas	18
1.3. Importancia de las orquídeas en el ecosistema.....	19
1.4. Importancia de las orquídeas en Ecuador.....	20
1.1. Características de las orquídeas.....	20
1.1.1. Tipo de hábitat.....	20
1.1.2. Ciclo Vegetativo.....	21
1.2. Descripción de las especies de orquídeas utilizadas en el estudio	22
1.2.1. Género: <i>Pleurothallis</i>	22
1.2.2. Género: <i>Odontoglossum</i>	23
1.2.3. Género: <i>Cyrtorchilum</i>	24
CAPÍTULO II	25
2. MICORRIZAS	25
2.1. Formación de micorrizas	25
2.2. Importancia ecológica de las micorrizas	25
2.3. Clasificación de hongos micorrízicos.....	26
2.3.1. Endomicorrizas.....	26
2.3.2. Ectomicorrizas.....	27
2.3.3. Ectendomicorrizas	27
2.3.4. Micorrizas de orquídeas	27
2.3.5. Micorriza ericoide	27
2.3.6. Micorriza arbutoide	28
2.3.7. Micorriza monotropoide.....	28
2.4. Características de hongos micorrízicos	28
2.5. Asociaciones micorrízicas con orquídeas.....	30

2.6.	Estados de digestión de los pelotones	32
2.7.	Proceso de colonización de una micorriza de orquídea.....	32
CÁPITULO III		34
3.	MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE HONGOS MICORRÍZICOS	34
3.1.	Fungi Insolation Medium (FIM)	34
3.2.	Papa Dextrosa Agar (PDA)	34
CAPÍTULO IV		35
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	35
4.1.	Área de estudio.....	35
4.2.	Métodos.....	37
4.2.1.	Recolección de raíces de orquídeas epífitas	37
4.2.2.	Preparación de medios de cultivo.....	37
4.2.3.	Preparación de las raíces y siembra en el Medio Fungi Insolation (FIM).....	38
4.2.4.	Observación de pelotones en Medio Fungi Insolation (FIM)	41
4.2.5.	Aislamiento de los hongos potencialmente micorrízicos en medio Agar Papa Dextrosa (PDA)	42
4.2.6.	Microcultivo de colonias de hongos potencialmente micorrízicos	44
4.2.7.	Caracterización de hongos potencialmente micorrízicos	46
4.2.8.	Identificación y descarte de hongos no micorrízicos	46
CAPÍTULO V		48
5.	RESULTADOS.....	48
5.1.	Cultivo de raíces de las tres orquídeas muestreadas sobre medio FIM.....	48
5.1.1.	Colonización de pelotones extraídos desde las raíces de las <i>Pleurothallis</i> sp., <i>Odontoglossum pardinum</i> , <i>Cyrtorchilum</i> sp. en medio de cultivo FIM	48
5.1.2.	Secciones radiculares colonizadas por pelotones extraídos desde las raíces de las tres especies de orquídeas epífitas en medio de cultivo FIM	49
5.2.	Cultivo de hongos con características macroscópicas adecuadas de hongos formadores de micorriza en medio PDA.....	50
5.2.1.	Colonización de hongos con características macroscópicas de potenciales especies fúngicas formadoras de micorrizas aislados de las raíces de las orquídeas <i>Pleurothallis</i> sp., <i>Odontoglossum pardinum</i> y <i>Cyrtorchilum</i> sp. en medio de cultivo PDA	50
5.2.2.	Secciones radiculares con colonización de hongos macroscópicamente adecuados como potenciales especies fúngicas formadoras de micorriza aislados de las raíces de las tres especies de orquídeas epífitas en medio de cultivo PDA	51

5.3. Cultivo de hongos con características macroscópicas y microscópicas adecuadas de hongos formadores de micorriza.....	52
5.3.1. Colonización de potenciales hongos formadores de micorriza aislados de las especies de orquídeas <i>Pleurothallis</i> sp., <i>Odontoglossum pardinum</i> y <i>Cyrtorchilum</i> sp.	52
5.3.2. Secciones radiculares con colonización de potenciales hongos formadores de micorriza aislados de las tres especies de orquídeas epífitas.....	53
5.4. Posibles géneros de las cepas con características de HFM encontradas en las raíces de las orquídeas epífitas.....	53
5.5. Identificación y descarte de hongos no micorrízicos	65
CAPÍTULO VI	67
6. DISCUSIÓN	67
CAPÍTULO VII	71
7. CONCLUSIONES	71
CAPÍTULO VIII	72
8. RECOMENDACIONES	72
CAPÍTULO IX	73
9. BIBLIOGRAFÍA.....	73
CAPÍTULO X	89
10. ANEXOS.....	89

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de las orquídeas	17
Tabla 2. Ubicación geográfica de las especies muestreadas.	35
Tabla 3. Códigos asignados para cada especie de orquídea epífita según tipo de muestra, número de muestra y sección radicular	39
Tabla 4. Cantidad de cajas Petri con colonización de estructuras de posibles pelotones extraídos de las raíces de las orquídeas epífitas y cajas Petri descartadas.....	48
Tabla 5. Componentes Medio de cultivo FIM.....	89
Tabla 6. Componentes Medio de cultivo PDA.....	89
Tabla 7. Caracterización morfológica de potenciales HFM descartados	90

Índice de Figuras

Figura 1.	Flor de la Orquídea <i>Epipactis helleborine</i> , que atrae el néctar.	18
Figura 2.	Ejemplar de orquídea <i>Pleurothallis</i> sp.	22
Figura 3.	Ejemplar de orquídea <i>Odontoglossum pardinum</i>	23
Figura 4.	Ejemplar de orquídea <i>Cyrtorchilum</i> sp.	24
Figura 5.	Caracteres morfológicos microscópicos de hongos micorrízicos.....	29
Figura 6.	Caracteres morfológicos macroscópicos de hongos micorrízicos.....	29
Figura 7.	Colonización micorrízica de raíces de <i>Laelia autumnalis</i>	31
Figura 8.	Diferentes estados de los pelotones.....	32
Figura 9.	Ubicación geográfica provincial, cantonal y parroquial del Área de estudio correspondiente al Bosque Protector Aguarongo	36
Figura 10.	Definición de la sección basal (A), media (B) y apical (C) de las raíces de orquídeas.....	38
Figura 11.	Proceso de recolección, preparación y siembra en el medio FIM de las raíces de orquídeas nativas del Bosque Protector Aguarongo	40
Figura 12.	Observación de posibles pelotones bajo el lente 10x. Estructuras de posibles pelotones dentro de las células corticales de la raíz.	41
Figura 13.	Observación de posibles pelotones bajo el lente 10x. Posibles pelotones sanos con presencia de hifas pequeñas o enrollamientos espirales.....	41
Figura 14.	Proceso de selección de pelotones con adecuado crecimiento en medio FIM y su replante en medio PDA	43
Figura 15.	Proceso de aplicación de la técnica de microcultivo a colonias fúngicas con características macroscópicas adecuadas a HFM	45
Figura 16.	Proceso de descarte de hongos no micorrízicos a través de la prueba de cinta.....	47
Figura 17.	Porcentaje de cajas Petri con colonización de pelotones en medio FIM y cajas descartadas por especie de orquídea epífita.....	49
Figura 18.	Porcentaje de cajas Petri con colonización de pelotones por sección radicular: sección A (basal), sección B (media) y sección C (apical).....	49
Figura 19.	Porcentaje de cajas Petri aptas para microcultivo por tener colonización de hongos con características macroscópicas de potenciales HFM en medio PDA.....	50
Figura 20.	Porcentaje de cajas Petri aptas para microcultivo por colonización de hongos con características adecuadas de HFM, cajas Petri sin crecimiento y cajas Petri contaminadas, para cada especie de orquídea epífita.....	51
Figura 21.	Porcentaje de colonización de hongos macroscópicamente adecuados como HFM por sección radicular: sección A (basal), sección B (media) y sección C (apical).....	51

Figura 22. Cantidad de potenciales hongos formadores de micorriza y hongos descartados por especie de orquídea epífita.....	52
Figura 23. Porcentaje de potenciales hongos formadores de micorriza aislados por sección radicular: sección A (basal), sección B (media) y sección C (apical) de las orquídeas epífitas	53
Figura 24. Porcentaje de posibles géneros de las cepas con características de HFM aislados de las tres especies de orquídeas epífitas	54
Figura 25. Cantidad de posibles géneros de hongos micorrízicos aislados de las raíces de las orquídeas <i>Pleurothallis</i> sp., <i>Odontoglossum pardinum</i> y <i>Cyrtochilum</i> sp.	54
Figura 26. Características microscópicas y macroscópicas de hongos potencialmente micorrízicos aislados de las raíces de orquídeas <i>Pleurothallis</i> sp., <i>Odontoglossum pardinum</i> y <i>Cyrtochilum</i> sp.....	55
Figura 27. Identificación macroscópica y microscópica de hongos descartados como micorrízicos y contaminados.....	65

Índice de Anexos

Anexo 1: Formulación de medios de cultivo empleados para 1 litro.....	89
Anexo 2: Caracterización morfológica de hongos descartados microscópicamente.	90

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Evelyn Lizeth Chamba Valarezo, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Aislamiento de hongos potencialmente micorrízicos presentes en tres especies de orquídeas epífitas nativas del cantón Gualaceo, Azuay, Ecuador ", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 08 de agosto del 2022



Evelyn Lizeth Chamba Valarezo

C.I: 1150176137

Cláusula de Propiedad Intelectual

Evelyn Lizeth Chamba Valarezo, autora del trabajo de titulación “Aislamiento de hongos potencialmente micorrízicos presentes en tres especies de orquídeas epífitas nativas del cantón Gualaceo, Azuay, Ecuador”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 08 de agosto de 2022



Evelyn Lizeth Chamba Valarezo

C.I: 1150176137

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

María Gabriela Palacios Padrón en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Aislamiento de hongos potencialmente micorrízicos presentes en tres especies de orquídeas epífitas nativas del cantón de Gualaceo, Azuay, Ecuador”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 08 de agosto del 2022



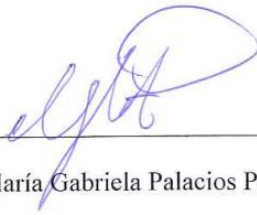
María Gabriela Palacios Padrón

C.I: 0106821051

Cláusula de Propiedad Intelectual

María Gabriela Palacios Padrón autora del trabajo de titulación “Aislamiento de hongos potencialmente micorrízicos presentes en tres especies de orquídeas epífitas nativas del cantón de Gualaceo, Azuay, Ecuador”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 08 de agosto del 2022



María Gabriela Palacios Padrón

C.I: 0106821051

Agradecimientos

Agradezco a mis padres, Franco y Mirian, por el apoyo y la motivación brindada en cada paso de este proceso, este logro es por y para ellos.

Gracias a todas las personas que aportaron con sus conocimientos y sapiencia para el desarrollo de esta investigación. Un agradecimiento especial para la Blga. María Elisa Durán por su dedicación y empeño en la tutoría del trabajo. A la Dra. Mónica Narváez, el Sr. Servando Morocho y la Blga. Mayra Jiménez por su ayuda en las diferentes etapas de este trabajo.

Agradezco de todo corazón a las personas que creyeron siempre en mí y que de una u otra forma aportaron significativamente y me brindaron motivación durante el proceso.

Evelyn

Quiero empezar por agradecer a Dios, Él fue mi apoyo y soporte durante todo el proceso de elaboración de esta investigación.

Agradezco a las personas que me permitieron culminar satisfactoriamente el presente trabajo. Un agradecimiento sincero para la Blga. María Elisa Durán por brindarnos su ayuda, conocimiento compromiso y dedicación. Quiero agradecer a la Dra. Mónica Narváez por su compañía y sabiduría brindada en este trabajo. Y también agradezco al Sr. Servando Morocho por echarnos una mano en el procedimiento en campo.

Mis más sinceros agradecimientos para mis padres, ellos son mi ejemplo de motivación, inspiración y superación diaria. Gracias a mis familiares, amigos y mi enamorado por siempre creer en mí y ser incondicionales para mí. Gracias a mis dos angelitos que tengo en el cielo, ustedes me acompañaron en todo proceso.

Gabriela

INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae pertenece a uno de los mayores grupos de plantas con flor comprendiendo aproximadamente 32000 especies en unos 800 géneros, con una media de un centenar de descubrimientos de nuevas especies cada año (Alghamdi, 2017). Debido a las características topográficas y la gran variedad de zonas climáticas, Ecuador corresponde a uno de los países con mayor diversidad de orquídeas registradas en el mundo (Gutiérrez *et al.*, 2014; Del Corral *et al.*, 2017). Dentro de su territorio es posible encontrar una de cada cinco especies de orquídeas del globo, y se han registrado más de 4302 especies, de las cuales 1741 son catalogadas como endémicas (Cerna, 2019).

A pesar de la mega diversidad de la familia Orchidaceae, el proceso de extinción de orquídeas en el país se está intensificado por la destrucción de hábitats en consecuencia del cambio de uso de suelo, la deforestación, la erosión y el tráfico ilegal de las especies (Jaramillo-Tapia, 2018). Según Miranda (2014), el 62 % de las especies de orquídeas registradas en Ecuador se distribuyen principalmente en las estribaciones de la cordillera de los Andes, a lo largo de la región interandina en bosques nublados (Zhang *et al.*, 2015). Sin embargo, estos bosques están reducidos a remanentes discontinuos a lo largo de la cordillera, pues han sido principalmente afectados por las actividades antrópicas (Román-Rodríguez, 2021). Esto ha provocado que cerca del 83 % de las especies de la familia Orchidaceae en nuestro país se encuentren amenazadas (Paredes, 2012).

Por otro lado, la afectación de las orquídeas no solamente es consecuencia de la actividad antrópica, sino que su propagación es también limitada por la particularidad de sus semillas de no poder germinar con facilidad (Apolo-Moreno, 2021). Es por ello, que estas plantas durante la etapa de germinación, y algunas durante todo su ciclo de vida, tienen la necesidad de asociarse a un simbionte conocido como hongo micorrízico (Delgado-Castro, 2019). La presencia de las estructuras micorrízicas favorece potencialmente el desarrollo correcto de las plantas, proporcionando a la planta los nutrientes necesarios para su crecimiento (Moína-Quimí *et al.*, 2018). Desafortunadamente, aún se conoce muy poco sobre cuáles son los simbiontes más apropiados para las especies de orquídeas epífitas, siendo crucial realizar investigaciones más profundas que permitan identificar diferentes hongos que estimulen la germinación de estas especies (Herrera *et al.*, 2019). Es por ello, que actualmente se está trabajando en desarrollar metodologías de germinación bajo condiciones *in vitro* que permitan una conservación efectiva estableciendo alternativas para el desarrollo y crecimiento de la familia Orchidaceae (Chávez *et al.*, 2014).

El Bosque Protector Aguarongo (BPA), es uno de los hotspots más importantes en el Ecuador (Delgado *et al.*, 2021). Dentro de su diversidad de flora vascular se han registrado 37 especies de plantas monocotiledóneas distribuidas en 8 familias y 28 géneros, siendo Orchidaceae una de las familias con mayor riqueza con 9 especies descritas dentro del bosque. Este ecosistema corresponde a bosque húmedo montano y es uno de los pocos remanentes de bosque andino en la cordillera de los Andes (Loyola, 2019). A pesar de que la riqueza florística y faunística del BPA ha sido afectada por varios factores antrópicos, aún representa una fuente de diversidad biológica que amerita esfuerzos de conservación (Farfán *et al.*, 2017). Por ello, en los últimos años se han realizado numerosas investigaciones sobre flora y fauna, permitiendo la protección de la biodiversidad del bosque del que también forman parte la familia Orchidaceae y su microbiota.

El presente trabajo pretende contribuir a suplir los vacíos de conocimiento relacionados a las orquídeas epífitas y su simbiosis fúngica, a través del aislamiento de potenciales HFM de especies de orquídeas nativas del BPA. Este proceso es fundamental para la posterior propagación *in vitro* de las especies de orquídeas, sobre todo de aquellas que se encuentran en un estado de amenaza en la naturaleza. Con esta investigación se espera mejorar los protocolos de propagación simbiótica de las orquídeas, facilitando un banco de especies de hongos potencialmente formadores de micorriza útiles para su uso futuro.

OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS

Objetivo General

Identificar la presencia de especies de hongos potencialmente micorrízicos en el sistema radicular de tres especies de orquídeas epífitas nativas en un piso altitudinal sobre los 3100 m s.n.m en el cantón Gualaceo, Provincia del Azuay, Ecuador.

Objetivos específicos

- Seleccionar y extraer fragmentos radiculares de tres especies de orquídeas epífitas nativas del cantón Gualaceo.
- Obtener cultivos puros de hongos potencialmente formadores de micorrizas encontrados en especies de orquídeas epífitas identificadas en campo.
- Caracterizar morfológicamente las colonias potencialmente micorrízicas de los hongos aislados.

CAPÍTULO I

1. ORQUÍDEAS

1.1. Generalidades de las orquídeas

El término orquídea se origina del latín “*orchis*” o testículo, referente a la forma de los pseudobulbos de algunas de las especies (Castellanos & Torres, 2018). Estas plantas pertenecen a la familia Orchidaceae, siendo la que posee mayor número de especies entre los vegetales (Sedano *et al.*, 2015). En la actualidad se reconocen 736 géneros con alrededor de 25000 a 30000 especies a nivel mundial (Chase *et al.*, 2015). Su distribución es diversa, encontrándose en todos los continentes a excepción de la Antártida; sin embargo, su mayor abundancia se concentra en las regiones tropicales y subtropicales en países como Ecuador, Colombia, Perú y Brasil (Salazar, 2009). Según Rivera (2002) la dominancia de las orquídeas depende de su distribución altitudinal y condiciones climáticas, siendo el rango de 100 a 4800 m s.n.m en donde existe mayor diversidad. Además, varias especies de orquídeas toleran condiciones de estrés, en donde puede existir elevados grados de sequía junto con deficiencia en nutrientes (CONABIO, 2011).

Las orquídeas pertenecen a la clasificación taxonómica descrita en la tabla 1. Se caracterizan por una variedad de flores, aromas y colores, además de presentar interacciones ecológicas importantes con algunos agentes polinizadores y hongos con los que forman micorrizas (Rivera, 2002; Sedano *et al.*, 2015). Las orquídeas poseen varios hábitos de crecimiento, la mayor parte de estas plantas son epífitas usando como soporte a los árboles para acceder a mejores condiciones lumínicas (Castellanos & Torres, 2018). Sus hojas son engrosadas en la base formando pseudobulbos, necesarios para almacenar nutrientes y agua (Krömer *et al.*, 2018). Las orquídeas terrestres crecen directamente sobre el suelo, produciendo tubérculos como órganos de reserva para almacenar agua y sustancias que permiten a estas plantas sobrevivir en períodos críticos (Troiani *et al.*, 2017). Asimismo, existen orquídeas litófitas que se caracterizan por vivir sobre rocas, y algunas pocas especies son acuáticas (Kunakhonnuruk *et al.*, 2019).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de las orquídeas

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Subclase	Monocotyledonae
Orden	Orchidales
Familia	Orchidaceae

Fuente: Rivera (2002)

En estas plantas, se distinguen cuatro tipos de órganos florales: sépalos, pétalos, columna y carpelos (Wang, *et al.*, 2019). Uno de los tres pétalos se encuentra modificado y se denomina labelo (figura 1).



Figura 1. Flor de la Orquídea *Epipactis helleborine*, que atrae el néctar. Abreviaturas: An, antera; G, ginostemo o columna; L, labelo; P, pétalo; Pol, polinios; Ro, Rostelo; Sl, sépalo lateral; Sm, sépalo medio; St, estigma.

Fuente: Cozzolino & Widmer, 2005

1.2. Distribución global de las orquídeas

Las orquídeas se encuentran ampliamente distribuidas en los trópicos y subtrópicos, particularmente en elevaciones medias, encontrándose ausentes solamente en regiones polares y desérticas (Zhang *et al.*, 2018). Mayoritariamente la familia Orchidaceae está conformada por especies epífitas que representan un 70 %, aunque también existen diversas comunidades terrestres en regiones tropicales y templadas (Phillips *et al.*, 2020). Debido a que tienen una especificidad micorrízica, una polinización especializada y tasas de germinación limitadas, la mayoría de estas especies se distribuyen en hábitats específicos, y a comparación de otras plantas, las orquídeas son extremadamente susceptibles a alteraciones del hábitat (Zhang *et al.*, 2015).

Estas plantas poseen una alta capacidad de adaptación climática, por lo que se encuentran distribuidas en un 90 % en zonas tropicales de América, Asia y África (Ochoa, 2003). Por lo que es de crucial importancia comprender de mejor manera sobre cómo la riqueza de las especies, amplitud de los nichos y tamaño de área de distribución se encuentran asociados a los gradientes geográficos y ambientales, esto permitirá una mejor conservación de las especies, además de servir de ayuda para predecir diferentes efectos del cambio global (Štípková & Kindlmann, 2021).

Ecuador, Colombia y Perú poseen una amplia distribución de especies de orquídeas principalmente en regiones andinas. Sin embargo, al considerar la cantidad de especies respecto a su superficie geográfica,

nuestro país cuenta con el mayor número de especies de orquídeas abarcando cuatro de las cinco subfamilias existentes en el mundo (Guevara, *et al.*, 2019). Ecuador es el hogar de más de 4000 especies de orquídeas que se distribuyen desde la Costa del Pacífico hasta los 4500 m s.n.m y representan aproximadamente un 20 % del total de la flora del país. Los bosques de la serranía ecuatoriana concentran más del 50 % de la diversidad de orquídeas, sobre todo en altitudes comprendidas entre 1500 a 2500 m s.n.m (Durán *et al.*, 2019). Por su lado, las especies endémicas se concentran entre los 1500 a 3000 m s.n.m, en ecosistemas de bosques montanos bajos y de neblina montanos (Endara, 2009).

1.3. Importancia de las orquídeas en el ecosistema

La familia Orchidaceae posee gran trascendencia desde el punto de vista ecológico, ya que mantiene el equilibrio dinámico del ecosistema cumpliendo importantes funciones (CONABIO, 2011). De esa forma, las llamativas flores de estas plantas mejoran las posibilidades de atracción de los diferentes polinizadores contribuyendo a mantener una estabilidad en el hábitat (Granados-Sánchez *et al.*, 2003). Del mismo modo, ayudan con la generación, mantenimiento y flujo de algunos servicios ecosistémicos (Blanco, 2020). La importancia ecológica de las orquídeas epífitas radica en su capacidad de formar grandes masas vegetales en las regiones superiores de los bosques. Las orquídeas permiten mantener funciones de barrera interceptando la neblina y nubes bajas, esto facilita el almacenamiento e infiltración de agua en el suelo, reduciendo el impacto del escurrimiento del agua y de la erosión (Castellanos & Torres, 2018). Adicionalmente, las orquídeas contribuyen al ecosistema al estar asociadas con hongos formadores de micorrizas, cumpliendo importantes funciones en el ciclo de nutrientes y brindando refugio y alimento a insectos, aves y mamíferos (CONABIO, 2011; Londoño & Villanueva, 2021).

Las orquídeas no sólo contribuyen a un equilibrio ecológico, su importancia también se enmarca debido a la ventaja económica que supone su venta para diferentes fines. En la actualidad, la belleza de sus flores, las ha convertido en motivo de cultivo por particulares e industriales como plantas de uso ornamental (Ruiz *et al.*, 2016). Según Hadi *et al.* (2015) la orquídea de mayor importancia económica es la *Vanilla planifolia*, la cual es frecuentemente utilizada como saborizante. A más del valor ornamental, muchas orquídeas tienen importancia medicinal y terapéutica, estas plantas por su potencial curativo están siendo investigadas como fuentes de tratamiento a diferentes tipos de enfermedades (Hossain, 2011). Sus características principales de belleza y fragilidad permiten que la familia Orchidaceae tenga un alto valor económico en la industria ornamental, no obstante, esto conduce a su disminución por la rápida sobreexplotación, los cambios climáticos y la deforestación (Kang, Won-Kang, Hwan-Kim, & Sivanesan, 2020).

1.4. Importancia de las orquídeas en Ecuador

Ecuador fue declarado país de las orquídeas en el año 2016, pues se encuentra dentro de uno de los *hotspots* de biodiversidad global de mayor importancia, conocido como Andes Tropicales. En nuestro país existe una gran diversidad de estas plantas, con más de 3550 especies, siendo un tercio de ellas endémicas (Sánchez & Rodríguez, 2018; Vaca *et al.*, 2019). Además, en nuestro país como en el resto del mundo, la industria de comercialización de orquídeas actualmente tiene alta rentabilidad, debido a que son valoradas por la gran variedad que exhiben con respecto a sus flores, tamaño, color, fragancia y textura. Sin embargo, pese a su gran importancia ecológica y comercial, la deforestación, la expansión de la frontera agrícola y el comercio ilegal, están reduciendo considerablemente la diversidad de especies de orquídeas silvestres ecuatorianas (Durán *et al.*, 2019). Según Jiménez (2014), de la población de orquídeas en el Ecuador, 1455 especies presentan algún tipo de amenaza, el 2 % se encuentran en Peligro Crítico (CR), y la gran mayoría en estado Vulnerable (VU). Por ello, nuevas iniciativas locales, provinciales y nacionales se enmarcan dentro del Plan de Acción Nacional para la conservación y aprovechamiento sostenible de estas especies incluyendo una producción sostenible a través de viveros y una comercialización controlada (Sánchez & Rodríguez, 2018; Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica, 2022).

1.1. Características de las orquídeas

1.1.1. Tipo de hábitat

La forma de vida de las orquídeas puede ser terrestre, epífita, litófito o saprófito (Zhang *et al.*, 2018). Las orquídeas con diferentes formas de vida se caracterizan por diferentes estructuras adaptativas y rasgos funcionales; sin embargo, todas poseen asociaciones con hongos micorrízicos de gran importancia para su crecimiento y desarrollo desde la germinación hasta la edad adulta (Qin *et al.*, 2020).

Orquídeas epífitas. - Aproximadamente un 70 % de todas las especies de la familia Orchidaceae pertenecen a este grupo. Las orquídeas epífitas crecen principalmente en árboles, arbustos y plantas de hoja caduca sirviendo como excelentes indicadores biológicos sobre cambios en el ecosistema (Timsina *et al.*, 2021). Se encuentran principalmente en bosques tropicales y se caracterizan a menudo por tener hojas suculentas con paredes celulares gruesas y estomas hundidos, sus raíces aéreas pueden tener más de un metro de largo y su crecimiento en las copas de los árboles garantiza un entorno con mayor suministro de luz. Para las orquídeas epífitas, la rápida absorción de agua por el velamen y su almacenamiento en los

pseudobulbos y hojas contribuyen al equilibrio hídrico de la planta y su tolerancia al estrés por sequía (Zhang *et al.*, 2018).

Orquídeas terrestres. - Son aquellas que germinan bajo la tierra y representan alrededor del 25 % de la totalidad de las especies de orquídeas registradas. Están ampliamente distribuidas en biomas de bosques y pastizales y se caracterizan por tener rizomas, bulbos o tubérculos además de raíces gruesas con función de almacenamiento (Alghamdi, 2019). La abundancia y distribución de las orquídeas terrestres se ven afectadas por cambios en el equilibrio del ecosistema y factores climáticos, entre los más importantes se destacan los gradientes de luz, humedad, sustratos geológicos y precipitaciones (Djordjević & Tsiftsis, 2019). Este tipo de orquídeas eventualmente emergen del suelo después de meses e incluso años, sintetizan clorofila y se vuelven fotosintéticas (Zhang *et al.*, 2018).

Orquídeas litófitas. - Se caracterizan por crecer sobre las rocas, es decir, su sustrato se encuentra asociado a lechos rocosos (Qin *et al.*, 2020). Este tipo de orquídeas se nutren de los musgos de la roca y los nutrientes disueltos en el agua de lluvia, además de sus propios tejidos muertos (Nauray *et al.*, 2017).

Orquídeas saprófitas. - Son aquellas que nacen y crecen sobre desechos vegetales en descomposición. Este tipo de orquídeas obtienen su alimento de las micorrizas, son fertilizadas por insectos y sus semillas son propagadas a través del viento. Las orquídeas saprófitas constituyen un porcentaje muy pequeño del total registrado (Horich, 1982; Kendon *et al.*, 2020).

1.1.2. Ciclo Vegetativo

Una orquídea es capaz de producir miles de semillas en una temporada reproductiva; sin embargo, debido a que carecen de endospermo pocas son las que se convertirán en plantas capaces de sobrevivir hasta la edad adulta (Shefferson *et al.*, 2020). Por esta razón, las orquídeas son dependientes de los hongos micorrízicos que les brindan nutrientes para su germinación, convirtiendo a las etapas de formación del embrión y plántula en las más cruciales de su ciclo de vida (Cozzolino & Widmer, 2005; Chávez *et al.*, 2015). La primera fase de germinación de las semillas conduce a la formación del protocormo, en este período transcurre las etapas de semilla en polvo y plántula, teniendo una duración de meses o años dependiendo de la especie (Shefferson *et al.*, 2020).

La floración de esta planta depende de factores climáticos como la precipitación y temperatura, por lo que, no todas las especies de orquídeas florecen en la misma época (Gastelbondo & Castellanos, 2018). En el ciclo de polinización, la mayor parte de las especies de orquídeas agrupan los granos de polen en

una sola estructura llamada polinario, siendo suficiente un solo evento de polinización exitoso para producir miles de semillas (Hernández *et al.*, 2011). Según Cozzolino & Widmer (2005), aproximadamente el 60 a 70 % de las orquídeas tienen una sola especie de polinizador. Los principales polinizadores de las orquídeas son insectos; sin embargo, existen especies que pueden ser polinizadas por aves especialmente en zonas tropicales, siendo el viento otro factor que contribuye a este proceso.


1.2. Descripción de las especies de orquídeas utilizadas en el estudio

1.2.1. Género: *Pleurothallis*

Etimología: El nombre se deriva del griego *pleuron* que significa costilla y *thallos* brote o tallo, en alusión a los muchos tallos como costillas que emergen con una hoja solitaria (Fernández *et al.*, 2018).

Características: Las plantas de este género pueden ser perennes, epífitas o terrestres, presentan tallos aéreos, unifoliados, delgados similares a peciolos, denominados ramicales. Poseen hojas coriáceas, duplicadas y articuladas (Fernández *et al.*, 2018). En Ecuador el género *Pleurothallis* es uno de los grupos que más aporta a la diversidad de especies de orquídeas endémicas del país (65 % de especies de la subtribu Pleurothallidinae) (Endara, 2018). En la figura 2 se puede observar un ejemplar de la orquídea descrita.

Distribución: América tropical y subtropical desde América Central hasta Bolivia, Argentina y Paraguay, crecen en alturas de hasta 3500 m s.n.m (Zelenko & Bermúdez, 2009).

<i>Pleurothallis</i> sp.	
	<p>Clasificación taxonómica: Reino: Plantae Filo: Magnoliophyta Clase: Liliopsida Orden: Asparagales Familia: Orchidaceae Subfamilia: Epidendroideae Tribu: Epidendreae Subtribu: Pleurothallidinae Género: <i>Pleurothallis</i></p> <p>Estado de amenaza Vulnerable (VU) - Apéndice II de CITES.</p>
<p>Figura 2. Ejemplar de orquídea <i>Pleurothallis</i> sp. Fotografía: Evelyn Chamba y Gabriela Palacios</p>	


1.2.2. Género: *Odontoglossum*

Etimología: El nombre se deriva del griego *odonto* que significa diente y *glossa*, lengua; haciendo referencia a la estructura dentada del callo, y a la lámina del labelo en forma de lengua (Posada, 2020).

Características: Este género es comúnmente epífito, sin embargo, ocasionalmente puede crecer de forma terrestre o en estratos rocosos (Fernández *et al.*, 2018). Sus pseudobulbos están pegados y tienen sus bordes marcados (Loyola, 2019).

Posee alrededor de 80 especies, encontrándose en las regiones montañosas de América Central y América del Sur, principalmente entre los 1500 a 2700 m s.n.m, no obstante, se han encontrado especímenes a 3660 m s.n.m (Cavero *et al.*, 1991). En la figura 3 se aprecia un ejemplar de la orquídea *Odontoglossum pardinum*.

Distribución: Alturas andinas de Sudamérica, en climas fríos o fríos/intermedios como en Bosques Lluviosos (Zelenko & Bermúdez, 2009).


<i>Odontoglossum pardinum</i>	
	<p>Clasificación taxonómica: Reino: Plantae Filo: Magnoliophyta Clase: Liliopsida Orden: Orchidales Familia: Orchidaceae Género: <i>Odontoglossum</i> Especie: <i>Odontoglossum pardinum</i></p> <p>Estado de amenaza: Vulnerable (VU) - Apéndice II de CITES.</p>
<p>Figura 3. Ejemplar de orquídea <i>Odontoglossum pardinum</i>. Fotografía: Evelyn Chamba y Gabriela Palacios</p>	

1.2.3. Género: *Cyrtochilum*

Etimología: El nombre proviene del griego *kyrtos* que significa “recurvo, hinchado” y *cheilos* “labio” en alusión a los gruesos y curvos labios de algunas especies. En nuestra región es comúnmente conocida como Urcubucu (Loyola, 2019).

Características: Es categorizada como especie nativa dentro del Bosque Protector Aguarongo, el género se distingue por la presencia de pseudobulbos, generalmente muy grandes que terminan en una o dos hojas. La mayoría de las plantas de este género crecen entre los 1500 y los 3000 m s.n.m, y son principalmente epífitas, pero algunas especies pueden crecer de forma terrestre en taludes (Fernández *et al.*, 2018). Se presenta en la figura 4 un ejemplar de *Cyrtochilum* sp.

Distribución: Sur y Centro de América a elevadas altitudes en los Andes. Se encuentran en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia (Zelenko & Bermúdez, 2009).

<i>Cyrtochilum</i> sp.	
	<p>Clasificación taxonómica: Reino: Plantae Filo: Tracheophyta Clase: Liliopsida Orden: Asparagales Familia: Orchidaceae Subfamilia: Vandoideae Tribu: Cymbidieae Subtribu: Oncidiinae Género: <i>Cyrtochilum</i></p> <p>Estado de amenaza: Vulnerable (VU) - Apéndice II de CITES.</p>
<p>Figura 4. Ejemplar de orquídea <i>Cyrtochilum</i> sp. Fotografía: Evelyn Chamba y Gabriela Palacios.</p>	

CAPÍTULO II

2. MICORRIZAS

2.1. Formación de micorrizas

El término micorriza proviene de los vocablos griegos *mike*: hongo y *rizha*: raíz, y ha sido asignado a la asociación simbiótica entre un hongo y la raíz de una planta (Cazar Iza & Pérez Reyes, 2019). Dicha simbiosis generalmente se considera como mutualista, aunque se exceptúan ciertos casos (Suárez-Galarza, 2016). En esta interacción ambos organismos se benefician pues, por un lado, el hongo proporciona a la planta nutrientes, agua y fosfatos que toma del suelo a través de su micelio, y por otro lado la planta brinda al hongo el carbono orgánico necesario para su desarrollo y multiplicación (Smith & Read, 2008). Además, la planta proporciona un microhábitat adecuado para que el hongo pueda completar su ciclo de vida (Camargo *et al.*, 2012).

La existencia de micorrizas se evidencia desde hace aproximadamente 400 millones de años, lo que demuestra que son tan antiguas como las propias plantas (Perez *et al.*, 2011). En el ambiente natural, aproximadamente entre el 80 % y 85 % de todas las plantas del mundo manifiestan tener una relación con micorrizas formando arbusculos, vesículas o hifas y pelotones en las raíces de las plantas (Suárez-Galarza, 2016; Pickles *et al.*, 2020).

2.2. Importancia ecológica de las micorrizas

La importancia de las micorrizas no sólo se debe al hecho de que pueden representar la mayor fracción de biomasa del suelo. Su función clave radica en la capacidad de interconectar, subterráneamente, a las raíces de plantas de la misma especie o de diferentes especies a través del micelio. Esto permite un libre flujo de nutrientes hacia las especies interconectadas (Blanco & Salas, 1997; Camargo *et al.*, 2012). El micelio extra-radical en especial, es capaz de extenderse más allá de los 9 cm de la raíz, lo que permite ampliar la esfera de influencia de la población microbiana asociada a la rizósfera y beneficiar la transferencia de carbono hacia zonas de estrés de las plantas (Pulido-Delgado *et al.*, 2002; Rojas *et al.*, 2015).

La presencia de las estructuras micorrízicas favorece potencialmente algunas funciones que permiten el desarrollo correcto de las plantas. Así, pueden favorecer la absorción, solubilidad y la disponibilidad de nutrientes como son el zinc, potasio, hierro y calcio. Además, ayuda a la asimilación del nitrógeno, y permiten la captación de iones móviles de fósforo (Moína-Quimí *et al.*, 2018). Gracias a su capacidad de

síntesis de metabolitos específicos, otorgan mayor resiliencia ante estrés biótico y abiótico actuando como una especie de protección contra posibles daños externos o microorganismos patógenos de especies vegetales (Cazar-Iza & Pérez-Reyes, 2019). Así mismo, las micorrizas son capaces de limitar la absorción de metales tóxicos (atrapándolos en sus hifas) y aumentar el área de exploración de la raíz en el suelo (Camargo *et al.*, 2012).

Por otro lado, la presencia de estructuras micorrízicas es beneficiosa para el suelo debido a que contribuyen a la formación de agregados por medio de la exudación de glomalina, una proteína producida por el micelio que permite la adherencia de partículas (Noda, 2009). De esta manera, se confiere mejores características de porosidad y permeabilidad para el flujo de agua y aire en el sustrato, y mejora sus propiedades físicas y químicas mediante el enriquecimiento de materia orgánica (Pérez *et al.*, 2011). La formación de la micorriza altera la fisiología y exudación radicales, lo que a su vez estimula y transforma la población de microorganismos circundante a las plantas, incrementando la actividad microbiana benéfica para el suelo y las plantas, logrando conectar los componentes bióticos y abióticos entre sí (Pulido-Delgado *et al.*, 2002).

2.3. Clasificación de hongos micorrízicos

Según la clasificación dada por Harley y Smith en 1983, y sustentada por Smith y Read en 1997, existen siete diferentes tipos de micorrizas. Esta clasificación se ha definido considerando sus características estructurales, el grupo taxonómico del hongo o la planta involucrada y las alteraciones morfológicas que la relación provoca (Andrade-Torres, 2010).

2.3.1. Endomicorrizas

Las endomicorrizas o micorrizas arbusculares abundan en la naturaleza, debido a que los hongos de la simbiosis, perteneciente a la clase de los Glomeromycetes, son capaces de colonizar a aproximadamente el 74 % de plantas terrestres entre las que incluyen árboles, arbustos, herbáceas, Bryophytas y Pteridophytas (Fernández, 2008; Moína-Quimi *et al.*, 2018). En la formación de esta micorriza las hifas penetran desde la rizodermis hasta las células corticales de la planta, para formar minúsculas arborescencias muy ramificadas llamadas arbusculos (Cando & Cárdenas, 2017). Este grupo no forma manto fúngico y prevalece en comunidades de clima cálido seco, cálido húmedo y templado-frío, dominadas por herbáceas y leñosas (Camargo *et al.*, 2012). Por otro lado, las especies de endomicorrizas no tienen especificidad en la elección de sus hospederos; sin embargo, dependiendo de los efectos que las

especies fúngicas causen sobre el crecimiento de los individuos vegetales, estas responden a especies específicas de hongos arbusculares (Prieto-Benavides *et al.*, 2012).

2.3.2. Ectomicorrizas

Las ectomicorrizas presentan un manto hifal rodeando a la raíz, pero el hongo no penetra más allá de los espacios intercelulares de la corteza. Los hongos capaces de formar este tipo de asociación son Basidiomycotina, Ascomycotina, y raramente los Zygomycotina, los hospederos corresponden a árboles y arbustos (Fernández, 2008; Cando & Cárdenas, 2017). Las especies ectomicorrizógenas predominan en ecosistemas forestales con gran acumulación de materia orgánica, ubicados en latitudes y altitudes intermedias de clima templado-frío (Camargo *et al.*, 2012).

2.3.3. Ectendomicorrizas

Estas asociaciones se caracterizan por la formación o no de un manto hifal en la raíz del hospedero, observándose una pequeña penetración de las hifas dentro de sus células estructurando enrollamientos (Yuan *et al.*, 2009). Las principales especies formadoras de ectendomicorrizas pertenecen a la clase Ascomycetes y Basidiomycetes quienes establecen relación con árboles y arbustos (Fernández, 2008).

2.3.4. Micorrizas de orquídeas

Las micorrizas de orquídeas u orquideoide no presentan un manto hifal pero se observa una penetración del hongo en las células radicales para formar estructuras de “ovillos” conocidos como pelotones (Cando & Cárdenas, 2017). Principalmente en las orquídeas, los hongos que forman la micorriza pertenecen a tres familias de Basidiomycetes: Tulasnellaceae, Sebacinaceae y Ceratobasidiaceae, aunque también se han encontrado especies fúngicas de Ascomycetes en esta relación (Fernández, 2008; Mujica-Pérez, 2019). En esta simbiosis, a diferencia de otras, se observa que la especie vegetal es muy dependiente del hongo, ya que éste estimula la germinación de sus semillas y el crecimiento inicial de la plántula (Andrade-Torres, 2010).

2.3.5. Micorriza ericoide

La micorriza ericoide también forma haustorio sin ramificación u ovillos espirales dentro de las células y como otras carece de manto hifal. Sin embargo, esta simbiosis solamente se da entre especies vegetales del orden Ericales y hongos Ascomycetes (Fernández, 2008). Aunque este tipo de micorriza se ha observado también en algunas briofitas, del grupo de los musgos (Andrade-Torres, 2010). Este tipo

predomina en suelos localizados en altas latitudes y elevadas altitudes de clima frío (Camargo *et al.*, 2012).

2.3.6. Micorriza arbutoide

Este tipo de micorriza presenta un manto externo con hifas que penetran a las células para formar los ovillos espirales o rulos, y similar al grupo anterior solo forman la asociación con especies de Ericacea: *Arbutus*, *Arctostaphylos*, y de Pyrolaceae: *Pyrola*, *Orthilia* (Neri & Villarreal, 2012).

2.3.7. Micorriza monotropoide

Las micorrizas monotropoides presentan un manto hifal y penetran en las células radicales formando haustorios sin ramificación. Se diferencia del grupo precedente por ser específicas de las especies vegetativas de Monotropaceae (Neri & Villarreal, 2012).

2.4. Características de hongos micorrízicos

El complejo fúngico tipo *Rhizoctonia*, al que pertenecen la mayoría de hongos micorrízicos, no produce esporas sexuales por lo que no suelen ser fértiles, de manera que su clasificación se basa en algunas características vegetativas morfológicas generales (Montes, 2016). Sin embargo, los análisis morfológicos se deben completar con estudios moleculares de secuencias de ADN (Beltrán-Nambo *et al.*, 2018).

Los caracteres morfológicos típicos en los que se basa la clasificación del complejo fúngico tipo *Rhizoctonia* incluyen características microscópicas (figura 5) como: ramificación hifal de 90°, constricción en el punto de ramificación, tabique en las hifas cerca del punto de crecimiento, aparición de células monillioideas y esclerocios, y número de núcleos (uni - bi- o multinucleadas). Por otro lado, las características macroscópicas (figura 6) identificables en cultivos *in vitro* de este tipo de hongos incluyen morfotipos como: crecimiento radial y aspecto de anillo micelial, aunque también irregular y sumergido. Una apariencia ligeramente algodonosa o alfelpada y ocasionalmente granular, con esclerocios cerosos glabros y aspecto costroso. En cuanto al color las colonias presentan un color blanco durante los primeros 10 días de crecimiento, y amarillo pálido en colonias de 20 días o más (Steinfert *et al.*, 2010; Beltrán-Nambo *et al.*, 2018).

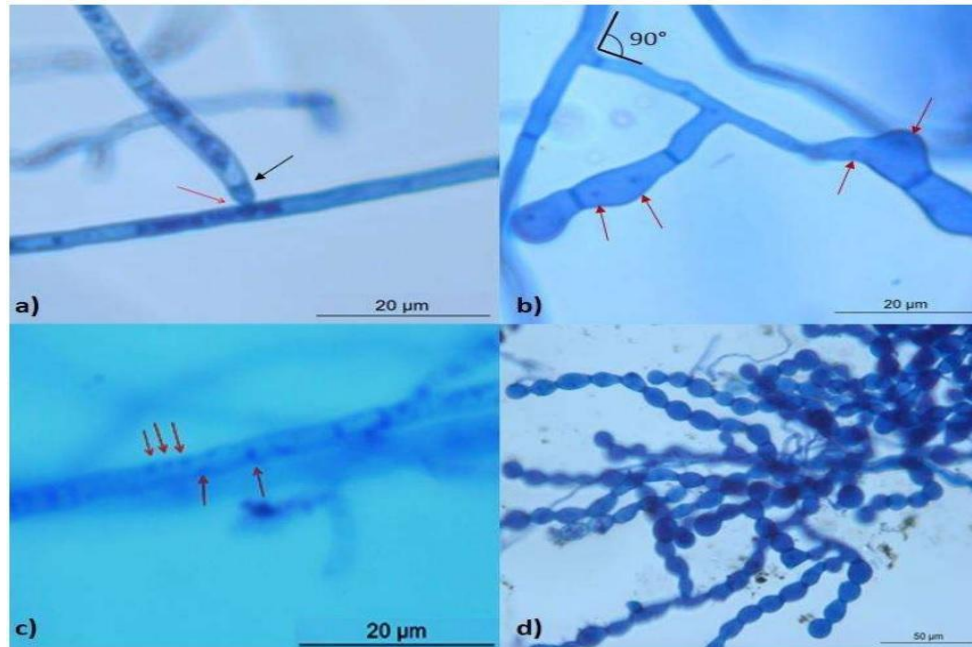


Figura 5. Caracteres morfológicos microscópicos de hongos micorrízicos: a) Constricción en el punto de ramificación (flecha roja) y septo cerca del punto de ramificación; b) ángulo cercano a los 90° entre hifa principal y secundaria, hifas binucleadas (flechas rojas); c) hifas multinucleadas (flechas); d) células monillioideas.

Fuente: Montes, 2016.



Figura 6. Caracteres morfológicos macroscópicos de hongos micorrízicos: a) crecimiento irregular y sumergido; b) esclerocios cerosos y aspecto costroso; c) crecimiento radial y formación de anillos de micelio, colonias algodonosas; d) Micelio algodonoso y formaciones en forma de tiras; e) esclerocios sumergidos de color sepia y sin formación de costras; f) crecimiento radial uniforme y colonias de aspecto ceroso y esclerocios de aspecto granular.

Fuente: Beltrán-Nambo *et al.*, 2018.

2.5. Asociaciones micorrízicas con orquídeas

Al carecer de órganos y sustancias de reserva fundamentales para el crecimiento y desarrollo del embrión, las orquídeas establecen una interacción simbiótica con hongos para formar micorrizas. Debido a la falta de endospermo y la presencia de carbohidratos complejos, las semillas de estas plantas forman una estructura denominada protocormo (Valadares *et al.*, 2021). Los protocormos al ser órganos completamente heterótrofos requieren un compañero fúngico específico, para así recibir carbono y otros nutrientes de los hongos micorrízicos asociados, una estrategia denominada micoheterotrofia (Kaur, 2020). Debido al crecimiento de la raíz y el intercambio nutritivo, la planta es quien controla la intensidad de esta simbiosis y por ende quien limita el proceso de colonización (Calva & Amari, 2017). Probablemente el hongo es el organismo que recibe poco o casi nada desde la planta. Además, la dependencia de las orquídeas hacia sus socios simbióticos fúngicos es considerada estricta en todas las etapas del ciclo de vida de la planta, desde la germinación hasta la edad adulta (Valadares *et al.*, 2021). Puesto que, aunque los protocormos eventualmente dan lugar a plántulas que tienen la capacidad de desarrollarse como plantas adultas con hojas verdes fotosintéticas, alrededor de 200 especies de orquídeas son aclorófilas y por ende siguen dependiendo del carbono derivado de hongos (Hynson *et al.*, 2013). Además, en este tipo de asociación existe un alto grado de especialización, en donde la especificidad es diferente entre especies de orquídeas y socios fúngicos, y cambia según las regiones geográficas (Beltrán-Nambo *et al.*, 2018; Valadares *et al.*, 2021).

En esta asociación simbiótica el hongo forma una estructura denominada “pelotón” al penetrar intracelular e intercelularmente en las células corticales de la raíz y en las semillas, produciendo enrollamientos hifales, tal como se ilustra en la figura 7 (Calva-Cabrera & Amari-Malla, 2017). Las micorrizas de orquídeas son consideradas únicas y de tipo endótrofo, puesto que las hifas viven y colonizan el interior de las células (Guzmán-Salinas & Moreno Coronado, 2014). Las especies fúngicas típicas de esa relación pertenecen al complejo fúngico tipo “*Rhizoctonia*”, un conjunto de especies asignadas taxonómicamente a Agaricomycetes en los órdenes Cantharellales (Tulasnellaceae y Ceratobasidiaceae) y Sebaciniales (Serendipitaceae). Aunque la mayoría de las orquídeas micoheterotróficas y mixotróficas se asocian con basidiomicetos y ascomicetos (Cazar-Iza & Pérez-Reyes, 2019; Suárez-Galarza, 2016). Varias de las especies de hongos simbiosis de orquídeas actúan como parásitos y patógenos para otras especies de plantas o incluso para diferentes especies de orquídeas. Se ha demostrado que los socios fúngicos de orquídeas causan pudriciones en raíces de guisantes, soja y pino, y crean efectos patógenos en coliflor y rábano, pero estimulan la germinación y el crecimiento de las plántulas de Orchidaceae (Sathiyadash *et al.*, 2020).

Existen una serie de factores bióticos y abióticos que afectan la estructura de las comunidades de hongos formadores de micorriza que colonizan a las orquídeas. Por un lado, están las diferentes especies vegetales y por otro, el sitio, la variación temporal, la elevación y las condiciones ambientales y estacionales del área en donde se está dando la interacción (Cevallos *et al.*, 2018). Sin embargo, las combinaciones particulares de factores ambientales pueden influir particularmente en las comunidades locales de micorrizas de orquídeas, por lo que es difícil generalizar los factores ecológicos que modifican las estructuras de esta simbiosis (Peay *et al.*, 2010). En todo caso, las asociaciones con micorrizas han permitido que las orquídeas sobrevivan en diversos hábitats alrededor del mundo (Sathiyadash *et al.*, 2020).

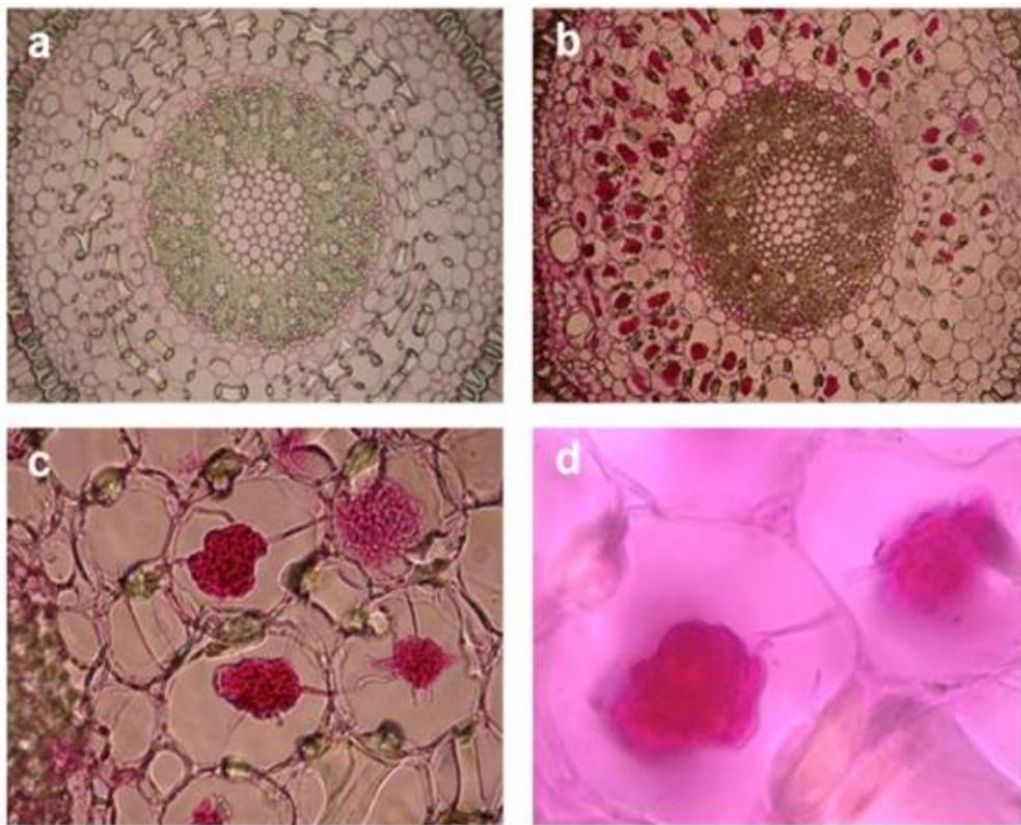


Figura 7. Colonización micorrízica de raíces de *Laelia autumnalis*: a) Cilindro central sin presencia de pelotones, ni hifas con lente 40x, b) corte transversal con presencia de pelotones, c) Pelotones e hifas teñidos con fucsina ácida en diferentes estados de digestión, d) acercamiento de pelotones a 100x.

Fuente: Jiménez *et al.*, 2018.

2.6. Estados de digestión de los pelotones

Los pelotones se consideran como la característica más distintiva de las micorrizas orquídeoides. Estos enrollamientos hifales son digeridos por la planta de una manera controlada, sirviendo como fuente de carbono y suministrando nutrientes tales como: azúcares, vitaminas, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos y minerales (Ordóñez-Castillo, 2006). Los pelotones se encuentran en tres estados de digestión dentro de la raíz de la orquídea: a) pelotones digeridos: con apariencia colapsada sin observarse hifas individuales; b) pelotones parcialmente degradados en proceso de digestión: se reconoce algo de la estructura celular o de la pared del hongo en los extremos; c) pelotones sin digestión aparente: observándose en la totalidad de la estructura las paredes de las hifas (figura 8).

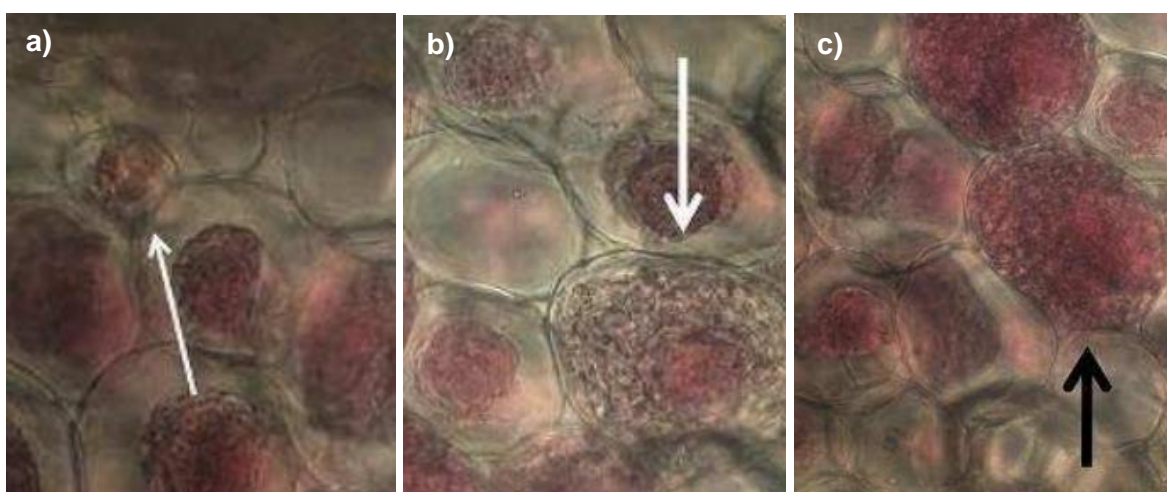


Figura 8. Diferentes estados de los pelotones: a) pelotones digeridos o colapsados, b) pelotones en proceso de digestión, y c) pelotones sin digestión.

Fuente: Moreno, 2013.

Aunque no se conoce bien el mecanismo que controla la degradación del pelotón (Kunga *et al.*, 2014), esto puede depender de la fenología de la planta, la edad de la raíz, su distribución y posición en la raíz, e incluso la estacionalidad climática (Beltrán, 2010).

2.7. Proceso de colonización de una micorriza de orquídea

La colonización de hongos micorrízicos en orquídeas se produce en las células corticales de las plantas, pudiendo ocurrir en raíces, rizomas u otras estructuras (Steinfort *et al.*, 2010; Nurfadilah *et al.*, 2016). En este proceso, el hongo formador de micorriza penetra a la raíz de la planta bien a través de los pelos de la raíz, o directamente atravesando las células epidérmicas (Sathiyadash *et al.*, 2012). Así, las hifas fúngicas atraviesan el velamen y entran en la corteza de la raíz a través de las células de paso de la exodermis. Desde aquí el hongo se propaga intracelularmente para formar las estructuras altamente enrolladas

llamadas pelotones. La colonización concluye cuando el núcleo de las células corticales es empujado hacia la periferia en las células invadidas y, como en otros tipos de micorrizas, el hongo nunca traspasa la endodermis (Sathiyadash *et al.*, 2012; Sathiyadash *et al.*, 2020). Una vez dentro de la célula, el hongo es separado del citoplasma por la membrana celular, donde se produce la transferencia de nutrientes (Steinfort *et al.*, 2010).

Los hongos formadores de micorrizas transfieren nutrientes a su huésped orquídea desde diferentes sustratos. Para el caso de las orquídeas epífitas, el hongo a través de su micelio se encarga de descomponer la corteza o sustrato que lo contiene, para dejar a disposición de la planta la materia orgánica y los nutrientes que lo componen (Zhang *et al.*, 2018). La translocación de nutrientes, principalmente carbono, nitrógeno y fósforo, se da de forma unidireccional o bidireccional. Se habla de un flujo unidireccional cuando hay ausencia de translocación de nutrientes del huésped al hongo, por el contrario, el flujo es bidireccional cuando los nutrientes una vez transferidos y asimilados por el rizoma de la planta se dirigen al micelio del hongo (Cameron *et al.*, 2007; Sathiyadash *et al.*, 2020).

Los patrones de colonización se generalizan en este tipo de simbiosis, aunque pueden diferir significativamente si se trata de orquídeas epífitas, litófitas o terrestres. Así, en las especies epífitas, la colonización fúngica se considera de tipo irregular puesto que solamente la porción radicular que está adherida a la corteza de los árboles o al sustrato, está en simbiosis con micorrizas. Las raíces que no están adheridas al sustrato lógicamente no estarán en interacción con hongos (Muthukumar & Kowsalya, 2017).

CÁPITULO III

3. MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE HONGOS MICORRÍZICOS

3.1. Fungi Insolation Medium (FIM)

Este medio es uno de los más empleados para el aislamiento y mantenimiento de los cultivos de hongos micorrízicos (Raya, 2009). Se considera como una excelente fuente de nutrientes para los hongos, pues proporciona oligoelementos, aminoácidos y vitaminas. A su composición se añade estreptomicina para evitar la contaminación bacteriana, además de extracto de levadura, fosfato ácido de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de potasio, nitrato de sodio, azúcar y agar (Anexo 1 - tabla 5) (Mursidawati, 2004). El crecimiento de los hongos se acelera llevando el medio a un pH de 5.5 (Kendon *et al.*, 2020).

3.2. Papa Dextrosa Agar (PDA)

El medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) se considera uno de los medios fúngicos universales más comunes (Hasanin & Hashem, 2020). Este medio se prepara con una infusión de papa (ingrediente natural), dextrosa y agar (materiales sintéticos), por lo que se considera como un medio semisintético (Anexo 1 - tabla 6). Cada uno de los tres componentes es esencial para el crecimiento y reproducción de microorganismos, especialmente hongos. El pH bajo, entre 4.5 a 5.6, inhibe el crecimiento de bacterias, lo que favorece el desarrollo de colonias fúngicas en laboratorio. En el medio PDA la papa constituye una fuente de carbono, vitaminas y energía, y adicionalmente, como fuente de azúcar y energía está la dextrosa (Octavia & Wantini, 2017).

CAPÍTULO IV

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Área de estudio

El área de estudio corresponde al Bosque Protector Aguarongo (BPA). Está ubicado en el cantón Gualaceo, provincia del Azuay con coordenadas UTM: 744404,2 - 9681773,1 y 742867,2 - 9669885 (figura 9). Este bosque andino se encuentra entre los 2271 y 3242 m s.n.m, además, es de gran importancia para varias comunidades del cantón Gualaceo, Sigsig y Cuenca al ser la principal fuente de abastecimiento de agua (Duque *et al.*, 2019). Debido a sus características climáticas, se encuentra catalogado dentro de las áreas de bosque y vegetación protectora del Ecuador, bajo el amparo del Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAATE), manteniendo una alta diversidad de especies de flora y fauna en su territorio (Loyola, 2019).

El BPA es considerado parte del ecosistema bosque siempreverde montano del sur de la Cordillera Oriental de los Andes, representados por alta abundancia y diversidad de plantas epífitas. Este ecosistema ocupa el primer lugar dentro de los cinco con mayor número de especies de flora en categoría de amenaza, por lo que, se caracteriza por ser frágil y tener alta prioridad de conservación (Ministerio del Ambiente, 2018).

El muestreo se llevó a cabo en el período de estación lluviosa perteneciente al mes de marzo del 2022, a una altitud comprendida entre los 3183 m s.n.m y 3218 m s.n.m. La georreferenciación de los sitios de muestreo se realizó con un receptor GPS de mano de alta sensibilidad (GPS-72H) marca Garmin. En la tabla 2 se presentan las coordenadas geográficas de cada uno de los puntos de muestreo, con la respectiva especie de orquídea y estado de madurez.

Tabla 2. Ubicación geográfica de las especies muestreadas.

Coordenadas geográficas de los puntos de muestreo en el BPA				
X	Y	Altura (m s.n.m)	Especie	Estado de madurez
739722	9674338	3218	<i>Cyrtochilum</i> sp.	Madura - presencia de flores
739940	9674438	3210	<i>Pleurothallis</i> sp.	Madura - presencia de flores
740304	9674428	3183	<i>Odontoglossum pardinum</i>	Joven – sin presencia de flores

Fuente: Elaboración Propia

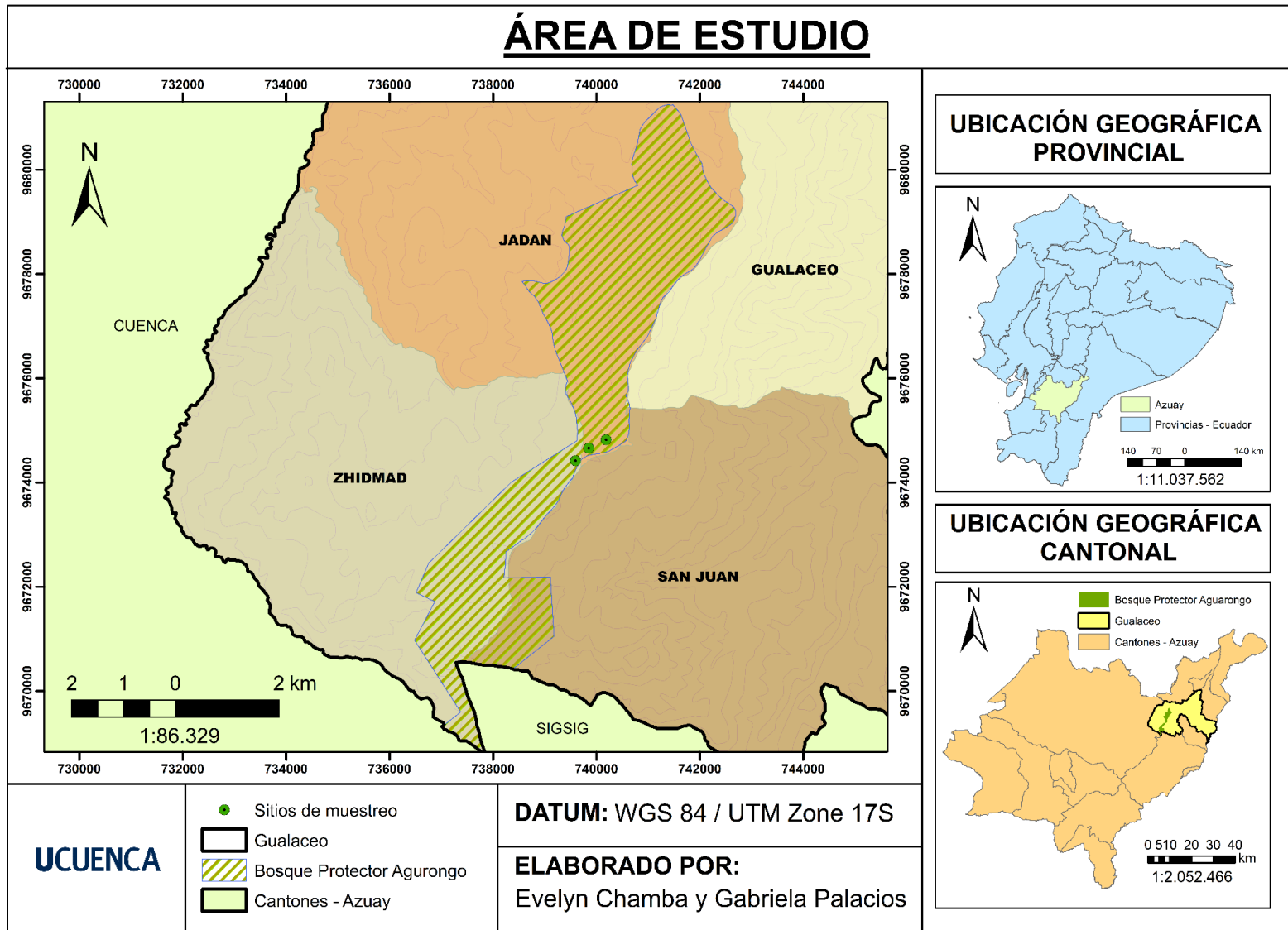


Figura 9. Ubicación geográfica provincial, cantonal y parroquial del Área de estudio correspondiente al Bosque Protector Aguarongo

Fuente: Elaboración propia

4.2. Métodos

Este estudio de tipo experimental consistió en aislar colonias de potenciales hongos formadores de micorrizas (HFM) de orquídeas epífitas nativas, utilizando el procedimiento propuesto por Zettler *et al.* (2013). Se recolectaron fragmentos de raíces de tres especies de orquídeas epífitas nativas del BPA: *Cyrtochilum* sp., *Pleurothallis* sp., y *Odontoglossum pardinum*, respectivamente.

4.2.1. Recolección de raíces de orquídeas epífitas

La toma de los fragmentos de raíces se realizó considerando ciertas características de las orquídeas como su estado de madurez y abundancia. Según Zettler *et al.* (2007), para tener una mayor probabilidad de aislar hongos micorrízicos de las orquídeas, es recomendable trabajar con raíces jóvenes, características por su color amarillento u opaco, con notable abundancia de pelotones activos. Así mismo, se consideró que la planta tenga una apariencia sana y esté en contacto directo con la corteza del árbol hospedero, lo que asegura una mayor probabilidad de la presencia de hongos micorrízicos (Vargas & Victorino, 2015).

Por cada especie de orquídea se recolectaron 10 fragmentos de raíces, de entre 3 a 7 centímetros de longitud, con su respectiva réplica. Los fragmentos se cortaron con un bisturí estéril sin ocasionar daños a la planta ni comprometer su sistema radicular. Se obtuvieron un total de 60 fragmentos de raíz (20 fragmentos por especie). Las muestras se colocaron en bolsas de plástico etiquetadas y se trasladaron al laboratorio de micropropagación de orquídeas en el Campus Balzay de la Universidad de Cuenca para el posterior análisis.

4.2.2. Preparación de medios de cultivo

Para la preparación de medios de cultivo, tanto del Medio Fungi Isolation (FIM) como del Papa Dextrosa Agar (PDA), se emplearon los componentes y reactivos en las concentraciones presentadas en el Anexo 1. Se regularon las condiciones de pH óptimas para el crecimiento de hongos, controladas a través de un pHímetro modelo PHS-3C, y posteriormente, se esterilizaron los medios a 120°C y a 0,15 MPa de presión en una autoclave vertical modelo BK-24HDD y se almacenaron a 4°C hasta su posterior uso.

4.2.3. Preparación de las raíces y siembra en el Medio Fungi Insolation (FIM)

La preparación de las muestras consistió en un proceso de lavado y desinfección establecido por Zettler *et al.* (2013) y Ordóñez *et al.* (2012), con el fin de eliminar restos de materia orgánica u otros elementos en las raíces recolectadas. Así, se aplicó el método de lavado estándar que emplea agua corriente para limpiar superficialmente las raíces. Posteriormente, se realizó una desinfección sumergiendo las raíces en una solución de agua destilada, etanol al 98 % e hipoclorito de sodio 90:5:5 durante 10 minutos para finalmente enjuagar de dos a tres veces con agua estéril. Las raíces desinfectadas fueron transferidas a cajas Petri estériles para la respectiva siembra.

Los fragmentos de raíz fueron divididos en tres secciones de aproximadamente 1 cm de longitud, considerando la sección basal (A), sección media (B) y sección apical (C) (figura 10). Este trabajo se realizó en condiciones de asepsia, bajo cámara de flujo laminar. Posteriormente, cada una de las secciones fueron trasladadas a una caja Petri plástica estéril para ser trituradas sobre una gota de agua estéril hasta obtener un “picadillo” de raíz. Una vez triturada la raíz, se vertió el Medio Fungi Insolation (FIM), uno de los medios más utilizados para el aislamiento de hongos a partir de raíces de orquídeas (Crespo-Santander & Ortega-Guaricela, 2015; Cando-Naula & Cárdenas-Pugo, 2017; León-Chuñir & Romero-Jiménez, 2017). Por último, las cajas Petri se sellaron con un film plástico para finalmente etiquetar las muestras según su código de identificación respectivo (tabla 3).

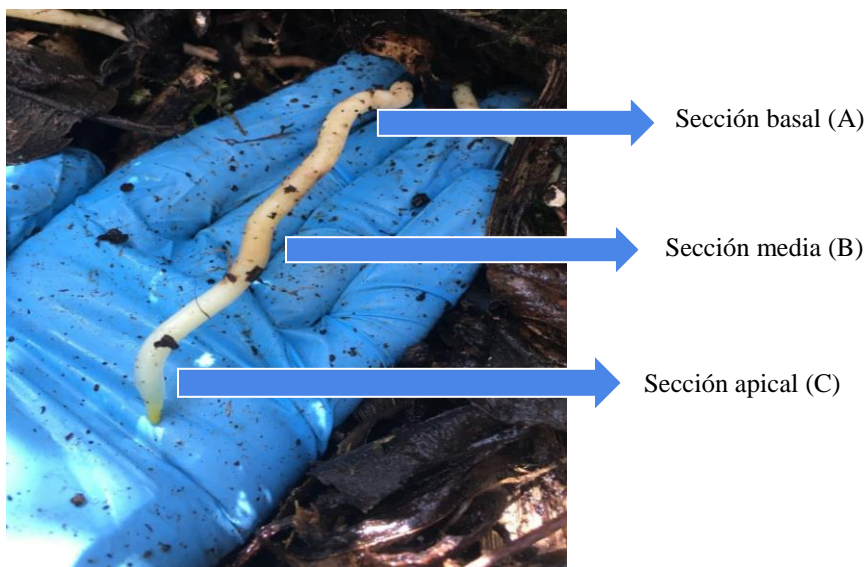


Figura 10. Definición de la sección basal (A), media (B) y apical (C) de las raíces de orquídeas
Fotografía: Gabriela Palacios & Evelyn Chamba

Tabla 3. Códigos asignados para cada especie de orquídea epífita según tipo de muestra, número de muestra y sección radicular

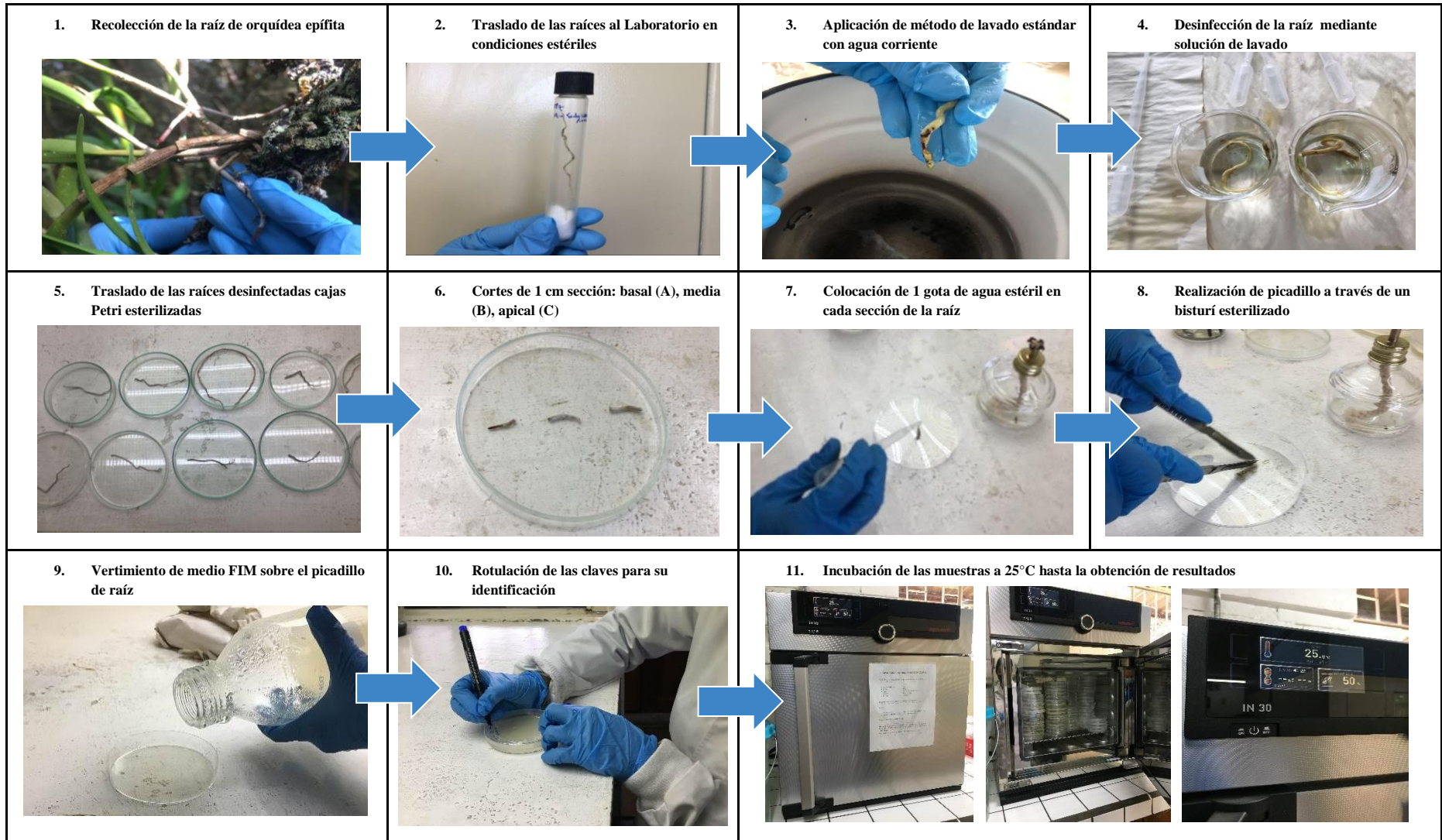
Especie	Código	Tipo de muestra	Número de muestra	Sección de raíz
<i>Cyrtochilum</i> sp.	Csp.	Muestra (M), Muestra Réplica (MR)	1-10	basal (A) media (B) apical (C)
<i>Pleurothallis</i> sp.	Psp.	Muestra (M), Muestra Réplica (MR)	1-10	basal (A) media (B) apical (C)
<i>Odontoglossum pardinum</i>	OS	Muestra (M), Muestra Réplica (MR)	1-10	basal (A) media (B) apical (C)

Fuente: Elaboración propia

Del cultivo de las muestras sobre medio FIM se obtuvieron 180 fragmentos de raíz cultivados: 60 correspondientes a *Pleurothallis* sp., 60 a *Odontoglossum pardinum* y 60 a *Cyrtochilum* sp. De manera más específica, del total de fragmentos sembrados para *Pleurothallis* sp., 20 pertenecieron a la sección A (basal), 20 a la sección B (media), 20 a la sección C (apical). La misma distribución se obtuvo para *Odontoglossum pardinum* y *Cyrtochilum* sp.

Los cultivos se incubaron a 25°C durante aproximadamente tres días, y luego se clasificaron con base a dos categorías: 1) Cajas Petri con presencia de pelotones, y 2) Cajas Petri descartadas, que incluyen cajas sin pelotones y cajas contaminadas por hongos ambientales y/o propios de la microbiota. Además, se realizó un control diario para identificación y separación de cultivos contaminados. El proceso de preparación de las raíces y siembra en el Medio Fungi Insolation (FIM) se presenta en la figura 11.

Figura 11. Proceso de recolección, preparación y siembra en el medio FIM de las raíces de orquídeas nativas del Bosque Protector Aguarongo



Fuente: Elaboración propia

4.2.4. Observación de pelotones en Medio Fungi Insolation (FIM)

El análisis microscópico del cultivo de raíces en medio FIM se realizó luego de 48 horas de incubación, con el objetivo de visualizar la formación de pelotones en las células corticales radiculares. Para la observación de pelotones se empleó el lente 10x de un microscopio marca Nikon. Cabe mencionar que, para las tres especies de orquídeas muestreadas, la aparición de pelotones fue más notoria entre los 6 a 12 días después de la siembra. Al cabo de este tiempo se identificaron elaboradas estructuras enroscadas colonizando las células corticales de la raíz (figura 12) y formaciones de ovillos espirales (figura 13). Dichas estructuras fueron caracterizadas como posibles pelotones que fueron marcados para su posterior aislamiento en PDA.

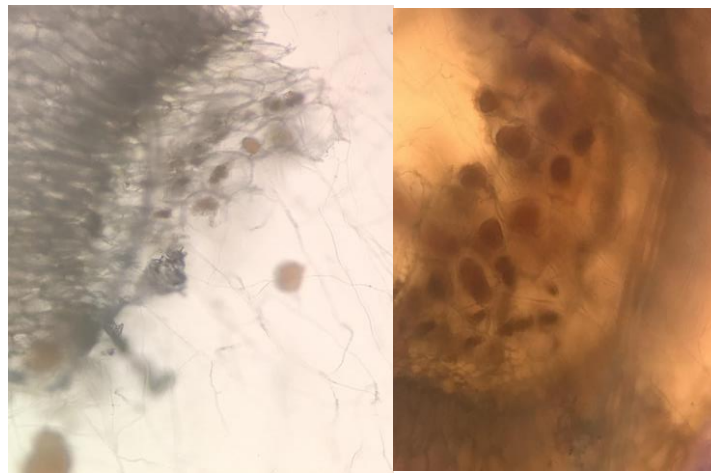


Figura 12. Observación de posibles pelotones bajo el lente 10x. Estructuras de posibles pelotones dentro de las células corticales de la raíz.

Fotografía: Evelyn Chamba y Gabriela Palacios.

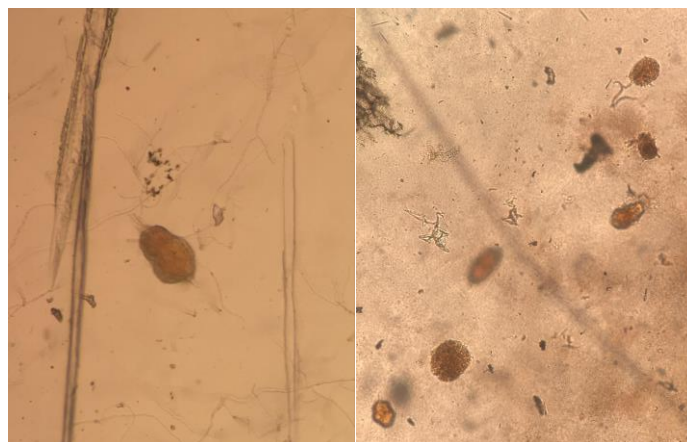


Figura 13. Observación de posibles pelotones bajo el lente 10x. Posibles pelotones sanos con presencia de hifas pequeñas o enrollamientos espirales.

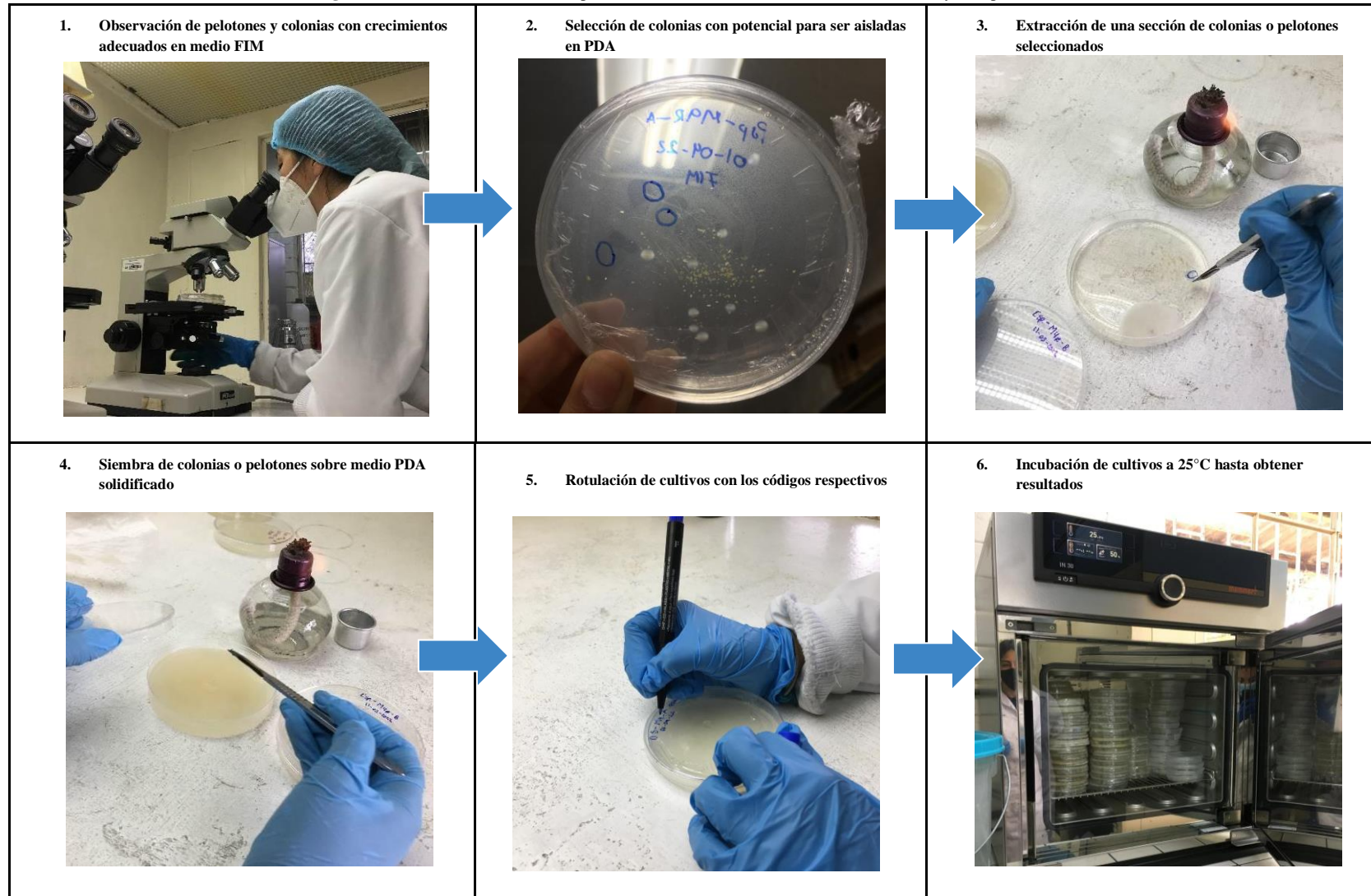
Fotografía: Evelyn Chamba y Gabriela Palacios

4.2.5. Aislamiento de los hongos potencialmente micorrízicos en medio Agar Papa Dextrosa (PDA)

Los hongos con potencial de ser micorrízicos poseen una coloración de micelio blanco-amarillento junto con una consistencia cremosa-algodonosa (Zettler *et al.*, 2013). Por lo tanto, las colonias que presentaron características macroscópicas adecuadas, y aquellas que presentaron las estructuras identificadas como pelotones, se repicaron en el medio Agar Papa Dextrosa (PDA) con el fin de purificar y mantener las colonias. Cabe recalcar que el proceso de aislamiento se efectuó en condiciones de esterilidad, trabajando bajo una cámara de flujo laminar. El procedimiento de aislamiento en PDA se detalla en la figura 14.

Luego de la incubación durante 8 días a 25°C, los resultados de la siembra en PDA se clasificaron en tres categorías diferentes: 1) Cajas Petri aptas para microcultivo por presentar características macroscópicas adecuadas de potenciales HFM; 2) Cajas Petri contaminadas en las que se incluyen cajas con presencia de hongos ambientales y cajas con hongos propios de la microbiota de la raíz, y 3) Cajas Petri sin crecimiento de micelio fúngico.

Figura 14. Proceso de selección de pelotones con adecuado crecimiento en medio FIM y su replante en medio PDA



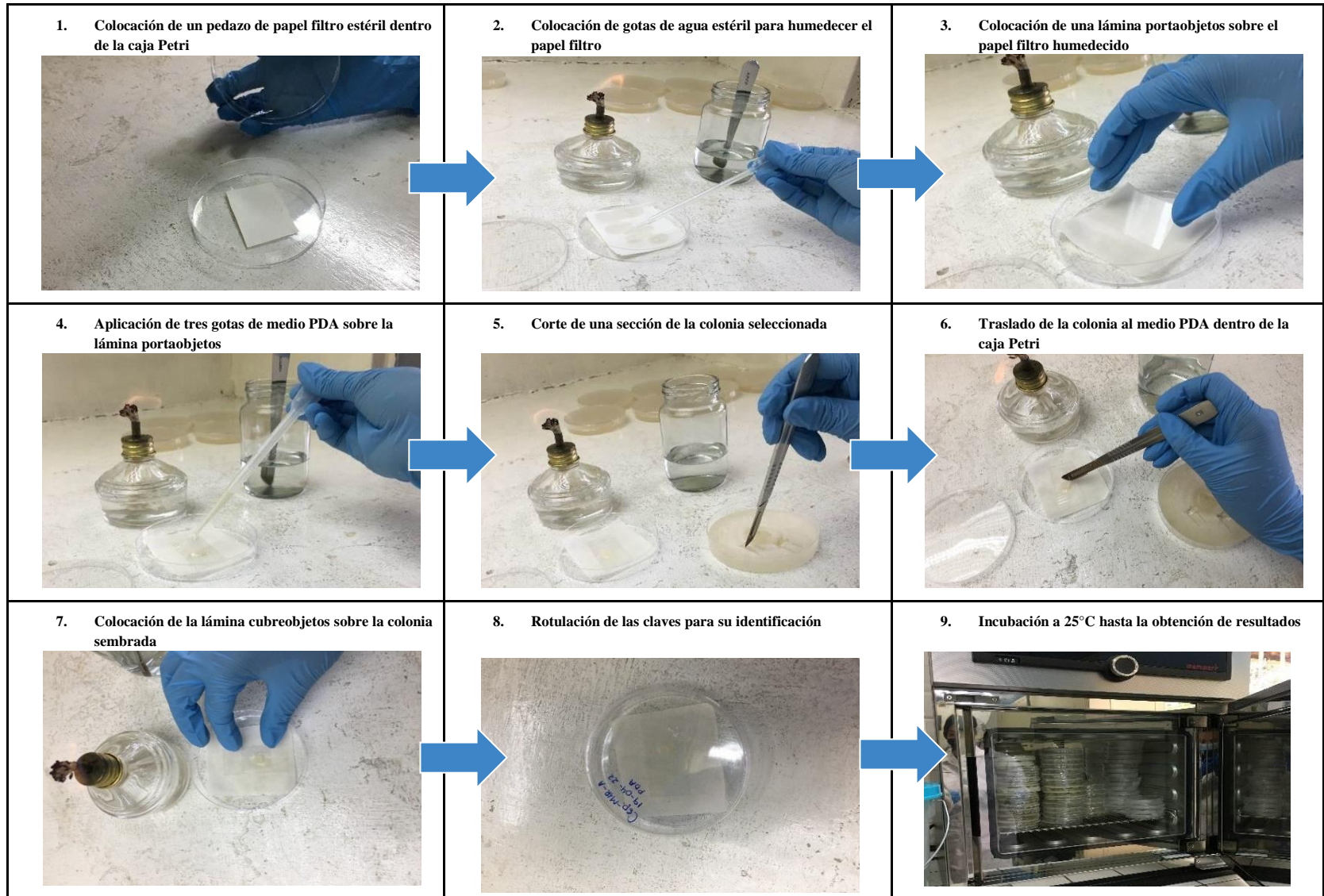
Fuente: Elaboración propia

4.2.6. Microcultivo de colonias de hongos potencialmente micorrízicos

Aquellos hongos cultivados en PDA y seleccionados como potencialmente micorrízicos, por presentar las características macroscópicas típicas del complejo fúngico tipo *Rhizoctonia* sp., se sometieron a una técnica de microcultivo con el fin de poder observar sus estructuras microscópicas. Las cepas con micelio de coloración blanca o parda, textura algodonosa y crecimiento radial, se observaron bajo un lente de 40x, a través del microcultivo, con el fin de identificar características como constricción de los puntos de ramificación de las hifas que forman ángulos rectos y ausencia de conidios (Zettler *et al.*, 2013; Moreno *et al.*, 2014).

El procedimiento consistió en colocar papel filtro humedecido con agua estéril en una caja Petri, sobre este se dispuso una lámina portaobjetos con tres gotas de medio PDA para la siembra de la colonia seleccionada. Finalmente, la colonia fue cubierta con una lámina cubreobjetos para su incubación a 25°C por aproximadamente 8 días. En la figura 15 se puede observar el procedimiento respectivo.

Figura 15. Proceso de aplicación de la técnica de microcultivo a colonias fúngicas con características macroscópicas adecuadas a HFM



Fuente: Elaboración propia

4.2.7. Caracterización de hongos potencialmente micorrízicos

La caracterización de hongos potencialmente micorrízicos se basó en la observación macroscópica y microscópica de las colonias con crecimiento adecuado. Según Fan *et al.* (2021) es necesario tomar en cuenta características macroscópicas como textura del micelio, coloración y morfología de la colonia e hifas que definen a este tipo de hongos. En general, los hongos con potencial de ser micorrízicos presentan un crecimiento circular concéntrico del micelio y en algunos casos sumergido, color blanquecino, textura algodonosa o cremosa, aspecto costroso y presencia de esclerocios, características que se ilustran en la figura 6. Así, cada uno de los cultivos se comparó con los rasgos morfológicos antes mencionados.

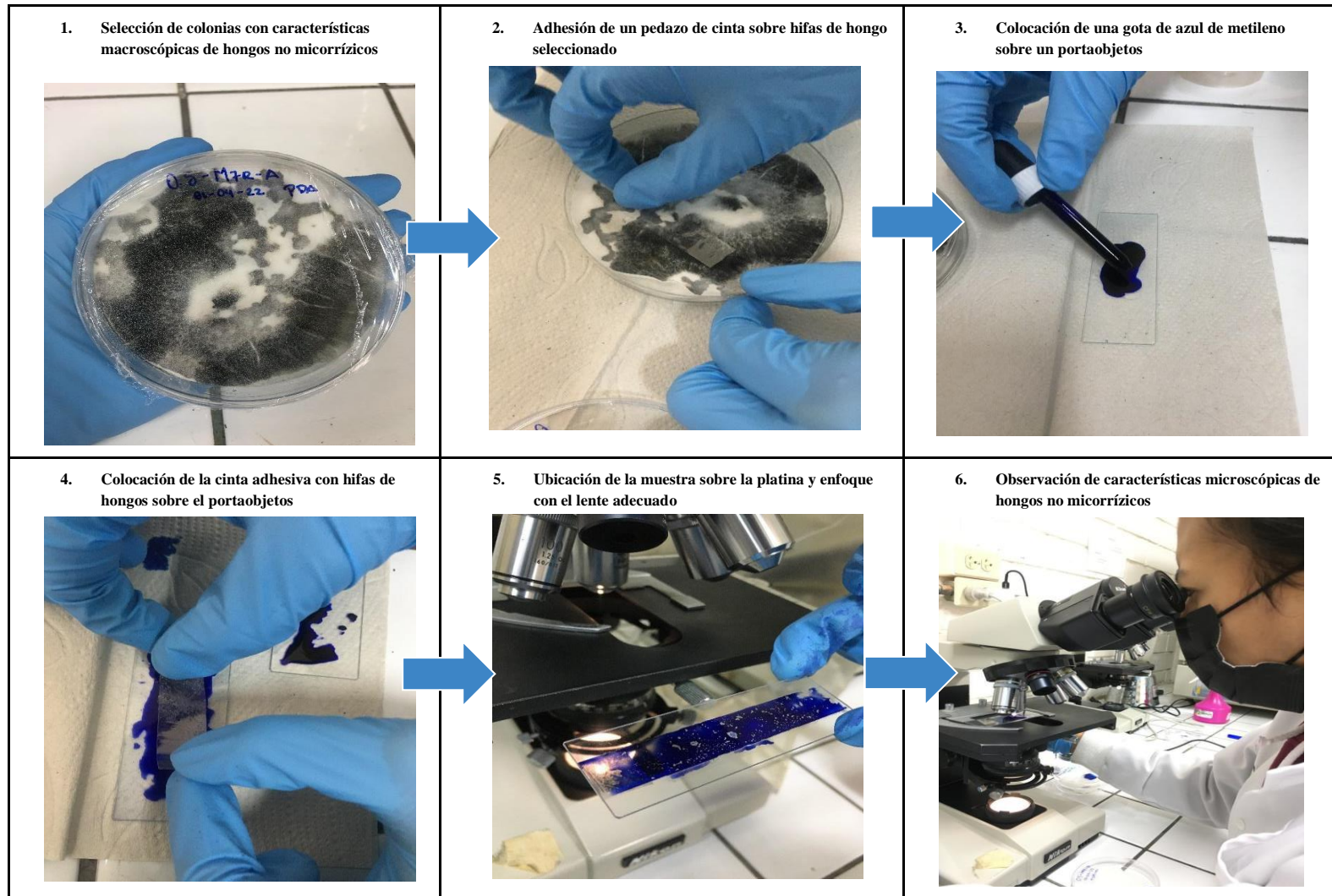
Para la caracterización microscópica de los hongos potencialmente micorrízicos, se observaron bajo un lente de 40x las colonias microcultivadas a partir de los 9 días de incubación. Se consideraron las características microscópicas presentadas en la figura 5, como: ramificación de las hifas en ángulos rectos (90°), hifas gruesas, presencia de núcleos, constricción y septo cerca del punto de ramificación (Barnett & Hunter, 2003; Alomía, 2014) para la identificación respectiva.

Los resultados obtenidos de la caracterización macroscópica y microscópica de hongos potencialmente micorrízicos se presentan en la figura 26.

4.2.8. Identificación y descarte de hongos no micorrízicos

La identificación de hongos no micorrízicos se realizó a través de una prueba de cinta, con ello se confirmó el descarte de colonias que macroscópicamente no mostraron características de hongos micorrízicos. La metodología se basó en colocar un pedazo de cinta adhesiva transparente sobre el micelio de la colonia, esta muestra fue colocada sobre una lámina portaobjetos con una gota de azul de metileno diluido (1 %), finalmente se identificó con el lente objetivo adecuado (40x) las posibles colonias con características inadecuadas para el fin del estudio. Este procedimiento se puede observar en la figura 16.

Figura 16. Proceso de descarte de hongos no micorrízicos a través de la prueba de cinta



Fuente: Elaboración propia

CAPÍTULO V

5. RESULTADOS

5.1. Cultivo de raíces de las tres orquídeas muestreadas sobre medio FIM

5.1.1. Colonización de pelotones extraídos desde las raíces de las *Pleurothallis sp.*, *Odontoglossum pardinum*, *Cyrtochilum sp.* en medio de cultivo FIM

El 37,28 % de todos los cultivos en cajas Petri en medio FIM (n=180) presentaron pelotones fúngicos, por lo que fueron seleccionados para el realizar un replante posterior en medio PDA. El 62,72 % restante de cultivos en cajas Petri con FIM fue descartado por no presentar colonización de pelotones fúngicos o por presentar colonias de hongos con características diferentes a los HFM (tabla 4).

Tabla 4. Cantidad de cajas Petri con colonización de estructuras de posibles pelotones extraídos de las raíces de las orquídeas epífitas y cajas Petri descartadas

Especie de Orquídea	Número de fragmentos radiculares sembrados *	Cajas con presencia de pelotones	Cajas descartadas	
			Cajas contaminadas	Cajas sin pelotones
<i>Pleurothallis sp.</i>	60	28	16	16
<i>Odontoglossum pardinum</i>	60	20	28	12
<i>Cyrtochilum sp.</i>	60	19	37	4
TOTAL	180	67	81	32

Fuente: Elaboración Propia

* En el número de fragmentos radiculares sembrados están consideradas las réplicas por especie

La tendencia en los resultados muestra que en las tres especies de orquídeas existió un descarte de cajas mayor al 50 % por no contar con estructuras de pelotones o por presentar hongos que no entran en el objetivo del estudio. Los cultivos extraídos desde la especie de orquídea *Pleurothallis sp* (n=60) tuvieron mayor porcentaje de cajas Petri con establecimiento de pelotones, mientras que los cultivos extraídos desde la especie de orquídea *Cyrtochilum sp* (n=60) tuvieron el menor porcentaje (figura 17).

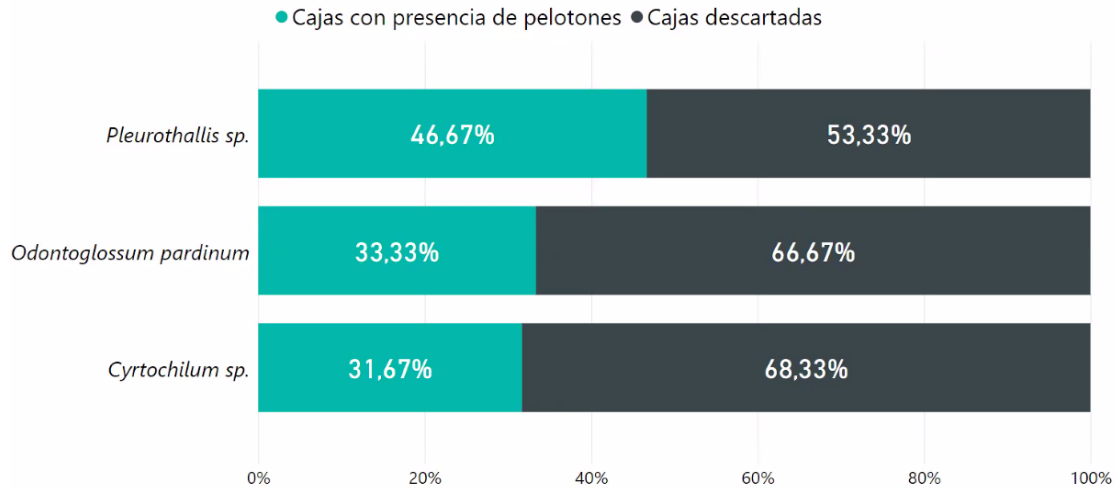


Figura 17. Porcentaje de cajas Petri con colonización de pelotones en medio FIM y cajas descartadas por especie de orquídea epífita
Fuente: Elaboración propia

5.1.2. Secciones radiculares colonizadas por pelotones extraídos desde las raíces de las tres especies de orquídeas epífitas en medio de cultivo FIM

La sección A (basal) de la raíz tuvo el mayor porcentaje de cultivos con presencia de pelotones (27 cajas), en comparación con la sección B (media) y sección C (apical) con 25 y 15 cajas respectivamente (figura 18). Es decir, mientras más cerca del pseudobulbo se tome la muestra de raíz, mayor es la colonización de pelotones. Además, se puede apreciar que la diferencia del porcentaje de cajas con presencia de pelotones es mínima entre la sección A (basal) y B (media).

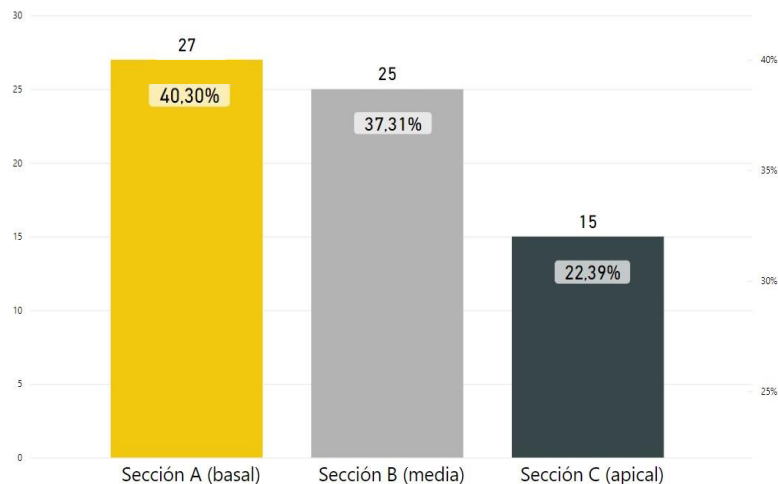


Figura 18. Porcentaje de cajas Petri con colonización de pelotones por sección radicular: sección A (basal), sección B (media) y sección C (apical)
Fuente: Elaboración propia

Los resultados de la caracterización de los hongos potencialmente micorrízicos se dividen en dos etapas. En primer lugar, se presentan los resultados de la caracterización macroscópica de las potenciales cepas de HFM aislados de las tres especies de orquídeas (aptas para microcultivo) (sección 5.2), para luego proceder a un análisis conjunto de sus características macroscópicas y microscópicas que permita definir en efecto las cepas de potenciales HFM (sección 5.3).

5.2. Cultivo de hongos con características macroscópicas adecuadas de hogos formadores de micorriza en medio PDA

5.2.1. Colonización de hongos con características macroscópicas de potenciales especies fúngicas formadoras de micorrizas aislados de las raíces de las orquídeas *Pleurothallis* sp., *Odontoglossum pardinum* y *Cyrtochilum* sp. en medio de cultivo PDA

El 49,25 % de los replantes tuvo características macroscópicas de hongos micorrízicos por lo que fueron considerados como aptos para microcultivo (figura 19). El porcentaje restante se dividió entre cajas sin crecimiento de micelio y cajas contaminadas o con presencia de hongos sin características macroscópicas adecuadas a potenciales HFM.

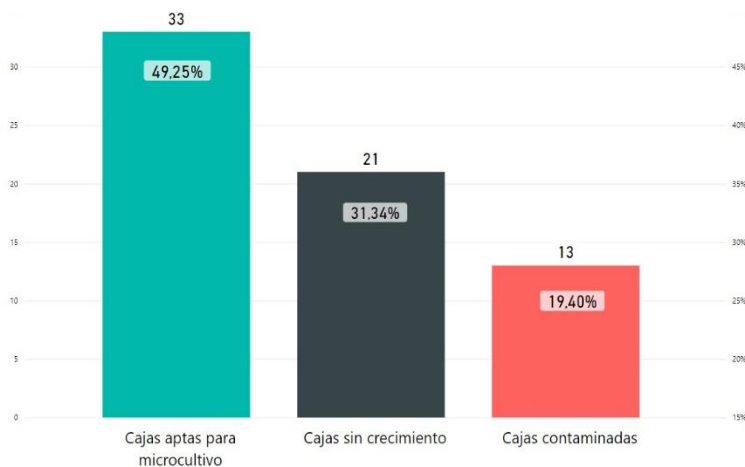


Figura 19. Porcentaje de cajas Petri aptas para microcultivo por tener colonización de hongos con características macroscópicas de potenciales HFM en medio PDA

Fuente: Elaboración propia

La orquídea *Cyrtochilum* sp. fue la especie que proporcionó la mayor cantidad de cajas aptas para microcultivo, seguido de la especie *Odontoglossum pardinum* con una diferencia mínima. Si bien la especie *Pleurothallis* sp. obtuvo la mayor cantidad de replantes en PDA por presentar el porcentaje de pelotones más alto, la mayoría de cultivos no tuvieron crecimiento fúngico, por lo que no resultaron hongos con características macroscópicas adecuadas (figura 20) Más de la mitad de los replantes en PDA realizados para *Cyrtochilum* sp. y *Odontoglossum pardinum*, resultaron apropiados para microcultivo por presentar un crecimiento de micelio fúngico adecuado. En cuanto al porcentaje de

cajas contaminadas, se puede observar que las tres especies de orquídeas presentaron una tendencia similar (figura 20).

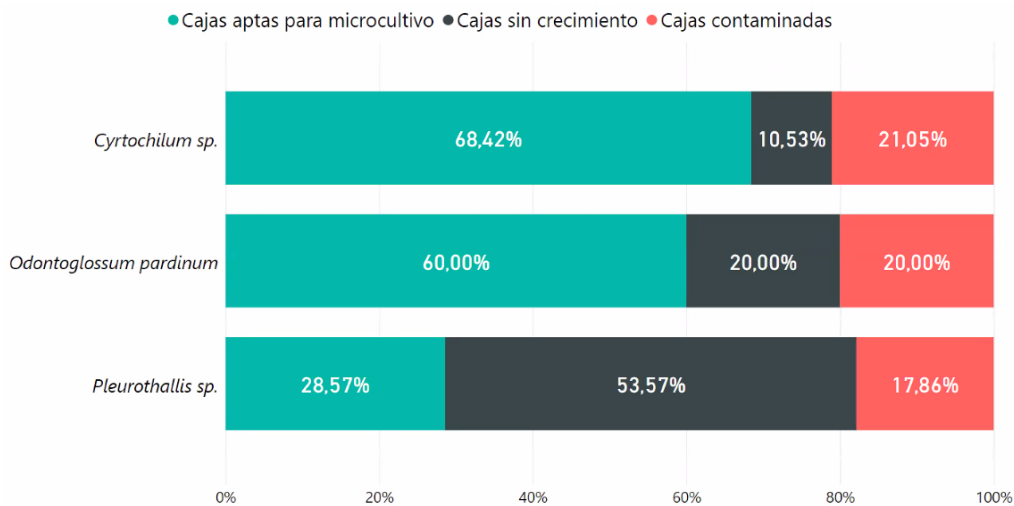


Figura 20. Porcentaje de cajas Petri aptas para microcultivo por colonización de hongos con características adecuadas de HFM, cajas Petri sin crecimiento y cajas Petri contaminadas, para cada especie de orquídea epífita
Fuente: Elaboración propia

5.2.2. Secciones radiculares con colonización de hongos macroscópicamente adecuados como potenciales especies fúngicas formadoras de micorriza aislados de las raíces de las tres especies de orquídeas epífitas en medio de cultivo PDA

El mayor porcentaje de cajas aptas para microcultivo se obtuvo de la sección B (media), aun cuando la sección A (basal) tuvo ligeramente la mayor cantidad de cajas con presencia de pelotones. Sin embargo, la diferencia entre el porcentaje de cajas con crecimiento de micelio adecuado para microcultivo entre la sección A (basal) y B (media) no es muy significativa (figura 21).

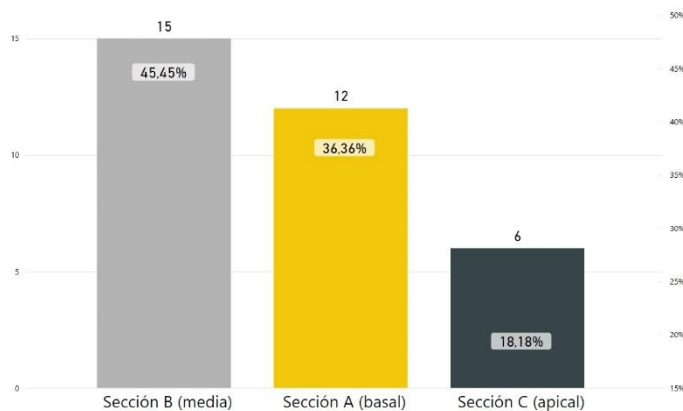


Figura 21. Porcentaje de colonización de hongos macroscópicamente adecuados como HFM por sección radicular: sección A (basal), sección B (media) y sección C (apical)
Fuente: Elaboración propia

5.3. Cultivo de hongos con características macroscópicas y microscópicas adecuadas de hongos formadores de micorriza

5.3.1. Colonización de potenciales hongos formadores de micorriza aislados de las especies de orquídeas *Pleurothallis* sp., *Odontoglossum pardinum* y *Cyrtorchilum* sp.

Luego del análisis morfológico de las características microscópicas a través de la técnica de microcultivo se logró discernir entre aquellas cepas que, aunque macroscópicamente tenían aspecto del complejo fúngico tipo *Rhizoctonia*, microscópicamente sus características no eran las adecuadas (Anexo 2 - tabla 7). Así, de las 33 cajas Petri analizadas en microcultivo, el 57,57 % (19 cajas) resultó ser cepas de hongos potencialmente micorrízicos, mientras que el porcentaje restante fue descartado.

Al realizar el análisis macroscópico y microscópico de forma conjunta, la especie *Odontoglossum pardinum* resultó ser la orquídea con mayor cantidad de posibles HFM con 47,36 % (9 cajas). Por el contrario, la especie *Pleurothallis* sp. fue la orquídea con menor número de cepas de hongos aisladas con un 15,80 % correspondiente a 3 cajas (figura 22).

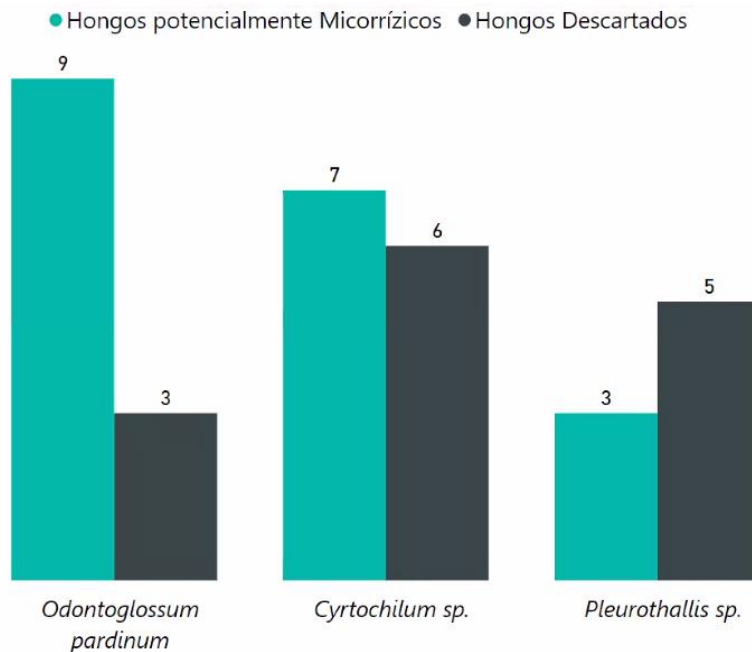


Figura 22. Cantidad de potenciales hongos formadores de micorriza y hongos descartados por especie de orquídea epífita
Fuente: Elaboración propia

5.3.2. Secciones radiculares con colonización de potenciales hongos formadores de micorriza aislados de las tres especies de orquídeas epífitas

El mayor porcentaje de potenciales HFM (47,37 % o 9 cajas) proviene de la sección B (media). Lo que coincide con los resultados anteriores, en los que la mayor cantidad de cepas aptas para microcultivo se originaron de esta sección. El 31,58 % (6 cajas) de cepas de hongos resultaron de la sección A (basal) y el 21,05 % (4 cajas) de la sección C (apical) (figura 23). Es decir, existe mayor colonización de potenciales HFM, evidenciado por la presencia de pelotones en estado activo, en la zona de la raíz que se encuentra en contacto directo con el sustrato.

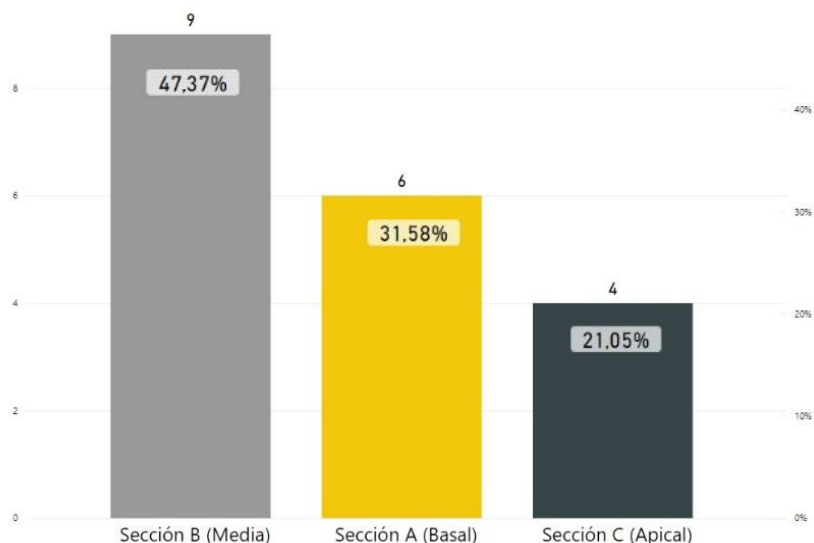


Figura 23. Porcentaje de potenciales hongos formadores de micorriza aislados por sección radicular: sección A (basal), sección B (media) y sección C (apical) de las orquídeas epífitas

Fuente: Elaboración propia

5.4. Posibles géneros de las cepas con características de HFM encontradas en las raíces de las orquídeas epífitas

Se emplearon las pautas de caracterización macroscópica y microscópica definidas por Fan *et al.* (2021), Barnett & Hunter (2003) y Alomía (2014) para determinar los posibles géneros micorrízicos a los que pertenecen las cepas aisladas. Los resultados de la caracterización de las 19 cajas Petri con potenciales HFM, demuestran que el mayor número de especies de hongos aislados pertenecen al posible género *Ceratobasidium* con un 47,36 % (9 cajas). El 42,10 % (8 cajas) de cepas aisladas posiblemente pertenecen al género *Tulasnella* y el 10,54 % (2 cajas) al género *Sebacina* (figura 24).

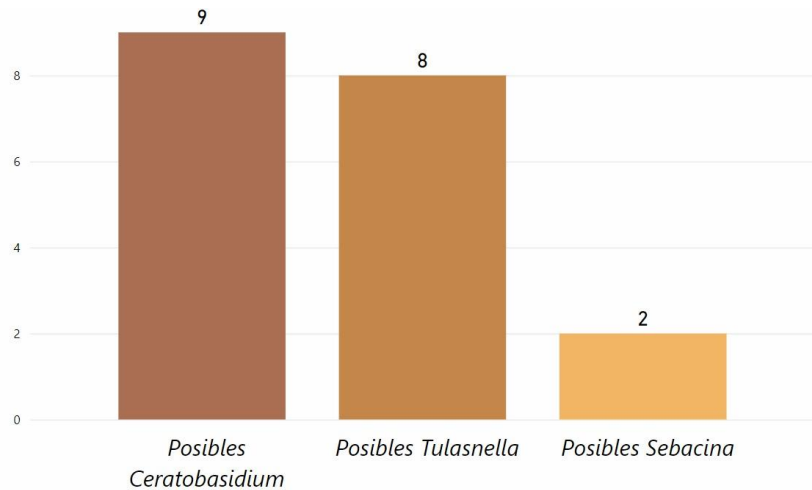


Figura 24. Porcentaje de posibles géneros de las cepas con características de HFM aislados de las tres especies de orquídeas epífitas
Fuente: Elaboración propia

En los cultivos examinados (n=19) se encontraron colonias correspondientes a tres géneros de microorganismos con características de HFM, siendo posiblemente estos *Ceratobasidium*, *Tulasnella* y *Sebacina*. Las colonias con aspecto de los géneros *Ceratobasidium* y *Tulasnella* estuvieron presentes en las raíces de las tres especies de orquídeas. Mientras que las colonias con aspecto del género *Sebacina* estuvieron presentes exclusivamente en las raíces de las especies de orquídea *Cyrtochilum* sp (figura 25). En la figura 26 se presenta la caracterización microscópica y macroscópica de las 19 cepas de hongos potencialmente micorrízicos aislados de las tres orquídeas epífitas.

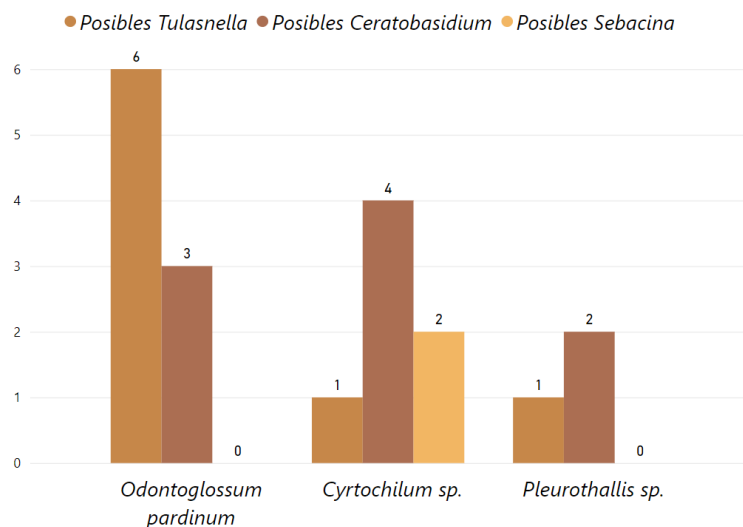

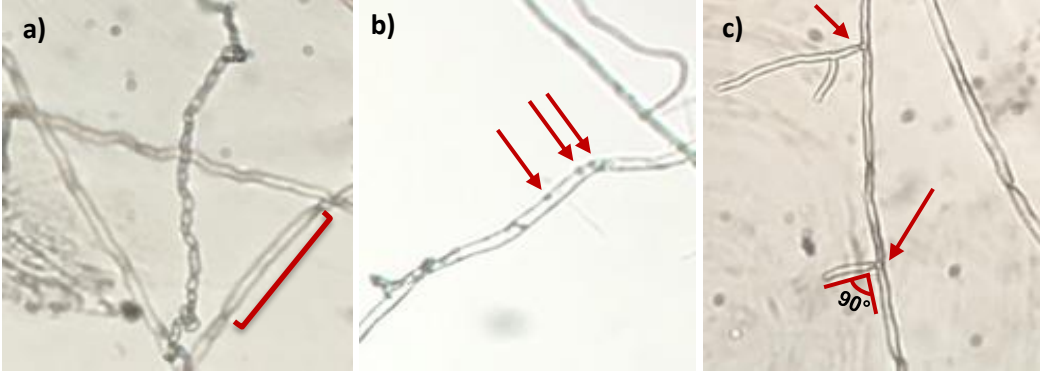
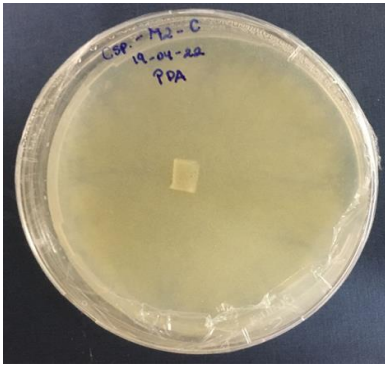
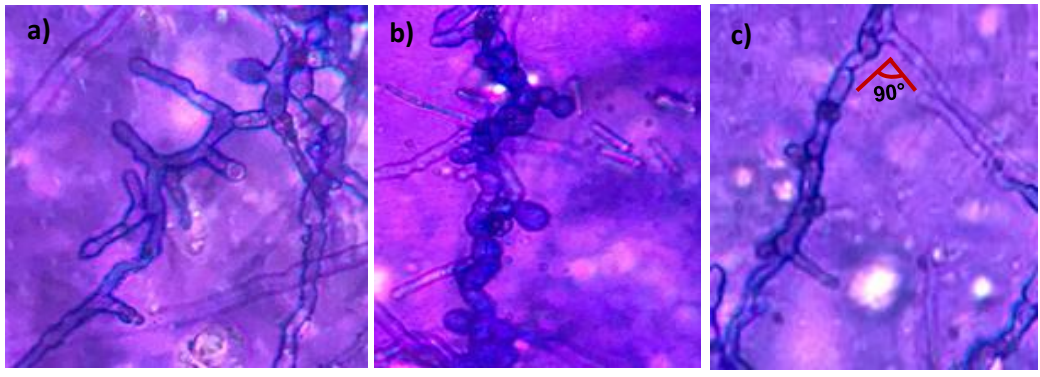

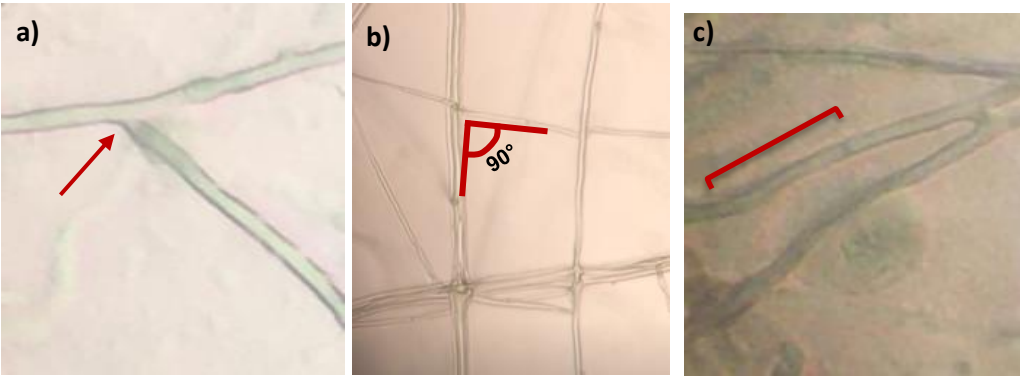
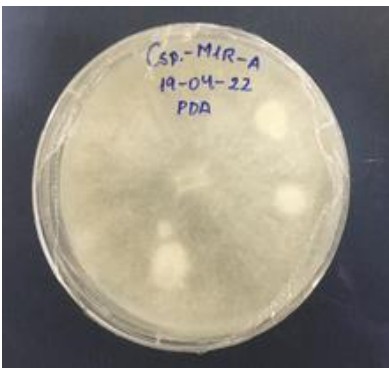
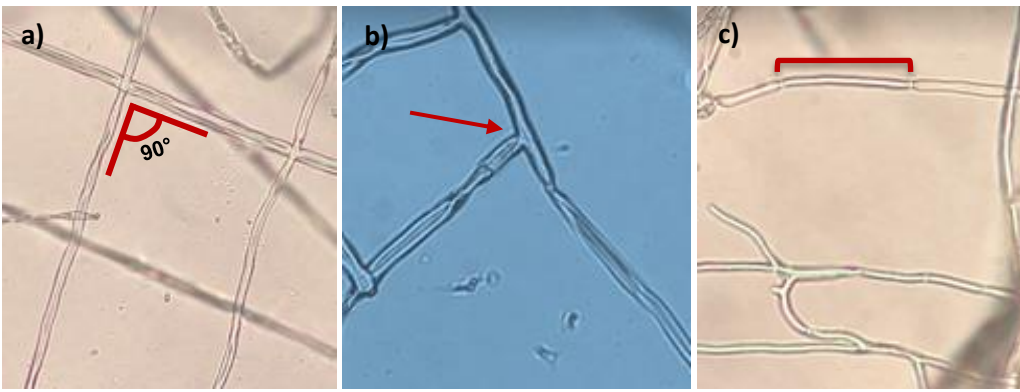

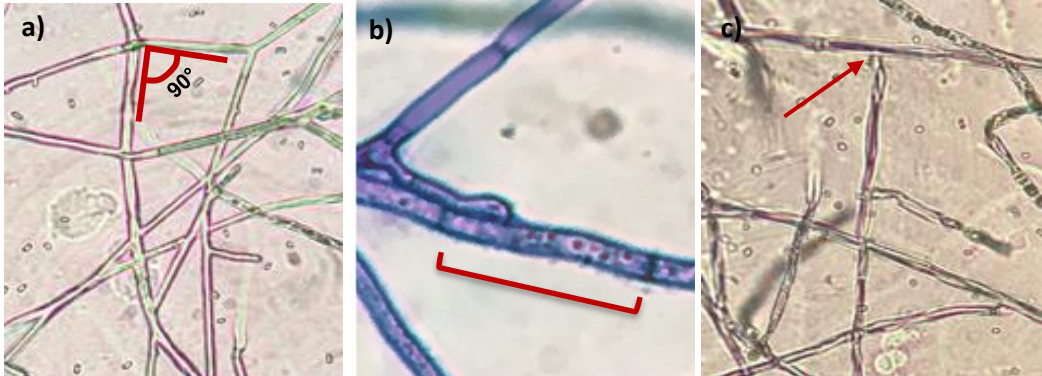
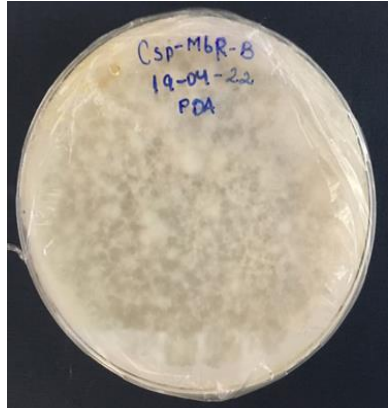
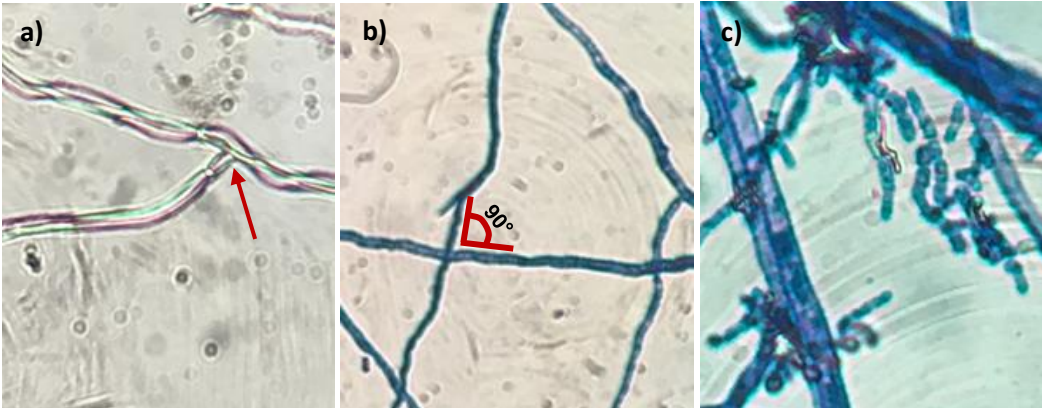



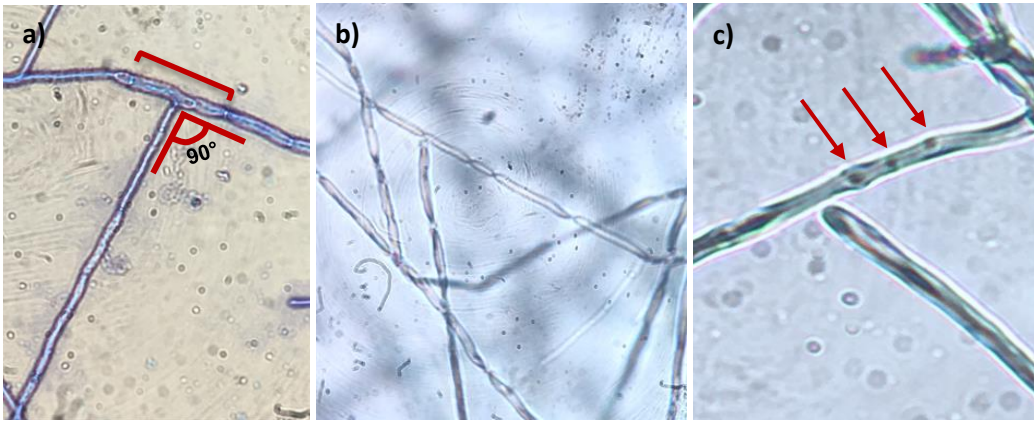
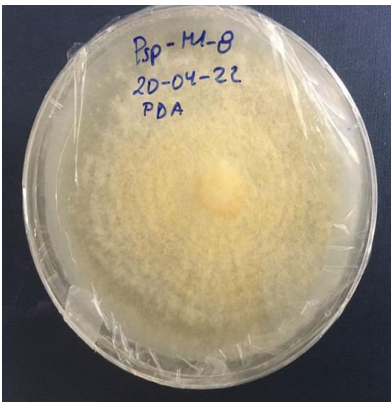
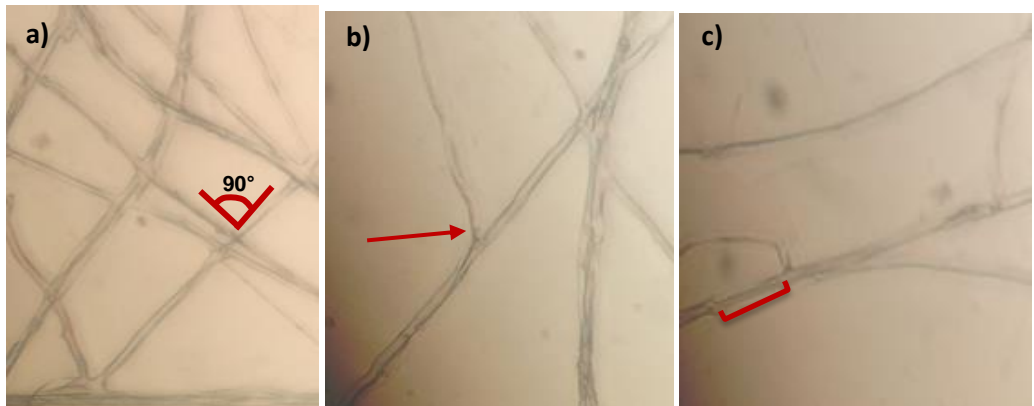
Figura 25. Cantidad de posibles géneros de hongos micorrízicos aislados de las raíces de las orquídeas *Pleurothallis* sp., *Odontoglossum pardinum* y *Cyrtochilum* sp.
Fuente: Elaboración propia

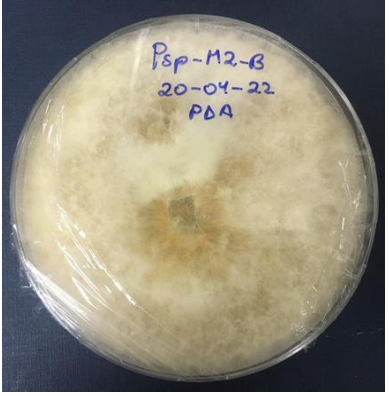
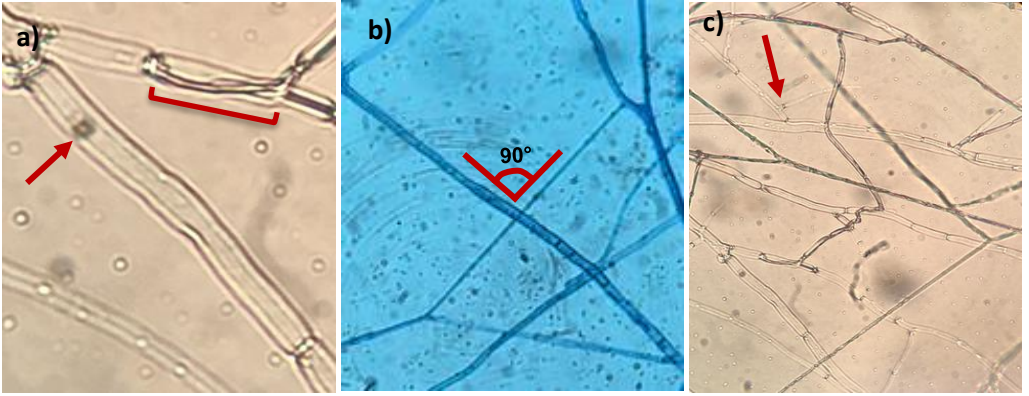
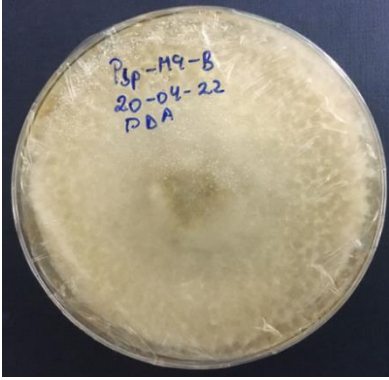
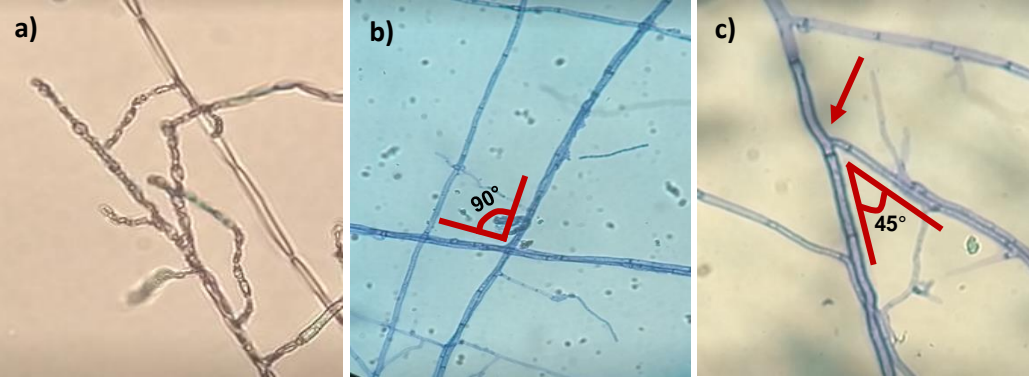
Figura 26. Características microscópicas y macroscópicas de hongos potencialmente micorrízicos aislados de las raíces de orquídeas *Pleurothallis* sp., *Odontoglossum pardinum* y *Cyrtorchilum* sp.

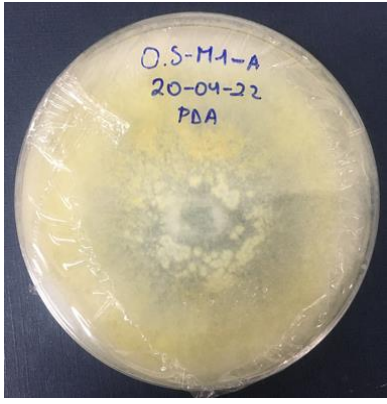
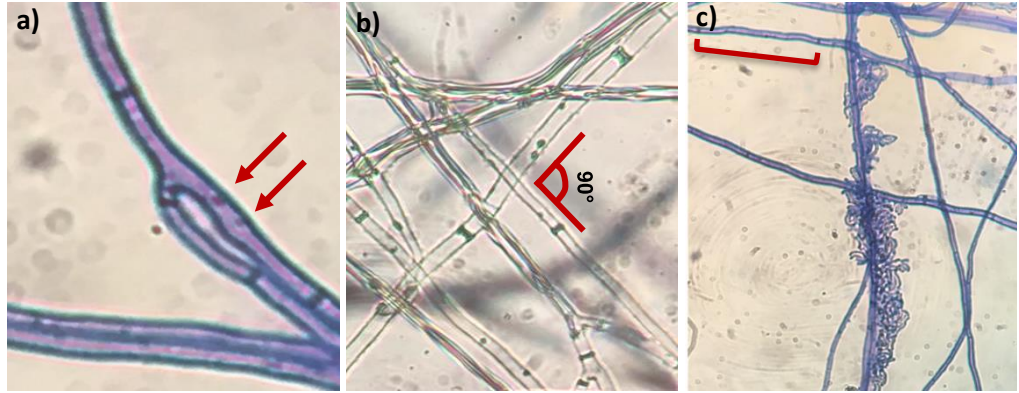

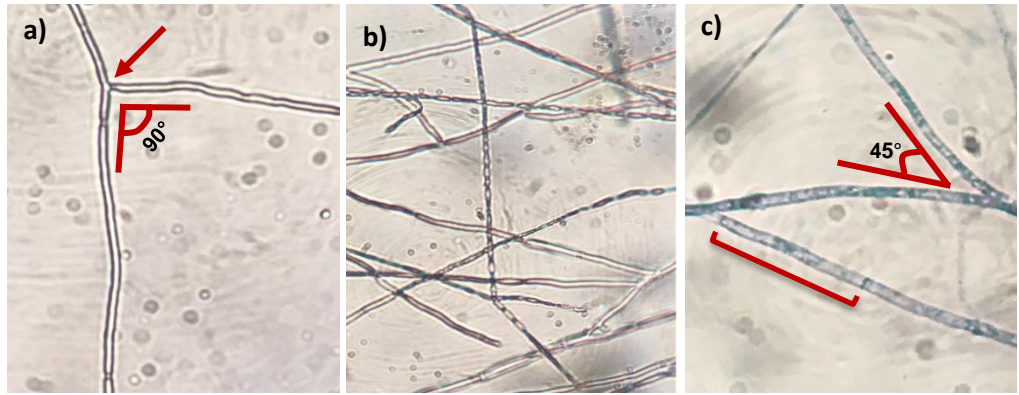
CÓDIGO	COLONIA MEDIO PDA	MICROCULTIVO (Lente 40x)
<p>Especie: <i>Cyrtorchilum</i> sp.</p> <p>Código: Csp - M1 - C</p>	 <p>Coloración del micelio: Blanco</p> <p>Posible género micorrízico: <i>Ceratobasidium</i> sp.</p>	 <p>Descripción Microscópica: presencia de células monillioides e hifas muy septadas (a), se aprecian hifas septadas binucleadas y multinucleadas (b), con punto de constricción en las ramificaciones en ángulos de 45° y 90° (c).</p> <p>Descripción Macroscópica: colonia grande con textura muy algodonosa y crecimiento radial y formación de anillos.</p>
<p>Especie: <i>Cyrtorchilum</i> sp.</p> <p>Código: Csp - M2 - C</p>	 <p>Coloración del micelio: Coloración Parda</p> <p>Posible género micorrízico: <i>Sebacina</i> sp.</p>	 <p>Descripción Microscópica: hifas cortas y muy septadas (a), gran presencia de células monillioides (b), con ángulos de 90° en algunas ramificaciones (c).</p> <p>Descripción Macroscópica: colonia grande con límite definido, textura cremosa y de coloración parda, con crecimiento radial.</p>

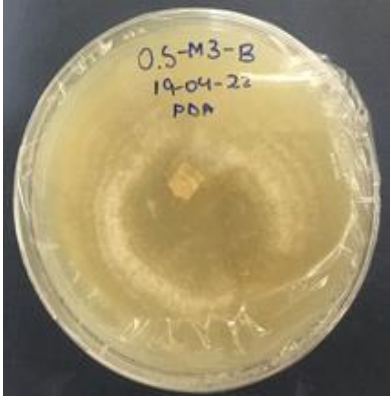
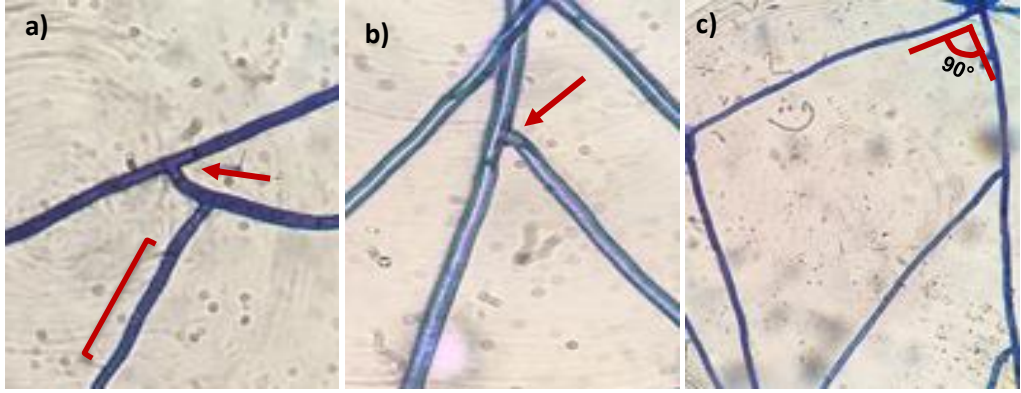
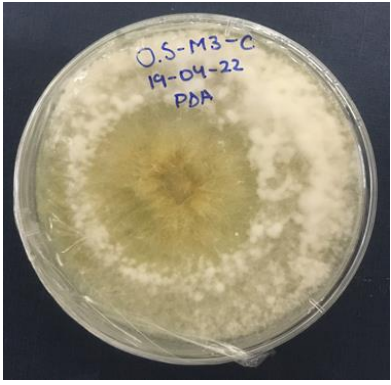
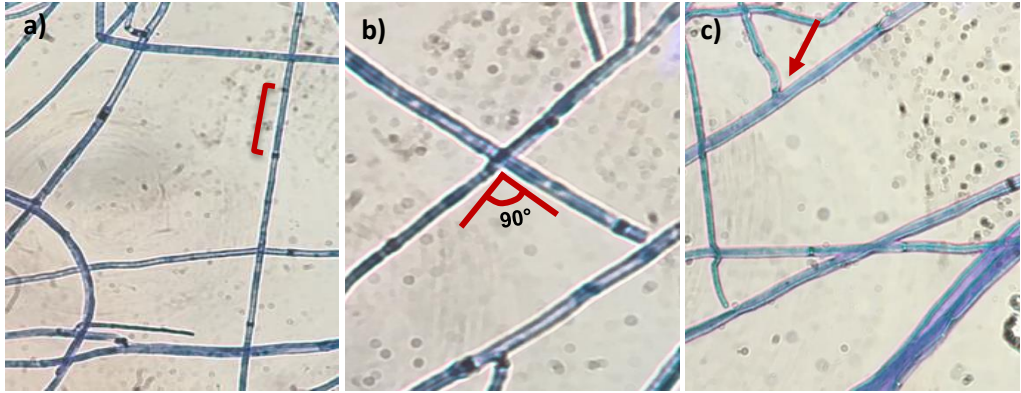
<p>Especie: <i>Cyrtochilum</i> sp.</p> <p>Código: Csp - M7 - B</p>		
	<p>Coloración del micelio: Blanco</p> <p>Posible género micorrízico: <i>Sebacina</i> sp.</p>	<p>Descripción Microscópica: constricción en el punto de ramificación (a), con ángulos de 90° y 45° en las ramificaciones (b), con hifas largas y septadas (c),</p> <p>Descripción Macroscópica: colonia pequeña con límite muy definido y textura cremosa en el micelio.</p>
<p>Especie: <i>Cyrtochilum</i> sp.</p> <p>Código: Csp - M1R - A</p>		
	<p>Coloración del micelio: Blanco</p> <p>Posible género micorrízico: <i>Tulasnella</i> sp.</p>	<p>Descripción Microscópica: ángulos de 90° en las ramificaciones (a), constricción y septo cerca del punto de ramificación (b), hifas largas y septadas (c).</p> <p>Descripción Macroscópica: colonia grande con micelio de textura algodonosa y crecimiento con formación de tiras.</p>

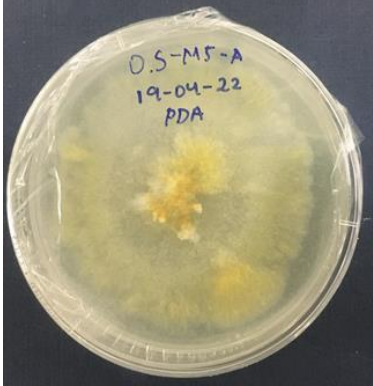
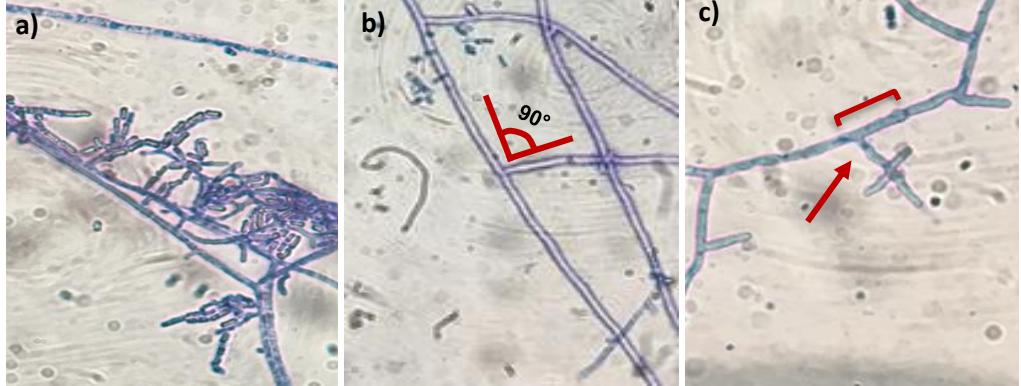
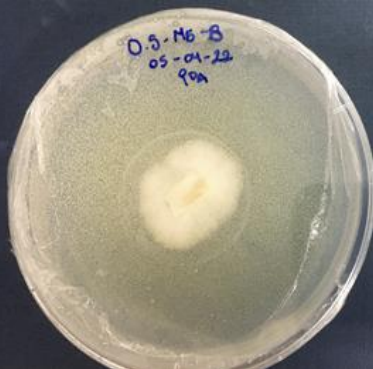
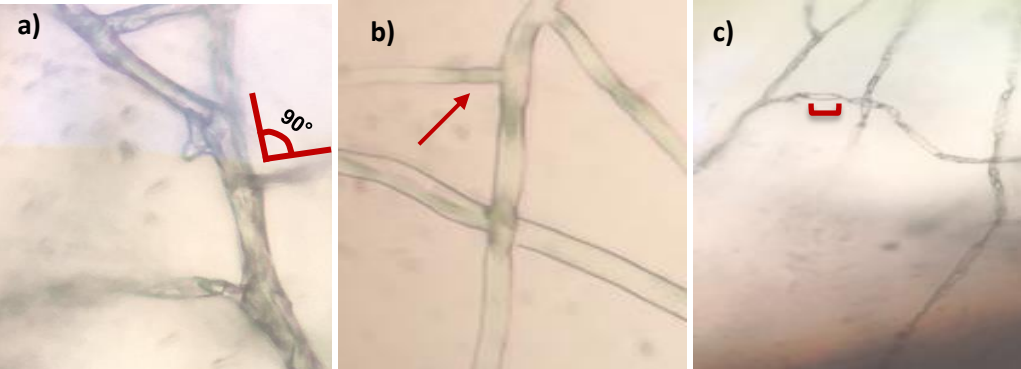
<p>Especie: <i>Cyrtochilum</i> sp.</p> <p>Código: Csp - M6R - A</p>		 <p>Coloración del micelio: Blanco</p> <p>Posible género micorrízico: <i>Ceratobasidium</i> sp.</p> <p>Descripción Microscópica: hifas cortas y con ángulos de 90° en puntos de ramificación (a), hifas con presencia de septos (b) y constricción y septos cerca del punto de ramificación (c).</p> <p>Descripción Macroscópica: colonia grande con micelio de textura algodonosa, con crecimiento de tipo radial.</p>
<p>Especie: <i>Cyrtochilum</i> sp.</p> <p>Código: Csp-M6R-B</p>		 <p>Coloración del micelio: Blanco - Pardo</p> <p>Posible género micorrízico: <i>Ceratobasidium</i> sp.</p> <p>Descripción Microscópica: hifas largas y septadas con septos cerca del punto de ramificación (a), con ángulos de aproximadamente 90° y 45° (b) y presencia de células monillioides (c).</p> <p>Descripción Macroscópica: colonia grande con micelio de textura algodonosa y de crecimiento irregular.</p>

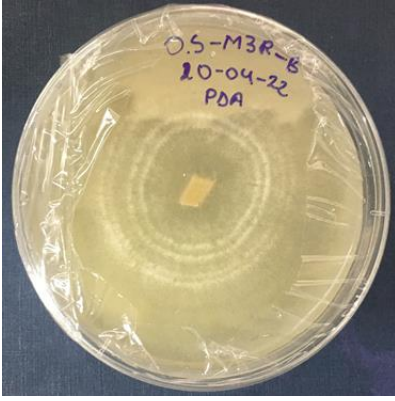
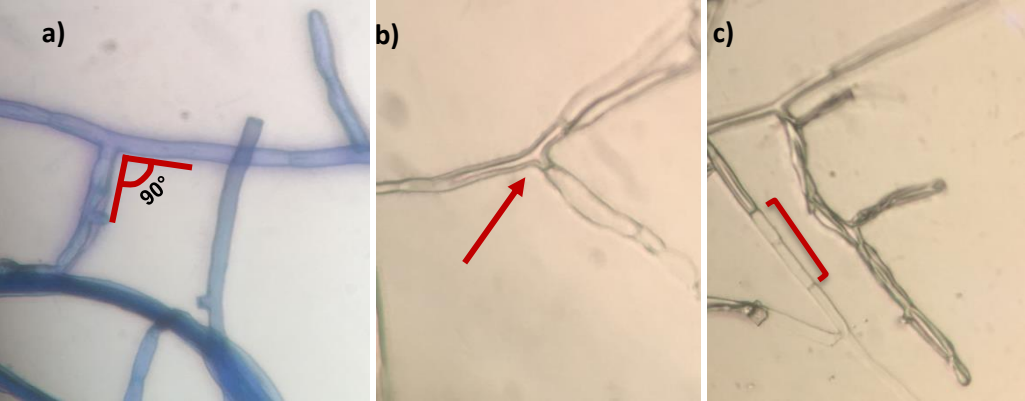
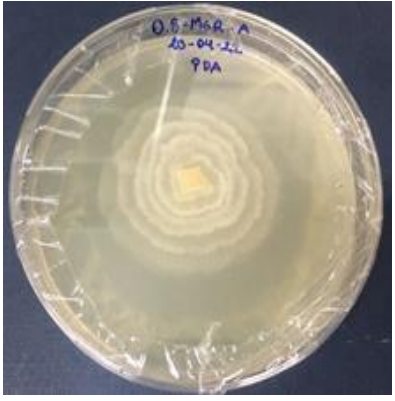
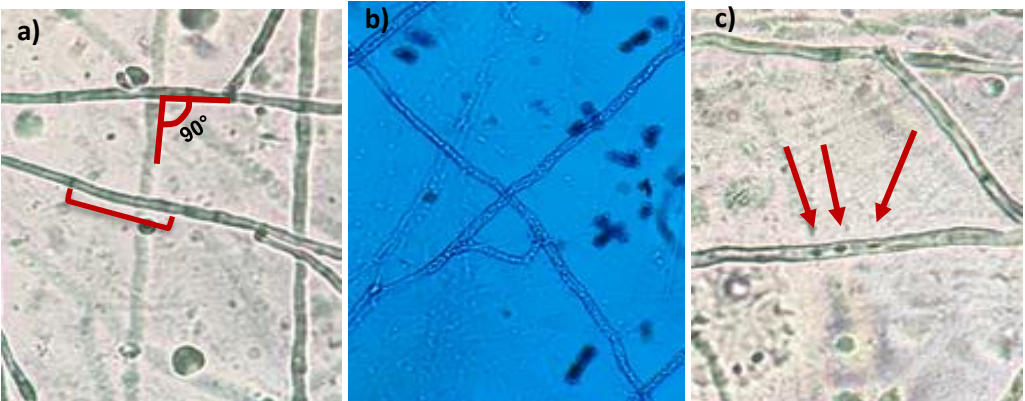
<p>Especie: <i>Cyrtochilum</i> sp.</p> <p>Código: Csp - M9R - A</p>		
	<p>Coloración del micelio: Blanco – Pardo</p> <p>Posible género micorrízico: <i>Ceratobasidium</i> sp.</p>	<p>Descripción Microscópica: hifas con ángulos de aproximadamente 90° en puntos de ramificación (a), hifas largas y septadas (b) y septos multinucleados con constricción en el punto de ramificación (c).</p> <p>Descripción Macroscópica: colonia grande con crecimiento radial y sumergido, aspecto ceroso y esclerocios de aspecto granular.</p>
<p>Especie: <i>Pleurothallis</i> sp.</p> <p>Código: Psp - M1 - B</p>		
	<p>Coloración del micelio: Blanco – Pardo</p> <p>Posible género micorrízico: <i>Tulasnella</i> sp.</p>	<p>Descripción Microscópica: ramificaciones en ángulos de 90° (a), presencia de punto de constricción y septo cerca del punto de ramificación (b) e hifas septadas (c).</p> <p>Descripción Macroscópica: colonia grande ligeramente algodonosa con bordes irregulares, presenta un crecimiento en anillos y ligera formación de costras.</p>

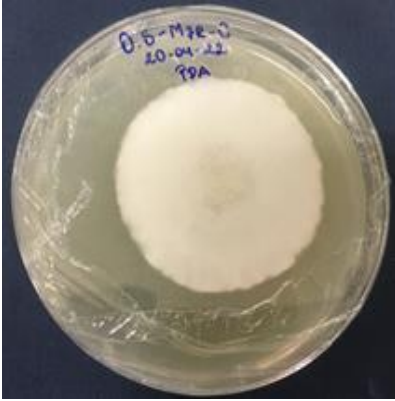
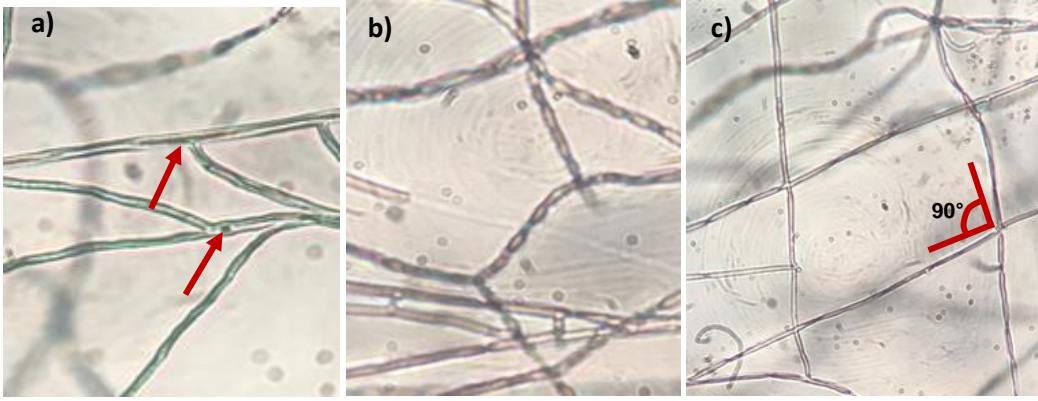
<p>Especie: <i>Pleurothallis</i> sp.</p> <p>Código: Psp - M2 - B</p>		
	<p>Coloración del micelio: Blanco – Pardo</p> <p>Posible género micorrízico: <i>Ceratobasidium</i> sp.</p>	<p>Descripción Microscópica: hifas alargadas con gran cantidad de septos (a y c), y ramificaciones con ángulos de 90° (b). Se observa punto de constricción en las ramificaciones de las hifas (c), presencia de núcleos (a).</p> <p>Descripción Macroscópica: colonia grande de textura aterciopelada con crecimiento irregular sin bordes definidos.</p>
<p>Especie: <i>Pleurothallis</i> sp.</p> <p>Código: Psp - M9 - B</p>		
	<p>Coloración del micelio: Blanco</p> <p>Posible género micorrízico: <i>Ceratobasidium</i> sp.</p>	<p>Descripción Microscópica: hifas muy septadas (c) con ángulos de ramificación de 90° y 45° (b y c). Se observa constricción y septo cerca del punto de ramificación y presencia de células monillioides (a)</p> <p>Descripción Macroscópica: colonia grande de textura algodonosa, bordes ligeramente definidos con crecimiento radial.</p>

<p>Especie: <i>Odontoglossum pardinum</i></p> <p>Código: OS - M1 - A</p>		
	<p>Coloración del micelio: Blanco- Pardo</p> <p>Posible género micorrízico: <i>Tulasnella</i> sp.</p>	<p>Descripción Microscópica: hifas largas binucleadas (a) con gran cantidad de septos (c), y ángulos de ramificación de 90° (b). Se observa punto de contricción y septo cerca de las ramificaciones.</p> <p>Descripción Macroscópica: colonia grande blanquecina en la parte central y color amarillento en los extremos. Posee una textura algodonosa con bordes irregulares y se observa esclerocios de aspecto granular.</p>
<p>Especie: <i>Odontoglossum pardinum</i></p> <p>Código: OS - M1 - B</p>		
	<p>Coloración del micelio: Blanco</p> <p>Posible género micorrízico: <i>Ceratobasidium</i> sp.</p>	<p>Descripción Microscópica: hifas largas muy septadas (b y c) con ángulos de ramificación de 90°(a) y 45° (c). Se observa punto de contricción y septos cerca de las ramificaciones (a)</p> <p>Descripción Macroscópica: colonia grande con textura algodonosa, posee un crecimiento regular con bordes definidos.</p>

<p>Especie: <i>Odontoglossum pardinum</i></p> <p>Código: OS - M3 - B</p>		
	<p>Coloración del micelio: Blanco</p> <p>Posible género micorrízico: <i>Tulasnella</i> sp.</p>	<p>Descripción Microscópica: hifas septadas (a), presencia de septo cerca del punto de ramificación (b), ramificaciones curvadas y algunas presentan ángulos de 90° (c) y 45°.</p> <p>Descripción Macroscópica: colonia de tamaño medio con textura ligeramente algodonosa en los bordes. Se observa un tipo de crecimiento radial con esclerocios de aspecto granular.</p>
<p>Especie: <i>Odontoglossum pardinum</i></p> <p>Código: OS - M3 - C</p>		
	<p>Coloración del micelio: Blanco</p> <p>Posible género micorrízico: <i>Ceratobasidium</i> sp.</p>	<p>Descripción Microscópica: hifas alargadas con gran cantidad de septos (a), y ramificaciones con ángulos de 90° (b). Se observan constricciones en el punto de ramificación (c).</p> <p>Descripción Macroscópica: colonia muy grande de textura algodonosa principalmente en el extremo superior. Presenta un crecimiento en anillos sin bordes definidos, muestra un color amarillento en la parte central y posee esclerocios de aspecto granular.</p>

<p>Especie: <i>Odontoglossum pardinum</i></p> <p>Código OS - M5 - A</p>		
	<p>Coloración del micelio: Parda</p> <p>Posible género micorrízico: <i>Tulasnella</i> sp.</p>	<p>Descripción Microscópica: hifas largas con presencia de septos (c) y ramificaciones con ángulos de 90° (b), se observa la existencia de células monillioides (a). Se aprecia en las hifas constricciones y septos cerca de las ramificaciones (a)</p> <p>Descripción Macroscópica: colonia grande con bordes ligeramente definidos y textura ligeramente algodonosa, posee una coloración amarillenta en los bordes y blanquecina en la parte central y un crecimiento de tipo radial.</p>
<p>Especie: <i>Odontoglossum pardinum</i></p> <p>Código OS - M5 - B</p>		
	<p>Coloración del micelio: Blanco</p> <p>Posible género micorrízico: <i>Tulasnella</i> sp.</p>	<p>Descripción Microscópica: hifas largas y septadas (c) y ramificaciones con ángulos de 90° (a) y 45°. Presencia de constricción en el punto de ramificación (b).</p> <p>Descripción Macroscópica: colonia pequeña de textura ligeramente algodonosa. Posee bordes levemente marcados y un crecimiento radial no bien definido.</p>

<p>Especie: <i>Odontoglossum pardinum</i></p> <p>Código: OS - M3R - B</p>		
	<p>Coloración del micelio: Blanco</p> <p>Posible género micorrízico: <i>Tulasnella</i> sp.</p>	<p>Descripción Microscópica: hifas septadas (c) con punto de constricción en las ramificaciones (b). Se observan algunos ángulos de ramificación de las hifas de 90° (a).</p> <p>Descripción Macroscópica: colonia de tamaño mediano con bordes definidos, se aprecia un crecimiento de tipo radial uniforme en anillos concéntricos.</p>
<p>Especie: <i>Odontoglossum pardinum</i></p> <p>Código: OS - M6R - A</p>		
	<p>Coloración del micelio Blanco</p> <p>Posible género micorrízico: <i>Ceratobasidium</i> sp.</p>	<p>Descripción Microscópica: hifas largas y septadas con ángulos de aproximadamente 90° en los puntos de ramificación (a) y (b), con septos multinucleados (c).</p> <p>Descripción Macroscópica: colonia mediana con bordes definidos y ligeramente algodonosa, crecimiento radial uniforme y formación de anillos de micelio</p>

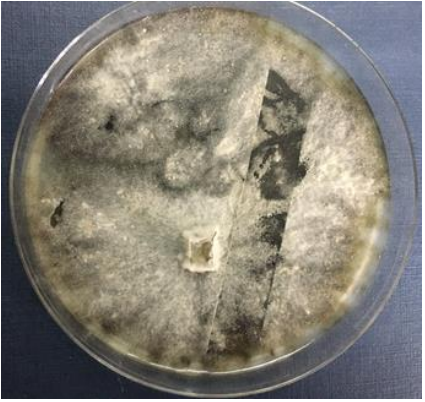
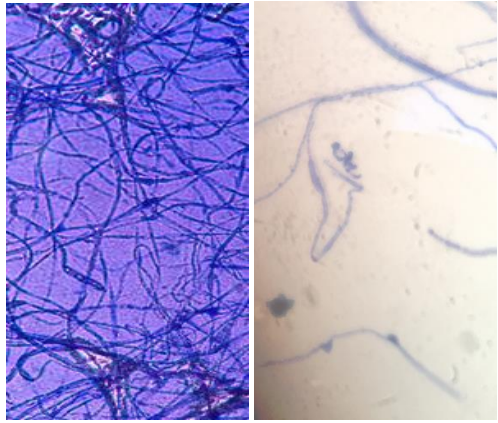
<p>Especie: <i>Odontoglossum pardinum</i></p> <p>Código: OS - M7R - C</p>		
	<p>Coloración del micelio Blanco</p> <p>Posible género micorrízico: <i>Tulasnella</i> sp.</p>	<p>Descripción Microscópica: hifas largas con septos cerca del punto de ramificación (a), presencia de células monillioides (b) y ángulos de aproximadamente 90° entre hifas principales y secundarias (c).</p> <p>Descripción Macroscópica: colonia mediana con bordes definidos y micelio de textura muy algodonosa y esponjosa, crecimiento radial uniforme.</p>

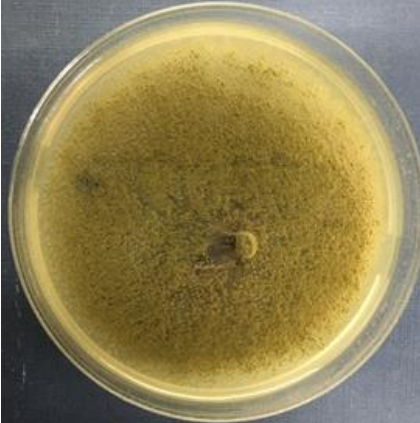
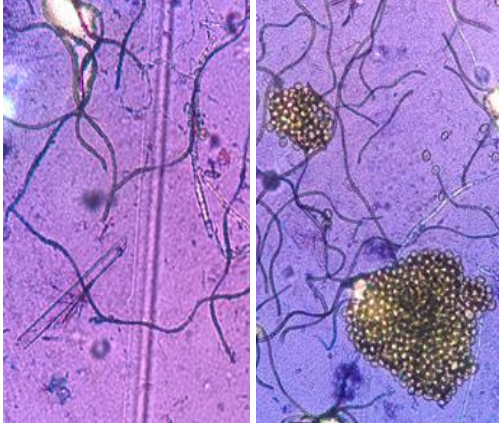
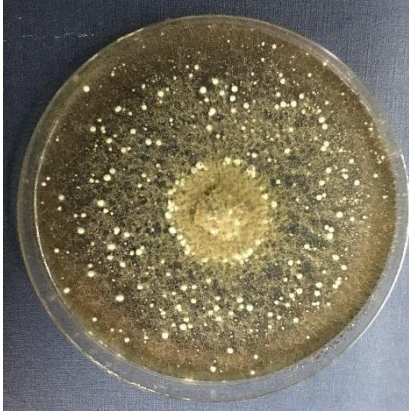
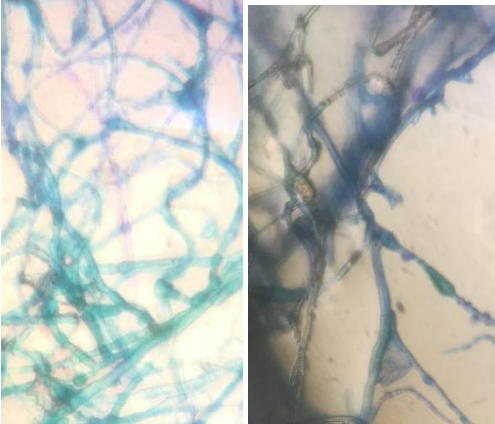
5.5. Identificación y descarte de hongos no micorrízicos

Los resultados de la prueba de identificación de hongos no micorrízicos, basada en las características macroscópicas y microscópicas, arrojaron la presencia de cepas de género *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium* y *Aspergillus*.

Se observó que, dentro de la microbiota de las raíces de las orquídeas, existen otras especies fúngicas diferentes al género *Rizochtonia*, clasificadas como no micorrízicas. En la figura 27 se presentan los resultados de algunas cepas encontradas.

Figura 27. Identificación macroscópica y microscópica de hongos descartados como micorrízicos y contaminados.

Código	Observación Macroscópica	Observación Microscópica
<p>Especie: <i>Cyrtochilum</i> sp.</p> <p>Código: Csp - M7 - A</p>		
	<p>Color del micelio: Color mixto: gris muy pigmentado y blanco.</p> <p>Posible género identificado: <i>Aspergillus</i> sp.</p>	<p>Descripción macroscópica: colonia grande con aspecto ligeramente algodonoso y crecimiento muy irregular.</p> <p>Descripción microscópica: hifas largas y en espiral con presencia de septos.</p>

<p>Especie: <i>Odontoglossum pardinum</i></p> <p>Código: OS - M4R - C</p>		
<p>Color del micelio: Verde oscuro</p> <p>Posible género identificado: <i>Aspergillus</i> sp. - <i>Penicillium</i> sp.</p>	<p>Descripción macroscópica: colonia grande con textura granulosa y formación de especie de costras de crecimiento irregular.</p> <p>Descripción microscópica: hifas largas con presencia de células cortas, de forma oval.</p>	
<p>Especie: <i>Pleurothallis</i> sp.</p> <p>Código: Psp-M3-A</p>		
<p>Color del micelio: Verdoso</p> <p>Posible género identificado: <i>Thioderma</i> sp.</p>	<p>Descripción macroscópica: colonia de crecimiento radial y aspecto ligeramente algodonoso.</p> <p>Descripción microscópica: hifas largas con presencia de clamidosporas. Estructuras de fialides.</p>	

CAPÍTULO VI

6. DISCUSIÓN

Con respecto a los géneros de hongos micorrízicos con mayor porcentaje de aislamiento en Ecuador, se han reportado a *Ceratobasidium* y *Tulasnella* (Ochoa & Guamán, 2016; Bermeo & Sarmiento, 2017). Estos resultados coinciden con los géneros que probablemente se obtuvieron en este estudio, a partir de 19 cepas aisladas, y puede atribuirse a que, en nuestro país, existe una alta riqueza de hongos micorrízicos de la familia Tulasnellaceae y Ceratobasideaceae principalmente en orquídeas epífitas (Guzmán & Moreno, 2014; Li *et al.*, 2021). Por el contrario, el género *Sebacina* es poco frecuente en Ecuador, con una baja diversidad en ecosistemas montanos y subandinos como en donde se ubica el BPA (Sigisfred *et al.*, 2013), lo que explica que solo se hayan obtenidos dos cepas con caracteres morfológicos acordes al género fúngico mencionado.

Dearnaley *et al.* (2012) mencionan que aún se continúa investigando si las comunidades de hongos formadores de micorrizas (HFM) exhiben determinadas tendencias respecto a los gradientes altitudinales. Las posibles cepas de *Ceratobasidium*, *Tulasnella* y *Sebacina* obtenidas en este estudio se aislaron de tres especies de orquídeas epífitas a una altura superior a los 3000 m s.n.m. Los resultados concuerdan con los de Herrera *et al.* (2019), quienes reportan los mismos tres géneros del complejo tipo *Rhizoctonia* en el Parque Nacional El Cajas, a una altitud similar. A pesar de que, en general, hay muy pocos estudios publicados sobre la distribución de HFM en diferentes elevaciones (Geml, 2017), se ha reportado que no existen diferencias significativas respecto a las comunidades de hongos simbiotes con las especies de orquídeas ubicadas en zonas entre los 3000 - 3500 m s.n.m (Cevallos *et al.*, 2018).

Adicionalmente, las propiedades de los árboles hospederos de orquídeas epífitas juegan un importante papel en la abundancia y diversidad de estas plantas y por ende en su microbiota (Orozco *et al.*, 2017). Si bien la mayor parte de la cobertura vegetal del BPA se encuentra dominado por matorral, existen remanentes de bosque con árboles pequeños con un dosel de entre 5 y 10 metros de altura (Loyola, 2019), en donde las epífitas existentes se caracterizan por estar adaptadas a una intensidad lumínica muy baja. Algunos géneros de la subtribu Pleurothallidinae, como *Pleurothallis*, ha sido encontrada en ambientes muy húmedos y con baja intensidad lumínica (Chaparro-Sierra, 2018). Así mismo, los géneros *Cyrtochilum* y *Odontoglossum*, se han encontrado a niveles de dosel similares a los del BPA (Hurtado-Iza, 2017; Loyola, 2019).

De esta manera, las condiciones ambientales del entorno pueden favorecer la actividad de ciertos HFM permitiéndoles obtener más carbono para apoyar el crecimiento de las orquídeas (Shefferson *et al.*, 2019). En el presente trabajo, las raíces fueron recolectadas en el mes de marzo que corresponde a la estación lluviosa, que favorece significativamente la colonización de algunos HFM y la formación de pelotones frescos (Kartzinel *et al.*, 2013; Bertolini *et al.*, 2014). No obstante, Jasinge *et al.* (2018) reconocen la complejidad de la colonización de diversos géneros fúngicos en diferentes periodos estacionales. Al respecto se menciona que la abundancia de la familia Tulasnellaceae aumenta conforme incrementan las precipitaciones, mientras que los hongos del género *Ceratobasidium* son dominantes en hábitats secos (Li *et al.*, 2021).

Otro factor que incide en la presencia de HFM es la etapa de desarrollo de la planta. Estos hongos no solo suministran carbohidratos a los protocormos durante la germinación, sino que también brindan nutrientes e inhiben el desarrollo de patógenos en las plantas adultas (De-Yun *et al.*, 2021; Valadares *et al.*, 2021). En este estudio se muestrearon ejemplares jóvenes de *Odontoglossum pardinum*; mientras que para *Cyrtorchilum* y *Pleurothallis* fueron plantas adultas, pues en este periodo aún existe cierto grado de micotrofia con hongos micorrízicos (Beltrán-Nambo *et al.*, 2018). Por el contrario, también existe evidencia sobre la ausencia de HFM en muestras de raíces de orquídeas maduras, pues estas ya han desarrollado sistemas de raíces bien asociados con su sustrato, volviéndose completamente autosuficientes en este estadio (Yokoya *et al.*, 2021). Sin embargo, el análisis de la interacción de los HFM durante todo el ciclo de vida de la planta, sigue siendo complejo (Jaramillo-Tapia, 2018).

La mayor cantidad de hongos potencialmente micorrízicos fueron aislados de *Odontoglossum pardinum*, en segundo lugar, *Cyrtorchilum* sp., siendo *Pleurothallis* sp. la especie de orquídea epífita con menor porcentaje de aislamiento. Observaciones similares fueron obtenidas por Bermeo & Sarmiento (2017), en donde se analizaron seis especies de orquídeas epífitas de la provincia del Azuay, incluyendo las empleadas en esta investigación. Dichos autores encontraron la mayor cantidad de hongos con características potencialmente micorrízicas en el género *Odontoglossum*. En cuanto al menor porcentaje de potenciales HFM aislados de *Pleurothallis* sp., nuestro resultado se asemeja al de Salazar *et al.* (2020), que compararon la riqueza de hongos asociados a raíces de orquídeas epífitas en dos bosques andinos del sur de Ecuador y obtuvieron porcentajes menores en *Pleurothallis* sp.

Del total de muestras de raíces analizadas, se logró aislar únicamente 19 cepas de potenciales HFM, pues aún se desconoce cuánto tiempo los pelotones pueden permanecer viables en las raíces después

de separarlas de la planta. Sin embargo, existen indicios de que las hifas en los tejidos corticales de las orquídeas pierden viabilidad incluso después de una noche de almacenamiento en el laboratorio (Suárez *et al.*, 2016). Además, encontrar pelotones en condiciones viables es un desafío durante el aislamiento de potenciales HFM (Yokoya *et al.*, 2015). Las 19 cepas aisladas con potenciales HFM aisladas en el presente estudio, resulta ser mínimo en comparación al número de muestras de raíces tratadas, lo que coincide con los trabajos de Suárez (2016), Novotná *et al.* (2018) y Cazar & Pérez (2019), que obtuvieron pocas cepas de potenciales HFM aislados de orquídeas epífitas en bosques ecuatorianos. Estos autores también indican que las especies fúngicas más abundantes durante el aislamiento de potenciales HFM, corresponden a miembros de Ascomycota (*Trichoderma* sp.).

Respecto a la colonización micorrízica en las especies de orquídeas estudiadas, se observó mayor presencia de pelotones en la sección basal de la raíz. Estos resultados son similares a los encontrados por Rendón Lara (2018), Jiménez *et al.* (2018) y Moreno Martínez (2011), quienes indican que la cantidad de pelotones se incrementa al aumentar la madurez de la raíz concentrándose en la región basal. Otros autores mencionan que la colonización depende directamente del contacto con la materia orgánica, por lo que los pelotones en las raíces de orquídeas epífitas se ubican en la región que toca el sustrato; mientras que las raíces aéreas no presentan colonización (Jiménez *et al.*, 2018; De-Yun *et al.*, 2021).

Por otro lado, a pesar de encontrar mayor cantidad de pelotones en la sección basal, la mayoría de las cepas de potenciales HFM se aislaron de la sección media, en todas las especies de orquídeas. Estos resultados coinciden con los de Rendón Lara (2018) en donde los hongos micorrízicos no se desarrollaron a partir de los pelotones aislados, pues posiblemente los pelotones se encontraban digeridos o en proceso de digestión, lo que disminuye su viabilidad de reproducción por la ausencia de hifas (Kunga *et al.*, 2014).

Generalmente, la identificación de hongos en el complejo fúngico tipo *Rhizoctonia* ha sido problemática debido a que no es común que los aislamientos en cultivo *in vitro* produzcan micelio reproductivo (Zettler & Corey, 2018). La tasa de crecimiento y el aspecto de las colonias resultaron ser factores diferenciadores importantes entre los principales géneros de potenciales HFM aislados en nuestro estudio, puesto que permitió clasificarlos en sus posibles géneros del complejo tipo *Rhizoctonia*. Los mismos caracteres morfológicos han sido empleados por Beltrán-Nambo *et al.* (2018), Montes, (2016) y Mosquera *et al.* (2010) para la asignación de géneros micorrízicos a cepas de hongos aisladas de diferentes orquídeas.

En cuanto al análisis del porcentaje de cajas contaminadas principalmente para *Odontoglossum pardinum* y *Cyrtochilum* sp., es correcto atribuir la supuesta contaminación y presencia de endófitos no micorrízicos a la propia microflora de las raíces de orquídeas (De-Yun *et al.*, 2021). Específicamente los géneros *Trichoderma* y *Fusarium*, encontrados durante el aislamiento de potenciales HFM, también han sido reportados en los estudios de Bermeo & Heras, (2019), Cueva, (2014), Novotná *et al.* (2018) y Yokoya *et al.* (2021) como endófitos no micorrízicos de orquídeas. Se ha demostrado que estas especies fúngicas promueven la germinación temprana de semillas de ciertas especies de orquídeas (Li *et al.*, 2021), contribuyen a tolerar el estrés hídrico y generan protección ante otros patógenos (Teixeira-Da Silva *et al.*, 2015; Salazar, 2017). Por ende, las cepas obtenidas para los géneros *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*, catalogadas como contaminación al no entrar en el objetivo del presente estudio, son más bien cultivos de hongos propios de las raíces de orquídeas.

CAPÍTULO VII

7. CONCLUSIONES

La metodología propuesta por Zettler. (2013) permitió el aislamiento e identificación morfológica de cepas puras de hongos potencialmente micorrízicos de las raíces de tres especies de orquídeas epífitas: *Odontoglossum pardinum*, *Cyrtochilum* sp. y *Pleurothallis* sp., nativas del Bosque Protector Aguarongo. Los posibles géneros aislados del complejo fúngico tipo *Rhizoctonia* fueron *Ceratobacidium* y *Tulasnella* de las tres plantas epífitas, mientras que el posible género *Sebacina* únicamente fue aislado de *Cyrtochilum* sp.

El mayor porcentaje de hongos potencialmente micorrízicos fue aislado de raíces de plantas de la especie *Odontoglossum pardinum*. Esto puede atribuirse a que, al estar en sus primeras etapas de crecimiento, tienen mayor dependencia del socio fúngico para su adaptación y desarrollo. Este hecho sugiere que existe una relación directa entre la abundancia fúngica de las raíces de las orquídeas y su etapa de ciclo de vida.

Se encontró mayor colonización micorrízica, evidenciada por la presencia de pelotones, en la sección basal (A) de las raíces; sin embargo, de la sección media (B) se obtuvo el más alto número de cepas potencialmente micorrízicas. Esto puede ser el resultado de una densa acumulación de pelotones en avanzado estado de digestión en la parte cercana a la base del pseudobulbo. Mientras que la sección media, aunque con una menor colonización, los pelotones se encontraron intactos.

Los resultados encontrados en esta investigación aportan al conocimiento de la biodiversidad fúngica del BPA, uno de los *hotspots* más biodiversos de Ecuador. Lo que evidencia que esta zona alberga taxones de hongos conocidos por ser beneficiosos para la vida de las orquídeas y por ende su protección es de suma importancia para la conservación de estas especies comúnmente amenazadas.

Finalmente, los hongos potencialmente micorrízicos aislados en esta investigación impulsan a la diversificación de banco de hongos micorrízicos de la provincia del Azuay contribuyendo a las técnicas de conservación *ex situ* de especies de orquídeas.

CAPÍTULO VIII

8. RECOMENDACIONES

La fase de recolección de las raíces de orquídeas, así como su posterior desinfección y lavado constituye una importante etapa previa al aislamiento eficaz de hongos potencialmente micorrízicos. Por ende, se recomienda trabajar bajo altas condiciones de esterilidad disminuyendo posibilidades de contaminación microbiológica.

Debido a la influencia de las condiciones ambientales en la presencia de potenciales HFM en orquídeas, se recomienda replicar el estudio considerando dos épocas de muestreo (invierno y verano). Lo que permitirá conocer más a profundidad el comportamiento de las comunidades fúngicas ante escenarios cambiantes de clima.

Es importante evaluar la eficacia de los hongos aislados en el presente estudio en la germinación simbiótica con semillas viables de orquídeas. Se recomienda que se compruebe la eficacia de germinación con especies de orquídeas que estén en alto grado de amenaza, para con ello promover su recuperación y conservación.

Se recomienda para futuras investigaciones emplear técnicas que apliquen la filogenia molecular que confirmen la presencia de las cepas aisladas pertenecientes al complejo fúngico tipo *Rhizoctonia*.

CAPÍTULO IX

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alghamdi, S. (2019). Influence of mycorrhizal fungi on seed germination and growth in terrestrial and epiphytic orchids. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(3), 495-502. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.10.021>
- Alomía, Y. A. (2014). *Hongos micorrízicos en Vanilla spp. (Orchidaceae) y su potencial para la germinación de semillas*. [Tesis previa a la obtención del título de Magíster en Ciencias Biológicas]. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- Andrade-Torres, A. (2010). Micorrizas: Antigua Interacción entre plantas y hongos. *Ciencia*, 84.
- Apolo-Moreno, K. V. (2021). *Evaluación de procedimientos en la conservación y germinación in vitro de semillas de la orquídea Epidendrum nocturnum*. [Tesis de grado previa a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo]. Universidad agraria del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrarias.
- Barnett, H. y Hunter, B. (2003). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Minesota: Prentice-Hall
- Beltrán, N. M. (2010). *Aislamiento y caracterización de hongos micorrízicos asociados a orquídeas terrestres del género Bletia (Orchidaceae) en la Reserva Natural Barranca del Cupatitzio, del Mpio. de Uruapan Michoacán*. [Tesis de grado previa a la obtención del título de máster en Ciencias Biológicas]. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Biología.
- Beltrán-Nambo, M., Montero-Castro, J. C., Martínez-Trujillo, M., Salgado-Garciglia, R., Otero-Ospina, J. T., & Carreón-Abud, Y. (2018). Characterization of mycorrhizal fungi of the genus *Tulasnella* (Tulasnellaceae, Basidiomycota) in the genus of orchids *Bletia* from Barranca del Cupatitzio Natural Reserve, Mexico. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 75(2). doi:<https://doi.org/10.3989/ajbm.2491>
- Bermeo-Avenidaño, M., & Heras Solís, P. (2019). *Caracterización taxonómico-funcional de hongos endófitos de raíces de Cyrtochilumgyriferum y Elleanthus amethystinoides que se desarrollan en Ocotea infrafoveolata van der Werff y Weinmannia fagaroides Kunth*. [Tesis de grado previa a la obtención del título de Ingeniera Agrónoma]. Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias.

- Bermeo, T. F., & Sarmiento, J. M. (2017). *Aislamiento y purificación de hongos micorrízicos asociados a seis especies de orquídeas de la parroquia Molleturo (Azuay) en un piso altitudinal de 1400 a 1800 m s.n.m.* [Tesis previa a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico]. Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas.
- Bertolini, V., Cruz, J., Damon, A., & Valle, J. (2014). Seasonality and mycorrhizal colonization in three species of epiphytic orchids in southeast Mexico. *Acta Botánica Brasilica*, 28(4), 512-518. doi:10.1590/0102-33062014abb34
- Blanco, K. N. (2020). *Comunicación Científica sobre orquídeas del Complejo Volcánico Doña Juana - Cascabel, Las Mesas, Nariño*. Portafolio de Ecología Histórica y Memoria Social (EHMS): Universidad de los Andes
- Blanco, F. A y Salas, E. (1997). Micorrizas en la agricultura: contexto mundial e investigación en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 21(1), 55- 67.
- Calva-Cabrera, P. V., & Amari Malla, J. L. (2017). *Estudio de la influencia de cepas de hongos micorrízicos de orquídeas en crecimiento y desarrollo de las plántulas de algunas especies de orquídeas epífitas en condiciones de laboratorio*. [Trabajo previo a la obtención del Título de Bioquímico Farmacéutico]. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Camargo, S. L., Montaña, N., De la Rosa, C. J., & Montaña, A. A. (2012). Micorrizas: una gran unión debajo del suelo. *Revista UNAM*, 13(7).
- Cameron D. D., Johnson I., Leake J. R., & Read D. J. (2007). Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *Ann Bot*, 99,831–834.
- Cando-Naula, M. P., & Cárdenas Pugo, M. V. (2017). *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]. Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas.
- Castellanos, C., & Torres, M. (2018). *Orquídeas de Cundinamarca: conservación y aprovechamiento sostenible*. Bogotá: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica.

- Cavero, M., Collantes, B., & Patroni, C. (1991). Orquídeas del Perú, Centro de Datos Para la Conservación del Perú. Lima.
- Cazar Iza, M., & Pérez Reyes, D. (2019). *Identificación molecular de hongos endófitos y micorrícicos presentes en la relación simbiótica de la especie Caucaea pichinchae (Orchidaceae) con su respectivo hospedero*. [Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingenieras en Biotecnología de los Recursos Naturales]. Universidad Politécnica Salesiana.
- Cerna, M. (2019). *Revisión de las especies latinoamericanas de orquídeas del género Dracula mediante la técnica molecular barcode*. [Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales]. Universidad Politécnica Salesiana.
- Cevallos, S., Declerck, S., & Suárez, J. P. (2018). In situ Orchid Seedling-Trap Experiment Shows Few Keystone and Many Randomly Associated Mycorrhizal Fungal Species During Early Plant Colonization. *Front. Plant Sci.*, 16. doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01664>
- Cevallos, S., Herrera, P., Sánchez, A., Declerck, S., & Suárez, J. P. (2018). Untangling factors that drive community composition of root associated fungal endophytes of Neotropical epiphytic orchids. *Fungal Ecology*, 34, 67-75. doi:<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.05.002>
- Chaparro-Sierra, O. S. (2018). *Estructura de la comunidad de Orquídeas Orchidaceae en tres coberturas vegetales en un ecosistema Altoandino, Boyacá, Colombia*. [Trabajo de grado para optar al título de biólogo]. Universidad de La Salle, Escuela de Ciencias Básicas y Aplicadas.
- Chase, M., Kenneth, C., John, F., Alec, P., Salazar, G., Berg, C., & Schuiteman, A. (2015). An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 177, 151–174.
- Chávez, H., Mosquera, A., & Otero, J. (2015). Propagación *in vitro* de semillas de la orquídea *Comparettia falcata* Poepp. & Endl. (Orchidaceae) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas. *Acta Agronómica*, 64(2), 125-133. doi:<http://dx.doi.org/10.15446/acag.v64n2.42976>
- CONABIO. (2011). La biodiversidad en Veracruz: Estudio de Estado. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Gobierno del Estado de Veracruz, Universidad Veracruzana, Instituto de Ecología, A.C. México.

- Cozzolino, S., & Widmer, A. (2005). Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecology & Evolution*, 20(9), 487-494. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.06.004>
- Crespo-Santander, A. P., & Ortega Guaricela, M. B. (2015). *Aislamiento de micorrizas y evaluación de la germinación simbiótica de las semillas de las Orquídeas en el orquideario de la Universidad de Cuenca*. [Tesis de grado previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico]. Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas, Escuela de Bioquímica y Farmacia.
- Cruz, J. B. (2014). *Desarrollo de una trampa in situ para el Aislamiento Micorrízico de Una Orquídea Epífita del Parque Nacional el Tepozteco*. [Tesis de grado para obtener el título de Licenciatura en Biología]. Universidad Autónoma de México, Facultad de estudios superiores Zaragoza.
- Cueva, A. (2014). *Caracterización molecular de hongos micorrízicos aislados a partir de cuatro especies de orquídeas epífitas, en dos pisos altitudinales de bosque montano*. [Trabajo de fin de Titulación]. Área Biológica. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Dearnaley, J., Martos, F., & Selosse, M. (2012). Orchid Mycorrhizas: Molecular Ecology, Physiology, Evolution and Conservation Aspects. *The Mycota*, 9, 207-230. doi:10.1007/978-3-642-30826-0_12
- Delgado-Castro, D. P. (2019). *Evaluación de germinación y desarrollo de dos especies del género Epidendrum (Orchidaceae), Cundinamarca, Colombia*. [Tesis de grado previo a la obtención de título de Biólogo]. Universidad Militar Nueva Granada.
- Delgado, E., Valdez, A., Covarrubias, S., Tosi, R., & Nicola, L. (2021). Soil Fungal Diversity of the Aguarongo Andean Forest (Ecuador). *Biología*, 10(12), 1289. doi:<https://doi.org/10.3390/biology10121289>
- Del Corral, V. H., Sucoshañay, D., Álvarez, L., & Castro, P. (2017). La actividad ecoturística y su incidencia en la conservación ambiental del Jardín Botánico Las Orquídeas del sector Los Ángeles de Puyo, Pastaza, Ecuador. *Revista interamericana de ambiente y turismo*, 13(2), 129-137. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-235X2017000200129>

- De-Yun, C., Xin-Ju, W., Tai-Qiang, L., Neng-Qi, L., & Jiang-Yun, G. (2021). In situ seedling baiting to isolate plant growth-promoting fungi from *Dendrobium officinale*, an over-collected medicinal orchid in China. *Global Ecology and Conservation*, 28.
- Djordjević, V., & Tsiftsis, S. (2019). The Role of Ecological Factors in Distribution and Abundance of Terrestrial Orchids. *Orchids Phytochemistry, Biology and Horticulture*, 1-71. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-030-11257-8_4-1
- Durán, M. E., Caroca, R., Jahreis, K., Narváez, M., Ansaloni, R., & Cazar, M. E. (2019). The micorrryzal fungi *Ceratobasidium* sp. and *Sebacina vermifera* promote seed germination and seedling development of the terrestrial orchid *Epidendrum secundum* Jacq. *South African Journal of Botany*, 125, 54-61. doi:<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.06.029>
- Duque, P., Cajamarca, R., Wemple, B., & Delgado, M. (2019). Estimación del Balance Hídrico de una Cuenca Andina. *LA GRANJA: Revista de Ciencias de la Vida*, 29(1), 56-69. doi:<http://doi.org/10.17163/lgr.n29.2019.05>
- Endara, L. (2009). Orquídeas endémicas del Ecuador. Patrones generales de endemismo.
- Endara, L. (2018). Familia: Orchidaceae. En S. León, R. Valencia, N. Pitman, L. Endara, C. Ulloa, & H. Navarrete, *Libro Rojo de las plantas endémicas del Ecuador*.
- Fan-Tian, Xiao-Feng Liao, Lian-Hui Wang, Xin-Xiang Bai, Yan-Bin Yang, Zai-Qi Luo & Feng-Xia Yan (2021): Isolation and identification of beneficial orchid mycorrhizal fungi in *Paphiopedilum barbigerum* (Orchidaceae), *Plant Signaling & Behavior*, DOI: 10.1080/15592324.2021.2005882
- Farfán, F., Parra, P., & Arichavala, D. (2017). Bromeliads of the Aguarongo Protective Forest-Ecuador and Adaptation to Climate Change. *Journal of Engineering and Applied Sciences*, 12(6), 1619-1622. doi:10.36478/jeasci.2017.1619.1622
- Fernández, R. (2008). Las micorrizas. Desenterrando un Tesoro. *Agricultura Orgánica*.
- Fernández, D., Tobar, F., Garzón, C., Yáñez, M., Mena, J., & González, D. (2018). Orquídeas y Bromelias de la Provincia de El Oro: Una guía de identificación para los principales géneros y especies del páramo al manglar. Quito-Ecuador: Publicación Miscelánea N° 9. Serie de Publicaciones GADPEO - INABIO.

- Gastelbondo, M., & Castellanos, C. (2018). Aprovechamiento comercial de orquídeas: Contexto socioeconómico en San Antonio del Tequendama y Fusagasugá. 92-125.
- Geml, J. (2017). Altitudinal gradients in mycorrhizal symbioses: The Current State of Knowledge on How Richness and Community Structure Change with Elevation. *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis: Ecological Studies.*, 107–123. doi:10.1007/978-3-319-56363-3_5
- Granados-Sánchez, D., y López-Ríos, GF, y Hernández-García, M. Á., & Sánchez-González, A. (2003). Ecología de las plantas epífitas. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 9(2), 101-111.
- Guevara, M. J., Leyva, N. C., & Caicedo, D. M. (2019). The Orchids, a sustainable alternative for the development of ecotourism. Case study, Carchi province, Ecuador. *Sathiri: Sembrador*, 14(2). doi:<https://doi.org/10.32645/13906925.911>
- Gutiérrez, D., Navarrete, G., & Espín, C. (2014). Orquídeas de la Amazonía Ecuatoriana: maravillas escondidas en las montañas Andino - Amazónicas. *Revista Socioambiental de la Amazonía Ecuatoriana*, 11, 27-30.
- Guzmán Salinas, N., & Moreno Coronado, B. (2014). *Efecto de la altitud en la composición y riqueza de hongos micorrízicos de orquídeas epífitas en Bosques Montano Altos del Sur del Ecuador*. [Tesis de grado previa a la obtención del título de Biólogo con mención en Ecología y Gestión]. Universidad del Azuay, Facultad de Ciencia y Tecnología, Escuela de Biología, Ecología y Gestión.
- Hadi, H., Said, S. N., & Ihsan, A. (2015). A Comprehensive Review of the Cosmeceutical Benefits of Vanda Species (Orchidaceae). *Natural Product Communications*, 10(5), 1483 - 1488. doi:<https://doi.org/10.1177/1934578X1501000842>
- Hasanin, M. S., & Hashem, A. H. (2020). Eco-friendly, economic fungal universal medium from watermelon peel waste. *Journal of Microbiological Methods*, 168. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105802>.
- Hernández, H. P., Damon, A., Mora, J., & Sánchez, D. (2011). Orchid pollination: specialization in chance? *Botanical Journal of the Linnean Society*, 165(3), 251-266. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2010.01109.x>

- Herrera, P., Suárez, J. P., Sánchez, A., Molina, C., Prieto, M., & Méndez, M. (2019). Many broadly-shared mycobionts characterize mycorrhizal interactions of two coexisting epiphytic orchids in a high elevation tropical forest. *Fungal Ecology*, 39, 26-36. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.11.003>
- Hossain, M. (2011). Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances — An overview. *Fitoterapia*, 82(2), 102-140. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.09.007>
- Horich, C. (1982). Saprophytic orchids. Notes on a strange group. *Orquideología*, 15(3), 202-210.
- Hurtado-Iza, H. (2017). *Caracterización y distribución vertical de epífitas vasculares (orquídeas y bromelias) y hospederos en un ecosistema de selva en el sur del Perú*. [Trabajo previo a la Maestría en Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente]. Universidad de Manizales.
- Hynson, N.; Madsen, T.; Selosse, M.-A.; Adam, I.; Ogura-Tsujita, Y.; Roy, M.; Gebauer, G. (2013). The physiological ecology of mycoheterotrophy. In *Mycoheterotrophy, the Biology of Plants Living on Fungi*; Merckx, V.S.F.T., Ed. Springer: New York, NY, USA; 297–344
- Jaramillo-Tapia, J. C. (2018). Diversidad y composición de la comunidad de hongos micorrízicos en tres poblaciones de *Stelis superfiens*, la especie de orquídea epífita más común en un bosque tropical del Sur de Ecuador. *Área Biológica y Biomédica*, 45.
- Jasinge, N., Huynh, T., & Lawrie, A. (2018). Changes in orchid populations and endophytic fungi with rainfall and prescribed burning in *Pterostylis revoluta* in Victoria, Australia. *Annals of Botany*, 121(2), 321-334. doi:<https://doi.org/10.1093/aob/mcx164>
- Jiménez, M. (2014). Orquídeas del Ecuador-Número de especies, endemismo, especies amenazadas y su manejo adecuado.
- Jiménez, N., Sandoval, M., Volke, V., Pedraza, M., & Fernández, E. (2018). Colonización micorrízica de *Laelia autumnalis* (La Llave & Lex.) Lindl. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 547-553. doi:10.19136/era.a5n15.1756
- Kang , H., Won Kang, K., Hwan Kim, D., & Sivanesan, I. (2020). Propagación *in vitro* de *Gastrochilus matsuran* (Makino) Schltr., Una orquídea epífita en peligro de extinción. *Plants*, 9(4), 524. doi:<https://doi.org/10.3390/plants9040524>

- Kartzinel, T., Trapnell, D., & Shefferson, R. (2013). Highly diverse and spatially heterogeneous mycorrhizal symbiosis in a rare epiphyte is unrelated to broad biogeographic or environmental features. *Molecular Ecology*, 22(23), 5949-5961. doi:<https://doi.org/10.1111/mec.12536>
- Kaur, S. (2020). Mycorrhiza in Orchid. (C. Springer, Ed.) Merillon JM. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-030-11257-8_7-1
- Kendon, J., Yokoya, K., Zettler, L. W., Jacob, A., McDiarmid, F., Bidartondo, M., & Sarasan, V. (2020). Recovery of mycorrhizal fungi from wild collected protocorms of Madagascan endemic orchid *Aerangis ellisii* (B.S. Williams) Schltr. and their use in seed germination *in vitro*. *Mycorrhiza*, 30, 567-576.
- Krömer, T., Acebey, A., & Toledo, T. (2018). Aprovechamiento de plantas epífitas: Implicaciones para su conservación y manejo sustentable en México. 175-196.
- Kunakhonnuruk, B., Inthima, P., & Kongbangkerd, A. (2019). The effect of culture media on asymbiotic seed germination in *Epipactis flava*, an endangered rheophytic orchid in Thailand. *Acta Horti*, 37-42. doi:10.17660/ActaHort.2019.1262.6
- Kunga, Y., Sakamoto, N., & Yurimoto, H. (2014). Stable isotope cellular imaging reveals that both live and degenerating fungal pelotons transfer carbon and nitrogen to orchid protocorms. *New Phytologist*, 202(2), 594-605. doi:<https://doi.org/10.1111/nph.12700>
- León-Chuñir, B. C., & Romero Jiménez, S. A. (2017). *Aislamiento de hongos potencialmente micorrízicos presentes en seis especies de Orquídeas nativas del sector San Pedro de Yumate, Molleturo, Azuay, Ecuador*. [Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero ambiental]. Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas.
- Li, T., Yang, W., Wu, S., Selosse, M., & Gao, J. (2021). Progress and Prospects of Mycorrhizal Fungal Diversity in Orchids. *Frontiers in Plant Science*. doi:10.3389/fpls.2021.646325
- Londoño, P. A., & Villanueva, D. F. (2021). *Evaluación de marcadores moleculares de cloroplastos y nucleares, para su uso en identificación molecular de germoplasmas de orquídeas*. [Trabajo previo a la obtención del Título de Biólogo]. Universidad con Acreditación Institucional.
- Loyola, J. (2019). *Guía de Flora. Bosque Protector Aguarongo*. Cuenca-Ecuador: Editorial Universitaria Abya-Yala.

Ministerio del Ambiente. (2018). Estadísticas del Patrimonio Natural del Ecuador Continental. Quito

Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica. (3 de Marzo de 2022). Comunicación-Noticias. Obtenido de Ecuador celebra el Día Mundial de la Vida Silvestre con su primer plan de protección de flora: <https://www.ambiente.gob.ec/ecuador-celebra-el-dia-mundial-de-la-vida-silvestre-con-su-primer-plan-de-proteccion-de-flora/#>

Miranda, D. (2014). *Estudio de factibilidad comercial y financiera para la producción y exportación a Francia de derivados de plántulas de orquídeas (orquídeas in vitro). caso: empresa Florería. Ltda.* [Tesis para la obtención del título de magíster en Administración de Empresas]. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de ciencias administrativas y contables.

Moína-Quimí, E., Oviedo-Anchundia, R., Nieto-Barcelona, S., Herrera-Samaniego, P., & Barcos-Arias, M. (2018). Evaluación de los Hongos Micorrízicos Arbusculares de zonas del trópico húmedo del Ecuador. *Revista Bionatura*, 3(1), 531-536. doi: DOI. 10.21931/RB/2018.03.01.9

Montes, N. (2016). *Especificidad potencial de hongos micorrizicos en el proceso de germinación y supervivencia in vitro de orquideas terrestres.* [Tesis previa a la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas]. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Biología.

Moreno, M. (2013). *Aislamiento de hongos micorrízicos de algunas especies del género Bletia en dos municipios del estado de México.* [Tesis previa a la obtención del grado de Ingeniero Agrónomo en Floricultura]. Universidad Autónoma del Estado de México.

Moreno, J., Herrera, Y., & Prado, A. (2014). Aislamiento y Caracterización de *Rhizoctonia* sp. Asociados a raíces de orquídeas en Fusagasugá-Cundinamarca. *Fitopatología Colombiana*, 38(1), 9-12.

Moreno-Martínez, D. (2011). *Estudios de germinación in vitro e in situ de Epidendrum parkinsonianum Hook. y Acineta barkeri (Bateman) Lindl. (Orchidaceae).* [Tesis previa para obtener el grado de Maestro en Ecología Tropical]. Universidad Veracruzana.

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

- Mujica-Pérez, M. I. (2019). *Especialización en micorrizas: Factores Ecológicos e Implicancias Macroevolutivas*. [Tesis previa a la obtención del grado de Doctor en Ciencias con mención en Ecología]. Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Muthukumar, T., & Kowsalya, A. (2017). Comparative anatomy of aerial and substrate roots of *Acampe praemorsa* (Rox.) . *Flora*, 17-28.
- Mursidawati, S. (2004). *Mycorrhizal Association, propagation and conservation of the myco-heterotrophic Orchid Rhizanthella Gardneri*. [Thesis for the degree of Master of Science]. University of Western Australia, Department Of Soil Science and Plant Nutrition.
- Nauray, W., Cavero, M., Trujillo, M., Arias, M., & Millán, R. (2017). *Orquídeas del Perú y Herramientas para su identificación*. Lima, Perú.
- Neri, C., & Villarreal, L. (2012). Simbiosis Micorrízica: Un análisis de su relevante función ecosistémica y en la provisión de servicios ambientales. 37-62.
- Noda, Y. (2009). Mycorrhizae: An alternative of ecological fertilization in pastures. *Pastos y Forrajes*, 32(2).
- Novotná, A., Benítez, Á., Herrera, P., Cruz, D., Filipczyková, E., & Suárez, J. (2018). High diversity of root-associated fungi isolated from three epiphytic orchids in southern Ecuador. *Mycoscience*, 59(1), 24-32.
- Nurfadilah, S., Dwi Yulia, N., & Ariyanti, E. E. (2016). Morphology, anatomy, and mycorrhizal fungi colonization in roots of epiphytic orchids of Sempu Island, East Java, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 592-603. doi:10.13057/biodiv/d170229
- Ochoa, M. (2003). *El gran libro de las orquídeas*. dve.
- Ochoa, L. G., & Guamán, M. V. (2016). *Aislamiento y selección de hongos potencialmente micorrízicos en seis especies de orquídeas nativas del cerro abuga en la provincia de Cañar*. [Tesis previa a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico]. Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas.
- Octavia, A., & Wantini, S. (2017). *Perbandingan Pertumbuhan Jamur Aspergillus flavus Pada Media PDA (Potato Dextrose Agar) dan Media Alternatif dari Singkong (Manihot esculenta Crantz)*. *Jurnal Analis Kesehatan*, 6(2), 625-631.

- Ordóñez-Castillo, N. (2006). *Evaluación preliminar de la asociación simbiótica de Masdevallia coccinea Linden Ex Lindl. (Orchidaceae) y un hongo formador de micorriza*. [Tesis de grado previa a la obtención del título de Bióloga]. Pontificia Universidad Javeriana.
- Ordóñez C., N. F., Otero, T. J., & Díez G., M. C. (2012). Hongos endófitos de orquídeas y su efecto sobre el crecimiento en *Vanilla planifolia* Andrews. *Acta Agronómica*, 61(3), 282-290.
- Orozco, J., Hurtado, H., & Betancur, J. (2017). Caracterización y distribución vertical de epífitas vasculares -orquídeas y bromelias- y hospederos en el ecosistema de selva en el sur de Perú. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. doi:10.22490/21456453.2034
- Otero, J., Mosquera, A., & Flanagan, N. (2013). Tropical orchid mycorrhizae: potential applications in orchid conservation, commercialization, and beyond. *Lankesteriana*, 13, 57-63.
- Paredes, E. F. (2012). *Determinación de los protocolos para cultivo in vitro de las especies Epidendrum schistochilum y Oncidium cultratum*. [Tesis previa a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales]. Universidad Politécnica Salesiana.
- Perez, A., Rojas, J., & Montes, D. (2011). Hongos formadores de micorrizas Arbusculares: Una alternativa biológica para la sostenibilidad de los agroecosistemas de praderas en el caribe colombiano. *Rev. Colombiana cienc. Anim.*, 3(2), 366-385.
- Peay, K. G., Bidartondo, M. I., & Arnold, E. A. (2010). Not every fungus is everywhere: scaling to the biogeography of fungal-plant interactions across roots, shoots and ecosystems. *New Phytol*, 878-882. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.03158.x
- Phillips, R., Reiter, N., & Peakall, R. (2020). Orchid conservation: from theory to practice. *Annals of Botany*, 126(3), 345-362. doi:10.1093/aob/mcaa093
- Pickles, B. J., Truong, C., Watts-Williams, S. J., & Bueno, C. G. (2020). Mycorrhizae for a sustainable world. *New Phytologist*, 225(3), 1065-1069.
- Posada, F. (2020). *Odontoglossum* HBK Breve historia del género. *Orquideología*, 37(2), 71-72.
- Pulido-Delgado, L. E., Medina, N., & Cabrera, J. A. (2002). *Hongos micorrízicos arbusculares y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: Alternativas para la producción de posturas de tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) y cebolla (Allium cepa L.)*.

- Prieto-Benavides, O., Belezaca-Pinargote, C., Mora-Silva, W., Garcés-Fiallos, F., Sabando-Ávila, F., & Cedeño-Loja, P. (2012). Identificación de Hongos Micorrízicos Arbusculares en Sistemas Agroforestales con Cacao en el Trópico Húmedo Ecuatoriano. *Agronomía Mesoamericana*, 23(2), 233-239.
- Qin, J., Zhang, W., Zhang, S.-B., & Wang, J.-H. (2020). Similar mycorrhizal fungal communities associated with epiphytic and lithophytic orchids of *Coelogyne corymbosa*. *Plant Diversity*, 42(2), 362-369. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pld.2020.07.005>
- Raya, K. (2009). Self and Cross inoculation of *Papilionanthe hookeriana* and *Taeniophyllum obtusum* orchid mycorrhiza. 12(1). doi:10.14203/BKR.V12I1.77
- Rasmussen, H., Dixon, K., Jersáková, J., & Těšitelová, T. (2015). Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements. *Ann Bot*, 116, 391-402.
- Rendón-Lara, C. (2018). *Caracterización morfológica y molecular de hongos micorrízicos orquídeoides aislados de Trichocentrum stramineum (Orquidaceae) en cinco localidades de Veracruz, México*. [Tesis previa a la obtención de grado de Maestro en Ecología Tropical]. Universidad Veracruzana.
- Rivera, R. (2002). Guía ilustrada de 55 especies de Orquídeas encontradas en la Reserva Biológica de Yuscarán, Honduras.
- Rojas, O., Borrero, Y., & Rodríguez, A. (2015). Influencia del Vitazyme, Hongos micorrízicos arbusculares y agua tratada magnéticamente en el cultivo del ají cachucha (*Capsicum annuum*). *Ciencia en su PC*(3), 102-117.
- Román-Rodríguez, R. R. (2021). *Influencia de las características de forófitos de dosel en la diversidad y distribución vertical de orquídeas epífitas, en un remanente de bosque de neblina montano del refugio de vida silvestre Pasochoa (Quito, Ecuador)*. [Tesis de grado previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas y Ambientales]. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Biológicas.
- Ruiz, J., Cox, L. D., Ruiz, J. Y., & Pérez, E. A. (2016). Diversidad y uso de las orquídeas. *Biagrociencias*, 9(1), 1-6

- Salazar, G. (2009). Orquídeas. Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Botánica, 153-169.
- Salazar, M. (2017). *Estudio comparativo de la riqueza de hongos endófitos asociados a la diversidad de orquídeas epífitas en los bosques de Mazán y la zona de influencia del Parque Nacional El Cajas*. [Trabajo de Graduación previa a la obtención del título de Magister en Agroecología y Ambiente]. Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- Salazar, S. (2018). *Aislamiento e identificación de cepas fúngicas de Stanhopea tigrina productoras de giberelinas con efecto benéfico para la orquídea*. [Trabajo de graduación previa a la obtención del título de Doctora en Microbiología]. Universidad Autónoma de Puebla.
- Salazar, J. M., Pomavilla, M., Pollard, A. T., Chica, E. J., & Peña, D. (2020). Endophytic fungi associated with roots of epiphytic orchids in two Andean forests in southern Ecuador and their role in germination. *Lankesteriana*, 20(1). doi:<http://dx.doi.org/10.15517/lank.v20i1.41157>
- Sánchez, A. E., & Rodríguez, K. S. (2018). Las orquídeas y su importancia en el desarrollo turístico de la provincia de Manabí, Ecuador. *Ecovida*, 8(1).
- Sathiyadash, K., Muthukumar, T., Karthikeyan, V., & Rajendran, K. (2020). Orchid Mycorrhizal Fungi: Structure, Function and Diversity. *Orchid Biology: Recent Trends & Challenges*, 239-280.
- Sathiyadash, K., Muthukumar, T., Uma, E., & Pandey, R. (2012). Mycorrhizal association and morphology in orchids. *J Plant Int*, 7, 237-248.
- Sedano, G., Manzo, A., Roldán, R., & Castellanos, J. (2015). Propagación *in vitro* de orquídeas y otras ornamentales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 451-456. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/2631/263139243061.pdf>
- Shefferson, R., Jacquemyn, H., & Hutchings, M. (2020). The demography of terrestrial orchids: life history, population dynamics and conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 192(2), 315–332. doi:<https://doi.org/10.1093/botlinnean/boz084>
- Shefferson, R., Bunch, W., Cowden, C., Lee, Y., Kartzinel, T., Yukawa, T., Jiang, H. (2019). Does evolutionary history determine specificity in broad ecological interactions? *Journal of Ecology*, 107(4), 1582-1593. doi:<https://doi.org/10.1111/1365-2745.13170>

- Sigisfredo, G., Kai, R., Robert, B., Franz, O., & Michael, W. (2013). Phylogenetic diversity and structure of sebacinoïd fungi associated with plant communities along an altitudinal gradient. *FEMS microbiology ecology*, 83(2), 265-278.
- Smith, S. E., & Read, D. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. New York: ELSEVIER Ltd.
- Steinfort, U., Verdugo, G., Besoain, X., & Cisternas, M. A. (2010). Mycorrhizal association and symbiotic germination of the terrestrial orchid *Bipinnula fimbriata* (Poepp.) Johnst (Orchidaceae). *Flora*, 205(12), 811-817. doi:<https://doi.org/10.1016/j.flora.2010.01.005>
- Štípková, Z., & Kindlmann, P. (2021). Factors determining the distribution of Orchids – a review. *European Journal of Environmental Sciences*, 11(1), 21-30. doi:<https://doi.org/10.14712/23361964.2021>
- Suárez-Galarza, D. E. (2016). *Aislamiento e Identificación Molecular de hongos micorrízicos de tres especies de orquídeas epífitas (Cyrtochilum myanthum, Scaphyglottis punctulata, Stelis superbiens) propios del bosque nublado al sur del Ecuador*. [Tesis de grado previa a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología]. Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales.
- Suárez, J., Weib, M., Abele, A., Garnica, S., Oberwinkler, F., & Kottke, I. (2016). Diverse tulasnelloïd fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in the Andean cloud forest. *Mycol Res*, 1257-1270.
- Teixeira-Da Silva, J., Tsavkelova, E., Zeng, S., Bun Ng, T., Parthibhan, S., Dobránszki, J., Rao, M. (2015). Symbiotic *in vitro* seed propagation of Dendrobium: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development. *Planta*, 1-22. doi:<https://doi.org/10.1007/s00425-015-2301-9>
- Timsina, B., Kindlmann, P., Subedi, S., Khatri, S., & Rokaya, M. (2021). Epiphytic Orchid Diversity along an Altitudinal Gradient in Central Nepal. *Plants*, 10(7). doi:<https://doi.org/10.3390/plants10071381>
- Troiani, H., Prina, A., Muiño, W., Tamame, M., & Beinticinco, L. (2017). *Botánica, morfología, taxonomía y fitogeografía*. Santa Rosa, Argentina: EduNLPam.

- Vaca, I., Cueva, E., Acurio, D., & Chiluisa, V. (2019). Morphological and morphometric analysis of seeds of three species of native orchids from the neotropical region of Ecuador. *Bionatura*. doi:<http://revistabionatura.com/files/2018.03.01.8.pdf>
- Valadares, R., Marroni, F., Sillo, F., Oliveira, R., Balestrini, R., & Perotto, S. (2021). A Transcriptomic Approach Provides Insights on the Mycorrhizal Symbiosis of the Mediterranean Orchid *Limodorum abortivum* in Nature. *Plants*, *10*(2). doi:<https://doi.org/10.3390/plants10020251>
- Vargas, L., & Victorino, A. (2015). *Caracterización Morfológica y de las secuencias ITS de aislamientos de hongos asociados a raíces de orquídeas en la región del Sumapazs*. [Trabajo de investigación presentado como requisito para optar el título de Ingeniero Agrónomo]. Universidad de Cundinamarca, Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- Wang, S., Viswanath, K., Tong, C., An, H., Jang, S., & Chen, F. (2019). Floral Induction and Flower Development of Orchids. *Frontiers in Plant Science*, *10*. doi:[10.3389/fpls.2019.01258](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01258)
- Waud M., Brys R., Van Landuyt W., Lievens B., Jacquemyn H. (2017). Mycorrhizal specificity does not limit the distribution of an endangered orchid species. *Mol. Ecol.* *26*, 1687–1701. doi:<https://doi.org/10.1111/mec.14014>
- Yokoya, K., Zettler, L. W., Bell, J., Kendon, J. P., Jacob, A. S., Schofield, E., . . . Sarasan, V. (2021). The Diverse Assemblage of Fungal Endophytes from Orchids in Madagascar Linked to Abiotic Factors and Seasonality. *Diversity*, *13*(2). doi:<https://doi.org/10.3390/d13020096>
- Yokoya, K., Zettler, L., Kendon, J., Bidartondo, M., Stice, A., Skarha, S., . . . Sarasan, V. (2015). Preliminary findings on identification of mycorrhizal fungi from diverse orchids in the Central Highlands of Madagascar. *Micorrhiza*, 611-625.
- Yuan Z. L., Y.C. Chen, y Yang, Y. (2009). Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting an epiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*): estimation and characterization. *World Journal Microbiology Biotechnolgy* *25*: 295- 303.
- Zelenko, H., & Bermúdez, P. (2009). *Orchids species of Perú*. Quito: Copyright.

- 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. *42*(1), 135-139.
- Zettler, L. W., Corey, L. L., Jacks, A. L., Gruender, L. T., & Lopez, A. M. (2013). *Tulasnella irregularis* (Basidiomycota: Tulasnellaceae) from roots of *Encyclia tampensis* in south Florida, and confirmation of its mycorrhizal significance through symbiotic seed germination. *Lankesteriana*.
- Zettler, L., & Corey, L. (2018). Orchid Mycorrhizal Fungi: Isolation and Identification Techniques. En Lee, YI, Yeung, & ET, *Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses—Methods and Protocols*. New York, NY: Springer Protocols Handbooks. doi:https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7771-0_2
- Zhang, S., Yang, Y., Li, J., Zhang, W., Huang, W., & Hu, H. (2018). Physiological diversity of orchids. *Plant Diversity*, *40*(4), 196-208. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pld.2018.06.003>
- Zhang, Z., Yan, Y., Tian, Y., Li, J., He, J., & Tang, Z. (2015). Distribution and conservation of orchid species richness in China. *Biological Conservation*, *181*, 64-72. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.10.026>
- Zhang, S.-B., Chen, W.-y., Huang, J.-L., Feng Bi, Y., & Yang, X.-F. (2015). Orchid Species Richness along Elevational and Environmental Gradients in Yunnan, China. *PLoS One*, *10*(11).

CAPÍTULO X

10. ANEXOS

Anexo 1. Formulación de medios de cultivo empleados para 1 litro

Tabla 5. Componentes Medio de cultivo FIM.

Componente o reactivo	Concentración
Nitrato de sodio	0,3 gr
Cloruro de potasio	0,1 gr
Fosfato ácido 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	0,5 ml
Agua	1000 ml
pH de ajuste	6,8

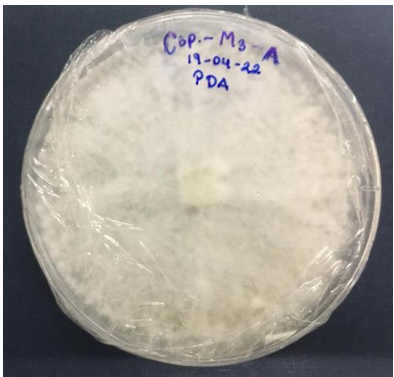
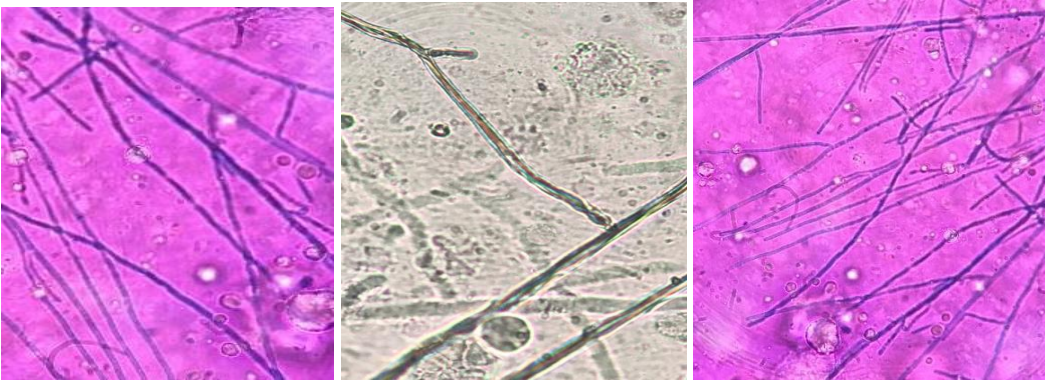

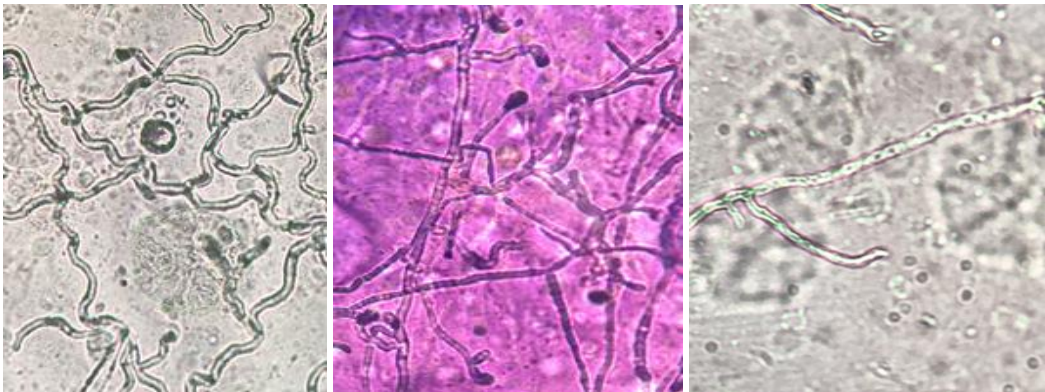
Nota: Se preparó solución una madre con 2,67 de estreptomicina en 200 ml de agua

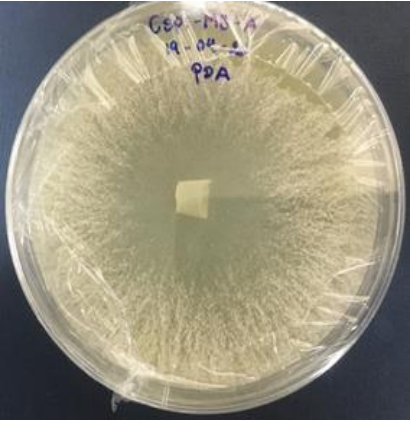
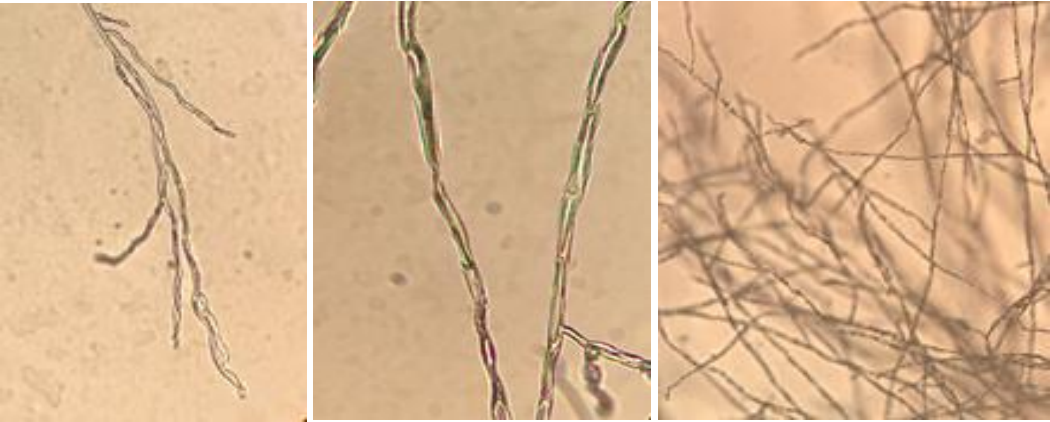
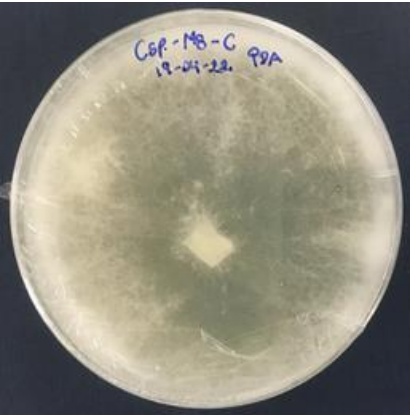
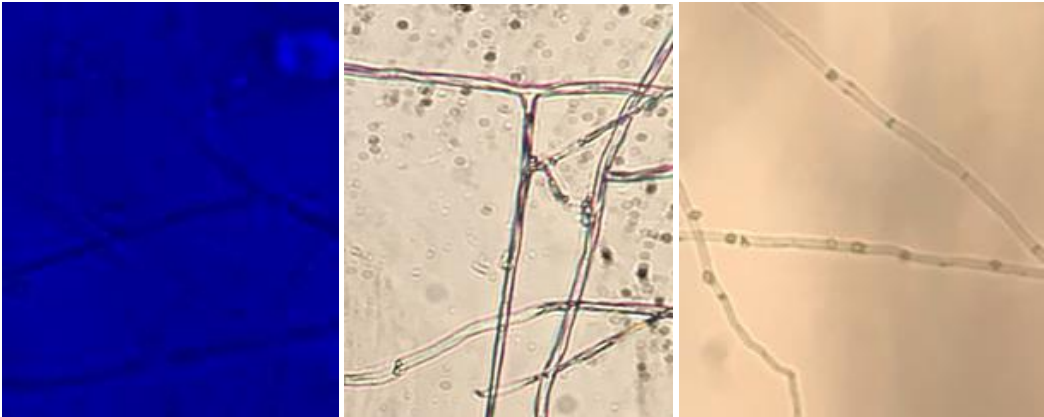
Tabla 6. Componentes Medio de cultivo PDA


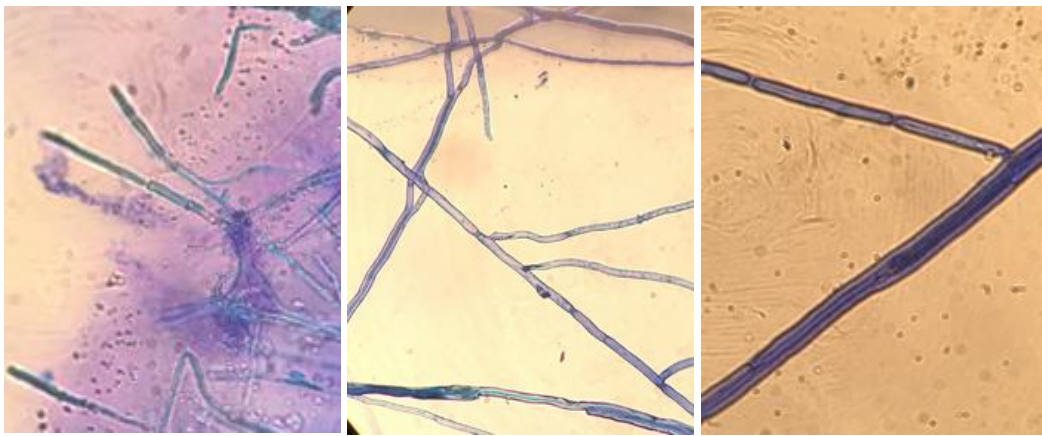

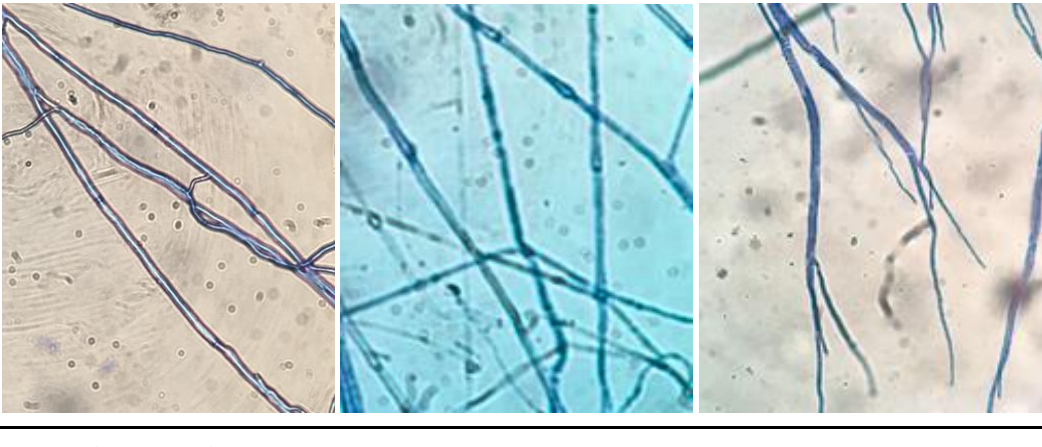
Componente o reactivo	Concentración
Agar	20 gr
Puré de papa	10 gr
Glucosa	20 gr
Agua Destilada	1000 ml
pH de ajuste	5,6

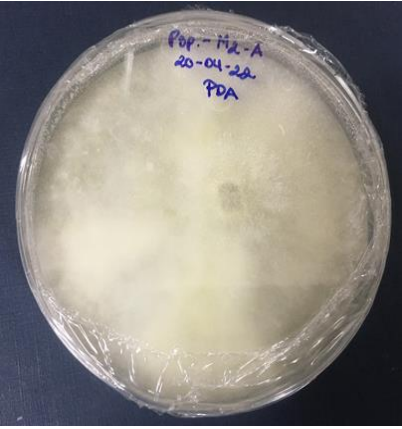
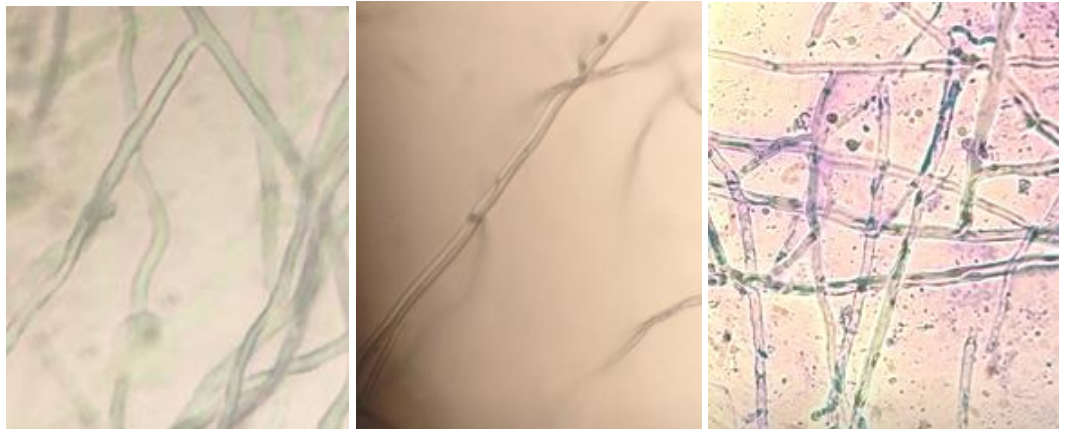
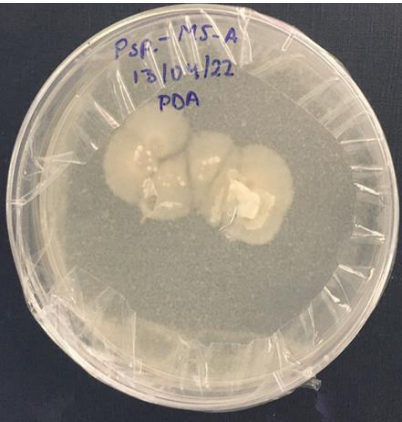
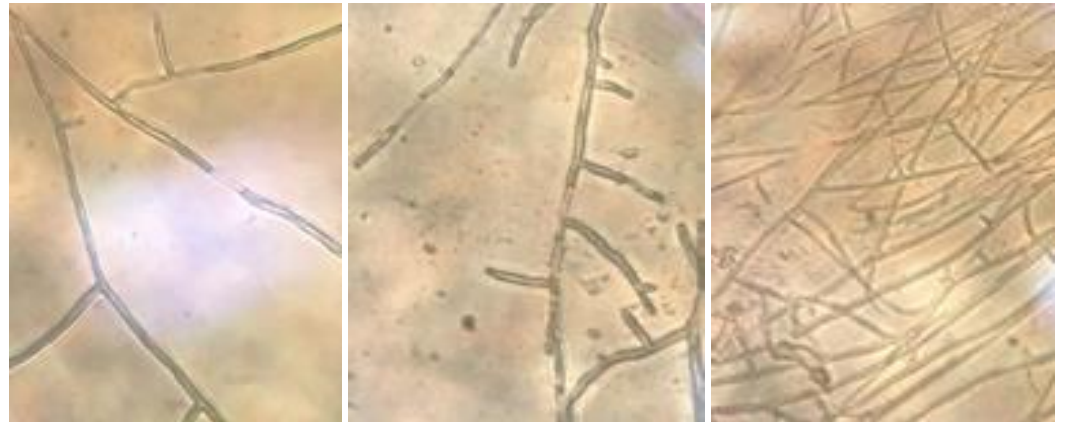
Anexo 2. Caracterización morfológica de hongos potencialmente micorrízicos descartados microscópicamente.

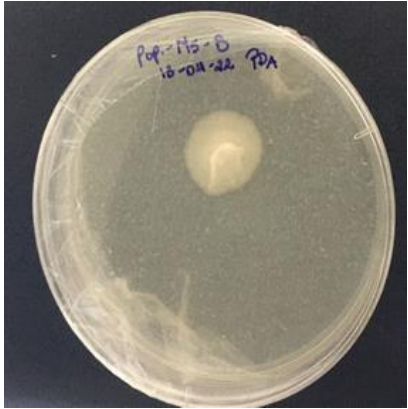
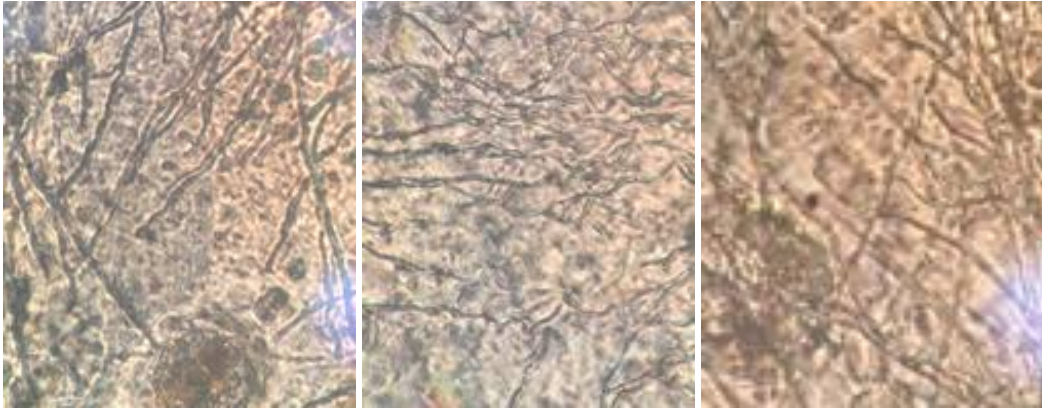
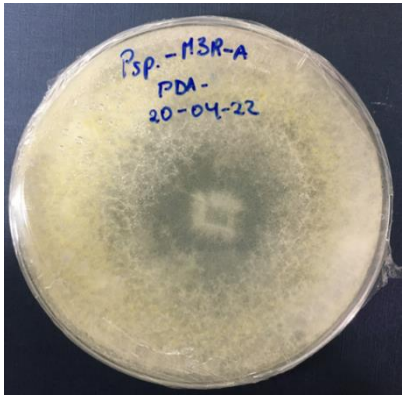
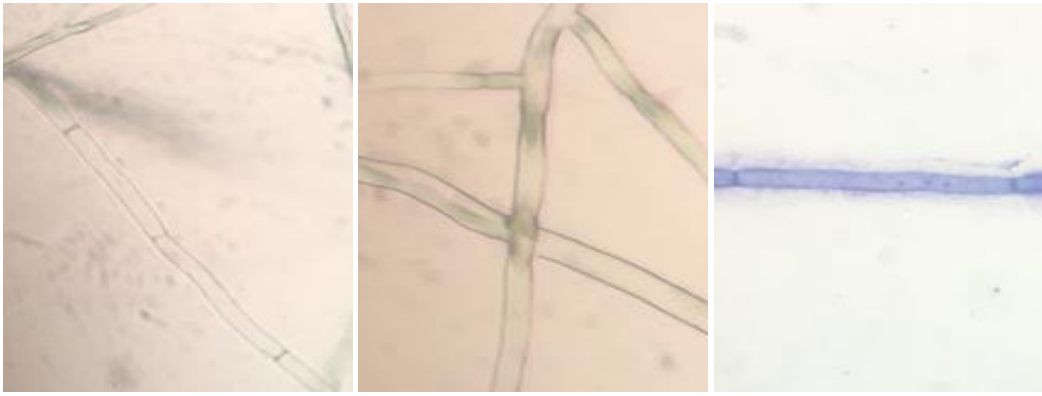
Tabla 7. Caracterización morfológica de potenciales HFM descartados

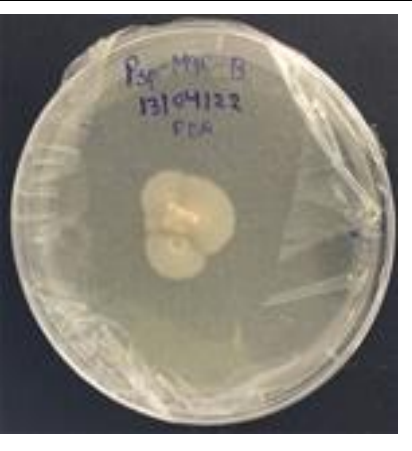
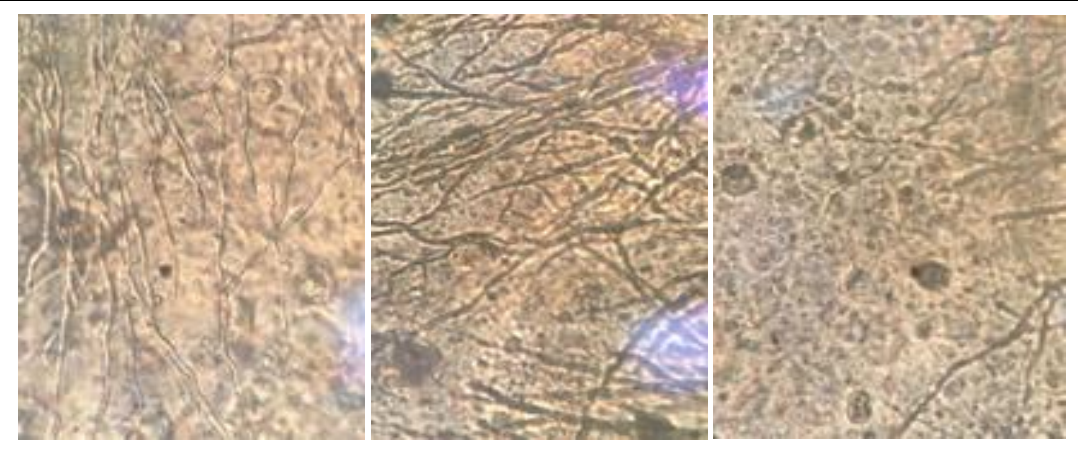
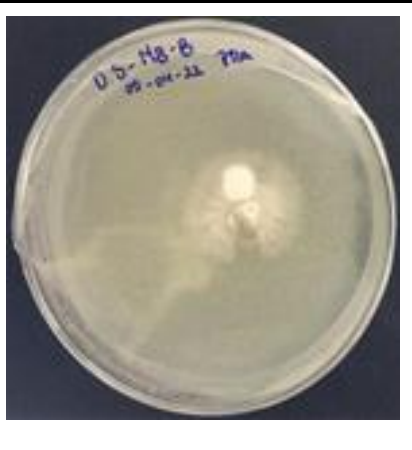
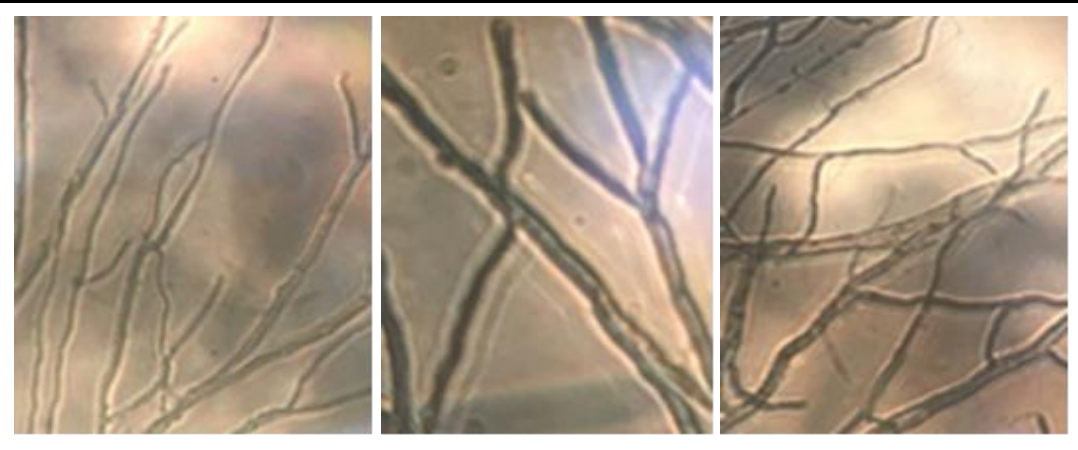
	COLONIA MEDIO PDA	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA
<p>Especie: <i>Cyrtochilum</i> sp.</p> <p>Código: Csp - M3 - A</p>		
	<p>Coloración del micelio: Blanco</p>	<p>Descripción Microscópica: hifas largas en mayoría con ramificaciones de 45° presencia de posible Descripción Macroscópica: colonia grande de textura algodonosa y coloración blanquecina, con crecimiento formando tiras largas.</p>
<p>Especie: <i>Cyrtochilum</i> sp.</p> <p>Código: Csp - M4 - C</p>		
	<p>Coloración del micelio: Blanco</p>	<p>Descripción Microscópica: hifas muy septadas y con apariencia curvada-espiral, hifas cortas portadoras de esporangios, ángulos de 45° entre la hifa principal y secundaria. Descripción Macroscópica: colonia grande con micelio de textura algodonosa y crecimiento de forma de tiras largas.</p>

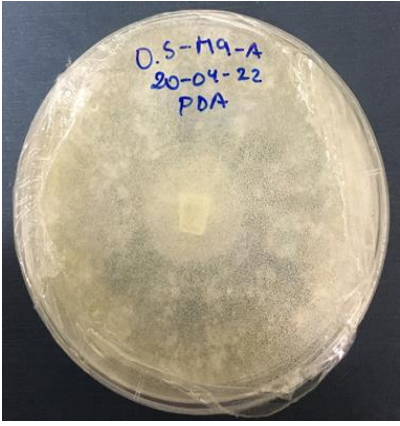
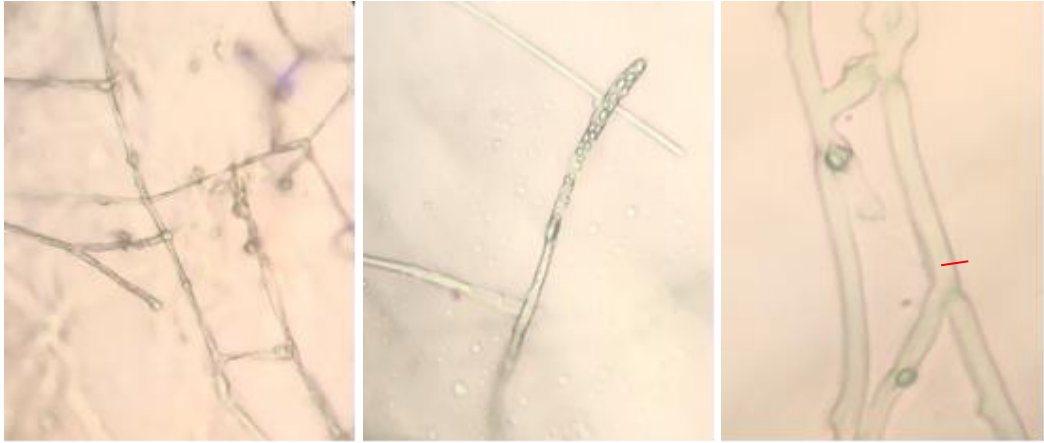


<p>Especie: <i>Cyrtochilum</i> sp.</p> <p>Código: Csp - M8 - A</p>		
	<p>Coloración del micelio: Blanco – Pardo</p>	<p>Descripción Microscópica: hifas cortas muy septadas, con ángulos de 45° en las ramificaciones. Descripción Macroscópica: colonia grande de textura algodonosa en el micelio y crecimiento en forma de tiras.</p>
<p>Especie: <i>Cyrtochilum</i> sp.</p> <p>Código: Csp - M8 - C</p>		
	<p>Coloración del micelio: Blanco</p>	<p>Descripción Microscópica: hifas largas y muy septadas, presencia de células monillioideas. Descripción Macroscópica: colonia grande con micelio de textura algodonosa y color blanco característico.</p>

<p>Especie: <i>Cyrtochilum</i> sp.</p> <p>Código: Csp - M1R - B</p>		
<p>Coloración del micelio: Blanco</p>		<p>Descripción Microscópica: hifas largas y septadas con ángulos agudos entre hifas primarias y secundarias. Descripción Macroscópica: colonia grande de textura muy algodonosa con crecimiento irregular.</p>
<p>Especie: <i>Cyrtochilum</i> sp.</p> <p>Código: Csp - M4R - B</p>		
<p>Coloración del micelio: Blanco</p>		<p>Descripción Microscópica: hifas largas con ángulos de 45° en las ramificaciones. Descripción Macroscópica: colonia con borde definido y de textura ligeramente algodonosa, crecimiento radial y formación de anillos de micelio.</p>

<p>Especie: <i>Pleurothallis</i> sp.</p> <p>Código: Psp - M2 - A</p>		
	<p>Coloración del micelio: Blanco</p>	<p>Descripción Microscópica: hifas largas con presencia de conidios y ángulos de 45°. Descripción Macroscópica: colonia grande con crecimiento irregular y textura algodonosa, no posee bordes definidos.</p>
<p>Especie: <i>Pleurothallis</i> sp.</p> <p>Código: Psp - M5 - A</p>		
	<p>Coloración del micelio: Blanco</p>	<p>Descripción Microscópica: hifas alargadas con ramificaciones cortas. Posee ramificaciones con ángulos principalmente de 45°. Descripción Macroscópica: colonia pequeña de textura cremosa con crecimiento irregular con bordes definidos.</p>

<p>Especie: <i>Pleurothallis</i> sp.</p> <p>Código: Psp - M5 - B</p>		
<p>Coloración del micelio: Blanco</p>	<p>Descripción Microscópica: hifas en punta y segmentadas a grandes intervalos, hifas curvadas. Posee ramificaciones con ángulos principalmente de 45°</p> <p>Descripción Macroscópica: colonia pequeña de textura cremosa con bordes definidos</p>	
<p>Especie: <i>Pleurothallis</i> sp.</p> <p>Código: Psp - M3R - A</p>		
<p>Coloración del micelio: Blanco - Pardo</p>	<p>Descripción Microscópica: hifas ángulos de ramificación en 45° y con presencia de conidios.</p> <p>Descripción Macroscópica: colonia grande sin bordes definidos, posee una textura de tipo algodónosa con un crecimiento irregular.</p>	

<p>Especie: <i>Pleurothallis</i> sp.</p> <p>Código: Psp - M9R - B</p>		
	<p>Coloración del micelio: Blanco – Pardo</p>	<p>Descripción Microscópica: hifas cortas con nula cantidad de septos, y ángulos de ramificación de 45°. No se observaron ángulos rectos. Con presencia de conidios.</p> <p>Descripción Macroscópica: colonia pequeña blanquecina de textura cremosa. Posee un borde definido.</p>
<p>Especie: <i>Odontoglossum pardinum</i></p> <p>Código: OS - M8 - B</p>		
	<p>Coloración del micelio: Blanco</p>	<p>Descripción Microscópica: hifas largas con ramificaciones cortas, se encontraron pocos septos y ramificaciones con ángulos principalmente de 45°.</p> <p>Descripción Macroscópica: colonia pequeña de textura ligeramente algodonosa, se aprecia un leve crecimiento radial y presencia de esclerocios.</p>

<p>Especie: <i>Odontoglossum pardinum</i></p> <p>Código: OS - M9 - A</p>		
<p>Coloración del micelio: Blanco</p>		<p>Descripción Microscópica: hifas largas septadas con ángulos de ramificación de 45°.</p> <p>Descripción Macroscópica: colonia grande sin bordes definidos y textura algodonosa con crecimiento de tipo radial formando anillos de micelio y formando tiras.</p>
<p>Especie: <i>Odontoglossum pardinum</i></p> <p>Código: OS - M4R - B</p>		
<p>Coloración del micelio: Blanco – Amarillento</p>		<p>Descripción Microscópica: hifas septadas y largas con ángulos de 45° entre hifas primarias y secundarias.</p> <p>Descripción Macroscópica: colonia grande algodonosa con crecimiento ligeramente radial formando anillos de micelio.</p>