

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:
IDENTIFICACION MORFOLOGICA Y MOLECULAR DE HONGOS
MICORRÍZICOS DE ESPECIES DEL GÉNERO DRACULA Y EPIDENDRUM
(ORCHIDACEAE)

AUTORES:
BYRON GERMÁN FUERTES FLORES
DIEGO ALEJANDRO MALLITASIG QUIHPE

TUTOR:
MARCO FERNANDO CERNA CEVALLOS

Quito, febrero del 2018

Cesión de derechos de autor

Nosotros, Byron Germán Fuertes Flores, con documento de identificación N° 1722557335, y Diego Alejandro Mallitasig Quishpe, con documento de identificación N° 1721774105, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: “Identificación morfológica y molecular de hongos micorrízicos de especies del género *Dracula* y *Epidendrum* (ORCHIDACEAE)”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Nombre: Byron Germán Fuertes Flores

Cédula: 172255733-5

Fecha: febrero 2018



Nombre: Diego Alejandro Mallitasig Quishpe

Cédula: 172177410-5

Fecha: febrero 2018

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación:
“Identificación morfológica y molecular de hongos micorrízicos de especies del género *Dracula* y *Epidendrum* (ORCHIDACEAE)”, realizado por Byron Germán Fuertes Flores y Diego Alejandro Mallitasig Quishpe, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, febrero 2018

A handwritten signature in blue ink, consisting of several vertical and horizontal strokes, appearing to be the name of the tutor.

Marco Fernando Cerna Cevallos

CI. 0501872071

Dedicatoria

A mis padres Isabel Quishpe y Patricio Mallitasig,

Por su esfuerzo para que no me falte nada, por darme la mejor herencia que es la educación, por apoyarme en todas mis decisiones y hacer de mí una persona de bien.

A mis hermanos Andrea y David,

Por ser mi ejemplo a seguir, por sus consejos y por su motivación para no decaer ante las adversidades.

A mis abuelitos Rosa y Ramón,

Por demostrarme su cariño constantemente, por compartir sus sabios consejos y querer siempre el bienestar tanto de mi familia como el mío.

Diego.

A mi madre Patricia Flores,

Por su amor incondicional, por sus consejos, por apoyarme en todo momento y por motivarme a siempre ser mejor.

A mi padre Germán Fuertes,

Por guiarme en el camino, por velar por mi seguridad, por todas las veces que me ha enseñado que con esfuerzo los sueños se cumplen.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

Byron.

Agradecimiento

Al grupo de Investigación NUNKUI WAKAN por hacer posible la ejecución y financiamiento del proyecto.

A nuestro Tutor Marco Cerna Ph. D por darnos la oportunidad de integrar el grupo de investigación y por su aporte brindándonos sus conocimientos para el desarrollo del presente proyecto de investigación

A Doña Sarita Gutiérrez y Don Alfredo Trujillo, propietarios del orquideario “Orquídeas de Sarina” por avernos otorgado los recursos genéticos necesarios para poder realizar este estudio.

A Michelle Parra y a Erika Paredes por su gran amistad, predisposición y colaboración en el desarrollo de nuestro proyecto de investigación

A nuestros amigos y compañeros que nos acompañaron a lo largo de nuestra carrera universitaria, especialmente a Daniela Pérez, Tania Cevallos, Michelle Campaña, Michelle Toapanta, Ronald Toapanta, Jonathan García, Francisco López, Michelle Tenorio, Christian Valdez y Yomaira Perengüez por brindarnos su amistad incondicional y apoyarnos en momentos difíciles.

Índice

Introducción	1
Capítulo 1	3
Marco Conceptual	3
1.1 Reino Fungi	3
1.1.1 Micorrizas	3
1.1.2 Clasificación	4
1.1.2.1 Ectomicorriza	5
1.1.2.2 Endomicorriza	5
1.1.3 Micorrizas de orquídeas o endomicorriza orquideoide	6
1.1.4 Importancia de las micorrizas	6
1.2 Degradación de materiales poliméricos	7
1.2.1 Celulosa	8
1.2.2 Biodegradación de la celulosa	8
1.2.3 Determinación de actividad celulolítica	9
1.2.3.1 Cuantificación de azúcares reductores mediante método DNS	9
1.1.5 Métodos de conservación de hongos	10
1.1.5.1 Aceite mineral	10
1.1.5.2 Liofilización	10
1.1.5.3 Refrigeración	10
1.1.5.4 Agar inclinado	10
1.1.5.5 Gel de sílice	10

1.2 Técnicas moleculares de Identificación de hongos	11
1.2.1 Extracción de ADN.....	11
1.2.2 Espaciadores Internos Transcritos	12
1.2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa	13
1.2.4 Electroforesis	14
1.2.5 Secuenciación	15
1.2.5.1 Secuenciación Sanger	16
1.3 orquídeas	17
1.3.1 Generalidades.....	17
1.3.2 Taxonomía	17
1.3.3 Hábito.....	18
1.3.4 Morfología	18
1.3.5 Formas de crecimiento.....	19
1.3.6 Germinación.....	19
1.3.7 Importancia de las orquídeas	20
1.3.8 Amenazas.....	20
1.3.9 Género <i>Dracula</i>	21
1.3.10 Género <i>Epidendrum</i>	22
Capítulo 2.....	23
Metodología	23
2.1 Colección de Orquídeas de los géneros <i>Dracula</i> y <i>Epidendrum</i>	23
2.1.1 Colección de muestras	23

2.2 Aislamiento e identificación de hongos micorrízicos	24
2.2.1 Preparación de medios de cultivo	24
2.2.2 Protocolo de desinfección	24
2.2.3 Protocolo de siembra y aislamiento	24
2.2.4 Identificación de hongos aislados	25
2.3 Metodología para la identificación molecular de micorrizas	25
2.3.1 Extracción de ADN.....	25
2.3.2 Amplificación de la región ITS	27
2.3.3 Secuenciación	27
2.3.4 Análisis de secuencias	27
2.4 Análisis del potencial degradador de materia orgánica por parte de los hongos micorrízicos	28
2.4.1 Degradación de celulosa	28
Capítulo 3.....	30
Resultados y discusión	30
3.1 Aislamiento de hongos micorrízicos	30
3.2 Identificación Morfológica.....	30
3.3 Extracción de ADN y amplificación de la región ITS	40
3.4 Análisis de secuencias	40
3.5 Determinación de actividad degradadora de materia orgánica.....	48
Conclusiones	57
Recomendaciones.....	59

Referencias..... 60

Anexos 77

Índice de tablas

Tabla 1 Códigos de las especies de orquídeas del género <i>Dracula</i> y <i>Epidendrum</i> utilizadas en el proceso de aislamiento de micorrizas	23
Tabla 2 Hongos micorrízicos aislados de especies pertenecientes a los géneros <i>Dracula</i> y <i>Epidendrum</i> ORCHIDACEAE	32
Tabla 3 Identificación macroscópica y microscópica de micorrizas aisladas.....	41
Tabla 4 Tabla del Blast de las muestras	46
Tabla 5 Concentraciones estándar de azúcares y absorbancia	49
Tabla 6 Medición de azúcares reductores por espectrofotometría UV	50

Índice de Figuras

Figura 1. Árbol filogenético elaborado a partir de los secuenciamientos de la región ITS de las especies aisladas.....	47
Figura 2. Curva de calibración	49
Figura 3. Cuantificación de azúcares reductores. Especie: <i>Trichoderma viride</i>	51
Figura 4. Cuantificación de azúcares reductores. Especie: <i>Pestalotiopsis microspora</i>	52
Figura 5. Cuantificación de azúcares reductores. Especie: <i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1...53	
Figura 6. Cuantificación de azúcares reductores. Especie: <i>Phoma</i> sp.....	54
Figura 7. Cuantificación de azúcares reductores. Especie: <i>Aspergillus fumigatus</i> ...55	
Figura 8. Cuantificación de azúcares reductores. Especie: <i>Cantharellales</i> sp.....	55

Índice de Anexos

Anexo 1. Colección de muestras de raíces de orquídeas	77
Anexo 2. Siembra de muestras de raíz	77
Anexo 3. Electroforesis en gel de agarosa.	78
Anexo 4. Amplificación de la región ITS	79
Anexo 5. Ensayo de degradación de celulosa	79
Anexo 6. Patente de manejo de vida silvestre.....	80

Resumen

Para esta investigación se aislaron hongo micorrízicos a partir de muestras de raíces pertenecientes a los géneros *Dracula* y *Epidendrum* ORCHIDACEAE, las cuales fueron sembradas en medio comercial PDA. A los hongos micorrízicos aislados se les realizó una identificación morfológica mediante observación al microscopio y una identificación molecular mediante secuenciación de la región ITS para conocer las especies fúngicas que realizan simbiosis con las orquídeas en estudio. Mediante el análisis de secuencias en software informático se identificaron 19 hongos micorrízicos del filo Ascomyceto, 1 hongo micorrízico del filo Basidiomiceto y dos hongos no clasificados taxonómicamente identificados como *Fungal* sp. Posterior a ello se realizaron pruebas de degradación de celulosa mediante el método de DNS para cuantificar azúcares reductores con la finalidad de conocer si las especies aisladas, mediante degradación de materia orgánica, podrían otorgar los nutrientes necesarios a las especies de orquídeas con quienes se relacionan; si bien todos los hongos presentaron un comportamiento degradador, destaca la especie *Cantharellales* sp. como la cepa con mayor capacidad degradadora. Se demostró que la relación entre orquídea y hongo micorrízico es específica en algunas especies de hongos y muy generalistas en otras especies como lo fue *Trichoderma*

Palabras clave: Simbiosis, micorriza, orquídeas, identificación, biodegradación.

Abstract

For this investigation, mycorrhizal fungi were isolated from root samples belonging to the genera *Dracula* and *Epidendrum* ORCHIDACEAE, which were planted in commercial PDA medium. The isolated mycorrhizal fungi were morphologically identified by means of microscopic observation and molecular identification by sequencing the ITS region to know the fungal species that perform symbiosis with the orchids under study. Sequence analysis in computer software identified 19 mycorrhizal fungi of the Ascomyceto phylum, 1 mycorrhizal fungus of the phylum Basidiomycete and two taxonomically unclassified fungi identified as *Fungal* sp. Subsequently, cellulose degradation tests were carried out using the DNS method to quantify reducing sugars in order to know if the isolated species, through degradation of organic matter, could provide the necessary nutrients to the orchid species with which they are related; Although all the fungi showed a degrading behavior, the *Cantharellales* sp. as the strain with the greatest degrading capacity. It was shown that the relationship between orchid and mycorrhizal fungus is specific in some fungal species and very generalist in other species such as *Trichoderma*.

Key words: Symbiosis, mycorrhiza, orchids, identification, biodegradation.

Introducción

Las orquídeas pertenecientes a la familia Orchidaceae, del grupo monocotiledóneas comprenden alrededor de 25000 especies en el mundo (Ramírez, 2016). Las orquídeas son plantas afamadas por la belleza de sus flores, por lo que su comercialización puede darse de forma legal o ilegal, siendo muchas de ellas extraídas de la naturaleza, generando un impacto sobre las especies endémicas (Guillén, 2016).

Una de las alternativas para evitar el comercio con especies silvestres es el cultivo *in vitro* de estos ejemplares, método que presenta algunas dificultades como la baja tasa de germinación de sus semillas, así como también su poco y lento crecimiento debido a la ausencia de la micorriza (asociación mutualista hongo-raíz) que aporta nutrientes para el crecimiento de la orquídea (Vargas y Victorino, 2015). En el pasado se consideraba que el hongo solo le proporcionaba a la orquídea hidratos de carbono pero se ha demostrado que además les suministra aminoácidos y nutrientes minerales (Chávez, Mosquera y Otero, 2014).

La distribución de orquídeas está influenciada por la disponibilidad de hongos apropiados para inducir a la germinación, siendo un factor determinante en el desarrollo del protocormo y de la plántula (Torres, 2012). De acuerdo con Durán, Rivero y Seemann (2007) resulta imprescindible realizar estudios sobre aislamiento, identificación, aprovechamiento y conservación de hongos micorrízicos para la creación de planes de propagación de orquídeas *in situ*.

La identificación morfológica de especies fúngicas tiene limitaciones y no permite identificar con exactitud el taxón al cual pertenecen. En la actualidad una prueba de identificación más específica hace referencia a la identificación molecular cuyos

parámetros permiten determinar la especie de un determinado microorganismo”. (Unda, Agüero, Fariñas y Martínez, 2011). Jiang, Lee, Cubeta y Chen (2015) en su estudio “Caracterización y colonización de hongos *Rhizoctonia endomycorrhizal* en la hierba medicinal *Anoectochilus formosanus* (Orchidaceae)” mencionan que se evidenció cómo hongos aislados de raíces de orquídeas aumentaron la germinación de las semillas entre un 44 a 91% y promovieron el crecimiento protocórmico de las fases III a VI del cultivo *in vitro* en comparación con otros tratamientos en ausencia de hongos micorrízicos.

El objetivo principal de este estudio fue identificar hongos micorrízicos de orquídeas de los géneros *Dracula* y *Epidendrum* mediante técnicas morfológicas y moleculares, para lo cual nos hemos planteado como objetivos específicos aislar hongos micorrízicos presentes en las raíces de especies de los géneros *Dracula* y *Epidendrum* ORCHIDACEAE mediante la técnica de screening en medio PDA, con el fin de emplearlos en posteriores estudios de identificación; determinar las especies de hongos micorrízicos aislados mediante la observación de su morfología y análisis molecular de las secuencias ITS, para el estudio de la relación con cada especie de orquídea estudiada y analizar el potencial degradador de materia orgánica de los hongos identificados mediante método de DNS para su posible uso en cultivos simbióticos.

Capítulo 1

Marco Conceptual

1.1 Reino Fungi

Comúnmente denominados hongos, son un grupo de organismos heterótrofos cuya pared celular está formada de quitina, se reproducen empleando esporas que pueden ser de origen sexual o asexual y poseen un sistema de digestión externa mediante el uso de enzimas extracelulares que degradan la materia en componentes más sencillos (Richards, Leonard, y Wideman, 2017).

1.1.1 Micorrizas

Derivada de los términos griegos *myces*, hongo y *rhiza*, raíz, constituye la asociación simbiote entre el conjunto de hifas fúngicas (micelio) y los órganos de absorción (raíces, rizomas o talos) de una planta hospedera, las hifas pueden envolver a la raíz y penetrarlas a través del córtex o podrían penetrar la raíz, pero sin formar un manto externo (Camargo, Montaña, De la Rosa y Montaña, 2012). Generalmente las micorrizas constituyen asociaciones mutualistas donde tanto la planta como el hongo intercambian productos que benefician a la especie con quien se relacionan, siendo evidenciado el resultado de esta asociación en el desarrollo sincronizado de plantas y hongos (Brundrett, 2004). En esta relación mutualista la planta le ofrece al hongo un micro hábitat en el cual desarrollar su ciclo de vida, así como también la disponibilidad de azúcares mientras que el hongo mejora la captación de agua, nutrientes, minerales de baja disponibilidad y defensa contra posibles patógenos (Camargo et al., 2012).

De acuerdo con Brundrett (2004) no toda relación micorrízica es mutualista en un sentido estricto, pues los hongos micorrízicos actúan como necrótrofos, endófitos o antagonistas.

En un entorno natural una micorriza se forma mediante cambios bioquímicos entre planta y hongo, éste penetra en la raíz formando vesículas y arbusculos cuya función principal es la de traslocar a la planta los nutrientes tomados del suelo por parte del hongo y recibir el carbono liberada por la raíz en forma de azúcares producto de la fotosíntesis (Corpoica, 2007).

1.1.2 Clasificación

Andrade (2010) menciona que la clasificación actual de las micorrizas fue realizada en primera instancia por Harley y Smith en 1983, quien describe 7 tipos de micorrizas basadas en su morfología y grupo taxonómico. Los tipos de micorrizas son:

- Ectomicorriza: desarrolla sus hifas entre las células del córtex y en la parte exterior.
- Micorriza arbuscular: simbiosis tipo micorriza obligada para la especie fúngica más no para la planta.
- Endomicorriza: las hifas fúngicas se desarrollan en las membranas celulares de las células radicales.
- Micorrizas de orquídeas o endomicorriza orquideoide: son micorrizas del tipo endomicorriza que se relacionan exclusivamente con orquídeas.
- Micorriza ericoide: endomicorrizas exclusivamente del filo Ascomiceto asociado con plantas del orden Ericales y algunas briofitas.

- Micorriza arbutoide: de comportamiento entre endomicorriza y ectomicorriza.
- Micorriza monotropeide: son extomicorrizas que se relacionan exclusivamente con plantas de la familia *Monotropaceae*.

1.1.2.1 Ectomicorriza

Este tipo micorriza se caracteriza por rodear con sus hifas las células de la primera capa de las raíces secundarias formando un entramado conocido como *red de Hartig*, a través de la cual se transportan agua, nutrientes y minerales a cambio de fotosintetatos, mientras que en la parte exterior de la raíz se forma una capa de micelio conocida como manto, el cual retiene metales pesados, evita el ingreso de organismos patógenos y la pérdida de agua (Colinas et al., 2012).

Strasburger y Sitte (2004) mencionan que una vez formado el denominado *morfotipo ectomicorrízico*, el hongo secreta hormonas que producen la ramificación de la raíz adoptando un aspecto esponjoso y ramificado, donde finalmente, el micelio se extiende hacia el suelo y los pelos absorbentes de la raíz son reemplazados por las hifas fúngicas.

1.1.2.2 Endomicorriza

Los hongos endomicorrízicos crecen entre las células del córtex y penetran en las paredes celulares desarrollándose en la membrana celular, llegando a tener un mayor contacto con las células de la raíz, lo cual genera una relación simbiótica más invasiva, facilitando la transferencia de nutrientes entre planta y hongo (Reyna, 2012).

1.1.3 Micorrizas de orquídeas o endomicorriza orquideoide

De acuerdo con García (2011) las micorrizas orquidoides, al igual que cualquier endomicorriza, se desarrollan en la membrana celular, pero a diferencia de otras especies de hongos micorrízicos las plantas a las cuales se asocian dependen enteramente de ellos para cumplir con su ciclo vital, debido a que en algún momento de su vida carecen de clorofila por lo que necesitan de un hongo para obtener carbono y minerales.

Para las semillas, los hongos micorrízicos son determinantes para iniciar el proceso de la germinación, debido a que carecen de endospermo, cotiledones y su embrión es demasiado pequeño (Camargo et al., 2012).

En híbridos de orquídeas la provisión de carbono por parte del hongo a la planta no es tan esencial como en especies silvestres, sin embargo, poseen un sistema nutricional mixotrófico recibiendo carbono tanto de la fotosíntesis como de la interacción micorrízica (Roy et al., 2013).

Aunque los hongos micorrízicos de orquídeas pertenecen normalmente a los Basidiomicetos tipo *Rhizoctonia*, estudios recientes demostraron que pueden estar involucrados otros hongos (Kottke y Chacón, 2009).

La presencia de un hongo micorrízico adecuado es de vital importancia para el desarrollo de orquídeas en medios silvestres, siendo muchas especies fúngicas específicas para determinados ejemplares de orquídeas (Martos et al., 2012).

1.1.4 Importancia de las micorrizas

Las micorrizas son importantes por las siguientes razones:

Mejoran la absorción de algunos nutrientes, elementos químicos como el fósforo, nitrógeno, potasio, y calcio son absorbidos a través de las redes de hifas externas por transportadores como H⁺-ATPasa. (Guzmán y Farías, 2005).

Las hifas son capaces de penetrar partes del suelo que son inaccesibles para las raíces aumentando la absorción (Aguilar y Martínez, 2011).

Producen hormonas como las auxinas y citoquininas que mejoran el desarrollo de las orquídeas (Carrasco, 2010).

Incrementan la resistencia ante patógenos, pues las micorrizas por competencia inhiben el crecimiento de otros microorganismos muchos de los cuales afectan a la planta (Aguilar y Martínez, 2011).

La materia orgánica presente en los suelos se compone de restos animales y vegetales; es la principal fuente de carbono orgánico, el cual es importante ya que otorga al sustrato estabilidad físico-química, estabilidad de compactación y estabilidad bioquímica (Martínez, Fuentes, y Acevedo, 2008). Los hongos micorrízicos son los encargados de degradar la materia orgánica, mediante lo cual no solo el sustrato mejorará sus características sino que también serán beneficiadas las especies vegetales al tener acceso a carbono orgánico (Europapress, 2009).

1.2 Degradación de materiales poliméricos

Se entiende como degradación a los procesos que conducen a una modificación de la estructura y del peso molecular del polímero que, en general, disminuye; existen varios agentes que pueden desencadenar el proceso de degradación, los cuales son: luz (fotodegradación), calor (degradación térmica), agentes atmosféricos (degradación oxidativa), humedad (degradación hidrolítica), hongos y microorganismos (biodegradación) (Benavidez, 2014).

1.2.1 Celulosa

Es un polímero formado por moléculas de cadenas lineales de β -(1,4)-D-glucopiranososa (Muñoz, García, Méndez, Acevedo y Rodríguez, 2017). Se sintetiza en las plantas a partir de la GDP-glucosa (Guanosindifosfato) o la UDP-glucosa (Uridindifosfato) por acción de la celulosa-sintetasa (Benavidez, 2014).

La celulosa es la fuente de carbono renovable con mayor abundancia en la naturaleza y resalta su importancia en el ámbito biológico e industrial; es el componente principal de fibras naturales como es el caso del algodón, yute, lino, caña de azúcar, entre otras (Romero, Marfisi, Ontiveros, Rojas De Gáscue y Peña, 2014) .

El enlace que presenta la red de hidrógeno, hace de la celulosa un polímero estable que no se disuelve fácilmente en disolventes acuosos, esta red proporciona también una gran rigidez a las cadenas de celulosa (Kalia et al., 2011).

1.2.2 Biodegradación de la celulosa

Por biodegradación se refiere a la capacidad de un material para descomponerse en dióxido de carbono, metano, agua y componentes orgánicos, en el cual la acción enzimática de microorganismos sea el mecanismo predominante (Meneses, Corrales y Valencia, 2007).

Se ha logrado encontrar actividad celulolítica en algunas variedades de hongos y bacterias; los hongos son reconocidos como agentes de descomposición de celulosa en particular, para lo cual producen enzimas hidrolíticas para soportar su crecimiento, ya sea como saprófitos o como patógenos (Gutiérrez, Moreno y Montoya, 2015).

La actividad celulolítica está ampliamente distribuida en el reino Fungi; se ha reportado en hongos anaerobios de los géneros *Neocallimastix*, *Piromyces*,

Caecomyces, *Orpinomyces* y *Anaeromyces*, y en hongos aerobios de los géneros *Bulgaria*, *Chaetomium*, *Helotium*, *Neurospora*, *Coriolus*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Poria*, *Schizophyllum*, *Serpula*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Trichoderma* (Lynd, Weimer, van Zyl y Pretorius, 2002; Tian, Beeson, Iavarone, Sun, Marletta, Cate y Glass, 2009).

En la actualidad existen estudios que demuestran que hongos pertenecientes al Phylum *Ascomycota* dominan la comunidad microbiana encargada de la descomposición de residuos celulósicos (Wilson, 2011).

1.2.3 Determinación de actividad celulolítica

La degradación de la celulosa por microorganismos fúngicos se atribuye a las enzimas Endoglucanasas, Exoglucanasas y β -Glucosidasas, las cuales degradan la celulosa en componentes de menor peso molecular, entre ellos la glucosa (Escudero, Daza, Gil y Mora, 2013).

1.2.3.1 Cuantificación de azúcares reductores mediante método

DNS

Mediante análisis en espectrofotometría se puede cuantificar azúcares reductores en una muestra, elaborando una curva de calibración siguiendo el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS); el método consiste en una reacción redox que ocurre entre el DNS y los azúcares reductores, determinando grupos carbónicos libres de los azúcares reductores oxidándolos y provocando una reducción endotérmica (Mendez, Vidal, Lorber y Márquez, 2007).

Una mol de azúcar reacciona con una mol de DNS, de esta forma realizando una curva de calibración en base a DNS se puede relacionar las moles de DNS que han

reaccionado con las moles de azúcar, realizando una correlación para conocer la cantidad específica mediante la lecturas de absorbancia en espectrofotómetro a 540 nm (Meza, 2013).

1.1.5 Métodos de conservación de hongos

1.1.5.1 Aceite mineral

Consiste en recubrir con aceite mineral estéril un cultivo que se encuentre en óptimas condiciones de crecimiento (Ayala, 2017). Con esta técnica, los cultivos pueden mantenerse por un periodo de 12 a 30 meses (Instituto de Biotecnología, 2016).

1.1.5.2 Liofilización

Consiste en el congelamiento entre 0 y 5°C del cultivo de microorganismos seguido por un secado al vacío; este método es el más empleado a nivel industrial debido a que evita los riesgos de contaminación y mantiene la estabilidad genética de los microorganismos (Hernández y Loaiza, 2014).

1.1.5.3 Refrigeración

Consiste en mantener a los microorganismos en medio de cultivo a temperaturas entre los 4 y 10°C (Hoyos y Rodríguez, 2013).

1.1.5.4 Agar inclinado

Consiste en realizar resiembras del microorganismo en agar inclinado; esta metodología es válida para periodos de tiempo cortos, puede realizarse a temperatura ambiental y no requieren equipos específicos (Ayala, 2017).

1.1.5.5 Gel de sílice

Mediante este método de conservación es posible mantener la viabilidad de hongos por más de 10 años; consiste en suspender una concentración de conidios en una

mezcla de leche descremada y cristales de gel de sílice previamente enfriados (Montesinos, Ayala, y Berlanga, 2015).

1.2 Técnicas moleculares de Identificación de hongos

Para Murray, Rosenthal y Pfaller (2017) la secuenciación de ácidos nucleicos y los métodos proteómicos se están convirtiendo en las técnicas de referencia para identificación de hongos, por este motivo la secuenciación es la forma más rápida y objetiva de identificar especies de hongos basándose en la amplificación de las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS).

Los análisis moleculares comprenden la extracción de ADN, la amplificación de un segmento a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y finalmente la secuenciación (Iglesias, 2009). El marcador molecular por excelencia empleado para hongos lo constituye los espaciadores entre las regiones codificantes del ADNr que presentan secuencias de bases menos conservadas (Morerira, Huising y Bignell, 2012).

1.2.1 Extracción de ADN

Debido a que la molécula de ADN es el analito que se empleará en la amplificación, la pureza que tenga al final determinará el éxito en la reacción PCR; para realizar la extracción de ADN primero se debe realizar una lisis celular, empleando sales caotrópicas para romper las estructuras tridimensionales de proteínas y agentes detergentes como SDS para eliminar las membranas celulares (Microbial, 2009). La solución de lisis es la encargada de disolver membranas y organelos, incluidos mitocondrias y el núcleo (Cold Spring Center Harbor Laboratory DNA Learning, 2014).

Para degradar la fracción proteica asociada al ADN se puede emplear una solución de proteasa o añadir una solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, el fenol precipita las proteínas mientras que el cloroformo resuspende el ADN (Dhaliwal, 2013).

Cuando se ha degradado la fracción proteica comienza la purificación del ADN ya sea en etanol frío o en isopropanol debido a que el ADN no es soluble en estas soluciones; por medio de centrifugación el ADN precipita en un pellet el cual deberá ser purificado con lavados sucesivos de alcohol (Microbial, 2009).

El almacenamiento del ADN deberá ser en una solución tampón de Tris/EDTA para conservar la molécula a largo plazo, debido a que el Tris proporciona un pH 8 que reduce la actividad de nucleasas mientras que el EDTA se une a los cationes que emplean las mismas para funcionar quedando de esta forma inactivadas (Cold Spring Harbor Laboratory DNA Learning, 2014).

1.2.2 Espaciadores Internos Transcritos

El marcador molecular por excelencia para hongos es la región espaciadora transcrita interna ribosómica nuclear (ITS) pues otorga algunas ventajas por sobre otras regiones debido a su elevado contenido de información y a su facilidad de amplificación (Schoch et al., 2012).

La región ITS corresponde a las secuencias que intercalan las secuencias codificantes para la región ribosomal 16 S, 5.8 S y 26 S, constando de tres partes, la región ITS1, la región ITS2 y en medio de ellas la región 5.8 S altamente conservada (Saltos, 2012).

La región ITS posee una extensión de entre 500 a 750pb, ambos espaciadores se incorporan al ribosoma, pero sufren una escisión específica en el momento de la maduración del ARN ribosómico (Poczai y Hyvönen, 2010).

A diferencia de las regiones codificantes que tienen una evolución más lenta, los espaciadores evolucionan de forma más rápida, razón por la cual son empleados como marcadores en estudios filogenéticos en diferentes niveles (Poczai y Hyvönen, 2010).

Realizar estudios con la región ITS ofrece varias ventajas pues posee una herencia biparental, a diferencia de otros marcadores heredados por la madre, estructura multicopia, fácil amplificación ayudado por la existencia de varios cebadores universales ya establecidos, fácil secuenciación debido a su extensión moderada, sus altos número de copias resultado de la amplificación generando resultados altamente reproducibles y nivel evolutivo adecuado para estudios filogenéticos a nivel de género y especie debido a la existencia de polimorfismos, inserciones y deleciones de la secuencia (Schoch et al., 2012).

Los primers ITS1 e ITS4 se emplean en estudios taxonómicos por ser universales para todo tipo de especies fúngicas y debido a que actualmente se puede secuenciar toda la región ITS permitiendo de esta forma identificar especies de una manera mucho más eficaz; finalmente la región ITS no es conservada teniendo una variabilidad significativa en sus pares de bases haciéndolo importante en estudios de metabarcoding (Op De Beeck et al., 2014).

1.2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Conocida por sus siglas como PCR, es un ensayo enzimático desarrollado por el Dr. Kary Mullis en los años 80 que permite obtener múltiples copias de fragmentos de

ADN de interés a partir de trazas de ADN; este método necesita, además de la molécula de ADN, la enzima ADN polimerasa, nucleótidos y cebadores (Garibyan y Avashia, 2013).

Los cebadores también conocidos como primers, consisten en fragmentos cortos de ADN de secuencia específica que delimitan la secuencia a amplificar del ADN diana, dando la señal de inicio y fin al ADN polimerasa, el cual una vez haya reconocido estas secuencias empieza a unir nucleótidos complementarios al ADN molde (Garibyan y Avashia, 2013). Dado que el ADN polimerasa puede añadir nucleótidos a partir de un grupo 3'-OH preexistente el cebador cumple este papel permitiendo delinear la región específica de secuencia plantilla (NCBI, 2015).

Los componentes antes mencionados se mezclan en tubos o placas en concentraciones apropiadas y luego colocadas en un termociclador que es un equipo que genera ciclos de diferentes temperaturas en pasos preprogramados (Garibyan y Avashia, 2013).

Cada ensayo de PCR consta principalmente de tres ciclos, el primero conocido como desnaturalización, donde la temperatura se eleva por encima del punto de fusión de las dos hebras de ADN separándolas (92 – 96 °C), seguido de un descenso de temperatura que permite a los cebadores unirse a los segmentos diana del ADN, etapa conocida como hibridación (50 – 60 °C), y finalmente la temperatura se eleva nuevamente (72°C), para que la enzima ADN polimerasa extienda los cebadores, añadiendo nucleótidos y sintetizando los productos de PCR (Brunstein, 2013).

1.2.4 Electroforesis

De acuerdo a lo mencionado por Lee, Costumbrado, Hsu y Kim (2012) la electroforesis es el método por el cual se confirma la presencia o ausencia de ADN y

productos de PCR, debido a que el gel de agarosa se forma de aglomeraciones de L- y D-galactosa asociadas de forma no covalente, formando redes donde el tamaño del poro determina el recorrido que el fragmento de ADN puede recorrer.

El ADN o el producto de PCR se carga junto con un tampón de carga en pocillos previamente moldeados en el gel de agarosa, mismo que es colocado en la cámara electroforética, la cual genera un campo eléctrico que va desde el polo negativo cátodo, hacia el polo positivo ánodo, a través de un tampón conductor, el ADN posee carga negativa, debido a su esqueleto fosfato, razón por la cual migrará al ánodo en el campo eléctrico (Instituto Nacional de Salud del Perú, 2003). La distancia recorrida es inversamente proporcional al tamaño del ADN, es decir a mayor tamaño menor es la distancia recorrida (Lee et al., 2012).

Para visualizar los productos de PCR o el ADN es necesario añadir al gel un colorante químico (fluoróforo) el cual se intercala entre las hebras de la doble cadena de ADN, antiguamente se empleaba bromuro de etidio como colorante, pero actualmente se emplea Sybr Safe ($C_{28}H_{28}N_2O_3S_2$), el cual absorbe la luz azul a una longitud de onda máxima de 509 nm y emite luz verde a una longitud de onda de 524 nm (Garibyan y Avashia, 2013).

La velocidad a la cual migra el ADN dependerá de la concentración de agarosa en el gel, tamaño de la molécula del ADN, tipo de agarosa, tampón de electroforesis (conductor eléctrico), voltaje aplicado y conformación de ADN (Lee et al., 2012).

1.2.5 Secuenciación

Es el proceso que se le da al ADN posterior a la reacción de PCR con la finalidad de conocer la secuencia de bases nitrogenadas que forma la cadena de ADN (Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano, 2015).

1.2.5.1 Secuenciación Sanger

El método Sanger consiste en sintetizar una hebra de ADN complementaria a una hebra de cadena simple usada como molde; en la reacción intervienen el ADN polimerasa, los 4 2'-desoxinucleótidos (dNTP) y 4 dideoxinucleótidos (ddNTP) también conocidos como nucleótidos de parada que carecen del grupo 3'-OH que permite la adición de nucleótidos sucesivos deteniendo la síntesis de la nueva hebra al ser incorporados por el ADN polimerasa (Garrigues, 2017).

Vázquez (2016), menciona que el método se lleva a cabo en 4 reacciones distintas en diferentes tubos, cada uno de los cuales tendrá el mismo ADN molde, la enzima ADN polimerasa, un cebador específico para la secuencia, marcado radiactivamente, nucleótidos normales y los dideoxinucleótidos, uno para cada tubo correspondiente a la base nitrogenada. Se inicia la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) donde el ADN polimerasa añade nucleótidos a la cadena molde delimitada por el cebador radiactivo añadiendo dNTPs hasta que de forma aleatoria se incorpora el ddNTP interrumpiendo la reacción, así en cada tubo existirá fragmentos secuenciados de diferentes tamaños (Burnstein, 2017).

Finalmente, el resultado de la reacción es revelado por electroforesis capilar en un gel de acrilamida, cada fragmento interrumpido por un ddNTP marcado corre por el tubo capilar hasta alcanzar la cámara detectora donde un láser excita al fluoróforo, el cual emite una fluorescencia de un color determinado al que se le asigna el nombre de la base correspondiente y el orden de las emisiones revela la secuencia del ADN (Campion y Canul, 2004).

1.3 orquídeas

1.3.1 Generalidades

Son plantas de belleza exótica, que han logrado cautivar al ser humano por lo colorido de sus flores y fragancias, las mismas que han sido cultivadas y mejoradas para fines de ornamentación, convirtiéndose así en una de las principales flores en el mercado florícola a nivel mundial (Novoa, Espejo, Alarcón, Cisternas y Domínguez, 2015). El tamaño de las orquídeas es muy variado, las hay de unos pocos centímetros hasta plantas que llegan a medir 15 metros (García, 2011).

Las orquídeas han sido conocidas desde hace miles de años atrás, un ejemplo es en la antigua Grecia donde se las valoraba por sus cualidades curativas y afrodisiacas (García, 2011). Se cultivaban en China y en Japón desde hace al menos 25 siglos (Fallis, 2013).

El nombre de la familia viene del griego *orkhis* que significa testículos (por la semejanza de la pareja de tubérculos de algunas especies terrestres con aquellos órganos), el término fue empleado por Teofrasto de Ereso para nombrar una planta de este grupo en su obra *De causis plantarum* (Fallis, 2013).

Son una de las más numerosas familias de plantas del reino vegetal distribuidas por todo el mundo con alrededor de las 25000 especies (Novoa et al., 2015). Se divide en 5 sub-familias con 870 géneros y se distribuyen mayoritariamente en ambientes tropicales y templados, con excepción de los polos y algunos desiertos (Dressler, 2005).

1.3.2 Taxonomía

La clasificación taxonómica de las orquídeas según Tropicos (2017) es la siguiente:

Clase: Equisetopsida

Subclase: Magnoliidae

Superorden: Liliales

Orden: Asparagales

1.3.3 Hábito

Presentan tres tipos de hábito de acuerdo al sustrato donde se desarrollan (MINAM, 2015).

Orquídeas epífitas: Son plantas que se asientan sobre las ramas y troncos de los árboles (Cabrera, 2014).

Orquídeas terrestres: Se desarrollan a nivel del suelo (Salazar, 2013).

Orquídeas litófitas: Se asientan sobre las rocas que les brindan soporte para su desarrollo (Fischer, 2007).

1.3.4 Morfología

Flores: Tienen seis partes que son tres sépalos iguales entre sí, tres pétalos, de los cuales dos son iguales y uno diferente llamado labelo (Zaragoza, 2013).

El labelo puede envolver una pieza central llamada columna la cual contiene los órganos sexuales, también puede producir néctar u otros compuestos aromáticos para atraer a los insectos polinizadores de la flor (García, 2011).

Semillas: Son diminutas, carentes de endospermo (Vargas, 2012).

Hojas: Se pueden observar dos tipos de hojas: hojas conduplicadas que presentan venas del mismo tamaño, usualmente gruesas y hojas cilíndricas que son alargadas (MINAM, 2015).

Pseudobulbos: Protuberancias que se distinguen en la base de las hojas en el caso de orquídeas epífitas (Cadavid y Salazar, 2008).

Raíces: Son estructuras alargadas, cubiertas por un tejido esponjoso blanquecino llamado velamen (en el caso de orquídeas epífitas) esencial para la captación de agua y nutrientes (MINAM, 2015).

1.3.5 Formas de crecimiento

Monopodial: Poseen un tallo único de crecimiento vertical, en el centro se generan hojas nuevas constantemente (Ávila, 2015).

Simpodial: El tallo tiene una tendencia de crecimiento horizontal en el cuál se forman ápices dando origen a tallos con crecimiento vertical (Zaragoza, 2013).

1.3.6 Germinación

Las condiciones como la humedad, el calor y la aireación que provocan la germinación de la mayoría de plantas no son suficientes para el caso de las orquídeas (Fallis, 2013). Las semillas de las orquídeas generalmente necesitan de un hongo específico para lograr germinar realizando una función simbiótica, denominada micorrízica, que es cuando dos organismos conviven beneficiándose mutuamente sin afectarse (García, 2011).

Cuando a la semilla la invaden con una especie apropiada de hongo, ésta queda envuelta sobre una densa capa de hifas; en estas condiciones, las hifas aportan los azúcares al embrión necesarios para su crecimiento actuando como diminutas raíces que absorben nutrientes del medio (Fallis, 2013).

La germinación de orquídeas en ausencia de hongos micorrízicos es posible si la siembra se realiza en medios de cultivo con una alta concentración de azúcares (Fallis, 2013).

1.3.7 Importancia de las orquídeas

Las orquídeas cumplen un rol fundamental en la dinámica de bosques tropicales, están relacionadas íntimamente al ciclo de nutrientes y a la productividad primaria de los mencionados hábitats; de igual manera, distribuyen y albergan recursos a otros organismos, promoviendo la diversidad en distintos grados (Cruz y Greenberg, 2005).

Además de ser la clave para mantener con vida el planeta, las orquídeas brindan oportunidades para el desarrollo económico de las comunidades, a través de la creación de actividades turísticas que faciliten la observación de este tipo de plantas (Ministerio de Turismo, 2015).

1.3.8 Amenazas

Para Rivera (2007) la extracción indiscriminada, la explotación forestal, los incendios y la venta ilícita son ejemplos de peligros a los que están sujetos este tipo de plantas en el Ecuador.

Las orquídeas en su hábitat natural están consideradas como amenazadas y en peligro. Ecuador es parte del CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre) que tiene como propósito crear un marco legal para que la comercialización de la biodiversidad sea regulada y que a su vez el desarrollo de esta actividad no lleve a la extinción de estas especies (Jiménez, 2015).

Las orquídeas se encuentran en los apéndices I y II del CITES. Las especies del género *Phragmipedium* y *Perispermia* se encuentran en el apéndice I, es decir, están consideradas en peligro de extinción y su comercialización está prohibida; las

especies restantes se encuentran en el apéndice II y son las especies que no se encuentran en peligro de extinción pero que necesitan un estricto control en su comercio (UNEP, 2012).

1.3.9 Género *Dracula*

Las plantas del género *Dracula* fueron apreciadas en la horticultura mucho tiempo antes de que se estableciera formalmente el género en 1978; en la segunda mitad del siglo XIX, las especies de este género (entonces tratadas como *Masdevallia*) se cultivaron ampliamente por su belleza extraña y exótica (Pupulin, Merino y Medina, 2009). Para Ávila (2015) *Dracula* viene del latín “dragoncito”, el cual alude al aspecto de las flores de muchas especies.

El género *Dracula* es exclusivo del neotrópico y la mayoría de las especies se encuentran entre 1500 y 2500 metros de altitud (Sáenz y Camargo, 2003). Las plantas son pequeñas, de tallos cortos, hojas carinadas, sépalos intermitentes y las flores consisten en 3 sépalos unidos en su base con extremos alargados en puntas finas (Pupulin et al., 2009).

Existen 118 especies del género *Dracula* conocidas en todo el mundo, de las cuales más de la mitad se localizan en el noroccidente de la Cordillera de los Andes; para la flora del Ecuador se han registrado 56 especies, siendo Carchi (21), Pichincha (16) e Imbabura (10) las provincias más ricas en especies de este género (Zambrano y Solano, 2011).

Solamente 10 especies se conocen en la región amazónica ecuatoriana de las cuales 7 se localizan en Zamora Chinchipe y 3 en Morona Santiago (Pupulin et al., 2009).

1.3.10 Género *Epidendrum*

El nombre del género proviene del griego *epi*: sobre y *dendrom*: árbol, que hace referencia al hábitat usual de muchas de sus especies (Palacios, 2015).

Las especies de *Epidendrum* tienen una gran diversidad morfológica, algunas orquídeas pueden llevar docenas de flores diminutas, hojas planas, sus tallos secundarios pueden ser simples o muy ramificados, otras pueden tener tallos alargados similares a cañas (Crespo y Ortega, 2015).

Posee alrededor de 1000 especies, epífitas en su mayoría, distribuidas en América tropical a 3500 msnm y en el Ecuador se encuentran 442 de las cuales 324 se han identificado (Palacios, 2015).

Capítulo 2

Metodología

2.1 Colección de Orquídeas de los géneros *Dracula* y *Epidendrum*

2.1.1 Colección de muestras

Las raíces de orquídeas del género *Dracula* fueron proporcionadas por el Jardín Botánico “Orquídeas de Sarina” ubicado en El Quinche mientras que las raíces de orquídeas del género *Epidendrum* fueron recolectadas en el cantón Quijos (Anexo 1). Localizada la orquídea, se realizaron pequeños surcos alrededor de la planta y se obtuvieron 2 segmentos de raíz de 5 cm visualmente sanos. Posteriormente fueron almacenados en sobres de papel y fueron etiquetados con un código asignado en el libro de campo de Marco Cerna 2017, ver tabla 1.

Tabla 1

Códigos de las especies de orquídeas del género *Dracula* y *Epidendrum* utilizadas en el proceso de aislamiento de micorrizas.

Nº de especie	Código Marco Cerna
1	3365
2	3400
3	3401
4	3402
5	3403
6	3408
7	3409
8	3419
9	3420
10	3431
11	3454
12	3459
13	3460
14	3461
15	3462
16	3468
17	3470

Elaborado por: Los autores, 2017

2.2 Aislamiento e identificación de hongos micorrízicos

Los hongos micorrizicos fueron aislados de segmentos de raíces de especies pertenecientes a los géneros *Dracula* y *Epidendrum* ORCHIDACEAE.

2.2.1 Preparación de medios de cultivo

Potato dextrosa agar PDA: Se disolvieron 39 g de medio en un litro de agua destilada y se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos (Neogen, 2015).

2.2.2 Protocolo de desinfección

Las raíces fueron lavadas con agua potable para remover residuos adheridos a la muestra. En la cámara de flujo laminar, las raíces fueron hidratadas en un vaso de precipitación con agua destilada estéril; se retiró el velamen empleando pinzas y luego se lavaron con agua estéril. Posterior a estos lavados, las raíces fueron incubadas en tubos eppendorf de 2mL que contenían una solución de megacilina 20 ppm durante 24 horas a una temperatura de 24 °C (Hoyos y Rodríguez, 2013).

Las raíces fueron desinfectadas con lavados de agua destilada estéril por 2 minutos, alcohol al 70% por 2 minutos, agua destilada estéril por 2 minutos, hipoclorito de sodio al 2,5% por 1 minuto y finalmente agua destilada estéril por 2 minutos de acuerdo al protocolo de Otero, Ackerman y Bayman (2002).

2.2.3 Protocolo de siembra y aislamiento

Las raíces desinfectadas fueron cortadas en 4 segmentos de aproximadamente 0,2 cm mismos que se colocaron en una caja Petri con medio de cultivo PDA (Hoyos y Rodríguez, 2013) (Anexo 2).

Una vez realizadas las siembras, las cajas Petri se incubaron a 25 °C (Benalcazar, 2015). A los seis días se visualizó la presencia y desarrollo del micelio, luego se realizaron cinco subcultivos para obtener material fúngico puro y homogéneo.

Los hongos puros conseguidos fueron subcultivados en 3 repeticiones para ensayos posteriores.

2.2.4 Identificación de hongos aislados

Identificación morfológica

De acuerdo con la técnica de López et al (2014), se obtuvieron muestras de micelios mediante cinta adhesiva transparente, la cual fue colocada en un porta objetos que contenía una gota de azul de lactofenol, la muestra fue observada con 40x y 100x, se tomaron fotografías, para ubicar el género se comparó con las muestras registradas en el libro Illustrated Genera of Imperfect Fungi.

2.3 Metodología para la identificación molecular de micorrizas

La identificación molecular de micorrizas se realizó extrayendo ADN de muestras de hongos; posterior a ello se amplificó la región ITS mediante PCR convencional. Los productos de PCR fueron analizados en gel de agarosa para analizar presencia o ausencia de amplificación, a su vez, se confirmó si el tamaño de banda corresponde al tamaño de la región ITS.

Los productos de PCR fueron enviados a secuenciar mediante la técnica Sanger en la empresa MACROGEN en Corea.

2.3.1 Extracción de ADN

Las muestras fueron preparadas de acuerdo al protocolo descrito por Umesha, Manukumar y Raghava (2016) en la cámara de flujo laminar se tomaron 50 mg de material fúngico (cuerpo e hifas) de las cepas aisladas previamente. Con las cuales se procedió a extraer el ADN mediante una adaptación de las técnicas descritas por Raeder y Broda (1985) y Paredes y Yugsi (2016): al material celular colectado en los tubos eppendorf se añadió 500 µL de buffer de lisis (200 mM Tris HCl pH 8.5, 250

mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS), se homogenizó la mezcla empleando un agitador de vidrio, se aplicó el vórtex por un minuto y se incubó en el termo bloque por 20 minutos a 37 °C. Luego se agregó 500 µL de una solución a 4 °C de fenol-cloroformo en proporción 1:1 y se homogenizó en el vórtex por 5 minutos. Posterior a ello se centrifugó a 13000 rpm por 30 minutos para separar la fracción proteica suspendida en el fenol del ADN suspendido en el cloroformo.

El sobrenadante fue transferido a un tubo de 1.5 mL y se añadió 400 µL de cloroformo a -20 °C, se mezcló un 1 minuto por inversión y nuevamente se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos. Se tomó el sobrenadante y se incubó en un nuevo tubo junto con 4 µL de ARNasa (10mg/mL) a 37 °C por 30 minutos. Se agregó 500 µL de isopropanol a 4°C, se mezcló por inversión durante 1 minuto y se incubó a -20 °C por 15 minutos. Terminado el tiempo de incubación se centrifugó por 5 minutos a 13000 rpm. Se desechó el sobrenadante conservando el pellet formado, el cual fue lavado añadiendo 500 µL de etanol al 70% a -20 °C y mezclando 1 minuto por inversión. Finalmente se centrifugó por 5 minutos a 13000 rpm, posterior a ello el sobrenadante fue desechado, el pellet seco se re suspendió en 50 µL de TE y es almacenado a -20 °C.

Se determinó la presencia o ausencia de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, añadiendo 5 µL de Sybr safe por cada 50 mL de TBE 1X. Cada muestra fue preparada con 5 µL de ADN, 5 µL de tampón de carga Blue Juice 2X y fueron corridas a 90 V por 40 minutos en la cámara de electroforesis Labnet (Lee, et al, 2012). El gel fue revelado y fotografiado en un foto documentador Bio-imaging systems ® (Anexo 3).

2.3.2 Amplificación de la región ITS

La amplificación de la región ITS se realizó usando los primers ITS 1 (5´CCGTAGGTGAACCTGCGG-3´) e ITS 4 (5´TCCTCCGCTTATTGATATGC-3´), mediante la técnica PCR: En tubos de 0.2 mL se colocó 12.5 µL de Master Mix Go Taq *Promega*, 0.5 µL de primer ITS1 Forward, 0.5 µL de primer ITS 4 Reverse, 10 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de ADN resultando en un volumen final de 25 µL para cada tubo descrito en el manual de *Promega M7841*. La técnica de PCR se realizó en el termociclador marca *Labnet Multigene* ® bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, annealing a 53 °C por 1 minuto, extensión inicial por 1 minuto a 72 °C y extensión final de 10 minutos a 72 °C seguido de mantenimiento a 4 °C (Umesha et al., 2016).

Los productos de PCR fueron evidenciados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% bajo las mismas condiciones empleadas para detectar presencia de ADN (Anexo 4).

2.3.3 Secuenciación

Los productos de PCR fueron enviados a secuenciar en la empresa *Macrogen* en Corea, en tubos *ependorf* de 1.5 mL con 20 µL de muestra a una concentración de 20 ng para ser analizados empleando la técnica *Sanger*.

2.3.4 Análisis de secuencias

Se analizaron la validez de las secuencias obtenidas mediante el programa *FinchTV* versión 1.4.0. Posteriormente las secuencias fueron alineadas en el software *Muscle* del programa *Mega 7*, para finalmente elaborar un árbol filogenético mediante el método *Neighbor-joining* con el propósito de determinar si las especies fúngicas se

agrupan en función del género o en función de las orquídeas con quienes hacen simbiosis

2.4 Análisis del potencial degradador de materia orgánica por parte de los hongos micorrízicos

2.4.1 Degradación de celulosa

Fue necesario identificar a los hongos micorrízicos que tengan la capacidad de degradar materia orgánica con la finalidad de determinar si estas especies fúngicas aportan nutrientes como el carbono a las orquídeas con las que se relacionan y de esta manera conocer si su uso es posible en cultivos simbióticos.

Para estos ensayos se empleó el bagazo de caña cuyo material fue percolado con agua caliente para extraer al máximo los azúcares (Nuñez, 2016).

Se preparó medio nutritivo de 10 g de peptona, 10 g de NaCl y 1 g de extracto de carne para 1 L de agua suplementado con bagazo de caña previamente secado, pulverizado y tamizado a 1 mm de diámetro, a una concentración de 1% y se llevó el PH a 5.5 mediante adición de HCl 0.1N. Se esterilizó el medio y se repartió 30 mL en matraces previamente esterilizados. De las cajas Petri que contenían los cultivos puros se cortó un segmento de 1 cm² el cual se usó como inóculo para cada matraz e incubado a 26°C con agitación de 120 rpm por una semana. Para determinar la degradación de celulosa mediante cuantificación de azúcares reductores liberados se tomaron muestras cada 24 horas a partir de la inoculación (Jácome, Asanza y Carrión, 2009) .

Se realizó una curva patrón realizando soluciones estándar a 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 g/L de sacarosa haciendo reaccionar 1 mL de muestra con 1 mL de reactivo DNS (Anexo 5).

Se tomó 1 mL de muestra y se adicionó 1 mL de reactivo DNS, se llevó a ebullición cada muestra por 15 minutos y posterior a ello se detuvo la reacción en un recipiente con agua y hielo (Cristancho y Monroy, 2014). Se realizaron lecturas a 540 nm en espectrofotómetro en sensibilidad media, la absorbancia registrada fue reemplazada en la ecuación de la recta para conocer la concentración de azúcares reductores liberada durante cada tiempo de muestreo para cada especie de hongo (Guzmán, García y Larios, 2013) .

Capítulo 3

Resultados y discusión

3.1 Aislamiento de hongos micorrízicos

En este trabajo se investigaron 17 especies de orquídeas, de las cuales 9 pertenecen al género *Dracula* y 8 al género *Epidendrum*. Se obtuvieron 22 cultivos de hongos puros y posterior al análisis de secuencias se determinó que pertenecen a 18 especies diferentes de hongos micorrízicos. Ver tabla 4.

En 5 especies de orquídeas se observó la presencia de 2 micorrizas por cada especie vegetal, y en las 12 orquídeas restantes se encontró solo una micorriza por cada orquídea estudiada. Hoyos y Rodríguez (2013) estudiando los géneros *Oncidium*, *Pleurothallis*, *Stelis*, *Prostechea* y *Epidendrum* también encontraron una sola especie de micorriza para cada orquídea, llegando a aislar especies de hongos que actúan como patógenos y hongos que actúan como biocontroladores.

Girlanda *et al.*, (2011) encontraron que la especies *Ophrys fuciflora*, *Anacamptis laxiflora*, *Orchis purpurea* y *Serapias vomeracea* poseen especificidad fúngica correlacionada, pero en contraste con ello, Pecoraro *et al.* (2017) aislaron 9 taxones de hongos en raíces de *Cephalanthera damasonium* y 9 tipos de hongos para *Cephalanthera longifolia* mencionando que estas especies de orquídeas son generalistas en sus asociaciones micorrízicas.

3.2 Identificación Morfológica

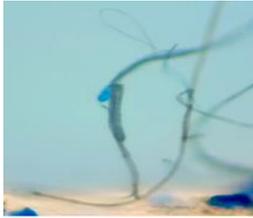
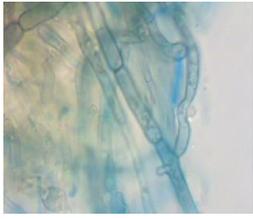
Las especies de hongos fueron identificadas morfológicamente a nivel de morfoespecie debido a la ausencia de esporulación, esto es muy común en cultivos *in vitro* como lo señalan Vanegas, Gutiérrez y Marín (2014). *Ascomycota* sp. fue la

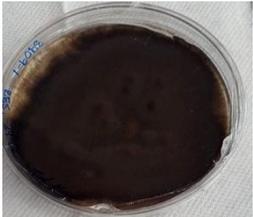
especie que mayor tiempo demoró en crecer encontrándose desarrollo de micelio a partir de los 20 días; en el resto de hongos se presentó un desarrollo variable entre los 7 a 14 días una vez realizada la siembra.

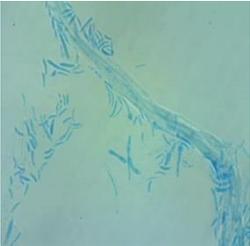
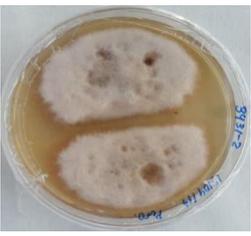
En la mayoría de las especies se presentó mejor definición de hifas al ser observadas con un aumento de 40X, mientras que aquellas que por su tamaño pudieron ser observadas a 100X son las que presentaban estructuras reconocibles para ser catalogadas de acuerdo a su género. Ver tabla 2.

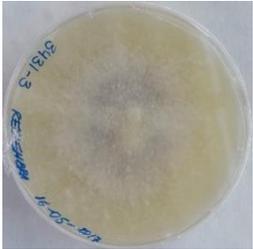
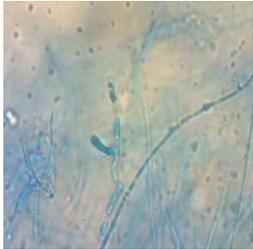
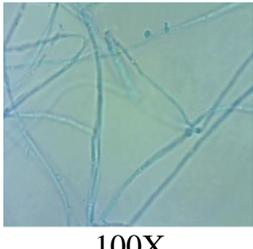
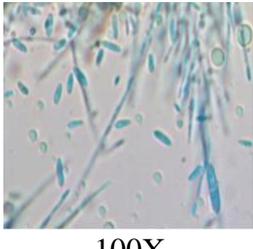
Tabla 2

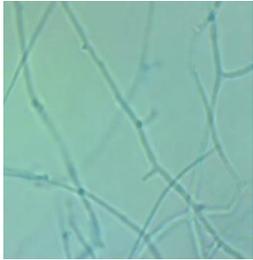
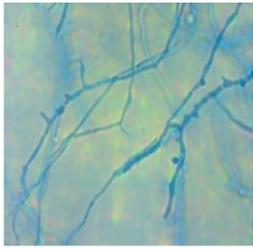
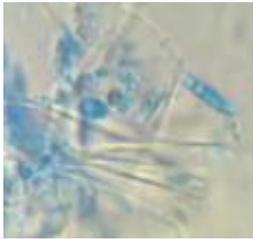
Identificación macroscópica y microscópica de micorrizas aisladas.

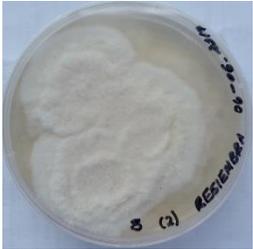
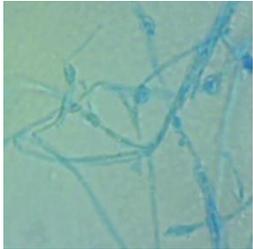
Especie de orquídea	Fotografía macroscópica	Fotografía microscópica	Descripción	Taxonomía
3400 <i>Dracula simia</i>		 40X	Forma: <i>Sclerotium</i> . Ausencia de conidios, esclerocios oscuros e irregulares, micelio delgado.	División: Ascomycota
3401 <i>Dracula simula</i>		 40X	Forma: <i>Rhizoctonia</i> Presencia de micelio largo ramificado.	Orden: Cantharellales Especie: <i>Cantharellales</i> sp.
3402 <i>Dracula vampira</i>		 40X	Forma: <i>Gonatorrhodiella</i> Ápice inflado, conidióforos rectos, robustos y hialinos.	Orden: Hypocreales Familia: Nectriaceae Especie: <i>Ilyonectria liliigena</i>

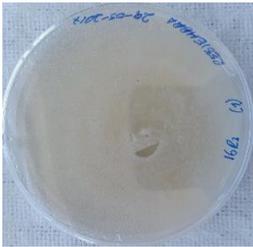
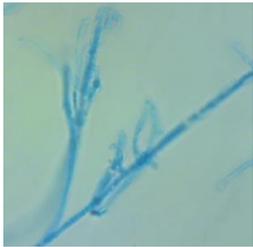
Especie de orquídea	Fotografía macroscópica	Fotografía microscópica	Descripción	Taxonomía
3403 <i>Dracula sodiroi</i>		 100X	Género: <i>Alternaria</i> Conidióforos oscuros con conidios ovoides separados longitudinalmente por septos, soportada acropetalmente en un apéndice apical.	Orden: Pleosporales Familia: Pleosporaceae Especie: <i>Alternaria</i> sp.
3408 <i>Dracula gigas</i> (Rosada)		 100X	Género: <i>Aspergillus</i> Conidióforos terminados en estructura globosa en masa con fialidas en el ápice.	Orden: Eurotiales Familia: Aspergillaceae Especie: <i>Aspergillus fumigatus</i>
3409 <i>Dracula navarrorum</i>		 100X	Forma: <i>Sordariomycetes</i> Estructuras filiformes unicelulares hialinas.	Orden: Xylariales Familia: Xylariaceae Especie: <i>Xylariaceae</i> sp.

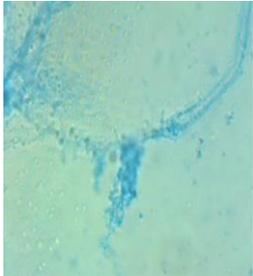
Especie de orquídea	Fotografía macroscópica	Fotografía microscópica	Descripción	Taxonomía
3419 <i>Dracula gigas</i>		 <p style="text-align: center;">40X</p>	<p>Forma: <i>Nodulosporium</i></p> <p>Conidióforos hialinos, células conidígenas cortas y gruesa.</p>	<p>Especie: <i>Sordariomycetes</i> sp.</p>
3420 <i>Dracula benedettii</i>		 <p style="text-align: center;">100X</p>	<p>Forma: <i>Gonatorrhodiella</i></p> <p>Conidióforos rectos hialinos, ápice inflado, conidios hialinos ovoides.</p>	<p>Orden: Hypocreales</p> <p>Familia: Nectriaceae</p> <p>Especie: <i>Ilyonectria protearum</i>.</p>
3431 <i>Dracula Gorgona</i>		 <p style="text-align: center;">40X</p>	<p>Género: <i>Phoma</i></p> <p>Conidióforos cortos, conidios unicelulares ovoides. Color crema.</p>	<p>Orden: Pleosporales</p> <p>Familia: Didymellaceae</p> <p>Especie: <i>Phoma</i> sp.</p>

Especie de orquídea	Fotografía macroscópica	Fotografía microscópica	Descripción	Taxonomía
3431 <i>Dracula Gorgona</i>		 100X	Forma: <i>Rhizoctonia</i> Micelio hialino largo	Orden: Xylariales Familia: Hypoxylaceae Especie: <i>Daldinia</i> cf. <i>loculatoides</i>
3365 <i>Epidendrum</i> sp.1		 100X	Forma: <i>Rhizoctonia</i> Micelio largo ramificado tabicado.	Orden: Xylariales Familia: Sporocadaceae Especie: <i>Neopestalotiopsis</i> sp.2
3454 <i>Epidendrum</i> sp.2		 100X	Forma: <i>Sordariomycetes</i> Estructuras filiformes unicelulares hialinas.	Orden: Hypocreales Familia: Nectriaceae Especie: <i>Ilyonectria</i> sp.

Especie de orquídea	Fotografía macroscópica	Fotografía microscópica	Descripción	Taxonomía
3454 <i>Epidendrum</i> sp.2		 40X	Forma: <i>Rhizoctonia</i> Micelio largo ramificado tabicado.	Orden: Diaporthales Familia: Valsaceae Especie: <i>Phomopsis</i> sp.
3459 <i>Epidendrum</i> sp.3		 40X	Forma: <i>Sclerotium</i> Ausencia de conidios, esclerocios oscuros e irregulares, micelio delgado.	Orden: Xylariales Familia: Sporocadaceae Especie: <i>Neopestalotiopsis</i> sp.1
3460 <i>Epidendrum</i> sp.4		 100X	Forma: <i>Rhizoctonia</i> Micelio ramificado largo y hialino.	Orden: Xylariales Familia: Sporocadaceae Especie: <i>Pestalotiopsis microspora</i>

Especie de orquídea	Fotografía macroscópica	Fotografía microscópica	Descripción	Taxonomía
3460 <i>Epidendrum</i> sp.4		 40X	Forma: <i>Papulospora</i> Micelio color marrón claro, estructuras similares a esclerotio en grupos compactos a manera de bulbils.	Orden: Calosphaeriales Familia: Calosphaeriales Especie: <i>Calosphaeriales</i> sp.
3461 <i>Epidendrum</i> sp.5		 40X	Forma: <i>Rhizoctonia</i> Micelio ramificado largo y hialino.	Orden: Hypocreales Familia: Hypocreaceae Especie: <i>Trichoderma koningiopsis</i>
3461 <i>Epidendrum</i> sp.5		 100X	Forma: <i>Sclerotium</i> Esclerocios marrón e irregular.	Orden: Glomerellales Familia: Glomerellaceae Especie: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>

Especie de orquídea	Fotografía macroscópica	Fotografía microscópica	Descripción	Taxonomía
3462 <i>Epidendrum</i> sp.6		 40X	Forma: <i>Rhizoctonia</i> Micelio ramificado largo y hialino.	Reino: <i>Fungi</i> Especie: Morfo especie 1
3468 <i>Epidendrum</i> sp.7		 40X	Forma: <i>Papulospora</i> Micelio color marrón claro, estructuras similares a esclerotio en grupos compactos a manera de bulbils.	Reino: <i>Fungi</i> Especie: Morfo especie 2
3468 <i>Epidendrum</i> sp.7		 40X	Género: <i>Trichoderma</i> Conidióforos ramificados no verticilados, conidios unicelulares ovoides.	Orden: Hypocreales Familia: Hypocreaceae Especie: <i>Trichoderma viride</i>

Especie de orquídea	Fotografía macroscópica	Fotografía microscópica	Descripción	Taxonomía
3470 <i>Epidendrum</i> sp.8		 40X	<p>Género: <i>Trichoderma</i></p> <p>Conidióforos ramificados no verticilados, conidios unicelulares ovoides.</p>	<p>Orden: Hypocreales</p> <p>Familia: Hypocreaceae</p> <p>Especie: <i>Trichoderma viride</i></p>

Nota: La clasificación taxonómica se incluyó en la tabla una vez realizada la identificación molecular.

Elaborado por: Los autores, 2017. Fuente: (Barnett y Hunter, 1955), (NCBI, 2017b).

En la mayoría de hongos analizados no se pudo diferenciar estructuras típicas de su especie por la ausencia de esporulación. De acuerdo con Vanegas, Gutiérrez y Marín (2014), cultivos de hongos realizados *in vitro* se vuelven estériles presentando desarrollo vegetativo razón por la cual muchas especies son clasificadas solamente como *Mycelia sterilia*.

3.3 Extracción de ADN y amplificación de la región ITS

La extracción de ADN se realizó con el método de fenol-cloroformo modificado por Raeder y Broda, (1985); Paredes y Yugsi, (2016); permitió obtener ADN con un tamaño de aproximadamente 1000 pb como se pudo observar en el gel de electroforesis (Anexo 3b).

El ADN obtenido fue utilizado para amplificar la región ITS mediante la técnica PCR convencional y se obtuvieron bandas con una media de 525 pb, lo cual indica que corresponde al tamaño normal a la región ITS, siendo su tamaño variable entre 500 y 750 pb de acuerdo a lo mencionado por (Poczai y Hyvönen, 2010).

3.4 Análisis de secuencias

En la mayoría de las especies se ha obtenido una identidad y cobertura superior al 98%. Algunas especies fueron identificadas solo a nivel de género y orden, esto debido a que no se encontró información registrada en las bases de datos. Ver tabla 3.

Tabla 3

Análisis de secuencias en el software BLAST

Código	Hongo aislado	Identidad	Secuencia obtenidas
3400 <i>Dracula simia</i>	<i>Ascomycota</i> sp.	98%	TGCCCTTCCGGGTAGATCTCCCACCCTTGAATAAAATACCTTT GTTGCTTTGGCAGGACGCGTTTACGCCAGAGGCTTCGGCTTT TGAGTGCTGCCAGAGGACCACAACCTCTGTTTTAGTGATGT CTGAGTACTATAATAAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTC TTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA ACGCACATTGGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTT CGAGCGTATTATAACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGAG CTCGCTATCTGCGGCTCCTAAAATCAGTGGCGGTGCCTGTAG GCTCTACGCGTAGTAATACTTCTCGCTATAGAGTCTGTGGG TTACTTGCCAACAACCCTAATTTTTAAGGTGACCTCGGAT CAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAA
3401 <i>Dracula simula</i>	<i>Cantharellales</i> sp.	95%	TGAAACCCGTCTCTCGTGTTACCTCGAAAACTTTTTTTTT CCAAGGCACACGTTAAAGATCGTTCGCGTGTGAGTCTAAC ATCGGTTGTATAAACTTTTTACAACCGGTAGCGCTGGATCCC TTGGCACGTCATTGATGAAGACCGTTGCAAATGCGATAAA GTGATGTGATGCGCAAGTCCACCCTTACGTGAATCATCG AGTTGTTGAACGCATTGCACCGCGCCCTAATCCGGTGCGGT ATGCCCTTTGAGCGTATTGTATCCCTTCGGGAGTCCTTTTA CAAGGACCCGAGTTCCGGAGCCCTCGGTCCTCTCGGATCGTG TTCTCTCATATGCTCGCGCGATCGCTGATGGGGCCCCCA ATGCCTAAGCGTGGAGTTCCTCCTAAACCCAGAAACGCTTG ACCGGCTTTGAGCCCGCTCCAAGTCTGCCTAACCGGGG GACTAAAAACATGACCTCATTGG
3402 <i>Dracula vampira</i>	<i>Ilyonectria liliigena</i>	99%	CCCTGTGACATACCATTGTTGCTCGGGCGTGCCTGCTTCG GCAGCCCGCCAGAGGACCCAAACCTTGATTTTATACAGTAT CTCTGAGTAAATGATTAATAAATCAAACCTTCAACAACG GATCTCTGGTCTTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATC TTTGAACGCACATTGGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGC CTGTTCGAGCGTCAATTTCAACCTCAAGCCCCGGGCTTGGT GTTGGAGATCGGGCTGCCCCCGGGGCGCGCCGCTCCCAA ATATAGTGGCGGTCTCGCTGTAGCTTCTCTGCTAGTAGCA CACCTCGCACTGAAAAACAGCGTGGCCACGCCGTTAAACCC CCACTTCTGAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCG CTGAACCTAAGCATAT
3403 <i>Dracula sodiroi</i>	<i>Alternaria</i> sp.	100%	TCTCGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATCACCTTGTCTTTT GCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTCCGCCACCACTAGGAC AAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAA TTAATAATTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGC ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAAT TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC GCCCTTTGGTATTCCAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATT TGACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGTCTCTAG CTTTGTGAGACTCGCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCCTA CTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTGCACCTCTATCAGCAA AGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCG GATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAAT
3408 <i>Dracula gigas (rosada)</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100%	CTCCACCCGTGTCTATCGTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCC CCGTTTTGACGCGCCCGGGGAGGCTTGCGCCCCCGGGCCC GCGCCCGCCGAAGACCCCAACATGAACGCTGTCTGAAAGT ATGCAGTCTGAGTTGATTATCGTAATCAGTTAAAACCTTCAA CAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCG AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT CGAGTCTTTGAACGCACATTGGCCCCCTGGTATTCCGGGGG GCATGCCTGTCCGAGCGTCAATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTT GTGTGTTGGGCCCCCGTCCCTCTCCCGGGGACGGGCCCC AAAGGCAGCGGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGG GGCTTTGTCACCTGCTCTGTAGGCCCGGGCGCCAGCCGA CACCCAACCTTTATTTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAG

			GGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT
3409 <i>Dracula navarrorum</i>	<i>Xylariaceae</i> sp.	99%	TACCTTACGTTGCCTCGGCAGGTGCGCCTACCTAGTAGCAC CCTACCCTGTAGGGCCTACCCGGGAGACGCGGGTAAGCCTG CCGGCGGCCACGAACTCTGTTAATATTGAATTCTGAACA TATAACTAAATAAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGG TTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC ACATTGCGCCCATAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTCCGAG CGTCATTTCAACCCCTAAGCCTCTGTTGCTTAGTGTGGGAGC CTACAGCACCTGTAGCTCCCCAAAGTTAGTGGCGGAGTCGGT TCACACTCTAGACGTAGTAATTTTATCTCGCCTATTAGTTGGA CCGGTCTCCCGCGTAAAACCCCTAAAATTTGAAGGTTGACC TCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGC
3419 <i>Dracula gigas</i>	<i>Sordariomycetes</i> sp.	99%	TACTTCAACCATTGCGAACTCGTCCAAGTTGCTTCGGCGGCG CGGCTCCCTAACGGGGGCGCCGAGCCCTGCCTCTCCGGA GGTTCCGGGGCGCCCGCGGAGGTACGAACTCTGTATTATAG TGGCATCTCTGAGTAAAAAGCAAATAAGTTAAAACCTTCAAC AACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCGAATTCAGTGAATCATC GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTAGTACTTACCGGG CATGCCTGTTGAGCGTCATTCAACCCCTCAAGCTCTGCTTG GTGTTGGGGCCCTACGGCTGCGGTAGGCCCTGAAAGGAAGT GGCGGGCTCGCTACAACCTCCGAGCGTAGTAATTCATTATCTC GCTAGGGAGGTTGCGGCGTCTCTGCGGTTAAAGACCATC TTAAACCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTG AACTTAAGCATATCAATA
3420 <i>Dracula benedetti</i>	<i>Ilyonectria protearum</i>	99%	ACTCCCAACCCCTGTGACATACCATTGTTGCTCGGCGGTG CCTGCTTCGGCAGCCCGCCAGAGGACCCAAACCTTGATTTT ATACAGTATCTTCTGAGTAAATGATTAATAAATCAAAAACCT TCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCA GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAA TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCAGTATTCTG GCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTCAACCCCTCAAGCCCC CGGGCTTGGTGTGGAGATCGGGCGTCCCTCCGGGGCGCGCC GGCTCCAAAATATAGTGGCGGTCTCGCTGTAGCTTCTCTGCG GTAGTAGCACACCTCGCACTGGGAAACAGCCCTGGCCACGCC GTTAAACCCCACTTCTGAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTA GGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATC
3431 <i>Dracula Gorgona</i>	<i>Phoma</i> sp.	100%	GCTATCTCTTACCCATGTCTTTTGTGAGTACCTTCGTTTCTCGG CGGGTCCGCCCGGATTGGACAAATTTAAACCCCTTTGCAGT TGCAATCAGCGTCTGAAAAACATAATAGTTACAACCTTCAA CAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA AATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCGAATTCAGTGAATCATC GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCATGGGG CATGCCGTTGAGCGTCATTGTACCTCAAGCTCTGCTTGG TGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGGTGAGACTCGCCTTAAA ACAATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTTCGGAGCGCAGTACATC TCGCGCTTTGCACTCATAACGACGACGTCCAAAAGTACATTT TTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAC TTAAGCATA
	<i>Daldinia cf. loculatoides</i>	96%	CCTTTGTGACCTTACCGTCTGTTGCCTCGGCGGGCTGTGCCTAC CCGGTAGCTACCCGGTAGGTGCGCTCCAAGCCCGCCGGTGG ACCGCTAAATCTATTTAATACTGTATCTGAAATGCTTCAA CGTAATAAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTG GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTATTGAGCGTCA TTTCAACCCCTAAGCCTCAGTGTCTAGCGTTGGGAATCTGC CCTGTATTTATAGGGCAGTTCCTTAAAGTATTGCGAGAGTT GGGGCATACTCTAAGCGTAGTACTATTCTCTCGCTTCTGTA GTTGCTCGGGGCTTGGCTTAAAACCCCTATATTCTCTGTG GTTGACCTCGGATTAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCA TATCAATAAGCGGAGGAA
3365 <i>Epidendrum</i> sp. 1	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.1	100%	TGTGAACTTACCTTTTGTGCTCGGCAGAAATATAGGTCTT CTTATAGCTGCTGCCGGTGGACCATTAAACTCTGTTATTTA TGTAATCTGAGCGTCTTATTTAATAAGTCAAAAACCTTCAAC AACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCGAATTCAGTGAATCATC GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATAGTATTCTAGTGGG CATGCCGTTGAGCGTCATTCAACCCCTAAGCCTAGCTTA GTGTTGGGAATCTACTTCTTAGGAGTGTAGTTCCTGAAA

			TACAACGGCGGATTTGTAGTATCCTCTGAGCGTAGTAATTTT TTTCTCGCTTTTGTAGGTGCTATAACTCCCAGCCGCTAAACC CCCAATTTTTGTGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCC GCTGAACCTAAG
3454 <i>Epidendrum</i> sp.2	<i>Ilyonectria</i> sp.	99%	CCCTGTGACATACCATATCGTTGCCTCGGCGGTGCCGTTTC GGCGGCCCGCCAGAGGACCCAAACCCTGTATTAAGTATTCT TCTGAGTAAATGATTAATCAATCAAACTTTCAACAACGGA TCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT TGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCT GTCCGAGCGTCATTCAACCCTCAAGCCCGGGCTTGGTGT TGGAGATCGGCGAGCCCTCCGGGGCAAGCCGTCTCCAAATT TAGTGGCGGTCTCGCTGTAGCTTCCTCTCGGTAGTAGCACAC CTCGCACTGGGAAACAGCGTGGCCACGCCGTAAACCCCCC ACTTCTGAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCT GAACCTAAGCATATCAATAA
	<i>Phomopsis</i> sp.	100%	CCTTTGTGAACCTATACCTTTTAGTTGCCTCGGCGTCAGGCCG GCCCCCTAGGGGCCCTCGGAGACGAGGAGCAGGCCCGCCG ACGGTACACCAAACTCTGTTTTACACTGAAACTCTGAGAA ATAAACATAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG GTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG CACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCTGTTCGA GCGTCATTCAACCCTCAAGCCTGGCTTGGTGATGGGGCACT GCTTCGCAAGGAGCAGGCCCTGAAATCTAGTGGCGAGCTCG CCAGGACCCCGAGCGCAGTAGTTAAACCCTCGCTCTGGGAA GCCCTGGCGGTGCCCTGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAAAA TTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCA TATCAATAAGCGGAGGA
3459 <i>Epidendrum</i> sp.3	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.2	100%	GGGGGCCTTGAAGCATGGCAGCGTGCATGCTCCCTAAACCC ACTGTAACCTGACCCTGTTCTTGCTTTCCGGCAGGCAGCC CAGGGAGGGGCTCTCGGCTTCTAGCGGTGGGGACTCGTCCCC CCCGGAGCGCCTGCCGGACGGCACCACAACAACTTTCAT GGCGTATCTTTACTGTCTGAGTACTGAAAAAACAAAGTTA AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAG AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCACTAGC ACTCTAGTGGGCATGCTGTTTCGAGCGTCATTTCCACCCTC GAGCCACCTGTGGCTCGGCGTTGGGGCGTGCTACAGCGGTGC TCCGGCGCCCGTAGGCCCTGAAAGTTAGTGGCGGGCTCGCT AGTGCTCCGGCGTAGTAATCTCTTACCTATCGCCTAGGAGG CCTGGCGGGTTGCTGGCCGTTAAACACCCTAAATTACAGAA GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGC ATATCAATAAGCCGGAGGAAAATCAATAGCTGAAATTTCTT TATCGTTTCGATTAGATCCTTAACTAAGATTCTTTCTGACTGT AGTATGGCATCCCAATAGGGGACTGGGCGGGTTTCTCTTGT CAGATTTTCCATTATAGCTGGACGTGGACGCATATGTTGTA TCTCTATCACAATTGAATCTGGATCTCCAAAAATATATCTT ATATCGTATATAGTCTAACTTCGGGGTTATGGCACACACTAA ACAAATAATCTCTATGGCTTTTACTACCCCTTTTCGCTATTT CTCT
3460 <i>Epidendrum</i> sp.4	<i>Pestalotiopsis</i> <i>microspora</i>	100%	TGTGACTTACCTTTTGTGCTCGGCAGAAGTTATAGGTCTTC TTATAGCTGCTGCCGGTGGACCATTAAACTCTTGTATTITAT GTAATCTGAGCGTCTTATTTAATAAGTCAAACTTTCAACA ACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG AATCTTTGAACGCACATTGCGCCATTAGTATTCTAGTGGC ATGCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCTAGCTTAG TGTTGGGAATCTACTTCTCTTAGGAGTTGTAGTCTCGAAAT ACAACGGCGGATTGTAGTATCCTCTGAGCGTAGTAATTTT TTCTCGCTTTTGTAGGTGCTATAACTCCCAGCCGCTAAACC CCAATTTTTGTGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCG CTGAACCTAAGCATATCAATAA
	<i>Calosphaerialis</i> sp.	80%	GTGACTTACCTTTTGTGCTCGGCAGAAGTTATAGGTCTTCT TATAGCTGCTGCCGGTGGACCATTAAACTCTTGTATTITATG TAATCTGAGCGTCTTATTTAATAAGTCAAACTTTCAACAA CGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA ATCTTTGAACGCACATTGCGCCATTAGTATTCTAGTGGGCA

			TGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCTAGCTTAGT GTTGGGAATCTACTTCTTCTTAGGAGTTGTAGTTCCTGAAATA CAACGGCGGATTTGTAGTATCCTCTGAGCGTAGTAATTTTTT CTCGCTTTTGTAGGTGCTATAACTCCCAGCCGCTAAACCCC CAATTTTTGTGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGC TGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
3461 <i>Epidendrum</i> sp.5	<i>Trichoderma</i> <i>koningsiopsis</i>	100%	CCCAATGTGAACCATAACAACTGTTGCCTCGGCGGGGTCAC GCCCGGGTGCCTGCGAGCCCCGAACAGGCGCCCGCCGG AGGGACCAACCAAACTCTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTT ATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATCAAAATGAATCAAAAC TTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACC CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTC TGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACC CTCCGGGGGGTCCGGGTTGGGACTTCGGGAACCCCTAAG ACGGGATCCCGGCCCTAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCA GCCTCTCCTGCGCAGTAGTTGCACAACCTCGACCCGGGAGCG CGGCGCGTCCACGTCCGTAAAACACCAACTTCTGAAATGTT GACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCAT
	<i>Colletotrichum</i> <i>gloeosporioides</i>	99%	CCCTTTGTGACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGCAGGG TCTCCGTGACCCTCCCGGCCCTCCCGCCCCGGGCGGTTCGGC GCCCGCCGGAGGATAACCAAACTCTGATTTAACGACGTTTCT TCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAACTTTTAAACAACGG ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT TTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCC TGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGG GGCCCTACGGCTGACGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGAC CCTCCCGGAGCCTCCTTTCGCTAGTAACCTTACGCTCTCGCACT GGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCAATTTTCCA AAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTA AGCA
3462 <i>Epidendrum</i> sp.6	<i>Fungal</i> sp.1	99%	TCCAAACCCTTTGTGACCTTACCCTGCTTTTCTCGGCGCGTGC TGCGGTTACCCTGTAGCTACCCTGGAGACACCTACCCTGTAG GTGTCTACCCTGGAGCTACCCTGTAGCCGCGTGAAGGCCCGC CGCAGGACCATTAAACTCTGTTTTTACAGCTGTATCTCTGA ATACTTAACTGAAATAAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTC TTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA ACGCACATTGCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTATT CGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCCTGTGCTTAGCGTTGG GAGTCTACGGCTTCGGCGTAGTTCCTGAAAAATCAGTGGCGGA GTTAGGGTACACTCTCAGCGTAGTAATCTCTCTCGCTTGTGT GGTGGCCCTGGCTGCTAGCCGTAAAACCCCTATTTTCTAGT GGTTGACCTCGGATTAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGC AT
3468 <i>Epidendrum</i> sp.7	<i>Fungal</i> sp.2	99%	TTTGTGACCTTACCCTGCTTTCTCGGCGCGTGTGCGGTTAC CCTGTAGTACCCTGGAGACACCTACCCTGTAGGTGCTACC CTGGAGCTACCCTGTAGCCGCGTGAAGGCCCGCCGAGGAC CATTAAACTCTTGTTTTTACAGCTGTATCTCTGAATGCTTAA TGAAATAAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTG GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTATTCGAGCGTCA TTCAACCCTTAAGCCCTGTGCTTAGCGTTGGGAGTCTACG GCTTCGGCGTAGTTCCTGAAAATCAGTGGCGGAGTTAGGGTA CACTCTCAGCGTAGTAATCTCTCTCGCTGTGTGGTGGCCCTG GCTGCTAGCCGTAAAACCCCTATTTTCTAGTGGTTGACCTC GGATTAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCAT
	<i>Trichoderma viride</i> sp.1	99%	GTGACCATACCAAACTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGG GTGCGTGCAGCCCGGAACAGGCGCCCGCCGGAGGGACC AACCAAACTCTTCTGTAGTCCCCTCGGGACGTTATTTCTTA CAGCTCTGAGCAAAAATCAAAATGAATCAAACTTTCAAC AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGG CATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGG GGGTCGGCGTTGGGACTTCGGGAACCCCTAAGACGGGAT CCCGGCCCTAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCC

			TGCGCAGTAGTTGCACAACCTCGCACCGGGAGCGGGCGCG TCCACGTCGGTAAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCG GATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
3470 <i>Epidendrum</i> sp.8	<i>Trichoderma viride</i> sp.2	100%	TGTGAACCATACCAAACCTGTTGCCTCGGGGGGTCACGCCCC GGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACAGGCGCCCGCGGAGGGA CCAACCAAACCTTTCTGTAGTCCCTCGGGACGTTATTTTT ACAGCTGTAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAACTTTCAA CAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCA AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCAGTATTCTGGCGGG CATGCCTGTCCGAGCGTCATTCAACCCTGAACCCCTCCGG GGGGTCGGCGTTGGGACTTCGGGAACCCCTAAGACGGGAT CCCGGCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCA TGCGCAGTAGTTGCACAACCTCGCACCGGGAGCGGGCGCG TCCACGTCGGTAAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCG GATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCAT

Elaborado por: Los autores, 2017. Fuente: (NCBI, 2017a)

Se identificaron 19 micorrizas del filo Ascomiceto, 1 micorriza Basidiomiceto y 2 hongos que no pudieron ser clasificados taxonómicamente usando la base de datos del NCBI, por lo que fueron nombrados como *Fungal* sp.1 y *Fungal* sp.2. Dearnaley, Martos y Selosse (2012) indican que las orquídeas hacen simbiosis del tipo micorriza con basidiomicetos y ascomicetos.

Tabla 4

Hongos micorrízicos aislados de especies pertenecientes a los géneros *Dracula* y *Epidendrum* ORCHIDACEAE.

Código	Especie de orquídea	Hongo aislado	Letra asignada
3400	<i>Dracula simia</i>	<i>Ascomycota</i> sp.	A
3401	<i>Dracula simula</i>	<i>Cantharellales</i> sp.	B
3402	<i>Dracula vampira</i>	<i>Ilyonectria liliigena</i>	C
3403	<i>Dracula sodiroi</i>	<i>Alternaria</i> sp.	D
3408	<i>Dracula gigas</i> (Rosada)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	E
3409	<i>Dracula navarrorum</i>	<i>Xylariaceae</i> sp.	F
3419	<i>Dracula gigas</i>	<i>Sordariomycetes</i> sp.	G
3420	<i>Dracula benedettii</i>	<i>Ilyonectria protearum</i>	H
3431	<i>Dracula Gorgona</i>	<i>Phoma</i> sp.	I
		<i>Daldinia</i> cf. <i>loculatoides</i>	J
3365	<i>Epidendrum</i> sp.1	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.1	K
3454	<i>Epidendrum</i> sp.2	<i>Ilyonectria</i> sp.	L
		<i>Phomopsis</i> sp.	M
3459	<i>Epidendrum</i> sp.3	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.2	N
3460	<i>Epidendrum</i> sp.4	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	O
		<i>Calosphaerialis</i> sp.	P
3461	<i>Epidendrum</i> sp.5	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	Q
		<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	R
3462	<i>Epidendrum</i> sp.6	<i>Fungal</i> sp.1	S
3468	<i>Epidendrum</i> sp.7	<i>Fungal</i> sp.2	T
		<i>Trichoderma viride</i> sp.1	U
3470	<i>Epidendrum</i> sp.8	<i>Trichoderma viride</i> sp.2	V

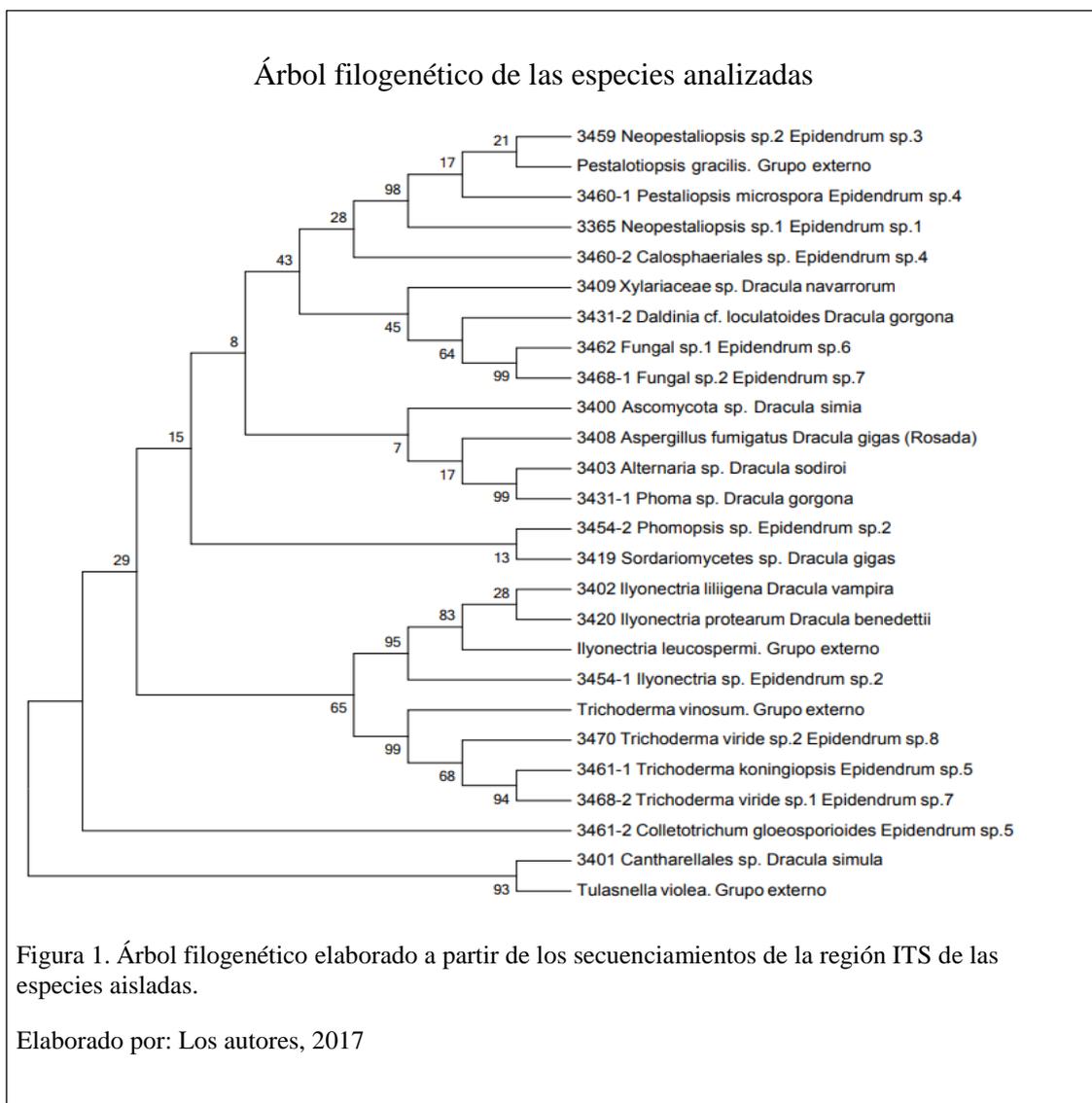
Nota: A cada especie de hongo se le asignó una letra del alfabeto con la finalidad de analizar si la relación entre orquídea y hongo micorrízico es específica para cada especie vegetal. Elaborado por: Los autores, 2017.

El género *Ilyonectria* se encontró en *Dracula vampira*, *Dracula benedettii* y *Epidendrum* sp.2, y especies del género *Trichoderma* fueron aisladas únicamente en orquídeas *Epidendrum*. El género *Ilyonectria* también fue aislado por Han, Xiao y Gao (2016), a partir de raíces de la orquídea china en peligro de extinción *Paphiopedilum spicerianum*.

Fueron aisladas especies que son patógenas para otras plantas, pero beneficiosas para orquídeas (Ordoñez, 2012) como lo son *Aspergillus fumigatus* y *Phoma* sp. Esto

puede ser corroborado con lo presentado por López, Vega y Montoya (2013), quienes reportaron que existe asociación del tipo micorriza entre *Aspergillus fumigatus* y *Vanilla panifolia*.

Fueron identificados, entre otros, hongos de los géneros *Phoma*, *Phomopsis* y *Trichoderma*, los cuales también han sido identificados por Ordoñez (2012), en raíces de vainilla.



Para confirmar que el árbol filogenético estaba bien realizado, se tomó como grupo externo a las especies *Tulasnella violea*, *Trichoderma vinosum*, *Pestalotiopsis*

gracilis e *Ilyonectria leucospermi*. Todas estas especies se alinearon junto con los grupos formados por las especies fúngicas estudiadas, alineándose en base a su género, presentando soportes de rama altos, lo cual confirma que la identificación molecular fue correcta.

Se formó dos grupos, el primero comprendido por hongos del filo Ascomiceto y el segundo por una micorriza Basidiomiceto. Los sub grupos fueron formados en función de los géneros a los que pertenecían las especies de micorrizas.

Las especies antes identificadas como *Fungal* sp.1 y *Fungal* sp.2 formaron un grupo con soporte de rama alto, lo que significa que estas especies posiblemente pertenecen a un mismo género; de igual forma la especie *Daldinia* cf. *loculatoides* presenta un ancestro en común con las especies *Fungal* sp. 1 y *Fungal* sp.2 como lo demuestra el árbol filogenético, lo que no indica que posiblemente las especies identificadas como *Fungal* pertenezcan al mismo orden que *Daldinia* cf. *loculatoides*.

Finalmente, los hongos micorrízicos se agruparon en función de su similitud genética y no en base a la especie de orquídea con la cual hace simbiosis, como lo indica el árbol filogenético.

3.5 Determinación de actividad degradadora de materia orgánica

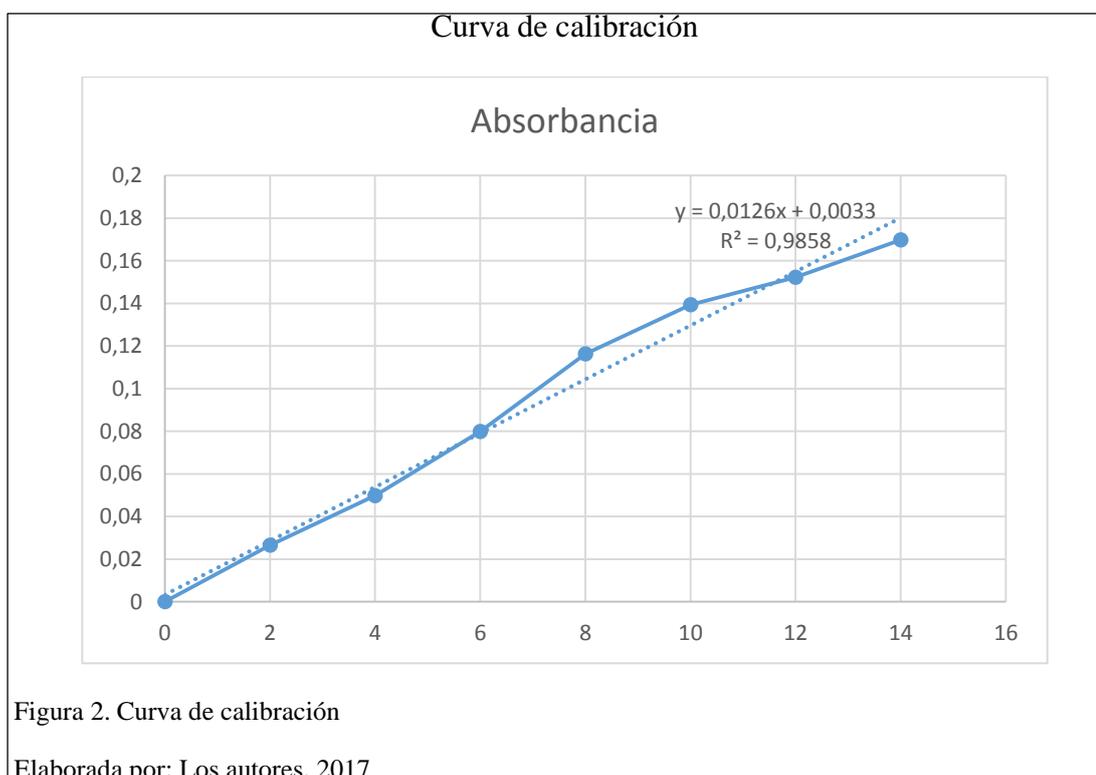
Se encontraron 20 especies de hongos micorrízicos degradadoras de celulosa, de todas ellas se obtuvo mayor degradación de celulosa en las especies *Cantharellales* sp., *Ascomycota* sp., *Trichoderma koningiopsis*, *Aspergillus fumigatus* y *Phoma* sp. lo cual fue evidenciado en las concentraciones finales de azúcares reductores. Ver tabla 6.

Tabla 5

Concentraciones estándar de azúcares y absorbancia

Sacarosa (g/L)	Absorbancia
0	0
2	0.0265
4	0.0497
6	0.0799
8	0.1163
10	0.1394
12	0.1522
14	0.1698

Elaborado por: Los autores, 2017



La curva mostró un R de 0.9858 demostrando que posee una buena linealidad, lo que indica que al reemplazar los datos de absorbancia, obtenidos en el análisis de cada muestra, en la ecuación de la recta, se tendrá datos válidos de concentración de azúcares.

Tabla 6

Medición de azúcares reductores por espectrofotometría UV

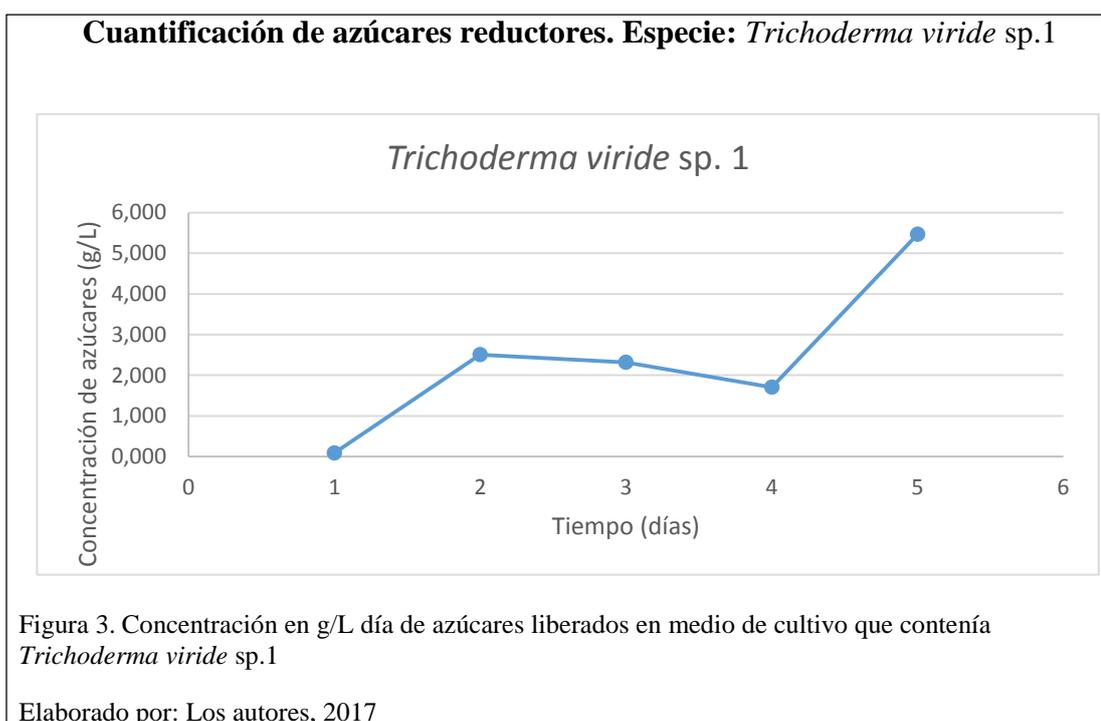
Código	Muestra	04/09/2017	05/09/2017	06/09/2017	07/09/2017	08/09/2017
		C (g/L)				
3400	<i>Ascomycota</i> sp.	1.631	2.944	2.607	2.052	4.734
3401	<i>Cantharellales</i> sp.	1.135	1.651	1.067	1.171	5.579
3402	<i>Ilyonectria liliigena</i>	1.278	3.222	2.175	1.798	3.913
3403	<i>Alternaria</i> sp.	0	1.536	1.341	3	3.817
3408	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.651	2.857	0.45	2.786	4.81
3409	<i>Xylariaceae</i> sp.	1.242	1.028	0.131	2.48	2.948
3419	<i>Sordariomycetes</i> sp.	0.425	1.94	1.472	1.036	4
3420	<i>Ilyonectria protearum</i>	0.258	1.774	0.679	2.929	3.067
3431	<i>Phoma</i> sp.	0	0.639	0.738	4.433	4.313
	<i>Daldinia loculatoides</i>	0.21	1.433	0.889	0	4.143
3365	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2	0	0.925	0.341	1.611	2.877
3454	<i>Ilyonectria</i> sp.	0.345	2.627	1.492	0	4.103
	<i>Phomopsis</i> sp.	0.575	1.048	0.317	1.266	2.306
3459	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	1.27	3.163	2.302	0.107	3.306
3460	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	0	0.659	1.512	1.603	2.675
3461	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	0.091	2.508	2.313	1.702	5.464
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	0.389	2.21	0.968	1.425	3.107
3462	<i>Fungal</i> sp. 1	1.512	1.143	0.651	2.242	3.829
3468	<i>Trichoderma viride</i>	0.159	1.722	0.706	2.234	3.635
	<i>Fungal</i> sp. 2	0.54	1.127	1.552	0.409	4.179
3470	<i>Trichoderma viride</i>	0.21	2.246	0.956	2.492	2.81

Elaborado por: Los autores, 2017

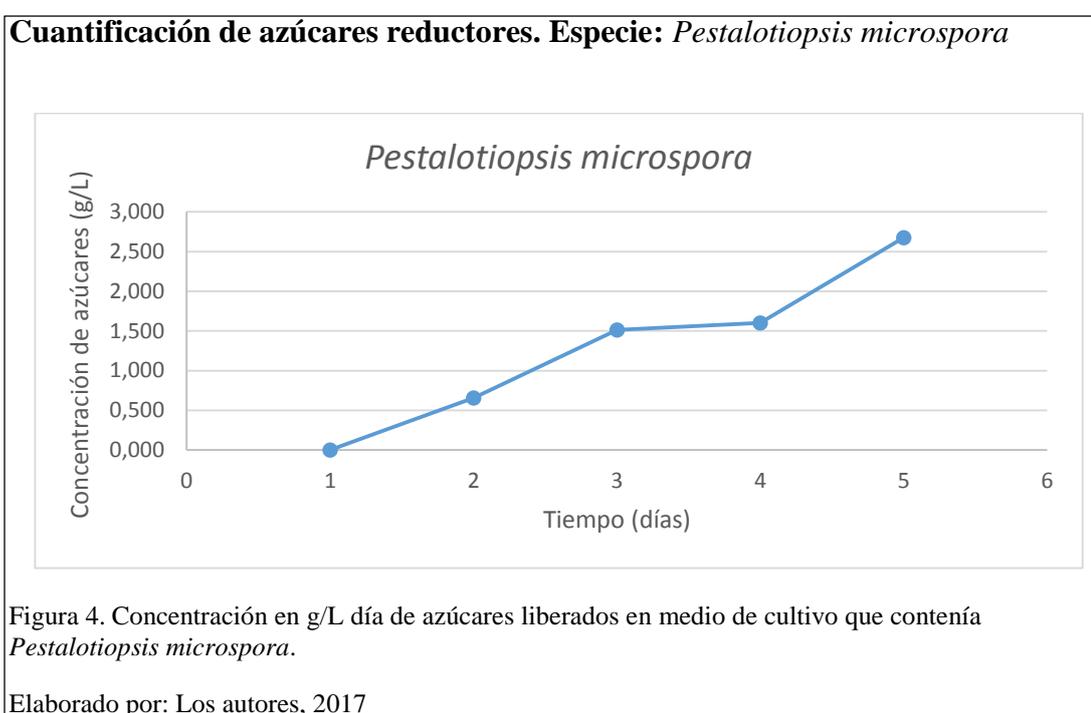
Gaitan y Perez (2007), mencionan que un tiempo de incubación de 48 horas facilita la activación de enzimas necesarias para degradar celulosa, midiendo azúcares reductores cada hora hasta completar 20 horas.

En la tabla 6 se observa la concentración de azúcares reductores, liberados producto de la degradación de celulosa, expresada en g/mL. A través de la cuantificación de azúcares, se evidenció que las especies micorrízicas aisladas poseen un comportamiento saprófito pues cada especie de hongo analizada mostró un aumento y descenso en las concentraciones de azúcar durante los días de medición, quedando en su punto más alto al día 5, lo cual significa que degradan la celulosa en componentes de menor peso molecular como lo son los azúcares reductores. Resultados similares fueron obtenidos por Chaparro y Rosas (2006), quienes estudiando la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera, demostraron que la concentración de azúcares reductores producidos por la degradación de celulosa aumentan y disminuyen su concentración en el medio de cultivo en cada día de medición, encontrando el punto final de degradación de celulosa al día 12, donde la concentración de azúcares descendió a 0 g/mL.

A continuación, se describen los casos más representativos



Trichoderma viride tiene un repentino aumento en su concentración de azúcares tanto en el día 2 como en el día 4 lo cual indica que podría tratarse de un comportamiento típico de esta especie. De igual forma se puede mencionar que esta especie se especializa en degradación de celulosa, se ha reportado el posible uso de *Trichoderma viride* en la producción industrial de celulasas (Ayala y Romero, 2013) lo cual explica la concentración alta de azúcares producto de la degradación de bagazo siendo uno de los más altos.



Pestalotiopsis microspora ha sido reportado como degradador de poliuretano (Rodríguez y Rodríguez, 2015) pero no existen estudios donde se empleen para degradación de celulosa. En el tiempo transcurrido tuvo un creciente aumento en la concentración de azúcares sin muchos decrementos, pero la concentración final es baja, razón por la cual no se emplea esta cepa de hongo para degradación de celulosa, pudiéndose evidenciar que en el día 1 la concentración de azúcares era nula lo que atribuye a su baja actividad celulolítica típica de esta especie.

Cuantificación de azúcares reductores. Especie: *Neopestalotiopsis* sp. 1

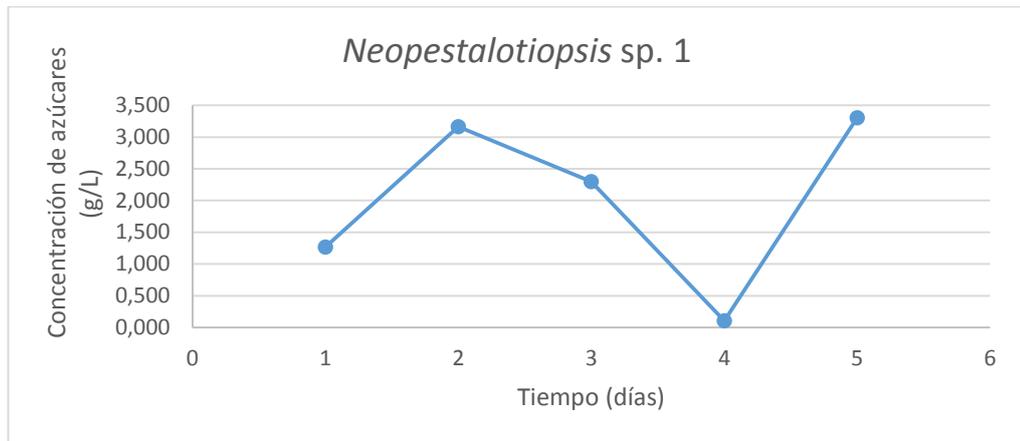


Figura 5. Concentración en g/L día de azúcares liberados en medio de cultivo que contenía *Neopestalotiopsis* sp. 1

Elaborado por: Los autores, 2017

El género *Neopestalotiopsis* por ser de reciente aparición (Maharachchikumbura, Hyde, Groenewald, Xu, y Crous, 2014) no presenta estudios sobre degradación de celulosa, pero en la antigua clasificación de géneros, *Pestalotiopsis* pertenece al filo Ascomiceto presentado estudios donde se le asocia a la degradación de plásticos, aunque también algunas especies son relacionadas con enfermedades de la palma de aceite (Arancibia, 2014).

Cuantificación de azúcares reductores. Especie: *Phoma* sp.

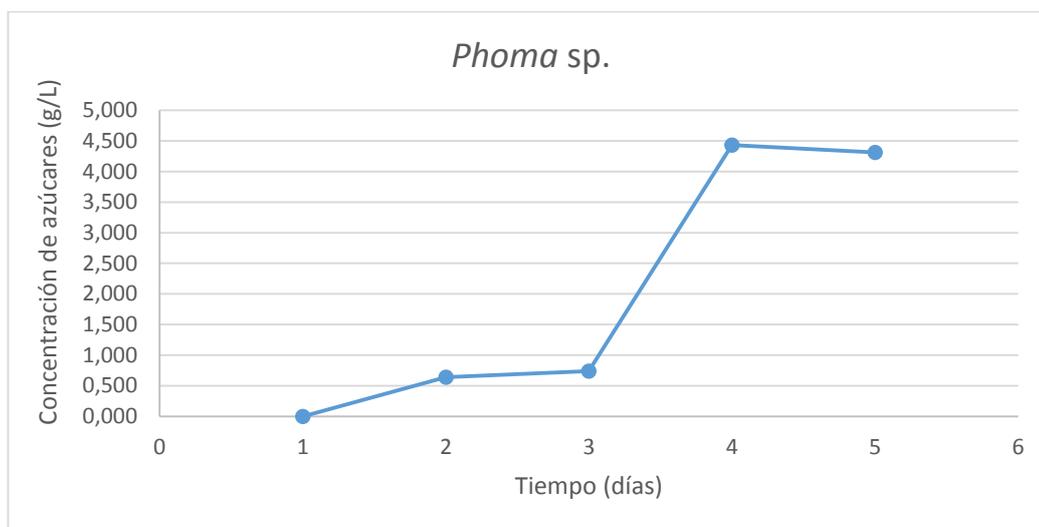


Figura 6. Concentración en g/L día de azúcares liberados en medio de cultivo que contenía *Phoma* sp.

Elaborado por: Los autores, 2017

El género *Phoma* figura dentro de la lista de hongos con capacidad celulolítica (Castillo, Viteri, y Viteri, 2015) lo cual demuestra los buenos resultados en la degradación de celulosa. La imagen muestra que a partir del día 3 aumenta considerablemente la concentración de azúcares, lo cual indica que posiblemente necesite de mayor tiempo de incubación para activar sus enzimas celulolíticas en base a lo mencionado anteriormente por Gaitan y Perez (2007) .

Cuantificación de azúcares reductores. Especie: *Aspergillus fumigatus*

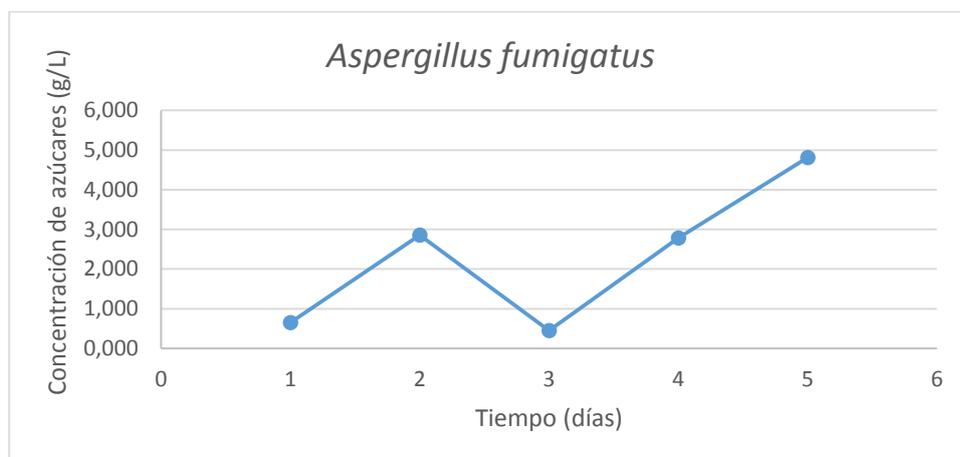


Figura 7. Concentración en g/L día de azúcares liberados en medio de cultivo que contenía *Aspergillus fumigatus*.

Elaborado por: Los autores, 2017

Aspergillus fumigatus presenta una buena capacidad degradadora del bagazo lo cual es evidenciado en la imagen donde su punto más alto de concentración de azúcares es al día 5. Álvarez, Osorio, Díez, y Marín (2014) mencionan la alta capacidad celulolítica de *Aspergillus fumigatus* con la posibilidad de ser empleado como biofertilizante

Cuantificación de azúcares reductores. Especie: *Cantharellales sp.*

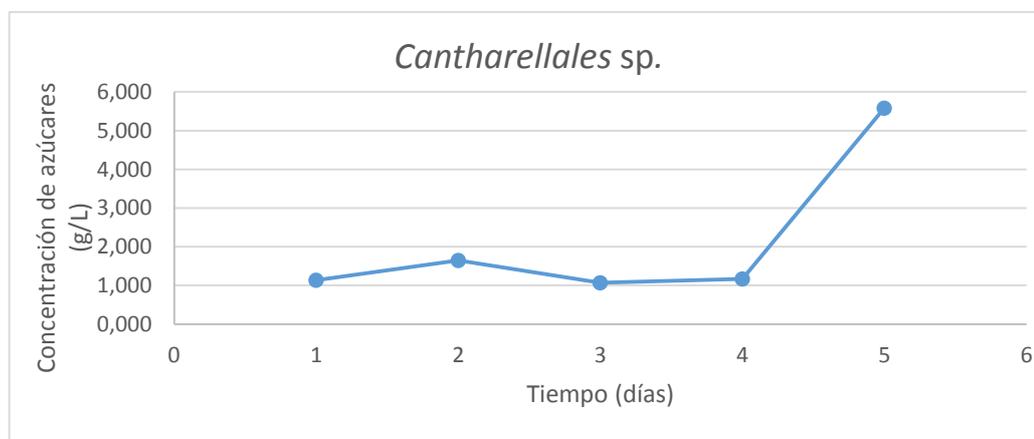


Figura 8. Concentración en g/L día de azúcares liberados en medio de cultivo que contenía *Cantharellales sp.*

Elaborado por: Los autores, 2017

Este hongo basidiomiceto fue la cepa con mayor capacidad degradadora teniendo un incremento espontáneo de su actividad degradadora al día número 5. Para Rodriguez (2009) los hongos basidiomicetos tienen capacidad celulítica secretando enzimas extracelulares que degradan residuos vegetales en tiempos cortos.

Conclusiones

En el aislamiento pudieran estar implicadas más de una especie fúngica asociada a las raíces de cada especie de orquídea, siendo un factor determinante tanto el ambiente en que se desarrollan como la metodología empleada para su aislamiento.

Muchas especies de hongos no pueden ser identificadas a nivel de especie, en casos especiales ni siquiera a nivel de género debido a que un elevado número de hongos cultivados *in vitro* no esporulan, haciendo que una identificación en base a su morfología resulte poco efectiva para analizar la relación entre orquídea y micorriza.

A pesar que 2 especies de hongos no presentaron información taxonómica en la base de datos del NCBI, el análisis molecular resulta el mejor método de identificación, debido a que en la mayoría de los casos se identificó género y especie, puesto que la variabilidad que posee la región ITS permitió encontrar dentro de una misma especie de hongos algunas variedades diferentes como lo sucedido con *Trichoderma*.

Tradicionalmente se consideraba que la asociación tipo micorriza se daba solo con hongos del filo Basidiomiceto, pero resultados obtenidos tanto en este trabajo como en otros similares, demuestran que puede existir relación con hongos del filo Ascomiceto.

La asociación simbiote entre orquídea y micorriza se presenta en todos los casos, existiendo mayor necesidad de este tipo de relación en aquellas especies de orquídeas que tienen dificultad de tomar nutrientes del sustrato en que se encuentren.

En base al árbol filogenético elaborado, se concluye que no existe relación entre la evolución de hongos micorrízicos y orquídeas debido a que los grupos formados fueron en base a los géneros taxonómicos de las especies fúngicas, presentándose en

un mismo grupo hongos que se relacionan con orquídeas *Epidendrum* y hongos que se relacionan con orquídeas *Dracula*.

En base a los resultados obtenidos se concluye que en la gran mayoría de especies de orquídeas existe, al momento de formar simbiosis, una especificidad fúngica.

Debido a que los hongos micorrízicos presentaron acción degradadora, podemos decir que son aptos para ser empleados en cultivos simbiontes, siendo capaces de otorgar a las orquídeas, con las cuales se relacionen, nutrientes suficientes que ayuden a su desarrollo y mantenimiento.

Recomendaciones

Sembrar hongos en medios de cultivo que propicien la esporulación para que de esta manera las especies fúngicas desarrollen todas sus estructuras y puedan ser observadas al microscopio.

Amplificar la región ITS a una temperatura de annealing entre 52 y 55°C pues se ha obtenido mejores resultados en este rango de temperatura.

Emplear en la cuantificación de azúcares por espectrofotometría uv sustratos que no oscurezcan el medio debido a que puede dificultar el paso del haz de luz afectando los resultados de la medición.

Utilizar los hongos micorrízicos aislados en cultivos simbióticos para evaluar los beneficios otorgados tanto en orquídeas como en otras especies vegetales.

Referencias

- Aguilar, J. M. De, & Martínez., D. G. (2011). Las micorrizas, nuestras aliadas ocultas., 5. Obtenido de http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_Ferti%2FFerti_2004_17_9_13.pdf
- Álvarez, C., Osorio, W., Díez, M., & Marín, M. (2014). CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS DE PLANTAS DE VAINILLA CON POTENCIAL COMO BIOFERTILIZANTES. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43731480002>
- Andrade, A. (2010). Antigua Interacción Entre Plantas Y Hongos. *Ciencia*, (August), 84–86. Obtenido de https://www.academia.edu/653234/Micorrizas_antigua_interacci3n_entre_plantas_y_hongos.
- Arancibia, V. (2014). *Caracterizacion de Alternaria alternata aislada de contenedores residuales urbanos y su potencial uso en la degradación de 6 polimeros de importancia ambiental*.
- Ávila, A. (2015). *Diseño De Un Orquideario Como Atractivo Turístico En Parroquia De Guala, Provincia De Pichincha*. Universidad Central del Ecuador. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/4521/1/T-UC-0004-002.pdf>
- Ayala, H., & Romero, H. (2013). Hidrólisis enzimática de la cascarilla de arroz utilizando *Trichoderma reesei*, 839–845.
- Ayala, M. (2017). Métodos de conservación de hongos entomopatógenos, (June). <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.25980.74885>

- Barnett, H., & Hunter, B. (1955). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 38(4), 480. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(55\)80058-7](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(55)80058-7)
- Benalcazar, N. E. C. (2015). Universidad Técnica De Machala, 19. Obtenido de http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/4485/1/CD00736-2015-TRABAJO_COMPLETO.pdf
- Benavidez, T. (2014). Síntesis y caracterización de membranas de acetato de celulosa, obtenidas a partir de desechos agroindustriales. *Universidad de El Salvador*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Brundrett, M. (2004). Diversidad y clasificación de las asociaciones micorrízicas. <https://doi.org/doi:10.1017/S1464793103006316>
- Brunstein, J. (2013). PCR: the basics of the polymerase chain reaction. *The Primer - A Guide to Molecular Diagnostics*. Obtenido de <https://www.mlo-online.com/pcr-the-basics-of-the-polymerase-chain-reaction.php>
- Burnstein, J. (2017). Back to Basics: Sanger sequencing and its applications. *MLO-Online.com*, (July). Obtenido de <https://www.mlo-online.com/back-basics-sanger-sequencing-applications>
- Cabrera, V. H. de G. (2014). La conquista del espacio: plantas epífitas. Obtenido de <http://saberesyciencias.com.mx/2014/04/01/la-conquista-del-espacio-plantas-epifitas/>
- Cadavid, I., & Salazar, S. (2008). *Micropropagación De Cattleya Quadricolor*. EAFIT. Obtenido de https://repository.eafit.edu.co/xmlui/bitstream/handle/10784/400/IsabelCristina_

CadavidCorrea_2008.pdf?sequence=1

Camargo, S. L., Montaña, N. M., De la Rosa, C. J., & Montaña, S. A. (2012).

Micorrizas: una gran unión debajo del suelo. *Revista Digital Universitaria*, 13(7), 19. Obtenido de <http://www.revista.unam.mx/vol.13/num7/art72/art72.pdf>

Campion, R., & Canul, J. (2004). Secuenciación de ácidos nucleicos. *Instituto de*

Biotecnología, UNAM, 48. Obtenido de <https://catedrabiologiamolecularusal.files.wordpress.com/2017/04/secuenciacion-de-acidos-nucleicos-bibliografia.pdf>

Carrasco, V. (2010). *Aspectos ecofisiológicos de la raíz de Pinus pseudostrobus y P.*

patula y especies ectomicorrízicas comestibles de Hebeloma spp. y Laccaria spp. Tesis de maestría. Obtenido de <http://www.biblio.colpos.mx:8080/xmlui/handle/10521/101>

Castillo, D., Viteri, P., & Viteri, S. (2015). Development and Evaluation of an

Inoculum of Cellulolytic Fungi. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 18(1), 217–226. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262015000100025&lng=en&nrm=iso&tlng=es

Chaparro, D. F., & Rosas, D. C. (2006). AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE HONGOS DESCOMPONEDORES DE MADERA EN LA RESERVA NATURAL LA MONTAÑA del ocazo, Qimbaya - Quindío. *Tesis*, 62.

Chávez, H., Mosquera, A., & Otero, J. (2014). Propagación in vitro de semillas de la

orquídea *Comporettia falcata* Poepp. & Endl. (Orchidaceae) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas. *Acta Agronomica*, 64(2), 125–133. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.42976>

Cold Spring Harbor Laboratory DNA Learning. (2014). Using DNA Barcodes to Identify and Classify Living Things. *Annals of Botany*, 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031581>

Colinas, C., Sourzat, P., Reyna, S., Palazón, C., Luigi, G., Honrubia, M., ... Trull, J. (2012). Truficultura. Fundamentos y técnicas.

Corpoica. (2007). Las micorrizas: una opción sostenible de manejo de suelos y nutrición de plantas. Obtenido de <https://goo.gl/9cyA7d>

Crespo, A., & Ortega, M.-B. (2015). Aislamiento De Micorrizas Y Evaluación De La Germinación Simbiótica De Las Semillas De Las Orquídeas En El Orquídeario De La Universidad De Cuenca, 34,56. Obtenido de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/21912/1/TESIS.pdf>

Cristancho, M., & Monroy, R. (2014). Manual de Métodos Generales Para Determinación De Carbohidratos. *Química*, 2(1), 2–33. Obtenido de <https://es.slideshare.net/LeidyCristancho/manual-de-mtodos-generales-para-determinacin-de-carbohidratos>

Cruz, A., & Greenberg, R. (2005). Are epiphytes important for birds in coffee plantations? An experimental assessment. *Journal of Applied Ecology*, 42(1), 150–159. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2004.00983.x>

Dearnaley, J., Martos, F., & Selosse, M. (2012). Orchid Mycorrhizas: Molecular Ecology, Physiology, Evolution and Conservation Aspects. *Fungal*

Associations, 2nd Edition, 9(September), 1–406. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30826-0>

Dhaliwal, A. (2013). Extracción y purificación de ADN. *Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología*. <https://doi.org//dx.doi.org/10.13070/mm.es.3.191>

Dressler, R. L. (2005). How Many Orchid Species? *Selbyana*, 26(1,2), 155–158. <https://doi.org/10.2307/41760186>

Durán, C., Rivero, M., & Seemann, P. (2007). Identificación de endomicorrizas en la orquídea nativa *gavilea araucana* (phil.) correa. *Agro Sur*, 35(2), 67–69. Obtenido de <http://mingaonline.uach.cl/pdf/agrosur/v35n2/art32.pdf>

Escudero, J., Daza, Z., Gil, N., & Mora, O. (2013). Evaluation of cellulolytic enzymes produced by native fungi through solid state fermentat. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 108–117. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v15n1/v15n1a11.pdf>

Europapress. (2009). Orquídeas y hongos, sociedad mixta. Obtenido de <http://www.europapress.es/ciencia/laboratorio/noticia-orquideas-hongos-sociedad-mixta-20090814112947.html>

Fallis, A. . (2013). Las Orquídeas. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Fischer, A. L. (2007). *Que son las orquídeas*. Buenos Aires. Obtenido de <https://goo.gl/LxUoyj>

Gaitan, D., & Perez, L. (2007). Aislamiento y evaluacion de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un

cultivo de crisantemo (*Dentranthema grandiflora*). *Icidca*, 16(2), 8.
<https://doi.org/9968-904-02-3>

García, R. (2011). Manual para la propagación de orquídeas. *Comision Nacional Forestal*, 1(Micropropagación de orquídeas), 30–38. Obtenido de http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/documentos/MANUAL_PARA_LA_PRO_PAGACION_DE_ORQUIDEAS.PDF

Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 3(133), 1–3. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>

Garrigues, F. (2017). Sanger: Estrategia de secuenciación de Primera Generación. Obtenido de <http://revistageneticamedica.com/blog/sanger/>

Girlanda, M., Segreto, R., Cafasso, D., Liebel, H. T., Rodda, M., Ercole, E., ... Perotto, S. (2011). Photosynthetic Mediterranean meadow orchids feature partial mycoheterotrophy and specific mycorrhizal associations1. *American Journal of Botany*, 98(7), 1148–1163. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000486>

Guillén, J. (2016). Orquídeas, el tráfico de especies en Cuba. Obtenido de http://www.14ymedio.com/nacional/Orquideas-trafico-especies-Cuba_0_2033796601.html

Gutiérrez, I., Moreno, N., & Montoya, D. (2015). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: Casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009>

Guzmán, P., García, G., & Larios, E. (2013). Determinación de azúcares reductores método DNS. Obtenido de

https://www.academia.edu/4403544/DETERMINACION_DE_AZUCARES_REDUCTORES_METODO_DNS?auto=download

Guzmán, S., & Farías, J. (2005). Biología y regulación molecular de la micorriza arbuscular. *Avances En Investigación ...*, 9. Obtenido de http://www.ucol.mx/revaia/antiores/PDF_DE_REVISTA/2005/MAYO.pdf

Han, J. Y., Xiao, H. F., & Gao, J. Y. (2016). Seasonal dynamics of mycorrhizal fungi in *Paphiopedilum spicerianum* (Rchb. f) Pfitzer - A critically endangered orchid from China. *Global Ecology and Conservation*, 6, 327–338. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2016.03.011>

Hernández, D., & Loaiza, A. (2014). Selección De Un Método Para La Conservación Y Preservación De Actinomicetos Aislados Del Suelo Del Jardín Botánico De La Universidad Tecnológica De Pereira. *Universidad Tecnológica De Pereira*, (1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

Hoyos, L., & Rodríguez, A. (2013). *Aislamiento De Micorrizas En Seis Especies De Orquídeas Nativas De Ecuador Para La Elaboración De Un Biofertilizante Potencialmente Útil En Rusticación De Orquídeas. Tesis*. Obtenido de <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>

Iglesias, G. (2009). Técnicas De Biología Molecular. *Genmolecular*. Obtenido de <https://genmolecular.com/tecnicas-de-biologia-molecular/>

Instituto de Biotecnología. (2016). Fundamentos y técnicas para la preservación de bacterias , hongos y levaduras, 1–30. Obtenido de <http://www.ibun.unal.edu.co/lineasGrupos/GruposTransversales/doc/lineamientos.pdf>

Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano. (2015). Qué es la secuenciación del ADN. Obtenido de <https://www.genome.gov/27563183/secuenciacion-del-adn/>

Instituto Nacional de Salud del Perú. (2003). Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. *Serie de Normas Técnicas N° 38*, 1–69. <https://doi.org/10.1024/0301-1526.32.1.54>

Jácome, E., Asanza, H., & Carrión, F. (2009). Degradación de Lignina del bagazo de caña (*Saccharum officinarum*) utilizando hongos ascomicetos. Obtenido de https://es.slideshare.net/utplcbcm1/degradacion-de-lignina-del-bagazo-de-caa-saccharum-2008165?from_action=save

Jiang, J. H., Lee, Y. I., Cubeta, M. A., & Chen, L. C. (2015). Characterization and colonization of endomycorrhizal Rhizoctonia fungi in the medicinal herb *Anoectochilus formosanus* (Orchidaceae). *Mycorrhiza*, 25(6), 431–445. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0616-1>

Jiménez, M. (2015). Orquídeas del Ecuador-Número de especies , endemismo , especies amenazadas y su manejo adecuado. *Actualidad*, (October), 1–3. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/268632113_Orquideas_del_Ecuador-Numero_de_especies_endemismo_especies_amenazadas_y_su_manejo_adecuado

Kalia, S., Dufresne, A., Cherian, B. M., Kaith, B. S., Avérous, L., Njuguna, J., & Nassiopoulos, E. (2011). Cellulose-based bio- and nanocomposites: A review. *International Journal of Polymer Science*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/837875>

- Kottke, I., & Chacón, J. (2009). Mutualistic, root-inhabiting fungi of orchids identification and functional types. *Proceedings of the Second Scientific Conference on Andean Orchids*, (August), 84–99. Obtenido de https://www.researchgate.net/profile/Juan_Suarez4/publication/236954911_Mutualistic_root-inhabiting_fungi_of_orchids_identification_and_functional_types/links/0c96051a6c7863bae5000000/Mutualistic-root-inhabiting-fungi-of-orchids-identification-and-functio
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments, (62), e3923. <https://doi.org/doi:10.3791/3923>
- López, C., Vega, N., & Montoya, M. (2013). Identificación Molecular De Microorganismos Asociados a La Rizosfera De Plantas De Vainilla En Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 18(2), 293–306.
- López, L., Hernández, M., Colín, A., Ortega, S., Cerón, G., & Franco, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología, 3(1), 10–18. Obtenido de <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2014/ir141b.pdf>
- Lynd, L., Weimer, P., van Zyl, W., & Pretorius, I. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Bioresource Technology*, 66(3), 506–577. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506>
- Maharachchikumbura, S. S. N., Hyde, K. D., Groenewald, J. Z., Xu, J., & Crous, P. W. (2014). Pestalotiopsis revisited. *Studies in Mycology*, 79(1), 121–186. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.005>

- Martínez, E., Fuentes, J. P., & Acevedo, E. (2008). Carbono orgánico y propiedades del suelo. *Revista de La Ciencia Del Suelo Y Nutrición Vegetal*, 8(1), 68–96. <https://doi.org/10.4067/S0718-27912008000100006>
- Martos, F., Munoz, F., Pailler, T., Kottke, I., Gonneau, C., & Selosse, M. A. (2012). The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. *Molecular Ecology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05692.x>
- Mendez, R., Vidal, S., Lorber, K., & Márquez, F. (2007). Producción limpia en la industria de curtiembre. *Producción Limpia En La Industria Curtiembre*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Meneses, J., Corrales, C. M., & Valencia, M. (2007). SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE UN POLÍMERO BIODEGRADABLE A PARTIR DEL ALMIDÓN DE YUCA. (Spanish). *Revista EIA*, (8), 57–67. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/eia/n8/n8a06.pdf>
- Meza, A. R. D. A. (2013). Principios básicos de bromatología para estudiantes de nutrición. Obtenido de <https://goo.gl/UHbXtm>
- Microbial. (2009). La extracción y purificación del ADN para el análisis por PCR. Mitos y realidades. *Newsletter Microbial*, 3, 1–2. Obtenido de http://www.microbial-systems.com/web/docs/Newsletter_Microbial_03.pdf
- MINAM. (2015). *Guía de identificación de orquídeas con mayor demanda comercial*. Obtenido de <http://www.serfor.gob.pe/wp-content/uploads/2016/03/GUIA-DE-ORQUIDEAS.pdf>
- Ministerio de Turismo. (2015). “Déjate seducir”, una exposición sobre Orquídeas y

Chocolates. Obtenido de <http://www.turismo.gob.ec/ejes-estrategicos/>

Montesinos, R., Ayala, M., & Berlanga, A. (2015). Manual para la conservación y mantenimiento de hongos entomopatógenos (Manual for the conservation and...

Obtenido de

https://www.researchgate.net/publication/304253307_Manual_para_la_conservacion_y_mantenimiento_de_hongos_entomopatogenos_Manual_for_the_conservation_and_maintenance_of_entomopathogenic_fungi

Morerira, F., Huising, J., & Bignell, D. (2012). Manual de biología de suelos tropicales. *Books.Google.Com*. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

Muñoz, E., García, F., Méndez, J., Acevedo, O., & Rodríguez, R. (2017). Obtención de pulpa de celulosa a partir de residuos de *Agave salmiana* B. Otto ex Salm.

Optimización, 84(200), 253–260. Obtenido de

<http://www.redalyc.org/pdf/496/49650910031.pdf>

Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2017). Microbiología Médica. *Aging*.

<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

NCBI. (2015). Accessing the Hidden Kingdom: Fungal ITS Reference Sequences.

Obtenido de <https://ncbiinsights.ncbi.nlm.nih.gov/2015/05/11/accessing-the-hidden-kingdom-fungal-its-reference-sequences-2/>

NCBI. (2017a). Blast. Obtenido de <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

NCBI. (2017b). Taxonomy. Obtenido de

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/?term=>

Neogen. (2015). Agar Papa Dextrosa – Potato Dextrose Agar. *Acumedia*, 4(7149), 3–

5. Obtenido de www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7149_SP_PI.pdf

Novoa, P., Espejo, J., Alarcón, D., Cisternas, M., & Domínguez, E. (2015). *Guía de Campo de las Orquídeas Chilenas*. Obtenido de http://www.corma.cl/_file/material/guia-de-campo-orquideas-2015-web.pdf

Nuñez, R. (2016). Qué es la extracción de azúcar. Obtenido de <http://www.casasauza.com/procesos-tequila-sauza/extraccion-de-azucar>

Op De Beeck, M., Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J., & Colpaert, J. V. (2014). Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097629>

Ordoñez, N. (2012). Efecto de hongos endófitos de orquídeas del grupo rhizoctonia y otros endófitos cultivables sobre el desarrollo de plantas de *Vanilla planifolia* Jacks., 65.

Otero, J. T., Ackerman, J. D., & Bayman, P. (2002). Diversity and host specificity of endophytic Rhizoctonia-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*, 89(11), 1852–1858. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.11.1852>

Palacios, T. (2015). “Estudio De Factibilidad De Exportación De Orquídeas Ecuatorianas Utilizando La Estrategia B2C,” 1–121. Obtenido de http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/10022/1/TESIS_FINAL%28002%29.pdf

Paredes, R., & Yugsi, E. (2016). *IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE LEVADURAS CON CAPACIDAD FERMENTATIVA Y RESISTENCIA ALCOHÓLICA AISLADAS DE PITAHAYA (Stenocereus queretaroensis f.a.c*

- Weber). Tesis. Obtenido de
<http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Pecoraro, L., Huang, L., Caruso, T., Perotto, S., Girlanda, M., Cai, L., & Liu, Z.-J. (2017). Fungal diversity and specificity in *Cephalanthera damasonium* and *C. longifolia* (Orchidaceae) mycorrhizas. Obtenido de
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jse.12238/full>
- Poczai, P., & Hyvönen, J. (2010). Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: Problems and prospects. *Molecular Biology Reports*, 37(4), 1897–1912. <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9630-3>
- Pupulin, F., Merino, G., & Medina, H. (2009). *Draculas del Ecuador*. Obtenido de
<https://goo.gl/N3n5gG>
- Raeder, U., & Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, (4875), 17–20.
- Ramírez, A. (2016). *Universidad Técnica De Machala. ESTUDIO DE FACTIBILIDAD PARA LA CREACION DE UNA EMPRESA DEDICADA A LA PRODUCCION Y EXPORTACION DE ORQUIDEAS, DESDE EL CANTON PIÑAS PROV. DE EL ORO, DIRIGIDA AL MERCADO DE SUIZA*. Obtenido de <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/6804/1/TUACE-2016-CI-CD00003.pdf>
- Reyna, S. (2012). Truficultura. Fundamentos y técnicas. Obtenido de
<https://goo.gl/rTfkwZ>
- Richards, T., Leonard, G., & Wideman, J. (2017). What Defines the "Kingdom Fungi"? Obtenido de

<http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.FUNK-0044-2017>

Rivera, P. D. V. (2007). MANEJO COMUNITARIO Y PROPUESTA DE CONSERVACION DE ORQUÍDEAS EN PERIBUELA, CANTON COTACACHI, PROVINCIA DE IMBABURA, (Tobar 2005), 8–24. Obtenido de <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/196>

Rodríguez, A., & Rodríguez, Y. (2015). *BIODEGRADACIÓN DE POLIURETANO MEDIANTE EL USO DEL HONGO Pestalotiopsis microspora*. Obtenido de https://www.academia.edu/14192074/BIODEGRADACIÓN_DE_POLIURETANO_MEDIANTE_EL_USO_DEL_HONGO_Pestalotiopsis_microspora

Rodriguez, M. N. S. (2009). Evaluacion del papel de los microorganismos lignocelulolíticos sobre los residuos vegetales en suelos rizosféricos de papa criolla *Solanum phureja* en municipios de Cundinamarca., 149. Obtenido de <http://www.bdigital.unal.edu.co/8468/1/186302.2010.pdf>

Romero, P., Marfisi, S., Ontiveros, P., Rojas De Gáscue, B., & Peña, G. (2014). Obtención de celulosa microcristalina a partir de desechos agrícolas de Cambur (*Musa sapientum*). Síntesis de celulosa microcristalina. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 15(6), 286–300. Obtenido de <http://www.ehu.es/reviberpol/pdf/NOV14/romero.pdf>

Roy, M., Gonneau, C., Rocheteau, A., Berveiller, D., Thomas, J. C., Damesin, C., & Selosse, M. A. (2013). Why do mixotrophic plants stay green? A comparison between green and achlorophyllous orchid individuals in situ. *Ecological Monographs*, 83(1), 95–117. <https://doi.org/10.1890/11-2120.1>

- Sáenz, E. C., & Camargo, J. C. F. (2003). Especies de los géneros *Dracula* y *Masdevallia* (Orchidaceae) en Colombia, 4(2), 187–201. Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/491/49140205.pdf>
- Salazar, G. (2013). Orquídeas. *Diversidad Biológica E Inventarios*, 3(12), 1–18. Obtenido de http://www.ibiologia.unam.mx/pdf/directorio/s/salazar/orquideas_pedregal.pdf
- Saltos, N. (2012). *Extracción de ADN genómico y amplificación de la región ITS por PCR en el ascomicete marino Lulwarthia grandispora*. Universidad de Guayaquil. Obtenido de [http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1681/1/Extracción de ADN genómico y amplificación de la región ITS por PCR en el ascomicete marino Lulwo...Saltos%2C Nancy.pdf](http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1681/1/Extracción%20de%20ADN%20genómico%20y%20amplificación%20de%20la%20región%20ITS%20por%20PCR%20en%20el%20ascomicete%20marino%20Lulwo...Saltos%2C%20Nancy.pdf)
- Schoch, C. L., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. a., & Chen, W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Strasburger, E., & Sitte, P. (2004). *Tratado de Botánica*.
- Tian, C., Beeson, W. T., Iavarone, A. T., Sun, J., Marletta, M. a, Cate, J. H. D., & Glass, N. L. (2009). Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(52), 22157–22162. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906810106>

- Torres, R. (2012). Caracterización molecular de micorrizas de orquídeas del género *Teagueia* spp ., 1–28. Obtenido de [http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/4262/3/Torres Quintero Rony Vladimir.pdf](http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/4262/3/Torres%20Quintero%20Rony%20Vladimir.pdf)
- Tropicos. (2017). Taxonomia Orchidaceae. Obtenido de <http://www.tropicos.org/Name/42000388>
- Umesha, S., Manukumar, H. M., & Raghava, S. (2016). A rapid method for isolation of genomic DNA from food-borne fungal pathogens. *3 Biotech*, *6*(2), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0436-4>
- Unda, F., Agüero, J., Fariñas, M. C., & Martínez-Martínez, L. (2011). Identificación de hongos de importancia clínica mediante técnicas moleculares. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clinica*, *29*(4), 282–285. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.12.011>
- UNEP. (2012). Apéndices I , II y III CITES, 41, 48. Obtenido de <http://www.cites.org/esp/app/2012/S-2012-09-25.pdf>
- Vanegas, K., Gutiérrez, P., & Marín, M. (2014). Molecular Identification of Fungi Isolated from Bean Tissues with Anthracnose Symptoms. *Acta Biológica Colombiana*, *19*(2), 143. <https://doi.org/10.15446/abc.v19n2.39154>
- Vargas, D. (2012). Establecimiento de un protocolo para el cultivo in vitro de semillas de *Cattleya violacea*, 1–96. Obtenido de [http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1671/1/Establecimiento de un protocolo para el cultivo in vitro de semillas de Cattleya violaceae. Vargas%2C Daniela.pdf](http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1671/1/Establecimiento%20de%20un%20protocolo%20para%20el%20cultivo%20in%20vitro%20de%20semillas%20de%20Cattleya%20violaceae.pdf)

- Vargas, L., & Victorino, A. (2015). *CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y DE LAS SECUENCIA ITS DE AISLAMIENTOS DE HONGOS ASOCIADOS A RAÍCES DE ORQUÍDEAS EN LA REGIÓN DEL SUMAPAZS*. UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA. Obtenido de [http://dspace.ucundinamarca.edu.co:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1467/Caracterización Morfológica Y de las Secuencias ITS.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://dspace.ucundinamarca.edu.co:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1467/Caracterización_Morfológica_Y_de_las_Secuencias_ITS.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Vázquez, A. (2016). Técnicas de secuenciación de nueva generación para el estudio del microbioma humano. Obtenido de [http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ANDREA VAZQUEZ ESCRIBANO.pdf](http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ANDREA_VAZQUEZ_ESCRIBANO.pdf)
- Wilson, D. B. (2011). Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 259–263. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.04.004>
- Zambrano, B. J., & Solano, R. (2011). Un nuevo híbrido natural de *Dracula* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) del suroccidente de Ecuador. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82(3), 758–761. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmbiodiv/v82n3/v82n3a3.pdf>
- Zaragoza, N. (2013). *Efecto de extractos de origen fúngico en la germinación asimbiótica in vitro de Guarianthe aurantiaca y Euchile mariae (Orchidaceae)*. Universidad Nacional Autónoma de México. Obtenido de <http://132.248.9.195/ptd2013/noviembre/0706159/0706159.pdf>

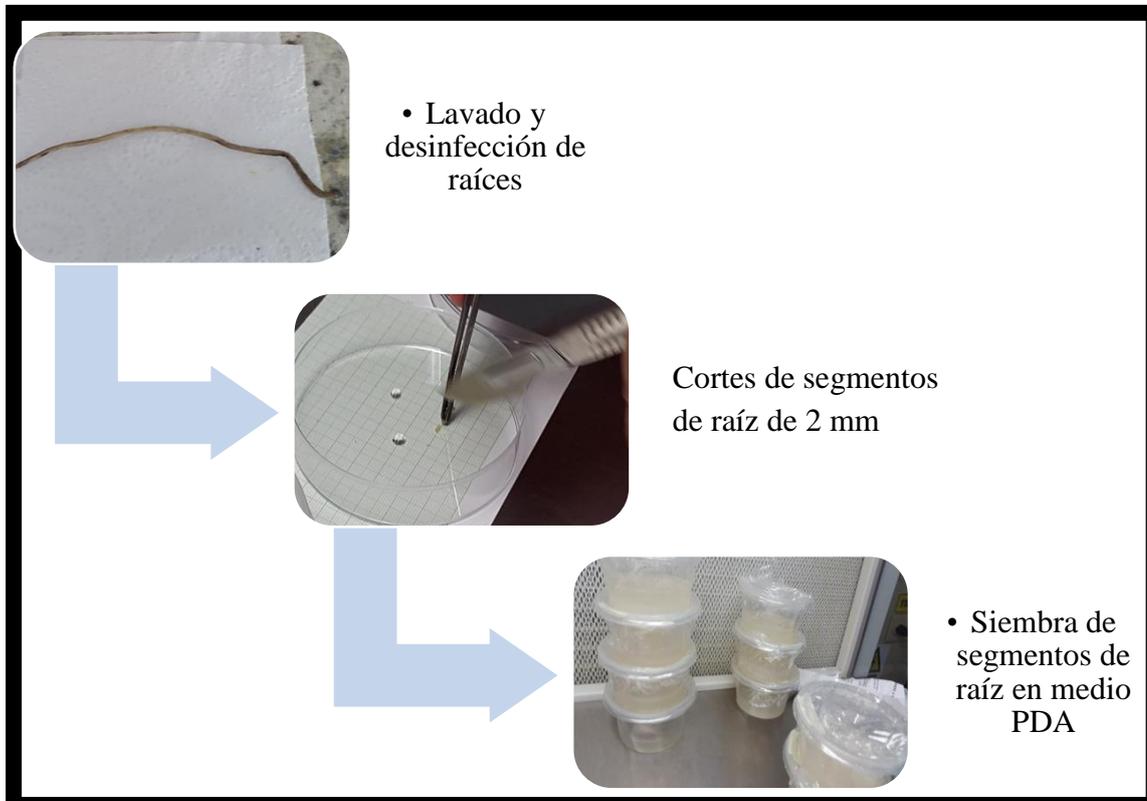
Anexos

Anexo 1. Colección de muestras de raíces de orquídeas



Nota: Tomada por los autores, 2017

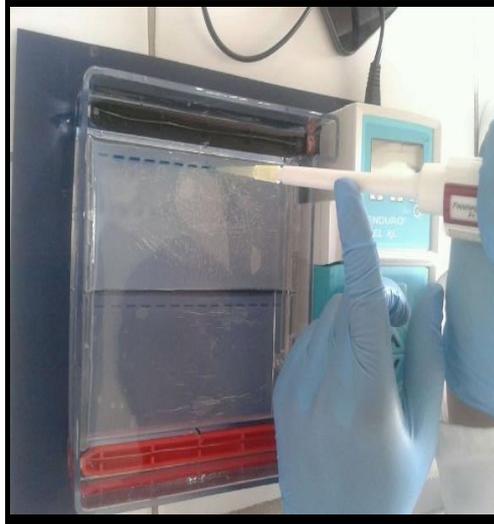
Anexo 2. Siembra de muestras de raíz



Nota: Tomada por los autores, 2017

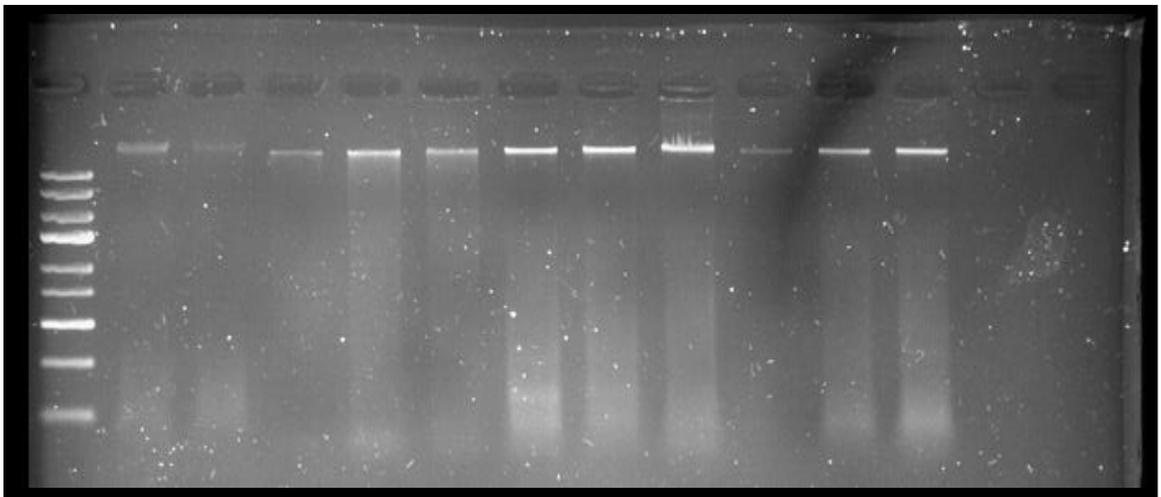
Anexo 3. Electroforesis en gel de agarosa.

Anexo 3a. Carga de muestras de ADN en cámara de electroforesis



Nota: Tomada por los autores, 2017

3b. Presencia de ADN total



Nota: Tomada por los autores, 2017

Anexo 4. Amplificación de la región ITS



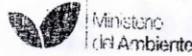
Nota: Tomada por los autores, 2017

Anexo 5. Ensayo de degradación de celulosa



Nota: Tomada por los autores, 2017

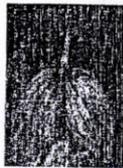
Anexo 6. Patente de manejo de vida silvestre



PATENTE DE MANEJO DE VIDA SILVESTRE 2017

Número:
005-2017-FLO-DPAP-MA

Lugar y Fecha:
Quito, 14 de febrero de 2017



La Dirección Provincial del Ambiente Pichincha del Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre, autoriza a: Sara Gloria Gutiérrez Torres, CI: 170027824-3 representante legal del Jardín Botánico y vivero comercial Orquídeas de Sarina, para que realice en el país el manejo de flora silvestre, de acuerdo a las siguientes especificaciones:

1. Solicitud de renovación de patente presentada por: Sara Gloria Gutiérrez Torres, mediante oficio s/n de fecha 24 noviembre 2016.
2. Valoración del informe anual y proyectos: Ing. Diego Morillo
3. Complementos de manejo autorizados: Manejo de flora silvestre con fines comerciales y fines recreacionales.
4. Contraparte institucional y responsabilidad técnica delegada a: Unidad de Patrimonio Natural, Dirección Provincial del Ambiente Pichincha.
5. Duración: 14 de febrero de 2017 al 13 de febrero de 2018
6. Inspección realizada al vivero y a las instalaciones del laboratorio: 28 de diciembre del 2016 por el Ing. Diego Morillo G.
7. Obligaciones del beneficiario:
 - 7.1. Llevar registro completo de: recolección, siembra, colecta, Cultivo, cosecha, acopio, procesamiento, comercialización, exportación e importación.
 - 7.2. Presentar un informe anual, incluyendo la planificación de trabajo del próximo año, para renovación de patente y aquella que fuera requerida por la autoridad en el transcurso del año.
 - 7.3. Regirse a las disposiciones citadas al reverso del presente documento.
 - 7.4. Facilitar información y permitir el acceso de los funcionarios del Ministerio del Ambiente a sus instalaciones para el respectivo control.
 - 7.5. Llevar un registro completo de actividades realizadas.

Lic. Rafael Mera Quiroga
DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE PICHINCHA, En cargo

Dirección Provincial del Ambiente Pichincha. Av. Amazonas N24 - 196 y calle Luis Cordero,
Edificio CONTEMPO, 3º piso. Quito - Ecuador
Telefax (593-2) 3816-230
www.ambiente.gob.ec

ESPECIFICACIONES DE LA PATENTE DE MANEJO DE VIDA SILVESTRE
No. 005-2017-FLO-DPAP-MA

1. Se autoriza el manejo y comercialización de las siguientes especímenes de flora según ANEXOS 1, 2 y 3.
2. Para el incremento de especies para comercio se deberá solicitar autorización previa, una vez que se haya comprobado y verificado su reproducción. Se asignará cupo.
3. Las especies autorizadas en los literales anteriores, se encuentran listadas en los apéndices de la CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres) por lo que la empresa deberá observar las decisiones y resoluciones establecidas por la Convención, publicadas en www.cites.org.
4. El MAE se reserva los controles y se retendrán aquellos ejemplares con apariencia silvestre que se ofrezca a venta. Orquídeas de Sarina asume las responsabilidades legales del uso indebido de los certificados CITES de exportación.
5. Para exportaciones verificadas se deberá presentar factura comercial, y el permiso fitosanitario emitido por Agrocalidad. El MAE realizará controles del producto a exportarse para lo cual podrá coordinar con las autoridades de control sanitario y aduanero.
6. Para exportaciones los especímenes deben estar debidamente etiquetadas y empacadas para que su identificación sea rápida a efectos de los controles, incorporándose un listado de referencia de lo exportado (packing list) en cada caja.
7. Orquídeas de Sarina asume las responsabilidades legales del uso indebido de los certificados CITES emitidos a su favor.
8. El certificado CITES de exportación, deberá presentarse obligatoriamente ante las autoridades aduaneras para su sellado.
9. Para la comercialización nacional deberán observarse las disposiciones establecidas por el SRI, los originales de las facturas emitidas podrán ser presentados como documento habilitante para solicitar permiso de exportación por parte de los compradores.
10. La renovación de patente deberá solicitarse con 30 días de anticipación adjuntando el informe anual. Presentará una lista total de las especies objeto de manejo y comercio indicando desde que año se inicio su comercialización.
11. En el informe anual se detallarán: Las transacciones comerciales efectivas (comercio local, exportaciones, importaciones). Listado de nuevos cupos, incrementos en la colección parental, documentación que respalde la adquisición legal (origen).
12. Para descripción y publicación de nuevas especies deberá notificarse previamente al Ministerio del Ambiente para el respectivo permiso.
13. Se llevará un sistema de control codificado en el que se que se registren las especies y sus diferentes fases de manejo, codificación de híbridos y especies; y diferenciación entre las plantas madres y las reproducidas.
14. La empresa deberá informar sobre sus importaciones y legalizarlas con la obtención del documento CITES de importación.
15. El incumplimiento de estas especificaciones y el uso indebido de este documento, así como el incumplimiento de aspectos legales, administrativos o técnicos establecidos en la misma, serán sancionados por la Ley y ameritará la suspensión inmediata de la presente patente.
16. Tasa por concepto de emisión de patente 200 dólares USD (Legislación Secundaria Libro IX) depositada con comprobante N° 791339867 de fecha 04 de octubre 2016 en la cuenta N° 0010000785 del Banco Nacional de Fomento.


RM/JWM
14/02/2017



Dirección Provincial del Ambiente Pichincha, Av. Amazonas N24 - 196 y calle Luis Cordero,
Edificio CONTEMPO, 3° piso. Quito - Ecuador
Telefax (593-2) 3816-230
www.ambiente.gob.ec