



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

**“ AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE HONGOS POTENCIALMENTE MICORRÍZICOS EN SEIS ESPECIES DE ORQUÍDEAS NATIVAS DEL CERRO ABUGA EN LA PROVINCIA DEL CAÑAR”.**

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

**AUTORES:**

Guamán García María Vicenta  
Ochoa Landy Laura Gabriela

**DIRECTORA:**

Dra. Raffaella Ansaloni.

CUENCA - ECUADOR

2016

## RESUMEN

Los hongos que forman asociaciones simbióticas con las raíces son llamados micorrizas, cumplen un papel muy importante durante su ciclo de vida, tanto en su nutrición como en la germinación de las semillas. En el presente estudio se analizó microscópicamente e ilustró las características de basidiomas de hongos potencialmente micorrízicos de orquídeas.

Para realizar este trabajo se sembraron distintos fragmentos de raíces de 6 especies de orquídeas nativas del Ecuador, colectados en el Cerro Abuga localizada en la parroquia Bayas del Cantón Azogues en la Provincia del Cañar.

De cada especie se sembraron 60 fragmentos de raíces en medio FIM, dando un total 360 fragmentos. Se aislaron 124 colonias viables en medio PDA, de los cuales 14 colonias presentaron características similares al género *Rhizoctonia*, el resto de las colonias presentaron características pertenecientes a hongos patógenos y saprófitos. Las colonias de interés se aislaron de *Trichoceros antennifer*, *Elleanthus amethystinoides*, *Stelis sp*, *Epidendrum chioneum*, *Pleurothallis linguifera* y *Epidendrum sp*.

**Palabras claves:** ORQUÍDEAS, MICORRIZAS, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN, *RHIZOCTONIA*, *TULASNELLALES*

## ABSTRACT

The fungi that form symbiotic associations with the roots are called mycorrhizae, play a very important role during their life cycle, both in their nutrition and germination of the seeds. In the present study it was analyzed microscopically and illustrated the characteristics of basidiomas of potentially mycorrhizal fungi of orchids.

In order to carry out this work, different root fragments of 6 species of orchids native to Ecuador were collected in the Abuga Hill located in the Bayas, Azogues city parish in the Province of Cañar.

From each species 60 root fragments were seeded in FIM medium, giving a total of 360 seeded fragments. 124 viable colonies were isolated in PDA medium, of which 14 colonies presented characteristics similar to the genus *Rhizoctonia*, the rest of the colonies presented characteristics belonging to pathogenic fungi and saprophytes. The colonies of interest were isolated from *Trichoceros antennifer*, *Elleanthus amethystinoides*, *Stelis* sp, *Epidendrum chioneum*, *Pleurothallis linguifera* and *Epidendrum* sp.

**Key words:** ORCHIDS, MYCORRHIZAE, ISOLATION AND IDENTIFICATION, RHIZOCTONIA, TULASNELLALES

## ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN.....</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>13</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>16</b>
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>18</b>
<b>OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS.....</b>	<b>20</b>
<b>CAPÍTULO I. .....</b>	<b>21</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>21</b>
1.1 ORQUÍDEAS.....	21
1.1.1 Generalidades de las Orquídeas.....	21
1.1.2 Características morfológicas de las orquídeas.....	22
1.1.3 Clasificación taxonómica de las orquídeas (Menchaca, 2011) .....	23
1.1.4 El ciclo vegetativo de una orquídea .....	24
1.1.5 Descripción de las especies de Orquídeas utilizadas en el aislamiento de hongos potencialmente micorrízicos en el presente trabajo.....	25
1.1.5.1 <i>Trichoceros antennifer</i> .....	25
1.1.5.2 <i>Elleanthus amethystinoides</i> .....	26
1.1.5.3 <i>Stelis sp.</i> .....	27
1.1.5.4 <i>Epidendrum chioneum</i> .....	27
1.1.5.5 <i>Pleurothallis linguifera</i> . .....	28
1.1.5.6 <i>Epidendrum sp.</i> .....	29
1.2. MICORRIZAS.....	30
1.2.1. Definición .....	30
1.2.2. Tipos de micorrizas .....	31
1.2.3. Hongos que forman micorrizas con orquídeas .....	32
1.2.3.1. Phylum <i>Basidiomycota</i> .....	32
1.2.4. Micorrizas de orquídeas .....	34
1.2.5 Proceso de colonización de una micorriza .....	35
1.2.5.1. Primera etapa .....	35
1.2.5.2. Segunda etapa .....	35
1.2.5.3. Tercera etapa .....	35
1.2.6 Beneficios de la micorrización en las orquídeas.....	35
1.2.6.1. Formación de agregados estables.....	36
1.2.6.2. Papel de la micorriza en la absorción de nutrimento.....	36
1.2.6.3. Nutrición de fósforo (P).....	36
1.2.6.4. Nutrición de otros elementos .....	37
1.2.6.5. Relaciones hídricas de la planta .....	37

1.2.6.6. Influencia sobre la Fotosíntesis del Hospedero. ....	37
1.2.7. Medios de cultivo empleados ....	37
1.2.7.1. Medio FIM (Fungi Isolation Medium): ....	37
1.2.7.2. Medio PDA (Agar Dextrosa-Papa): ....	37
<b>CAPITULO II.....</b>	<b>38</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
2.1. ÁREA DE ESTUDIO Y MUESTREO .....	38
2.2. MUESTREO .....	38
2.3. MATERIALES Y REACTIVOS .....	39
2.4. MÉTODOS .....	39
2.4.1. Recolección de raíces de orquídeas terrestres .....	40
2.5. AISLAMIENTO DEL HONGO MICORRÍZICO .....	40
2.5.1. Protocolo de lavado y siembra de las raíces en medio FIM (Fungi Isolation Medium) .....	40
2.5.2. Observación de pelotones en medio FIM (Fungi Isolation Medium) .....	43
2.5.3. Aislamiento del hongo en medio PDA (Agar Dextrosa-Papa).....	44
2.5.4. Microcultivo.....	46
<b>CAPÍTULO III. ....</b>	<b>48</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>48</b>
3.1 SIEMBRA DE LAS SEIS ESPECIES EN MEDIO FIM. ....	48
3.2 CRECIMIENTO DE COLONIAS EN MEDIO FIM DE LAS SEIS ESPECIES DE ORQUÍDEAS. ....	51
3.3 CRECIMIENTO DE LOS TRES FRAGMENTOS DE RAÍZ (A, B, C) EN MEDIO FIM DE LAS SEIS ESPECIES DE ORQUÍDEAS. ....	52
3.4 REPLANTE DE LAS COLONIAS DE MEDIO FIN EN MEDIO PDA DE LAS SEIS ESPECIES DE ORQUÍDEAS. ....	52
3.5 CRECIMIENTO DE COLONIAS EN MEDIO PDA DE LAS SEIS ESPECIES DE ORQUÍDEAS. ....	54
3.6 CRECIMIENTO DE LOS TRES FRAGMENTOS DE RAÍZ (A, B, C) EN MEDIO PDA DE LAS SEIS ESPECIES DE ORQUÍDEAS. ....	55
3.7 CRECIMIENTO DE COLONIAS SELECCIONADAS PARA MICROCULTIVO DE LAS SEIS ESPECIES DE ORQUÍDEAS.....	56
3.8 CRECIMIENTO DE LOS TRES FRAGMENTOS (A, B, C) SELECCIONADOS PARA EL MICROCULTIVO DE LAS SEIS ESPECIES DE ORQUÍDEAS. ....	57
3.9 MICROCULTIVO. ....	58
3.10 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS HONGOS AISLADOS. ....	59
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>82</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Asignación de códigos para cada una de las especies de orquídeas.....	39
<b>Tabla 2:</b> Protocolo de desinfección y siembra en medio FIM.....	42
<b>Tabla 3:</b> Procedimiento para la observación de pelotones.....	44
<b>Tabla 4:</b> Procedimiento para el aislamiento de los hongos en medio PDA.....	45
<b>Tabla 5:</b> Clasificación de las cajas Petri en medio PDA.....	46
<b>Tabla 6:</b> Procedimiento para microcultivo.....	47
<b>Tabla 7:</b> Siembra en medio PDA.....	51
<b>Tabla 8:</b> Replante de colonias en medio PDA.....	55
<b>Tabla 9:</b> Selección de cajas en medio PDA para el microcultivos.....	59
<b>Tabla 10.</b> Características morfológicas de los hongos posiblemente micorrízicos.....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> .Descripción de una flor de orquídea.....	22
<b>Figura 2</b> .Diferentes tallos de orquídeas.....	23
<b>Figura 3.</b> <i>Trichoceros antennifer</i> .....	25
<b>Figura 4.</b> <i>Elleanthus amethystinoides</i> .....	26
<b>Figura 5.</b> <i>Stelis sp</i> .....	27
<b>Figura 6.</b> <i>Epidendrum chioneum</i> .....	28
<b>Figura 7.</b> <i>Pleurothallis linguifera</i> .....	29
<b>Figura 8.</b> <i>Epidendrum sp</i> .....	30
<b>Figura 9.</b> Endomicorras en corte longitudinal de raíz.....	31
<b>Figura 10.</b> Ectomicorras en corte transversal de una raíz.....	32
<b>Figura 11.</b> Género <i>Rhizoctonia</i> .....	33
<b>Figura 12:</b> Características del género-forma <i>Rhizoctonia</i> .....	34
<b>Figura 13:</b> Esquema de zonas específicas de la raíz para el aislamiento.....	40

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Porcentaje de crecimiento de colonias en medio FIM de las seis especies de orquídeas.....	52
<b>Gráfico 2:</b> Porcentaje de crecimiento de los tres fragmentos en medio FIM de las seis especies de orquídeas.....	53
<b>Gráfico 3:</b> Porcentaje de crecimiento de colonias en medio FIM de las seis especies de orquídeas.....	56
<b>Gráfico 4:</b> Porcentaje de crecimiento de los tres fragmentos de raíz (A, B, C) en medio PDA de las seis especies de orquídeas.....	57
<b>Gráfico 5:</b> Porcentaje de crecimiento de colonias seleccionadas para microcultivo de las seis especies de orquídeas.....	58
<b>Gráfico 6:</b> Porcentaje de crecimiento de los tres fragmentos (A, B, C) seleccionados para el microcultivo de las seis especies de orquídeas.....	58

## ÍNDICE DE ANEXO

**Anexo1.** Sitio de muestreo de las seis especies de orquídeas en el Cerro Abuga (Parroquia Bayas).



Yo, Laura Gabriela Ochoa Landy, autora de la tesis "AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE HONGOS POTENCIALMENTE MICORRÍZICOS EN SEIS ESPECIES DE ORQUÍDEAS NATIVAS DEL CERRO DE ABUGA EN LA PROVINCIA DEL CAÑAR", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 11 de enero de 2017

Laura Gabriela Ochoa Landy

0104960323



Yo, María Vicenta Guamán García, autora de la tesis "AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE HONGOS POTENCIALMENTE MICORRÍZICOS EN LAS ESPECIES DE ORQUÍDEAS NATIVAS DEL CERRO ABUGA EN LA PROVINCIA DEL CAÑAR", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 11 de enero de 2017

Maria Vicenta Guamán García

0302482450



Yo, María Vicenta Guamán García, autora de la tesis "AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE HONGOS POTENCIALMENTE MICORRÍZICOS EN SEIS ESPECIES DE ORQUÍDEAS NATIVAS DEL CERRO DE ABUGA EN LA PROVINCIA DEL CAÑAR", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 11 de enero de 2017

María Vicenta Guamán García

0302482450



Yo, Laura Gabriela Ochoa Landy, autora de la tesis "AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE HONGOS POTENCIALMENTE MICORRÍZICOS EN EIS ESPECIES DE ORQUÍDEAS NATIVAS DEL CERRO ABUGA EN LA PROVINCIA DEL CAÑAR", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 11 de enero de 2017

Laura Gabriela Ochoa Landy

0104960323



## DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada primeramente a Dios por haberme dado la fuerza y sabiduría necesaria para poder cumplir uno de mis grandes sueños y además por brindarme su infinita bondad y amor.

También está dedicada a mis padres Ricardo y Luisa por ser esa guía constante día a día a lo largo de mi vida, quienes con su sacrificio se convirtieron en el pilar fundamental de mi esfuerzo y superación personal, y gracias a su apoyo y esfuerzo he llegado a culminar mi formación académica.

A mi hermano mayor por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida académica, por sus consejos y por mantenerme siempre en el camino de la superación.

A toda mi familia por estar siempre conmigo.

A la Universidad de Cuenca por permitirme ser parte de su gran familia, en especial a mis queridos profesores que cada día me impartieron sus experiencias y conocimientos.

## CON CARIÑO

***Gabriela Ochoa.***



## DEDICATORIA

A Dios por ser el sendero de luz en mi vida, por darme fortaleza suficiente y sabiduría permitiéndome culminar con este sueño tan anhelado.

A mi madre, la Sra. Etelvina García por ser mi guía constante durante toda mi vida, quien con su amor, sacrificio, esfuerzo y perseverancia se ha convertido en mi pilar fundamental de mi superación personal, gracias por enseñarme el amor, el respeto, la humildad, por tener siempre las palabras correctas y un consejo adecuando para ser mejor día a día y así llegar a culminar mi formación académica.

A mis hermanos, quienes durante todos estos años supieron siempre bríndame su apoyo incondicional y palabras de aliento.

A mi hijo, Christopher Fajardo por llegar a mi vida, por ser mi razón de vivir, por ser la personita que me enseña cada día a sonreír y por quien hago todo en la vida.

**Vicenta**



## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos a Dios por darnos sabiduría y fuerza para poder culminar con nuestros objetivos planteados desde el inicio de nuestra vida universitaria.

Agradecemos a nuestra familia por su apoyo incondicional

Agradecemos a la Dra. Raffaella Ansaloni por impartirnos sus conocimientos en la identificación de hongos micorrícico, por su valioso tiempo y asesoramiento en nuestro trabajo de investigación.

A la Dra. Mónica Narváez, Blga. María Elisa Durán y Dra. María Elena Cazar PhD. por brindarnos su ayuda y facilitarnos la ejecución de nuestro trabajo investigativo.

De manera muy especial queremos agradecer a la Dra. Raffaella Ansaloni y Dra. Mónica Narváez por prestarnos las instalaciones del laboratorio del Orquideario de la Universidad de Cuenca, ya que fue muy importante para poder realizar nuestra investigación.

**Gabriela y Vicenta**

## INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae constituye una de las familias de plantas más grandes con aproximadamente 25000 especies distribuidas en todos los continentes y ecosistemas a excepción de desiertos y casquetes polares (Arévalo *et al.*, 2011). Ecuador es un país mega diverso, que a pesar de su pequeño tamaño, posee más especies de orquídeas que cualquier otro país en el mundo (Ministerio de Turismo, 2013). El mismo que alberga 4016 especies de orquídeas equivalente al 20% de la flora nativa ecuatoriana de las cuales 1714 son especies endémicas en el país (Endara, 2006). Presentando una gran variedad de tamaños, aromas, formas y colores que atrae y encanta a personas y científicos de todas partes del planeta (Endara, 2006).

Las orquídeas están relacionadas estrechamente con el funcionamiento del ecosistema, siendo considerados como reguladores de la humedad (Granada, 2007). Sin embargo muchas de estas especies se encuentran en peligro de extinción debido a la pérdida de hábitat provocada por el hombre (Zettler, 2013).

Estas plantas presentan frutos conocidos como cápsulas las cuales contienen miles de semillas, que se dispersan por el viento a grandes distancias. Solo unas cuantas logran germinar en la naturaleza, pero carecen de endospermo, es decir, no tiene reservas alimenticias para la germinación. Esto conlleva a la necesidad de generar un vínculo con hongos específicos que le proporcionan nutrientes (Zhu *et al.*, 2008, Otero *et al.*, 2015) necesarios para la germinación y desarrollo temprano de la plántula (Mateos, 2006). Las asociaciones simbióticas que se dan entre raíces de las plantas y los hongos específicos se denominan micorrizas (Gelpi, 2012; de Almeida *et al.*, 2014).

Estas micorrizas cumplen un papel importante en la biología de las orquídeas por lo que son consideradas únicas (Otero *et al.*, 2015). Son de tipo endótrofo, que quiere decir que la hifas del hongo viven en el interior de las células formando una especie de ovillo en el citoplasma de las células hospederas de la planta (Córdoba *et al.*, 2015). Es así como se establece una relación mutualista, ya que el hongo se beneficia con los productos de la fotosíntesis como carbohidratos, mientras que la planta incrementa la absorción de agua y nutrientes, principalmente fósforo (Rivas *et al.*, 1998). Pero existen otros casos donde las orquídeas digieren los ovillos y aprovechan las sustancias nutritivas del hongo. De esta forma se establece una base de equilibrio en la que, el hongo no debe invadir

completamente los tejidos de la planta, ni esta debe digerir todas las hifas del hongo (Ackerman *et al.*, 1992; Rivas *et al.*, 1998; Velasco *et al.*, 2008).

Los hongos que forman micorrizas con orquídeas son los hongos pertenecientes al Phylum Basidiomycota del género *Rhizoctonia* con los órdenes *Tulasnellales*, *Sebacinales*, *Ceratobasidiales* y *Atractiellales*, que han sido reportados como formadores de esta asociación simbiótica y frecuentes colonizadores de orquídeas tanto epífitas como terrestres (Otero *et al.*, 2009).

Todas las orquídeas tienen una relación obligada con los simbiontes micorrízicos, es así, que el uso de estos hongos constituye una herramienta de gran importancia en la germinación simbiótica de las semillas para la conservación y propagación de las orquídeas, debido a que la germinación simbiótica presenta una ventaja frente a la asimbiótica en la obtención de plantas más viables y resistentes (Zettler, 2013). Por consiguiente la disponibilidad de estos simbiontes fúngicos desempeña un papel clave tanto en la distribución y diversidad de esta gran familia de orquídeas (Otero *et al.*, 2002; McCormick *et al.*, 2004). En la actualidad la conservación y el uso sustentable de las orquídeas es tema de suma importancia, pero en nuestro país no se conoce mucho sobre la diversidad fúngica y es escasa la información que se tiene acerca de la relación simbiótica de los hongos micorrízicos con las orquídeas (McCormick *et al.*, 2004).

En la presente investigación se aisló e identificó macroscópicamente y microscópicamente 14 colonias de micorrizas afines probablemente al género-forma *Rhizoctonia* en seis especie de orquídeas terrestres (*Trichoceros antennifer*, *Elleanthus amethystinoides*, *Stelis* sp, *Epidendrum chioneum*, *Pleurothallis linguifera*, *Epidendrum* sp.) nativas de la provincia del Cañar, mediante el uso de dos medios de cultivo para el aislamiento del hongo a partir de la raíz y mantener viables las colonias asiladas, con la finalidad de establecer nuevas estrategias de conservación *ex situ* e incentivar a futuro la creación de bancos de hongos micorrízicos para posteriores investigaciones orientadas a la conservación de esta gran familia de planta.

## JUSTIFICACIÓN

Ecuador es un país biodiverso en cultura, fauna y flora. Es importante destacar la gran diversidad de orquídeas nativas que encontramos en diferentes zonas (Cruz, 2011). Representan un 25% de la flora de las cuatro regiones geográficas: Costa, Sierra, Amazonía y las islas Galápagos, de las cuales el 43% son endémicas (Andes, 2014). En Ecuador según el Libro Rojo (2011) de plantas endémicas, se estima que 85% de las especies presentan algún tipo de amenaza: 2% en peligro crítico, 11% en peligro y 87% vulnerable. Endara (2008) indica que las especies endémicas son más vulnerables a la extinción, debido a la alta tasa de desforestación, los incendios forestales, la pérdida de hábitat y el comercio ilegal (González y Cueva, 2014). Por lo tanto es necesario plantear estrategias de conservación *ex situ* mediante el aislamiento y estudio de hongos micorrízicos que juegan un papel importante en la conservación de la gran familia Orchidaceae (Moreno, 2013), esto conlleva a la necesidad de generar un vínculo con hongos específicos que le proporcionan nutrientes necesarios para la germinación y desarrollo temprano de la plántula (Mateos, 2006). Las asociaciones simbióticas que se dan entre raíces de las plantas y los hongos específicos se denominan micorrizas (Gelpi, 2012).

Los hongos son organismos muy comunes en la naturaleza, pues estos viven prácticamente en todos los medios. Tienen además, una gran importancia en el mantenimiento de los bosques, ya que no solo actúan como degradadores de materia orgánica sino que también son capaces de formar asociaciones con numerosas plantas. Por ejemplo, los hongos micorrízicos ayudan a las orquídeas a tomar nutrientes y minerales para la germinación y desarrollo del embrión (Vargas y Manrique, 2015).

Los estudios en micorrizas reflejan un potencial aporte para la conservación de orquídeas que se encuentran en peligro de extinción. En nuestro país es escasa la información que se tiene sobre la diversidad de hongos micorrízicos y el papel que desarrollan en las poblaciones de orquídeas (Guzmán y Moreno, 2014). Investigaciones de este tipo aportan información útil para establecer nuevas estrategias de conservación de orquídeas a nivel de laboratorio.

Razón por la cual se ha planteado el aislamiento e identificación de hongos potencialmente micorrízicos asociados a las raíces de seis especies de orquídeas nativas de la provincia del Cañar. De esta forma, este estudio generará información valiosa para



entender la relación que existe entre este grupo de hongos con la comunidad de orquídeas.

## **HIPÓTESIS**

De las seis especies de orquídeas nativas de la provincia del Cañar empleadas en esta investigación, se pueden aislar y purificar hongos potencialmente micorrízicos.



## OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS

### OBJETIVOS GENERAL

Evaluar la presencia de hongos potencialmente micorrízicos en seis especies de orquídeas nativas del cerro Abuga del cantón Azogues en la Provincia de Cañar.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener cepas puras de hongos asociados a las seis especies de orquídeas nativas.
- Realizar la identificación morfológica de las colonias potencialmente micorrizas encontradas.

## CAPÍTULO I.

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1 ORQUÍDEAS.

##### 1.1.1 Generalidades de las Orquídeas

La palabra orquídea viene del griego *orchis* que significa testículo, por la forma de los tubérculos de algunas especies terrestres y porque crecen en pares (Velasco *et al.*, 2008).

La familia Orchidaceae es considerada como una de las familias más grandes de plantas vasculares con más de 25000 especies distribuidas por todo el planeta (Arévalo, 2011; Zhu *et al.*, 2008). Considerándolas entre las más amplias del Reino Vegetal (Gamarra *et al.*; 2014). Este grupo representa una gran variedad de formas florales, muchas de ellas discretas y carentes de valor ornamental (Velasco *et al.*, 2008)

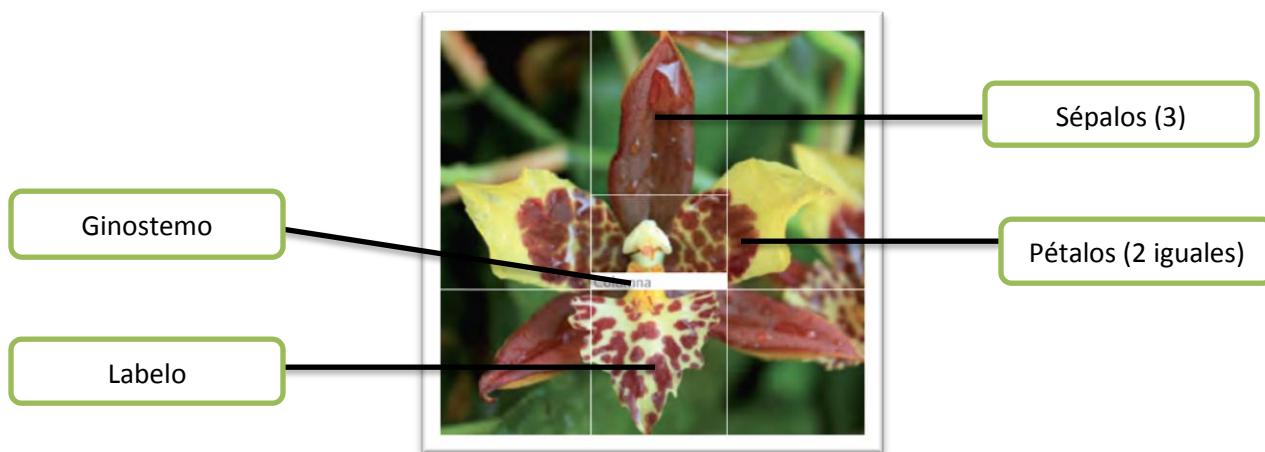
Las orquídeas exhiben una gran diversidad de formas, tamaños y belleza floral al localizarse en regiones tropicales y subtropicales a excepción de las zonas polares y los desiertos extremos (Mateos, 2006; Potentini, 2011).

Esta gran familia se caracteriza por presentar varios hábitats de crecimiento por la variabilidad morfológica. Es así que encontramos orquídeas: Terrestres, Litófitas y Epífitas. Las primeras presentan un sistema reticular que es subterráneo y se desarrollan en forma de tubérculo, rizoma o pseudobulbo y en forma de raíces más finas. Las segundas crecen sobre suelos rocosos, cuyas raíces aparecen por lo general por debajo del follaje de musgo que cubre las rocas. Las orquídeas epífitas son las más abundantes, estas viven sobre los árboles pero sin parasitar, sus raíces están fijas a los árboles y obtienen los nutrientes de la humedad del aire y a partir del humus producido por la descomposición de cuerpos de insectos, excrementos de aves, las hojas de los árboles, líquenes, entre otros (Granda, 2007).

En tales condiciones, las orquídeas desarrollan adaptaciones para poder sobrevivir, como por ejemplo órganos almacenadores de agua y nutrientes, raíces capaces de realizar la fotosíntesis y flores con estrategia para su reproducción (Merchaca, 2011; Arévalo *et al.*, 2011).

### 1.1.2 Características morfológicas de las orquídeas.

Se caracterizan por poseer flores vistosas que varían en su tamaño, forma, estructura y color. Tienen tres sépalos, tres pétalos de los cuales dos son iguales y uno diferente el mismo que se encuentra en el centro de la flor, siendo el labelo la parte más llamativa, cuya finalidad es atraer a los insectos polinizadores de la flor y una columna central que sustenta a las estructuras reproductoras masculinas y femeninas llamada ginostemo (Menchaca, 2011). Ver Figura 1.



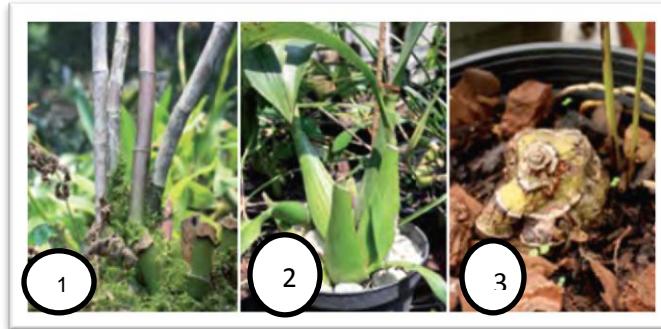
**Figura 1** .Descripción de una flor de orquídea.

Fuente: Menchaca, (2011).

El fruto es conocido botánicamente como cápsulas con muchas semillas de tamaño variado que van desde pocas micras hasta unos 5 milímetros, su peso varia de 1 a 22 microgramos. Estas semillas constan de una cáscara o testa que está formada por células muertas y un embrión no diferenciado, son carentes de endosperma (Menchaca, 2011; Potentini, 2011).

Las hojas son simples, alternas con márgenes enteros que por lo general son largas y angostas y principalmente con nervaduras paralelas. Conservándose por muchos años. Las especies de orquídeas que viven en lugares calurosos tienen hojas cilíndricas, lo cual evita que se deshidrate rápidamente (Menchaca, 2011).

Los tallos pueden ser de tres tipos principales: Tallos cilíndricos (1), pseudobulbos (2) o cormos (3). Ver Figura 2.



**Figura 2 .Diferentes tallos de orquídeas.**

Fuente: Menchaca, (2011).

Las raíces son un órgano vital para el anclaje de la planta y absorción de nutrientes (Potentini, 2011). En las orquídeas terrestres las raíces son estructuras alargadas y ramificadas, cubiertas de pelos absorbentes. Éstas están rodeadas por hifas de hongos que penetran y forman dentro de la raíz unos nódulos denominados pelotones. En raíces de las orquídeas epífitas los pelotones están constituidos por una funda de células muertas, esponjosas y porosas que se llama velamen (Potentini, 2011).

#### **1.1.3 Clasificación taxonómica de las orquídeas (Menchaca, 2011).**

Las orquídeas pertenecen a la siguiente clasificación taxonómica:

- Reino: Plantae.
- División: Magnoliophyta.
- Clase: Liliopsida.
- Orden: Asparagales.
- Familia: *Orchidaceae*.
- Subfamilias:
  - *Epidendroideae*
  - *Orchidoideae*
  - *Vanilloideae*
  - *Cypripedioideae*
  - *Apostasioideae*

#### **1.1.4 El ciclo vegetativo de una orquídea**

Las orquídeas son hierbas terrestres perennes, capaces de vivir varios años y de florecer anualmente si las condiciones son favorables. Poseen pseudotubérculos o rizomas que les permiten subsistir durante la época desfavorable del año (Ordoñez, 2014).

Las orquídeas se consideraron estériles hasta que en 1889, el botánico francés Noel Bérnard, descubrió que para la germinación se necesitaba una relación con ciertos hongos presentes en el suelo (Díaz, 2010). Es así como empieza el ciclo vegetativo de una orquídea, en la mayoría de las semillas de las orquídeas el embrión se encuentra rodeado de un tejido nutricio llamado endospermo, esta sustancia permite que el embrión crezca y se desarrolle hasta una planta joven capaz de producir sus primeras hojas y raíces. Pero algunas semillas sólo alcanzaron unas décimas de longitud debido a que carecen de sustancias de reservas (Velasco *et al.*, 2008), por lo que se necesita de un agente externo que aporte los nutrientes necesarios para el embrión en desarrollo (Díaz, 2010).

Cuando la semilla se encuentra en el suelo con el hongo apropiado, éste rodea la semilla mediante las hifas las cuales actúan como pequeñas raíces que absorben sustancias nutritivas (Nitrógeno (N), Fosforo (P), Potasio (K), Calcio (Ca)) y agua necesaria para la germinación, por lo tanto el hongo actúa como un intermediario entre la semilla y las sustancias nutritivas del suelo. (Díaz, 2010).

Durante la germinación, el embrión se irá hinchando hasta alcanzar el estado de protocormo, esto significa que el estado de desarrollo en la que se encuentran los embriones de las orquídeas es mayor (Velasco *et al.*, 2008). Una vez germinada, tras varios meses, comienza el desarrollo del primer tubérculo y la yema terminal produce una hoja, el tubérculo irá profundizando cada vez más en la tierra hasta que alcance la profundidad suficiente, esto con la finalidad de proteger a la semilla germinada de la desecación de las capas más superficiales del suelo (Díaz, 2010).

Después de varios meses la yema que sobresale del tubérculo entra en actividad, estas alcanzan la superficie del suelo produciendo una roseta de hojas con sus primeras raíces, la misma que es invadida por hongos micorrízicos especialmente del género *Rhizoctonia*, estableciendo así una simbiosis entre la raíz y el hongo (Zettler, 2013).

Después de dos meses las yemas van produciendo nuevas hojas y una raíz debajo de la tierra, esta raíz se engruesa y se transforma en un tubérculo radical, órgano de reserva que servirá para el periodo vegetativo siguiente. Meses después se produce el tallo floral, seguida de esto se produce la floración donde al mismo tiempo el nuevo tubérculo ha alcanzado el mismo tamaño que el primer tubérculo (Zettler, 2010). La planta con flores polinizadas da el inicio al desarrollo de las semillas, hecho que se lleva a cabo gracias a las reservas adquiridas del primer tubérculo que esta a su vez empieza a desintegrarse (Velasco *et al.*, 2008).

### **1.1.5 Descripción de las especies de Orquídeas utilizadas en el aislamiento de hongos potencialmente micorrízicos en el presente trabajo.**

#### **1.1.5.1 *Trichoceros antennifer***

- **Familia:** Orchidaceae Juss.
- **Subfamilia:** Cypripedioideae.
- **Género:** *Trichoceros antennifer* (Trópicos, 2015).



**Figura 3. *Trichoceros antennifer***

**Fotografía:** Vicenta Guamán y Gabriela Ochoa

Kunth propuso el género *Trichoceros antennifer*, basándose en plantas recolectadas por Humboldt y Bonpland a principios del siglo XIX (Zelenko *et al.*, 2009). Este género de orquídea es nativa de la Cordillera de los Andes, desde Colombia a Bolivia en los bosques montanos. Presentan flores que se parecen a diminutas moscas (Calaway, 2002). Cuya estrategia de polinización es la pseudocopulación, es decir, que engañan a insectos machos para que traten de unirse con la flor, transfiriendo así el polen cuando vuelven a

ser engañados por otra flor (Zelenko *et al.*, 2009). Estas Orquídeas son epífitas y terrestres (Calaway, 2002), y crecen a elevaciones que van desde 2400 metros hasta más de 3000 metros. Se adaptan bien sobre el lecho arbóreo, ya que en dicho lugar puede encontrar mucha humedad bajo luz brillante (Zelenko *et al.*, 2009). Ver Figura 3

#### 1.1.5.2 *Elleanthus amethystinoides*

- **Familia:** Orchidaceae Juss.
- **Subfamilia:** Epidendroideae.
- **Género:** *Elleanthus amethystinoides* (Trópicos, 2015).



**Figura 4.** *Elleanthus amethystinoides*

**Fotografía:** Vicenta Guamán y Gabriela Ochoa

*Elleanthus* fue propuesto por Presl en 1827 (Zelenko *et al.*, 2009). Su nombre proviene del griego *elle* que quiere decir figura mitológica y *anthus* que significa flor. Es nativo de América tropical en la región de la Cordillera de los Andes (Calaway, 2002). Este género comprende más de 100 especies, siendo plantas tanto terrestres como epífitas y se extienden desde las costas bajas hasta casi 4000 metros de altura. Estas presentan raíces carnosas, un tallo alto y delgado, con hojas lineares y lanceolado, con inflorescencias que terminan en un conjunto formando un racimo floral. Ver Figura 4. Son difíciles de distinguir de género *Sobralia* cuando no presenta brote o flor. El género necesita de gran humedad por lo que vive en los bosques húmedos (Calaway, 2002).

#### 1.1.5.3 *Stelis* sp.

- **Familia:** Orchidaceae Juss
- **Subfamilia:** Epidendroideae
- **Género:** *Stelis* sp. (Trópicos, 2015).



**Figura 5.** *Stelis* sp.

**Fotografía:** Vicenta Guamán y Gabriela Ochoa

Las especies de este género se sitúan en Norteamérica, Centroamérica y Sudamérica. Se pueden encontrar en bosques, montañas húmedas de clima tropical. Son plantas epífitas y terrestres, con una sola hoja lanceolada que se desarrolla desde un tallo. La mayoría de las especies desarrollan unos largos y densos racimos de unas pequeñas flores en diversos tonos, las mismas que presentan sépalos unidos desde la base, usualmente presentan pétalos cortos y un labelo grueso. Estas flores son fotosensitivas, que se abren con la luz del sol y algunas se cierran totalmente por la noche. En Ecuador se han reportado 428 de especies de este género (Calaway, 2002). Ver Figura 5.

#### 1.1.5.4 *Epidendrum chioneum*

- **Familia:** Orchidaceae Juss.
- **Subfamilia:** Epidendroideae.
- **Género:** *Epidendrum chioneum* (Trópicos, 2015).



**Figura 6.** *Epidendrum chioneum*

**Fotografía:** Vicenta Guamán y Gabriela Ochoa

Se encuentra en Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú en las elevaciones de 2300 a 2800 metros. Son orquídeas terrestres, a veces epífitas, de crecimiento monopodial con rizomas sin seudobulbos. Se caracteriza por presentar tallos rectos, simples o ramificados de 20 cm de alto. Son polinizados por mariposas y colibríes (Calaway, 2002). Ver Figura 6.

#### **1.1.5.5 *Pleurothallis linguifera*.**

- **Familia:** Orchidaceae Juss.
- **Subfamilia:** Epidendroideae
- **Género:** *Pleurothallis linguifera* (Trópicos, 2015).



**Figura 7. *Pleurothallis linguifera***

**Fotografía:** Vicenta Guamán y Gabriela Ochoa

El botánico Robett Brown descubrió este género, para separarlo de las especies de *Epidentrum* (Zelenko *et al.*, 2009). Proviene de la palabra griega *pleurothallos* que significa ramas parecidas a costillas. Son epífitas o terrestres que crecen desde el nivel del mar hasta los 3500 metros de altura. Crecen sobre lechos arbóreos con sus raíces cubiertas de musgo. Son carentes de pseudobulbos, sus hojas pueden ser delgadas y presenta una hoja solitaria, las flores surgen de la base de la hoja (Figura 7). Pueden encontrarse solas o en grupos pequeños. En Ecuador se han reportado 472 especies de 1215. La polinización se da por pequeñas moscas comúnmente del género *Lycoria*, *Bradesia* o *Drosophila* (Calaway, 2002).

#### **1.1.5.6 *Epidendrum* sp.**

- **Familia:** *Orchidaceae* Juss.
- **Subfamilia:** *Epidendroideae*.
- **Género:** *Epidendrum* sp. (Trópicos, 2015)



**Figura 8. *Epidendrum* sp.**

**Fotografía:** Vicenta Guamán y Gabriela Ochoa

Esta especie fue descrita en 1763 por Linnaeus. Etimológicamente proviene del griego *epi*: sobre y *dendrom*: árbol, debido a que estas especies crecen sobre los árboles. Se caracterizan por tener cañas como tallos, sus hojas son planas y sus flores sin una articulación entre el ovario y el pedúnculo (Figura 8). Son polinizadas por las polillas, colibríes o mariposas. Crecen en los bosques forestales húmedos fríos de los Andes. Este género está constituido por más de 1000 especies distribuidos en América tropical desde Florida hasta el norte de Argentina a 3500 metros sobre el nivel del mar, en el Ecuador se encuentran 442 especies de las cuales 324 se han identificado (Calaway, 2000).

## 1.2. MICORRIZAS

### 1.2.1. Definición

El término micorriza fue dado por el botánico alemán Albert Bernard Frank en 1885, y procede del griego *mykos*= hongo y *rhiza*= raíz, lo que significa que es una asociación simbiótica entre el micelio de un hongo y las raíces o rizoides de una planta terrestre. Gracias a esta asociación se permite la absorción de agua y nutrientes necesarios para el desarrollo de las plantas (Navarro, 2009).

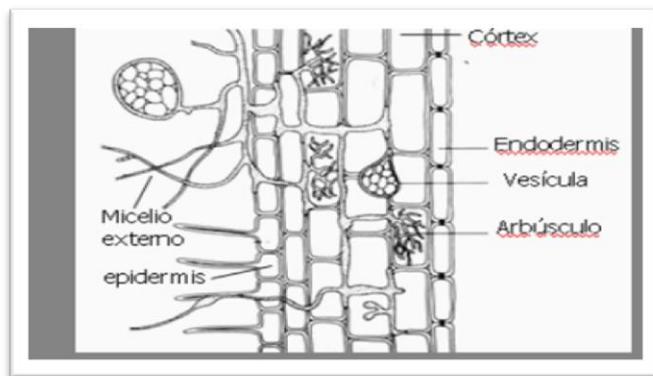
Estos hongos constituyen una asociación simbiótica con la raíz de una gran variedad de plantas. Esta unión entre hongos y raíces tiene una particularidad de que los dos se benefician, y a esto se le conoce como simbiosis, en donde, la raíz aprovecha los

nutrientes que el hongo toma del suelo, y se los traslada a la planta, y a su vez, el hongo toma de la planta el carbono necesario para su desarrollo (Peñaloza, 2012). La mayoría de los hongos que participan en esta asociación son miembros del género-forma *Rhizoctonia*. En las células corticales de las raíces, el hongo origina una estructura denominada 'pelotón' que es un enrollamiento hifal, el cual es degradado por la planta para obtener nutrientes (Mosquera y Otero, 2010).

### 1.2.2. Tipos de micorrizas

En la actualidad existen varios tipos de micorrizas, todos ellos basados en las características de la infección y en los organismos simbiontes que la establecen. Harley y Smith (1989) reconocen hasta siete tipos de micorrizas, pero principalmente se distinguen dos grandes tipos de micorrizas: Ectomicorrizas (micorriza ectotrófica) y Endomicorrizas (micorriza endotrófica) (Navarro, 2009).

**Endomicorrizas:** en este tipo de hongos, el micelio fúngico penetra en las células del córtex de la raíz, siendo el contacto más estrecho (Navarro, 2009). Ver Figura 9.

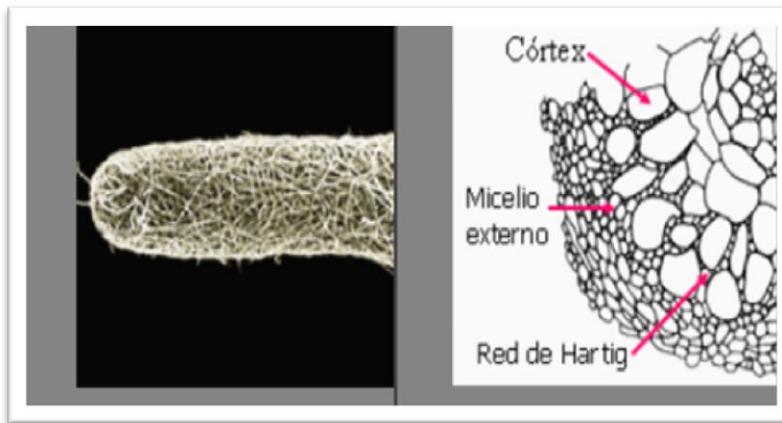


**Figura 9.**

Endomicorrizas en corte longitudinal de raíz

Fuente: <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema20/20-9micorrizas>

**Ectomicorrizas:** el hongo crece entre las células de la raíz rodeándolas sin penetrarlas, formando una estructura característica en forma de red, esto da lugar a que las raíces están rodeadas por una vaina formada por el hongo llamada manto fúngico (Figura 10), las hormonas que secreta el hongo provocan la ramificación de la raíz, que adopta un aspecto característico esponjoso y ramificado (Arbo *et al.*, 2006).



**Figura 10.** Ectomicorras en corte transversal de una raíz.

Fuente: <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema20/20-9micorras>

### 1.2.3. Hongos que forman micorrizas con orquídeas

En bosques tropicales, subtropicales y neotropicales se ha encontrado interacción entre hongos y orquídeas, estos hongos pertenecientes al subfilo Basidiomicotina, con los órdenes: *Tulasnellales*, *Sebacinales* *Ceratobasidiales* y *Atractieliales* como los hongos micorrízicos más comunes en orquídeas (Kottke *et al.*, 2009).

#### 1.2.3.1. Phylum Basidiomycota

Estos se caracterizan primordialmente por el hecho de que ellos producen sus esporas sexuales sobre la superficie de una estructura especializada y microscópica llamada basidio, además presentan sus hifas con septas a menudo provistos de fístulas (Alexopoulos *et al.*, 1996).

#### Orden *Tulasnellales*

Este tipo de hongos se han reconocido como saprófitos y parásitos, simbóticos en micorrizas con orquídeas. Gran parte de las colecciones de estas especies han sido realizadas a partir de madera u hojas en descomposición (Bourdot *et al.*, 1928). Sin embargo, varias especies han sido aisladas desde las raíces de orquídeas terrestres (Warcup *et al.*, 1967).

#### Características morfológicas de *Tulasnellales*

Entre las características principales de *Tulasnellales* tenemos: basidioma, extendido aracnoideo sin himenium definido, de ceroso a subgelatinoso y hialino (claro), muy a menudo invisible microscópicamente; las hifas son bi o multinucleadas, claras

monomíticas con o sin conexiones por fístulas (clamps), esporas: lizas y de variadas formas (Roberts *et al.*, 1999).

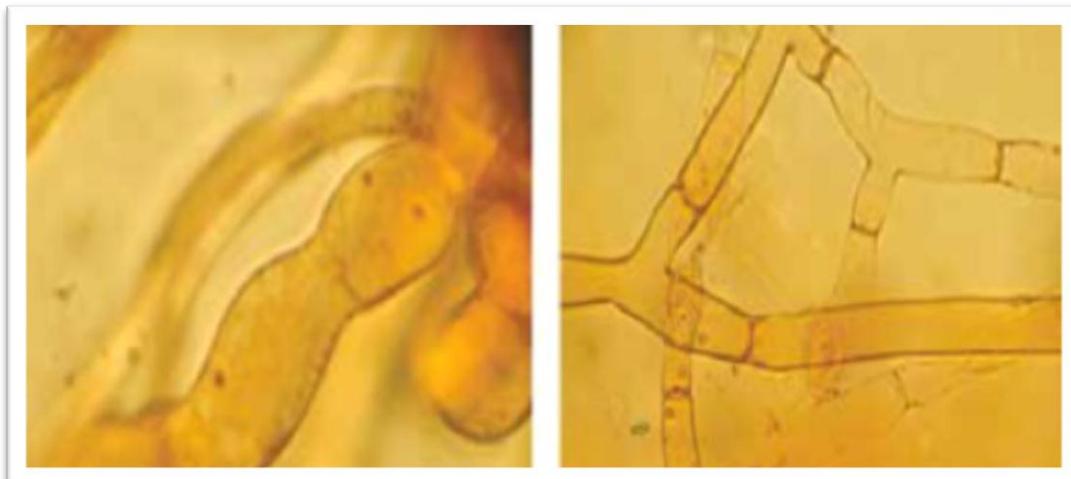
### **Forma *Rhizoctonia***

Los hongos *Rhizoctonia* son imperfectos (Warcup *et al.*, 1967) saprófitos, parásitos de plantas y hongos endomicorrícos de orquídeas, dentro del grupo *Basidiomycota*, clase *Basidiomycetes*. (Roberts, 1999).

En el laboratorio, el crecimiento de estas formas anamórficas ha sido inducido, caracterizándose por poseer hifas septadas, las cuales en algunos son heterocarióticas (dos o más núcleos genéticamente diferentes), o homocarióticas (núcleos genéticamente idénticos) (Roberts ,1999).

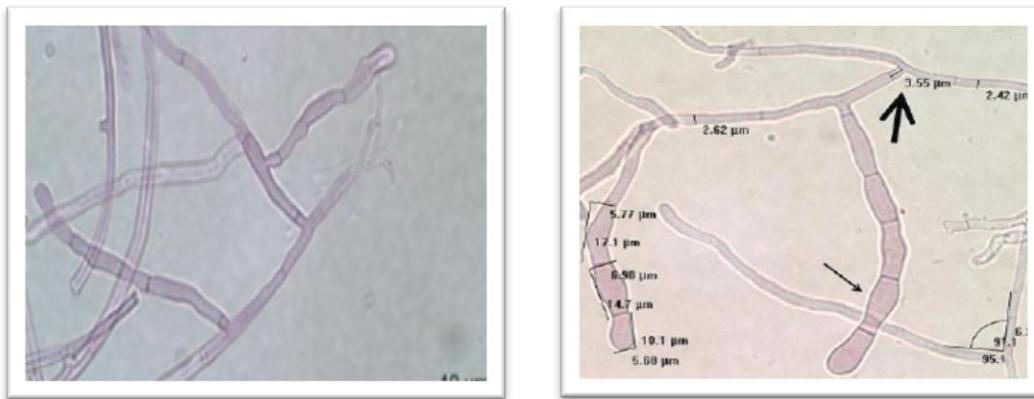
### **Morfología y citología de *Rhizoctonia***

En *in vitro* las hifas jóvenes *Rhizoctonia sp* se dirigen en la dirección del crecimiento e invariablemente parecen constreñidas al punto de unión de la hifa principal. En hifas desarrolladas se observan crecimientos en 90° de la hifa principal, también en 45° (Figura 11). Frecuentemente la mayoría de las células de la hifa principal se desarrollan en una nueva rama cerca del fin distal, así el septo basal (Figura 12) de la hifa principal está cerca de la ramificación (Barnett, 1998; Nodo, 2010).



**Figura 11.** Género *Rhizoctonia*.

Fuente: Mosquera, 2010



**Figura 12:** Características del género-forma *Rhizoctonia*.

Microscopía de campo claro de monilias (flecha negra delgada) y septo basal (flecha negra gruesa).

Fuente: Moreno-Camarena, 2012

#### 1.2.4. Micorrizas de orquídeas

La relación micorríza-orquídea es un tema de estudio de gran importancia a nivel mundial, algunos autores como el doctor Lawrence W. Zettler, catedrático del departamento de Biología de Illinois College, USA, y su equipo, demostraron que algunas orquídeas, generalmente las epífitas, son específicas en su interacción micorrícica (Zettler, 2007), y estos estudios marcó una pauta importante en la evolución de la familia Orchidaceae (Benzing, 1981).

Mediante estos estudios se sabe que la mayoría de las especies de orquídeas de zonas templadas, están durante todo su ciclo de vida infectadas con hongos micorrízicos, mientras que en las orquídeas tropicales se ha demostrado grados variables de asociación, demostrando que la unión de micorrizas con orquídeas de zonas tropicales es fundamental para la germinación, aunque en las siguientes etapas puede estar presente o no el hongo micorrízicos (Rasmussen, 1995).

Los estudios realizados por Cameron (2003) reporta que la asociación hongo-orquídea es mutualista, ya que sus resultados experimentales demostraron un intercambio recíproco de carbono entre hongo y orquídea. Además se conoce que los hongos son grandes proveedores de nutrientes minerales como el carbono (C) y nitrógeno (N), obtenidos a partir de compuestos como aminoácidos y sustancias como la celulosa, que son producidos y encontrados de forma natural. La actividad fotosintética permite que se

genere mayor intercambio nutricional y mineral de las orquídeas hacia los hongos, convirtiéndose en un flujo bidireccional constante entre ambos (Cameron *et al.* 2006).

#### **1.2.5 Proceso de colonización de una micorriza**

El proceso de colonización de una micorriza por una raíz de una planta se da de la siguiente forma, y es similar en todos los tipos de micorrizas:

##### **1.2.5.1. Primera etapa**

Se produce la diferenciación de la espora, propagación del hongo e identificación mutua planta-hongo/hongo-planta en la rizósfera, o en regiones próximas a las raíces o pelos radicales. La identificación es al parecer por sustancias exudadas desde la raíz que provocan el crecimiento del micelio y un biotropismo positivo del mismo hacia la raíz (De la Vega, 2006).

##### **1.2.5.2. Segunda etapa**

Consiste en el acercamiento y acoplamiento progresivo y gradual del micelio y la raicilla produciéndose el contacto intercelular al formarse una estructura que adhesiona ambos especímenes (De la Vega, 2006).

##### **1.2.5.3. Tercera etapa**

Se realiza la colonización y se producen cambios morfológicos y estructurales tanto en los tejidos colonizados por el hongo, como en la organización de la pared celular de la raíz. Posteriormente se produce la integración fisiológica de ambos especímenes (hongo-raíz) y, por último se produce una alteración de las actividades enzimáticas que se coordinan entre los especímenes para integrar sus procesos metabólicos (De la Vega, 2006).

Este proceso de asociación para formar micorrizas provoca alteraciones morfológicas y anatómicas en las plantas colonizadas tales como cambios en: la relación tallo raíz; la estructura de los tejidos radicales; el número de cloroplastos; aumento de la lignificación; alteración de los balances hormonales, etc. Efectos que no sólo son explicables como simple mejora nutritiva de la planta debido al aumento de eficacia en la absorción de nutrientes por la raíz gracias a la formación de la micorriza, sino que responde a cambios metabólicos más profundos y complejos, debidos a la integración fisiológica de los simbiontes (De la Vega, 2006).

#### **1.2.6 Beneficios de la micorrización en las orquídeas.**

Los hongos micorrízicos al ser seres heterótrofos necesitan de otros organismos para poder desarrollarse, dando lugar a una simbiosis, en donde los dos organismo resultan

beneficiados. Las orquídeas son una fuente de carbono y azúcares para el desarrollo de los hongos micorrízicos y estos a su vez proporcionan minerales y agua que extraen del suelo a la planta hospedera. (Honrubia, 2009)

#### **1.2.6.1. Formación de agregados estables**

Se ha observado que las hifas de las micorrizas, en cooperación con otros microorganismos, interactúan en el proceso de formación de agregados estables. El micelio desarrolla una estructura que mantiene las partículas unidas, después, tanto las raíces como las hifas aportan productos orgánicos que se incorporan a la estructura en formación. Los microorganismos excretan o exudan agentes compactantes (mucílagos, polisacáridos) que provocan una cementación del microagregado en formación. Finalmente estos se unen en macroagregados (Barea, 1999).

La cantidad de carbono que llega al suelo, mediado por las micorrizas es crítico para el desarrollo de la agregación del suelo. La glomalina producida por las micorrizas hace el papel de una verdadera goma o pega. Esta sustancia orgánica (glicoproteína) rica en carbono y nitrógeno, conjuntamente con las hifas, cementan las diferentes partículas del suelo, contribuyendo con la formación de agregados, otorgando al suelo mejores características físicas (Bernal *et al.*, 2006).

#### **1.2.6.2. Papel de la micorriza en la absorción de nutrimento**

La cantidad de nutrimentos que absorbe las plantas está determinada por la capacidad de absorción de la raíz y por la difusión de nutrimentos, por lo tanto, la liberación de elementos de la solución de suelo. El micelio externo de los hongos arbusculares incrementa el volumen de suelo explorado y determinan la utilización de iones de baja velocidad de difusión como: fósforo (P), zinc (Zn) y molibdeno (Mo) (Bernal *et al.*, 2006).

Las micorrizas además son productoras de enzimas hidrolíticas como proteasas y fosfatasas, estas últimas necesarias en la solubilización del fósforo y mineralización del fósforo orgánico, incrementando los nutrientes disponibles para el mantenimiento del sistema suelo-planta (Bernal *et al.*, 2006).

#### **1.2.6.3. Nutrición de fósforo (P)**

El fósforo presente en el suelo es poco soluble en el agua y por ello su concentración es muy pequeña en la solución del suelo. Entre 95 a 99% del fósforo del suelo no está disponible para las plantas, esto incluye las formas del fósforo inorgánico y el mineral insoluble. La concentración de fósforo en el micelio fúngico es 100 veces superior que en

el suelo, ya que se presenta mayor afinidad para la captación de fósforo. El hongo incrementan la asimilación del P por las plantas llevado a través de las hifas (González, 1998).

#### **1.2.6.4. Nutrición de otros elementos**

Las micorrizas también puede incrementar la utilización de otros nutrimentos del suelo. Se han encontrado altas concentraciones de nitrógeno (N) como efecto indirecto por la estimulación de la fijación simbiótica, potasio (K), hierro (Fe), manganeso (Mn), cloro (Cl), magnesio (Mg), y microelementos como Zinc (Zn), Azufre (S), Boro (B) y Molibdeno (Mo) en plantas micorrizadas (González, 1998).

#### **1.2.6.5. Relaciones hídricas de la planta**

Varios estudios ponen en evidencia que las micorrizas vesículo arbusculares (MVA) tienen mayor resistencia al estrés hídrico, este efecto se atribuye al mejor nivel nutritivo de la planta y a que las hifas externas del hongos son capaces de captar agua más lejos de la zona de deficiencia (González, 1998).

#### **1.2.6.6. Influencia sobre la Fotosíntesis del Hospedero.**

El proceso de la fotosíntesis es mayor en plantas micorrizadas no solo por los efectos de la nutrición en P, sino a una mayor eficiencia en la utilización de P en el proceso fotosintético en plantas micorrizadas ya que se induce en la planta la formación de compuestos que influencian la estructura y/o función de los cloroplastos (González, 1998)

### **1.2.6 Medios de cultivo empleados**

**1.2.7.1 Medio FIM (Fungi Isolation Medium):** Este medio es empleado para el aislamiento de hongos provenientes de la raíz de la planta; este contiene sales como nitrato de sodio, cloruro de potasio, fosfato ácido de potasio y sulfato de magnesio, sacarosa y levadura, suspendidos en Agar Agar; todos estos ingredientes constituyen los nutrientes necesarios para que el hongo pueda crecer y ser aislado. El medio también contiene Estreptomicina para evitar la contaminación bacteriana; es muy importante llevar a un pH de 6,8, para que el crecimiento sea óptimo (Rueda, 2004) (Narrea, 2006).

**1.2.7.2 Medio PDA (Agar Dextrosa-Papa):** Este medio es ampliamente utilizado para aislamiento, purificación y mantenimiento de hongos. Tiene la infusión de papa como fuente de almidones y la dextrosa que son la base para el crecimiento de hongos. El pH de 5,6 evita el crecimiento de las bacterias y es óptimo para el desarrollo de los hongos (Narrea, 2006).

## CAPITULO II

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. Área de estudio y muestreo

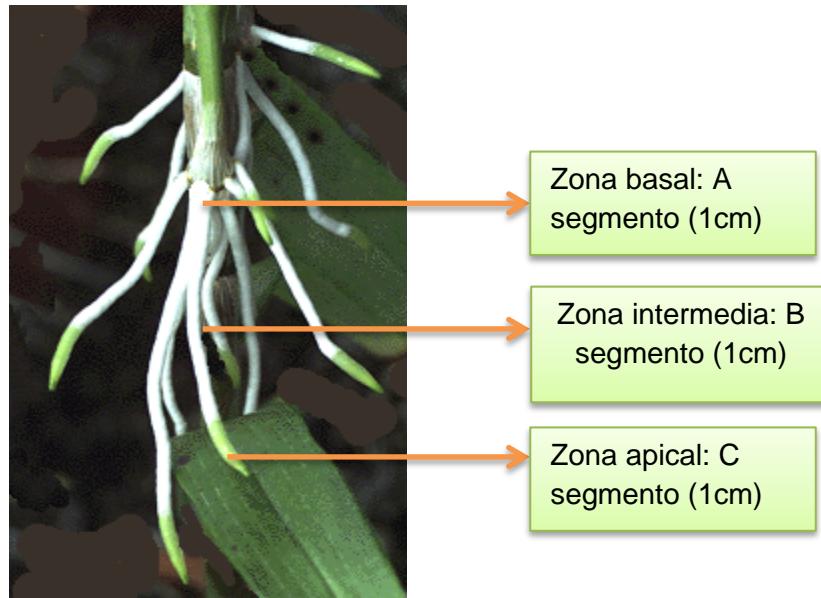
El presente trabajo es de tipo experimental, cuya área de estudio se encuentra ubicada en el Cerro Abuga localizada en la parroquia Bayas del Cantón Azogues en la Provincia del Cañar. El mismo que se encuentra a una altura 3090 msnm. Los puntos de recolección de las seis especies fueron georreferenciadas (Longitud: 78°59'44'' Oeste y Latitud: 2°40'10'' Sur) (**Anexo 1**).

#### 2.2. Muestreo

El tamaño de la muestra corresponde a 10 fragmentos de raíz de 3 a 5 cm por especie. Se trabajó por duplicado obteniendo un total 20 fragmentos de raíz por especie, dando una sumatoria de 120 fragmentos de raíz de las seis especies de orquídeas en estudio. Tras este proceso de recolección se emplearon raíces que no presentaban señales visibles de enfermedad o daño. En el laboratorio del Orquideario de la Universidad de Cuenca, se tomaron 3 segmentos de 1 cm de cada fragmento de raíz muestreada, estos segmentos pertenecen a las 3 zonas de la raíz: basal (A), intermedia (B), apical (C) (**Figura 16**). A cada especie de orquídea se asignó un código para su posterior identificación (**Tabla 1**).

**Tabla 1: Asignación de códigos para cada una de las especies de orquídeas.**

Especie	Código	Número de raíz	Zona de la raíz	Código final
<i>Trichoceros antennifer</i>	T	Se asignó un número a cada fragmento de raíz muestreada	De acuerdo a la zona de la raíz que se toma para la posterior siembra ( <b>Figura 16</b> )	T1A
<i>Elleanthus amethystinoides</i>	Ea			Ea1A
<i>Stelis sp</i>	S	desde 1 a 20 en cada una de las especies		S1A
<i>Epidendrum chioneum</i>	Ec			Ec1A
<i>Pleurothallis linguifera</i>	P			P1A
<i>Epidendrum sp</i>	E			E1A



**Figura 13:** Esquema de zonas específicas de la raíz para el aislamiento.

Fuente: <http://lasmilrespuestas.blogspot.com/2012/04/que-plantas-tienen-raices-que-cuelgan.html>

### 2.3. Materiales y reactivos

El presente trabajo se realizó bajo condiciones de esterilidad, usando la cámara de flujo laminar en todos los procesos de siembra, tanto en medio FIM (Fungi Isolation Medium) y su posterior resiembra en medio PDA (Agar Dextrosa-Papa).

Para el cultivo de los hongos es de vital importancia que los medios de cultivo, las cajas Petri, los aparatos y las raíces se mantengan desinfectadas desde el inicio hasta el final del aislamiento, esto con la finalidad de evitar contaminaciones (McKendrick ,2000).

Se utilizó cajas de plástico para la incubación, las cuales fueron acondicionadas para evitar contaminación externa. Los hongos fueron incubados a temperatura ambiente (22 – 25 °C). Los medios de cultivo fueron realizados con todos sus componentes puros y llevados a condiciones de pH específicos para el crecimiento y desarrollo idóneo de los mismos, todo esto con el empleo de un potenciómetro; por otra parte los dos medios fueron previamente esterilizados en una autoclave vertical de 32 litros, cuya temperatura y presión son suficientes para eliminar a todas las esporas de bacterias presentes en el medio (McKendrick ,2000).

### 2.4. Métodos

Para esta investigación se emplearon métodos de recolección de raíces, siembra y aislamiento de hongos aplicados por Zettler *et al*, (2013).

Los ensayos se desarrollaron por duplicado. Se realizó la documentación del proceso mediante fotografías y apuntes a lo largo de todo el estudio. Para procesar los datos obtenidos en esta investigación, se empleó un análisis descriptivo utilizando como herramienta de procesamiento Excel, para la realización de cálculos y tablas necesarias.

#### **2.4.1. Recolección de raíces de orquídeas terrestres**

La recolección de las muestras se realizó en los meses de julio y agosto del 2016.

Una vez localizadas las orquídeas, se realizó un surco alrededor de la planta hasta dejar expuestas las raíces, tratando de evitar su alteración, se procedió a cortar con un bisturí. Se tomó en cuenta las raíces jóvenes con un color amarillento u opaco, que es característico de la colonización de hongos micorrízicos (Zhu *et al.*, 2008) y además que estén en contacto directo con el suelo. Las muestras recolectadas fueron etiquetadas con su nombre científico y posteriormente trasladadas al laboratorio Orquideario de la Universidad de Cuenca (Acevedo, 2010; Ordoñez *et al.*, 2012)

#### **2.5. Aislamiento del hongo micorrízico**

##### **2.5.1. Protocolo de lavado y siembra de las raíces en medio FIM (Fungi Isolation Medium)**

En el laboratorio Orquideario, las raíces seleccionadas fueron sometidas a un proceso de lavado superficial con agua potable y jabón de tocador, esto para retirar la tierra que está impregnada en la raíz, con la finalidad de evitar cualquier tipo de contaminación a las células corticales de la raíz.

Las raíces lavadas fueron sumergidas en una solución para desinfectar (5ml de cloro, 5ml de alcohol 85% y 90 ml de agua) por 10 minutos. Despues se colocó las raíces en una caja Petri estéril y con ayuda de la cámara de flujo laminar se procedió a cortar las raíces con ayuda del bisturí, los 3 fragmentos obtenidos correspondiente a lo q indica la **Figura 16**, fueron colocados en cajas Petri diferentes.

En cada caja se procedió a añadir una gota de agua estéril y con ayuda de un bisturí se picó la raíz en fragmentos muy pequeños fragmentos, para lograr exponer los pelotones en el medio de cultivo. Posteriormente se vertió el medio FIM haciendo una siembra por inmersión. Las muestras se incubaron a temperaturas de entre 22 a 25°C en el cuarto de crecimiento del laboratorio en el Orquideario, la incubación se realizó de entre 7 a 10 días.

La desinfección de las raíces y la siembra en medio FIM, deben realizarse el mismo día.

El procedimiento de desinfección y siembra en medio FIM se observa en la **Tabla 2**.

**Tabla 2: Procedimiento de desinfección y siembra en medio FIM**

1. Lavar las raíces en agua potable.	
2. Colocar las raíces en la solución desinfectante por 10 minutos.	
3. Colocar las raíces desinfectadas en una caja Petri estéril.	

4. Cortar las raíces en fragmentos de 1 cm y colocar en cajas Petri diferentes, todo esto se debe realizar dentro de una cámara de flujo laminar.



5. Colocar una gota de agua estéril y picar la raíz en fracciones muy pequeñas.



6. Verter el medio FIM.



7. Etiquetar cada una de las cajas con los códigos respectivos y posteriormente incubar a 25°C de 7 a 10 días



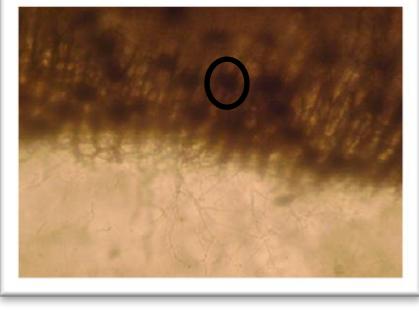
Elaborado por: Vicenta Guamán y Gabriela Ochoa

La revisión de cada uno de los cultivos fue constante y se realizó un registro tanto escrito como fotográfico.

### 2.5.2 Observación de pelotones en medio FIM (Fungi Isolation Medium)

A los dos días de la siembra en medio FIM, se realizó la observación al microscopio con lente de 40x, para constatar la presencia de pelotones con hifas viables dentro del tejido cortical de las raíces. El procedimiento de la observación de los pelotones se puede observar en la Tabla 3.

**Tabla 3: Procedimiento para la observación de los pelotones.**

1. Señalar la colonia que se quiere observar al microscopio.	
2. Mirar al microscopio con el lente de 40x.	
3. Determinar el posible pelotón y tomar registro fotográfico.	

Elaborado por: Vicenta Guamán y Gabriela Ochoa

### 2.5.3 Aislamiento del hongo en medio PDA (Agar Dextrosa-Papa)

Lo que se pretende obtener con este método es purificar las colonias.

Después de 7 a 10 días, se puede observar macroscópicamente el desarrollo de las colonias, las colonias con crecimiento adecuado fueron replicadas en medio PDA y de igual manera que en el medio FIM, las cajas Petri se etiquetaron e incubaron a 25°C por 7 días, en el cuarto de crecimiento del Orquideario de la Universidad de Cuenca. El proceso se observa a continuación.

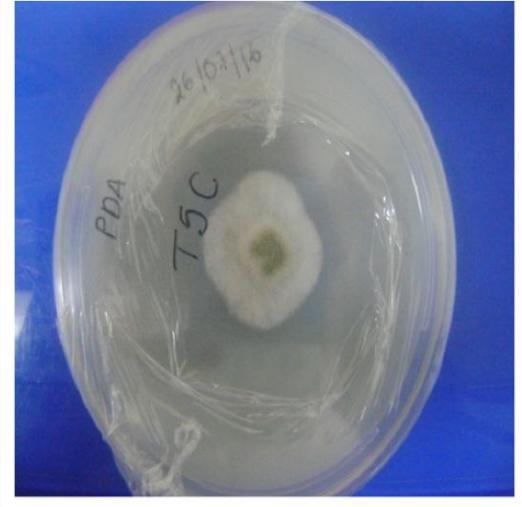
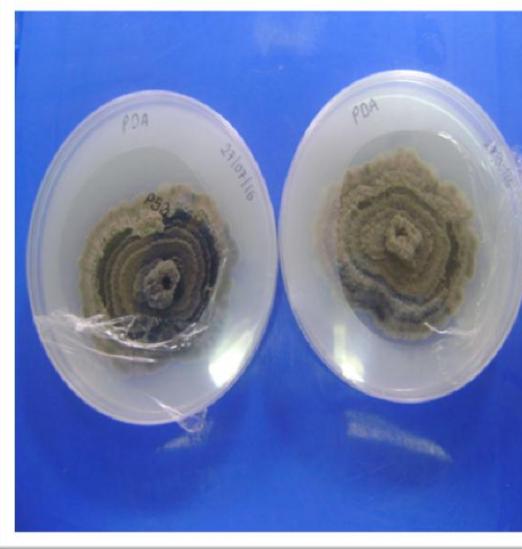
**Tabla 4: Procedimiento para el aislamiento de los hongos en medio PDA.**

<p>1. Determinar macroscópicamente la colonia que se va a replicar en medio PDA, partiendo del medio FIM.</p>	
<p>2. Cortar un fragmento de colonia de aproximadamente 1 mm x 1mm y colocar en medio PDA.</p>	
<p>3. Etiquetar e incubar por 7 días a 25°C.</p>	

Elaborado por: Vicenta Guamán y Gabriela Ochoa

De igual manera las colonias se revisó constantemente y se realizó un registro escrito y fotográfico. En esta etapa se realizó una clasificación de las cajas tomando en consideración las características macroscópicas de las colonias. Las características que deben presentar las colonias posiblemente micorrízicos son: color blanco-amarillento y de consistencia cremosa o algodonosa (Zettler et al., 2013). Ver tabla 5

**Tabla 5: Clasificación de las cajas en medio PDA.**

Característica	Ejemplo de colonia
1. Cajas seleccionadas para microcultivo, presentan características de posibles colonias micorrízicas.	
2. Cajas contaminadas en donde se puede observar colonias de color diferente al blanco.	

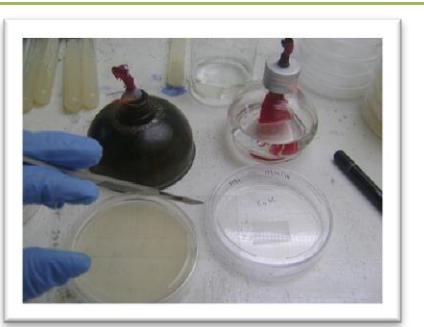
Elaborado por: Vicenta Guamán y Gabriela Ochoa

## 2.5.4 Microcultivo

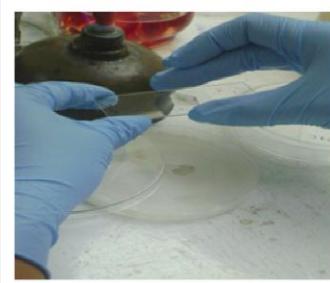
El microcultivo es un método que nos ayuda a observar con mayor certeza las características microscópicas de los cultivos.

Las cajas seleccionadas en el medio PDA, las cuales presentan las características revisadas en la literatura (Zettler *et al.*, 2013). Se colocaron tres gotas de medio PDA en una lámina portaobjetos, para luego sembrar la colonia seleccionada y cubrirla con una lámina cubreobjetos, posteriormente se colocó en una caja Petri, sobre papel humedecido, previamente tratado con luz UV. Se incubó a 25°C alrededor de 4 días, con revisión periódica. En total se seleccionaron 22 cajas para microcultivo. Ver tabla 6.

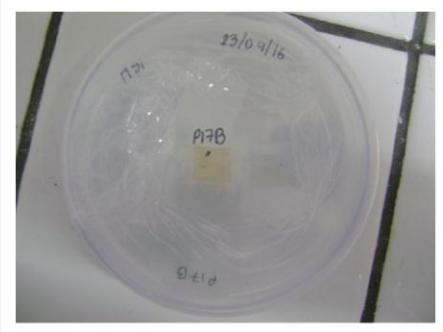
**Tabla 6: Procedimiento para microcultivo**

<p>1. Colocar en el fondo de una caja Petri un papel humedecido con agua estéril.</p>	
<p>2. Colocar tres gotas de agar (PDA) sobre una laminilla de vidrio y dejar solidificar.</p>	

3. Sembrar el hongo seleccionado y colocar un cubre objeto.



4. Etiquetar e incubar a 25°C por 4 a 7 días.



Elaborado por: Vicenta Guamán y Gabriela Ochoa

### CAPÍTULO III.

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

##### **3.1 Siembra de las seis especies en medio FIM.**

Se realizó la siembra de 360 cajas Petri en medio FIM que corresponde a 60 cajas por especie de la cual 20 cajas son fragmento A, 20 cajas son fragmento B y 20 cajas son fragmento C. Estos resultados se observan en la **tabla 7**.

- *Trichoceros antennifer*.

De las 20(100%) cajas del fragmento A, 5(25%) corresponde a cultivos contaminados, 5(25%) corresponde a cultivos sin crecimiento, 10(50%) corresponde a colonias aisladas para el replante en medio PDA.

De las 20(100%) cajas del fragmento B, 4(20%) corresponde a cultivos contaminados, 4(20%) corresponde a cultivos sin crecimiento, 12(60%) corresponde a colonias aisladas para el replante en medio PDA.

De las 20(100%) cajas del fragmento C, 4(20%) corresponde a cultivos contaminados, 6(30%) corresponde a cultivos sin crecimiento, 10(50%) corresponde a colonias aisladas para el replante en medio PDA.

- *Elleanthus amethystinoides*

De las 20(100%) cajas del fragmento A, 6(30%) corresponde a cultivos contaminados, 6(30%) corresponde a cultivos sin crecimiento, 8(40%) corresponde a colonias aisladas para el replante en medio PDA.

De las 20(100%) cajas del fragmento B, 8(40%) corresponde a cultivos contaminados, 2(10%) corresponde a cultivos sin crecimiento, 10(50%) corresponde a colonias aisladas para el replante en medio PDA.

De las 20(100%) cajas del fragmento C, 4(20%) corresponde a cultivos contaminados, 5(25%) corresponde a cultivos sin crecimiento, 11(55%) corresponde a colonias aisladas para el replante en medio PDA.

- *Stelis sp.*

De las 20(100%) cajas del fragmento A, 4(20%) corresponde a cultivos contaminados, 6(30%) corresponde a cultivos sin crecimiento, 10(50%) corresponde a colonias aisladas para el replante en medio PDA.

De las 20(100%) cajas del fragmento B, 3(15%) corresponde a cultivos contaminados, 5(25%) corresponde a cultivos sin crecimiento, 12(60%) corresponde a colonias aisladas para el replante en medio PDA.

De las 20(100%) cajas del fragmento C, 3(15%) corresponde a cultivos contaminados, 3(15%) corresponde a cultivos sin crecimiento, 14(70%) corresponde a colonias aisladas para el replante en medio PDA.

- *Epidendrum chioneum*

De las 20(100%) cajas del fragmento A, 13(65%) corresponde a cultivos contaminados, 0(0%) corresponde a cultivos sin crecimiento, 7(35%) corresponde a colonias aisladas para el replante en medio PDA.

De las 20(100%) cajas del fragmento B, 13(65%) corresponde a cultivos contaminados, 0(0%) corresponde a cultivos sin crecimiento, 7(35%) corresponde a colonias aisladas para el replante en medio PDA.

De las 20(100%) cajas del fragmento C, 4(20%) corresponde a cultivos contaminados, 4(20%) corresponde a cultivos sin crecimiento, 12(60%) corresponde a colonias aisladas para el replante en medio PDA.

- *Pleurothallis linguifera*

De las 20(100%) cajas del fragmento A, 9(45%) corresponde a cultivos contaminados, 1(5%) corresponde a cultivos sin crecimiento, 10(50%) corresponde a colonias aisladas para el replante en medio PDA.

De las 20(100%) cajas del fragmento B, 2(10%) corresponde a cultivos contaminados, 1(5%) corresponde a cultivos sin crecimiento, 17(85%) corresponde a colonias aisladas para el replante en medio PDA.

De las 20(100%) cajas del fragmento C, 1(5%) corresponde a cultivos contaminados, 6(30%) corresponde a cultivos sin crecimiento, 1(65%) corresponde a colonias aisladas para el replante en medio PDA.

- *Epidendrum sp*

De las 20(100%) cajas del fragmento A, 7(35%) corresponde a cultivos contaminados, 4(20%) corresponde a cultivos sin crecimiento, 9(45%) corresponde a colonias aisladas para el replante en medio PDA.

De las 20(100%) cajas del fragmento B, 10(50%) corresponde a cultivos contaminados, 1(5%) corresponde a cultivos sin crecimiento, 9(45%) corresponde a colonias aisladas para el replante en medio PDA.

De las 20(100%) cajas del fragmento C, 6(30%) corresponde a cultivos contaminados, 8(40%) corresponde a cultivos sin crecimiento, 6(30%) corresponde a colonias aisladas para el replante en medio PDA.

**Tabla 7: Siembra en medio FIM.**

Especies de Orquídeas	Fragmentos	Nº total de cajas sembradas en medio FIM.	% Total	cajas de cultivos contaminados		Cajas de cultivos sin crecimiento		Colonias aisladas para el replante en medio PDA	
				Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>Trichoceros antennifer</i>	A	20	100	5	25	5	25	10	50
	B	20	100	4	20	4	20	12	60
	C	20	100	4	20	6	30	10	50
<i>Elleanthus amethystinoides</i>	A	20	100	6	30	6	30	8	40
	B	20	100	8	40	2	10	10	50
	C	20	100	4	20	5	25	11	55
<i>Stelis sp</i>	A	20	100	4	20	6	30	10	50
	B	20	100	3	15	5	25	12	60
	C	20	100	3	15	3	15	14	70
<i>Epidendrum chioneum</i>	A	20	100	13	65	0	0	7	35
	B	20	100	9	45	6	30	5	25
	C	20	100	4	20	4	20	12	60
<i>Pleurothallis linguifera</i>	A	20	100	9	45	1	5	10	50
	B	20	100	2	10	1	5	17	85
	C	20	100	1	5	6	30	13	65
<i>Epidendrum sp</i>	A	20	100	7	35	4	20	9	45
	B	20	100	10	50	1	5	9	45
	C	20	100	6	30	8	40	6	30
TOTAL		360	100	102	100	73	100	185	100

Elaborado por: Vicenta Guamán y Gabriela Ochoa

### 3.2 Crecimiento de colonias en medio FIM de las seis especies de orquídeas.

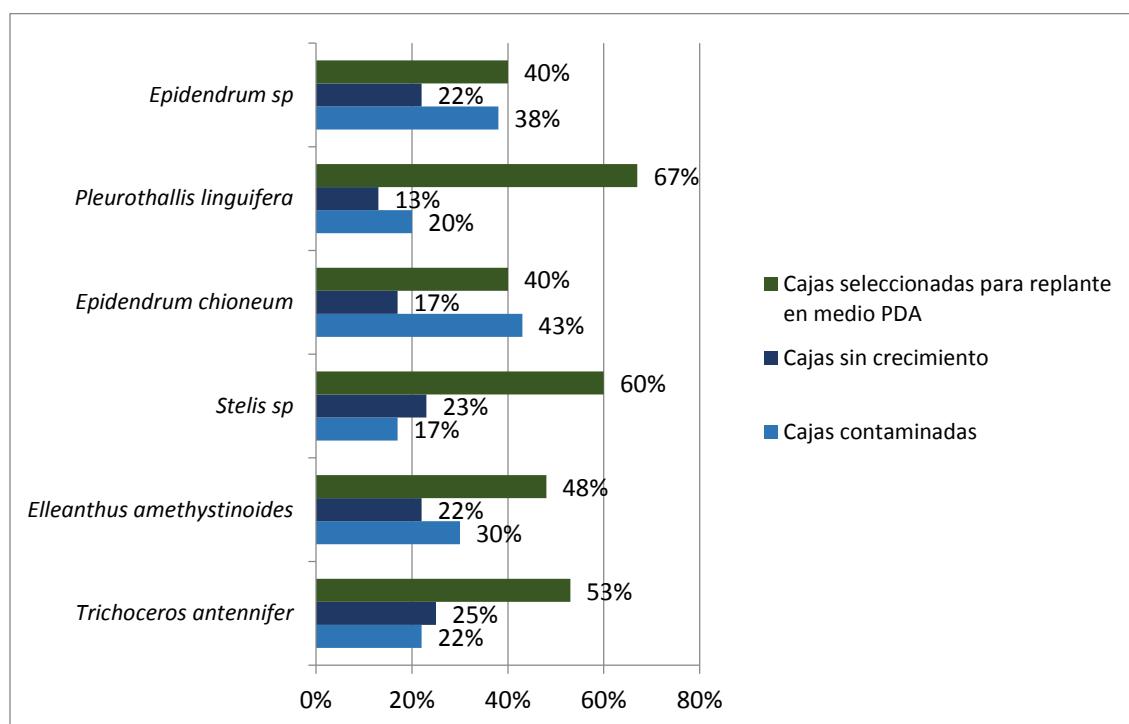
En el gráfico 1 se refleja el resultado de crecimiento de colonias de las seis especies de orquídeas.

La especie de *Pleurothallis linguifera* presenta el mayor porcentaje de cajas viables para el replante en medio PDA (67%) y el menor porcentaje corresponde a las especies *Epidendrum sp* y *Epidendrum chioneum* (40%).

*Trichoceros antennifer* presenta el mayor porcentaje de cajas sin crecimiento (25%), mientras que la especie de *Pleurothallis linguifera* presenta el menor porcentaje (13%).

La especie de *Epidendrum sp* presenta el mayor porcentaje de cajas contaminadas (43%) y *Stelis sp* el menor porcentaje (17%). Se observó la presencia de levaduras en todas las cajas contaminadas de las seis especies de orquídeas sembradas en medio FIM.

**Gráfico 1: Porcentaje de crecimiento de colonias en medio FIM de las seis especies de orquídeas.**



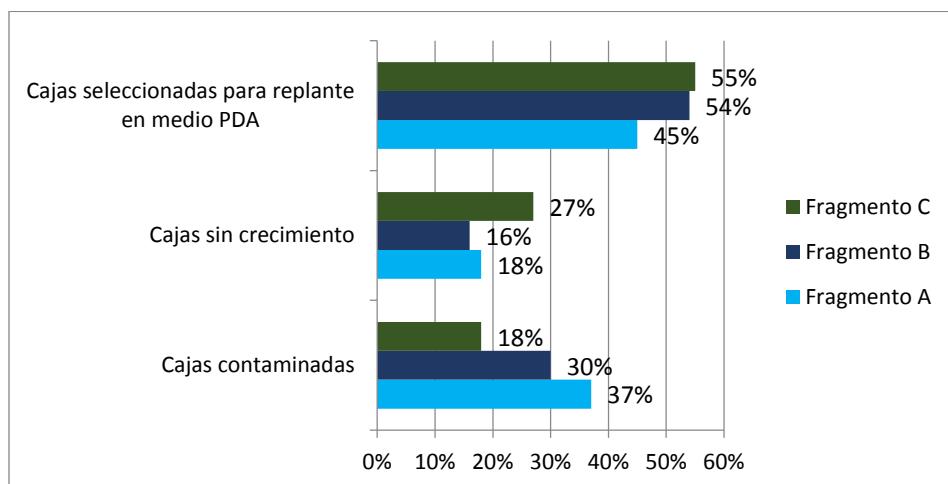
Elaborado por: Vicenta Guamán y Gabriela Ochoa.

### 3.3 Crecimiento de los tres fragmentos de raíz (A, B, C) en medio FIM de las seis especies de orquídeas.

En el gráfico 2 se observa el crecimiento de los 360 fragmentos (A, B, C) de raíces de las seis especies de orquídeas.

Las cajas seleccionadas para el replante en medio PDA, el fragmento C mostró el mayor porcentaje (55%), el fragmento B (54%) y el fragmento A el menor porcentaje (45%). En cuanto a las cajas sin crecimiento, el fragmento C presenta el mayor porcentaje (27%), el fragmento A (18%) y el fragmento B presenta el menor porcentaje (16%). Mientras que las cajas que presentaron contaminación por levaduras, el fragmento A presenta el mayor porcentaje (37%), fragmento B (30%) y el menor porcentaje el fragmento C (18%).

**Gráfico 2: Porcentaje de crecimiento de los tres fragmentos en medio FIM de las seis especies de orquídeas.**



Elaborado por: Vicenta Guamán y Gabriela Ochoa

### 3.4 Replante de las colonias de medio FIN en medio PDA de las seis especies de orquídeas.

Se realizó el replante de 185 cajas con colonias viables en medio PDA. Esto se observa en la tabla 8.

- *Trichoceros antennifer*.

De las 10 cajas del fragmento A se aislaron 2 (20%) cajas seleccionadas para el microcultivo, mientras que de las 12 cajas del fragmento B se obtuvo 1 (8%) caja y de las 10 cajas del fragmento C se obtuvo 0 (0%) cajas.

- *Elleanthus amethystinoides*.

De las 8 cajas del fragmento A se aislaron 1 (13%) caja seleccionada para el microcultivo, mientras que de las 10,11 cajas del fragmento B y C se obtuvo 1 (10%) ,1(9%) cajas respectivamente.

- *Stelis sp.*

De las cajas 10,14 correspondiente a los fragmentos A y C se obtuvo 2 (20%) ,2 (14%) cajas respectivamente, en cuanto al fragmento B se obtuvo de las 12 cajas replantadas 4(33%).

- *Epidendrum chioneum*

Del fragmento A se aisló 0 (0%) cajas de las 7 cajas replantadas, mientras que para el fragmento B se obtuvo 2(40%) cajas y para el fragmento C se obtuvo 3(25%) cajas replantadas de 5 y 12 cajas, respectivamente.

- *Pleurothallis linguifera*.

De esta especie se obtuvo 4 cajas que corresponden 0(0%) al fragmento A, 2(12%) al fragmento B y 2(15%) al fragmento C.

- *Epidendrum sp.*

En esta especie se obtuvo 2 (22%) cajas que corresponde al fragmento B, por lo tanto de los fragmentos A y C se obtuvo 0(0%) cajas.

**Tabla 8: Replante de colonias en medio PDA.**

Especie de orquídea	Fragmento	Nº Total de cajas aisladas para el replante en medio PDA	Cajas de cultivos contaminados		Cajas de cultivos descartados		Cajas seleccionadas para el microcultivo	
			Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b><i>Trichoceros antennifer</i></b>	A	10	2	20	6	60	2	20
	B	12	1	8	10	83	1	8
	C	10	4	40	6	60	0	0
<b><i>Elleanthus</i></b>	A	8	3	38	4	50	1	13

<i>amethystinoides</i>	B	10	4	40	5	50	1	10
	C	11	3	27	7	64	1	9
<i>Stelis sp</i>	A	10	3	30	5	50	2	20
	B	12	3	25	5	42	4	33
	C	14	10	71	2	14	2	14
<i>Epidendrum chioneum</i>	A	7	4	57	3	43	0	0
	B	5	1	20	2	40	2	40
	C	12	2	17	7	58	3	25
<i>Pleurothallis linguifera</i>	A	10	4	40	6	60	0	0
	B	17	7	41	8	47	2	12
	C	13	3	23	8	62	2	15
<i>Epidendrum sp</i>	A	9	4	44	5	56	0	0
	B	9	3	33	4	44	2	22
	C	6	4	67	2	33	0	0
<b>TOTAL</b>		185	65		95		25	

Elaborado por: Vicenta Guamán y Gabriela Ochoa.

### 3.5 Crecimiento de colonias en medio PDA de las seis especies de orquídeas.

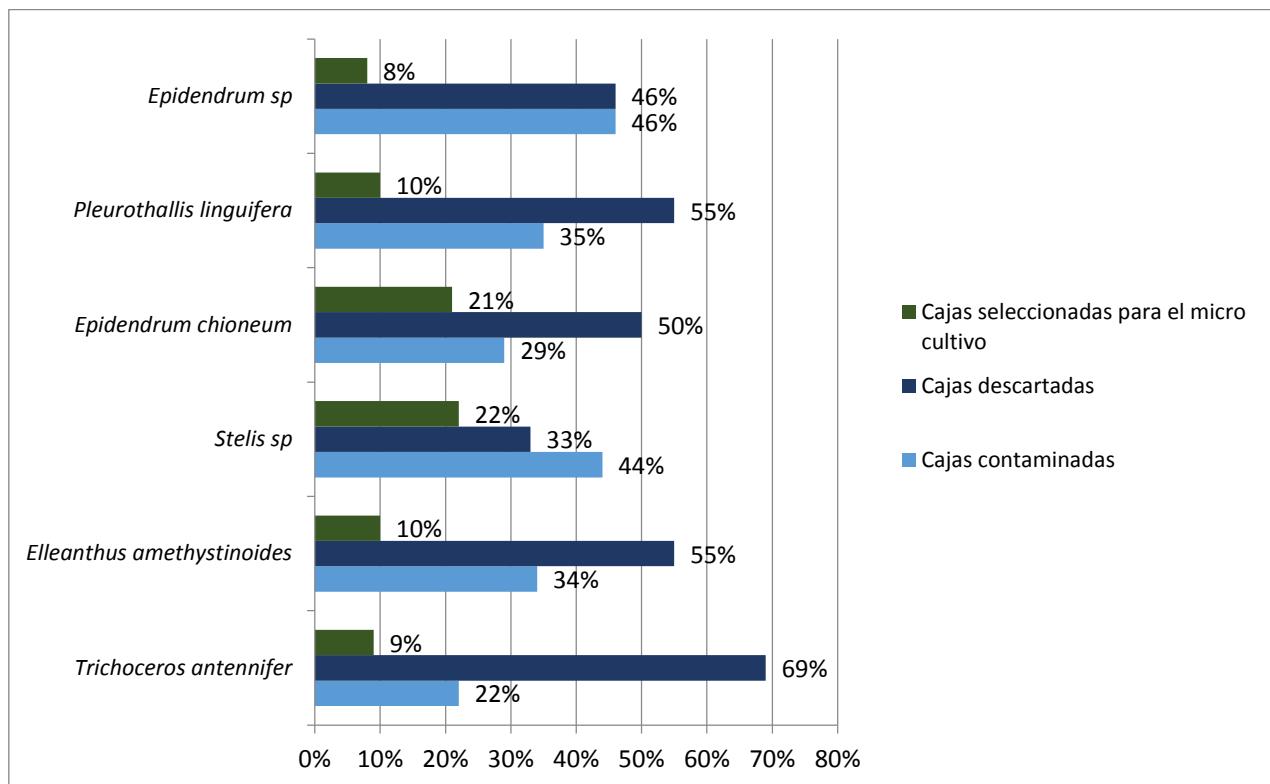
En el gráfico 3 presenta el resultado de crecimiento de colonias de las seis especies de orquídeas.

La especie que presenta mayor porcentaje de cajas seleccionadas para el microcultivo es *Stelis sp* con 22% y *Epidendrum sp* el menor porcentaje (8%).

Trichoceros antennifer presentó el mayor porcentaje de cajas descartadas con 69%, mientras que la especie de *Stelis sp* el menor porcentaje con 33%.

En cuanto a las cajas contaminadas *Epidendrum sp* presentó el mayor porcentaje con 46% y Trichoceros antennifer con el menor porcentaje que corresponde a 22%.

**Gráfico 3: Porcentaje de crecimiento de colonias en medio FIM de las seis especies de orquídeas.**

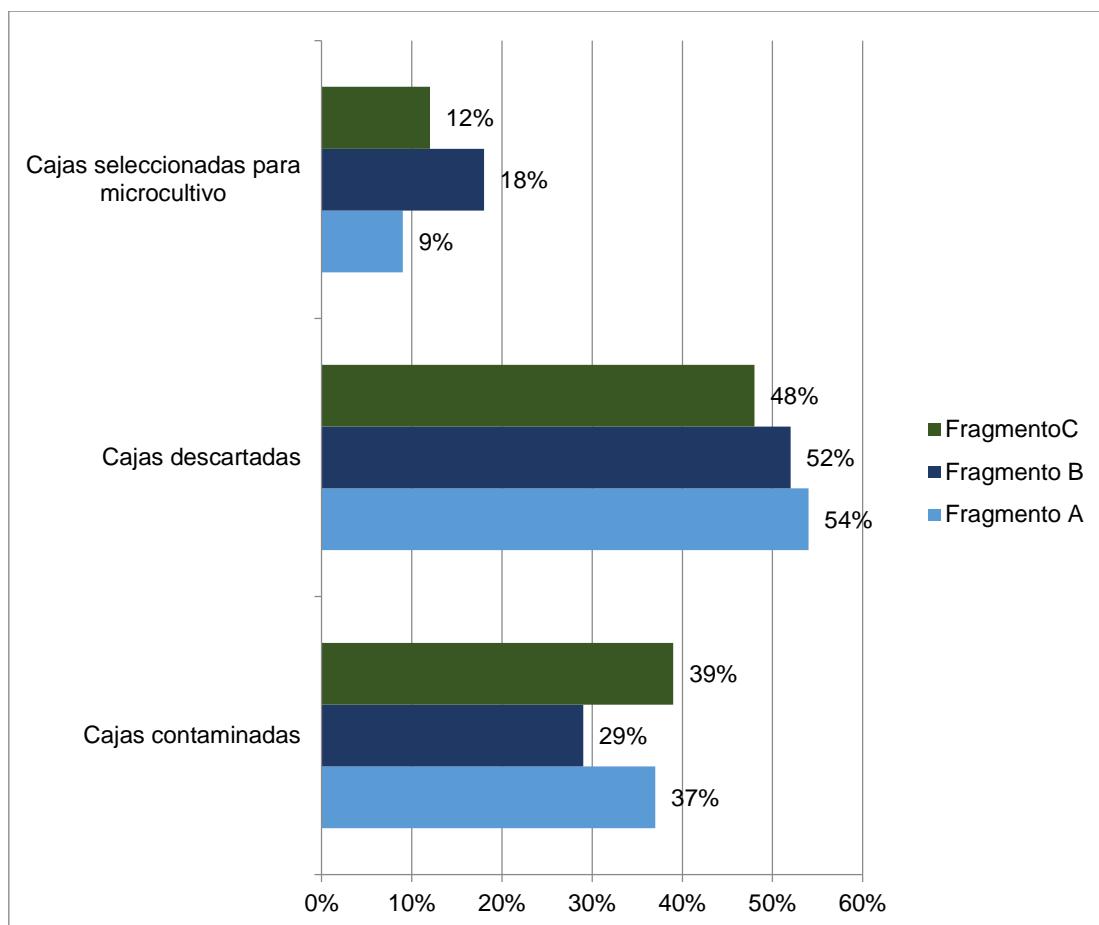


Elaborado por: Vicenta Guamán y Gabriela Ochoa.

### 3.6 Crecimiento de los tres fragmentos de raíz (A, B, C) en medio PDA de las seis especies de orquídeas.

En el gráfico 4 se observa que de las 185 cajas replantadas en medio PDA. El fragmento B presenta el mayor porcentaje (18%) de cajas seleccionadas para el microcultivo, el fragmento C (12%) y el fragmento A con el menor porcentaje (9%). De las cajas descartadas, el fragmento A presenta el mayor porcentaje (54%), el fragmento B (52%), el fragmento C el menor porcentaje (48%). Las cajas contaminadas por levaduras, el fragmento C presenta el mayor porcentaje (39%), el fragmento A (37%) y el B el menor porcentaje (29%).

**Gráfico 4: Porcentaje de crecimiento de los tres fragmentos de raíz (A, B, C) en medio PDA de las seis especies de orquídeas.**

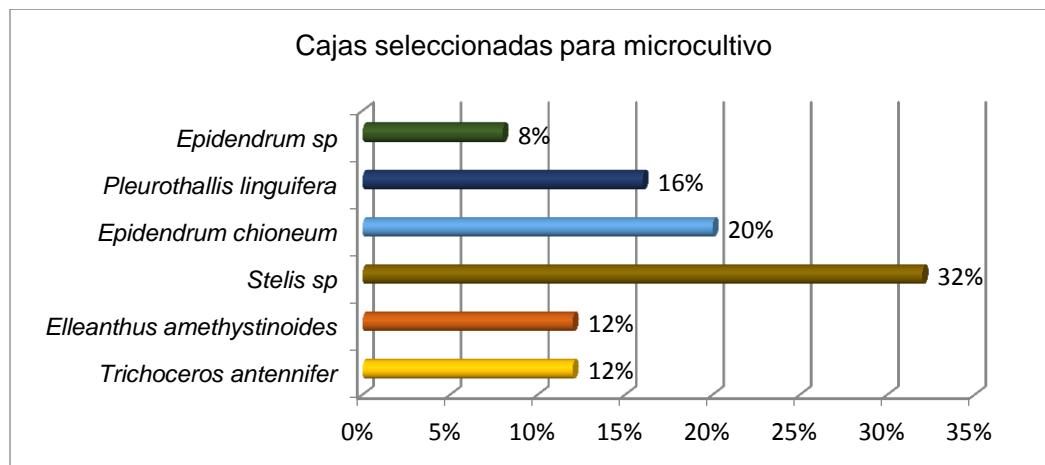


Elaborado por: Vicenta Guamán y Gabriela Ochoa.

### **3.7 Crecimiento de colonias seleccionadas para microcultivo de las seis especies de orquídeas.**

En el gráfico 4 se observan las especies de orquídeas con mayor porcentaje de crecimiento de las colonias seleccionadas para el microcultivo. *Stelis sp* con ocho cajas (32%) y *Epidendrum chioneum* con cinco cajas (20%).

**Gráfico 5: Porcentaje de crecimiento de colonias seleccionadas para microcultivo de las seis especies de orquídeas.**

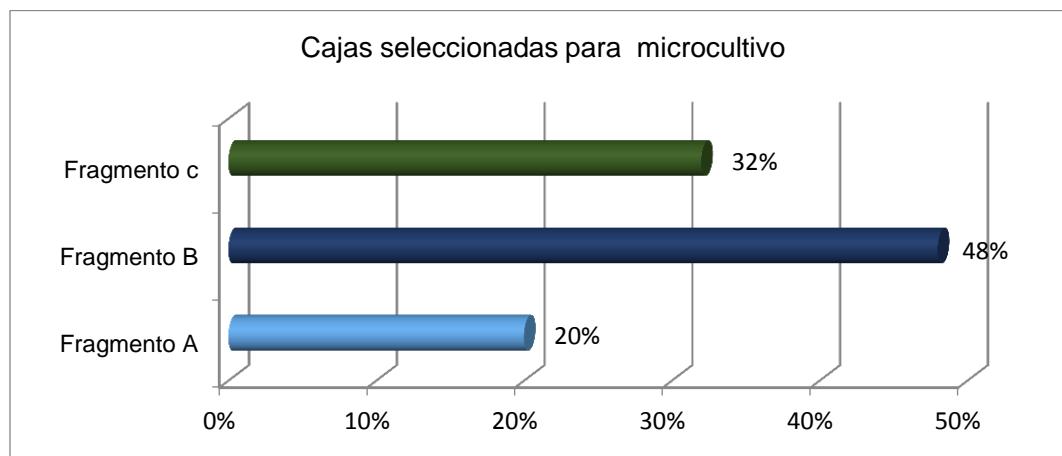


Elaborado por: Vicenta Guamán y Gabriela Ochoa.

**3.8 Crecimiento de los tres fragmentos (A, B, C) seleccionados para el microcultivo de las seis especies de orquídeas.**

De las 25 cajas seleccionadas para el microcultivo, 12 cajas corresponden al fragmento B presentando el mayor porcentaje que es 48%, mientras que el fragmento C con 8 cajas que corresponde al 32% y el fragmento A con 5 cajas que presenta el menor porcentaje que es 20%. Estos resultados se observan el gráfico 4.

**Gráfico 6: Porcentaje de crecimiento de los tres fragmentos (A, B, C) seleccionados para el microcultivo de las seis especies de orquídeas.**



Elaborado por: Vicenta Guamán y Gabriela Ochoa.

### 3.9 Microcultivo.

Del total de aislamientos en medio PDA, 25 fueron caracterizados macroscópicamente y microscópicamente, de acuerdo a las características que presenta los hongos micorrízicos, se elecciónaron 14 colonias las cuales presentan características semejantes al género *Rhizoctonia*. Esto se observa en la tabla 9.

**Tabla 9: Selección de cajas en medio PDA para el microcultivos.**

Especie de orquídea	Cajas seleccionadas microscópicamente y macroscópicamente.	Cajas con hongos potencialmente micorrízicos
<i>Epidendrum sp.</i>	Códigos: E19B,E17B.	E19B.
<i>Pleurothallis linguifera</i>	Códigos: P17B,P16C,P2B,P5C.	
<i>Epidendrum chioneum</i>	Códigos:Ec1B,Ec12C,E c6C,Ec4C,Ec12B.	Ec1B,Ec12C,Ec12B.
<i>Stelis sp</i>	Códigos:S4B,S20B,S9C ,S7C,S19B,S12A,S10A, S5B	S7C,S10A,S19B,S9C,S20 B,S4B.
<i>Elleanthus amethystinoides</i>	Códigos:Ea6C,Ea5A,Ea 1B.	Ea6C,Ea1B.
<i>Trichoceros antennifer</i>	Códigos:T2A,T3B,T4A,	T3B,T2A.

Elaborado por: Vicenta Guamán y Gabriela Ochoa.

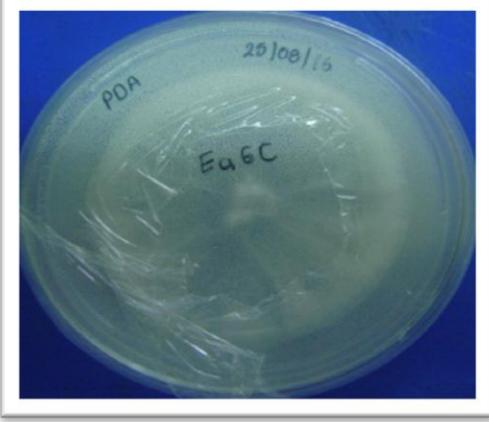
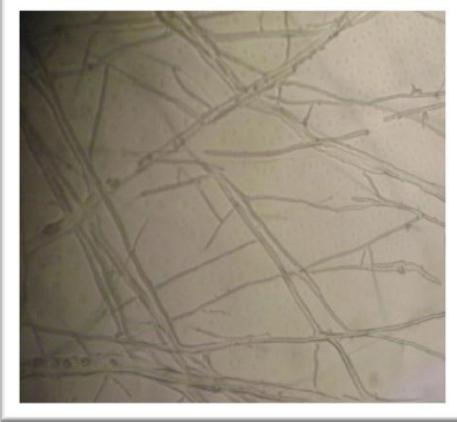
### 3.10 Características morfológicas de los hongos aislados.

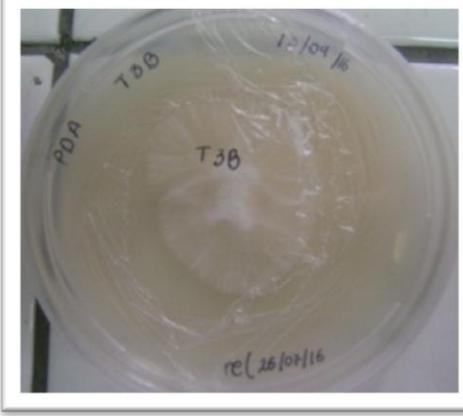
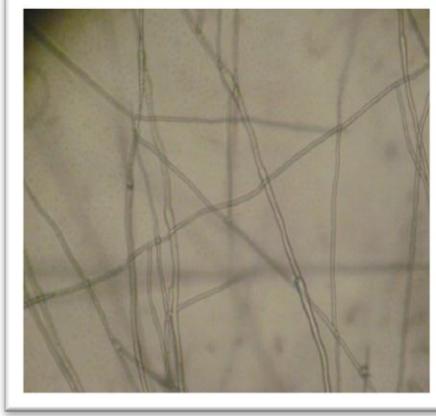
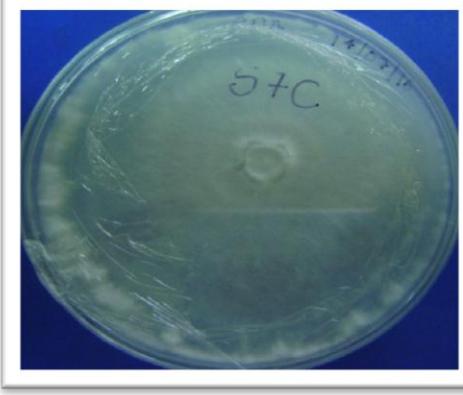
La identificación de los hongos se realizó mediante las características morfológicas de los aislamientos obtenidos en el medio PDA. De los 25 aislamientos caracterizados macro y microscópicamente, se identificó microscópicamente 14 colonias con características similares a *Rhizoctonia* que según Mosquera, 2010 en su investigación, nos dicen que microscópicamente los hongos del género *Rhizoctonia* presentan hifas en forma de T, largas o anchas, ramificadas, con septos, que forman ángulos rectos de 90° o ángulos de 45° y presencia de células monilioides de forma elipsoide o esférica.

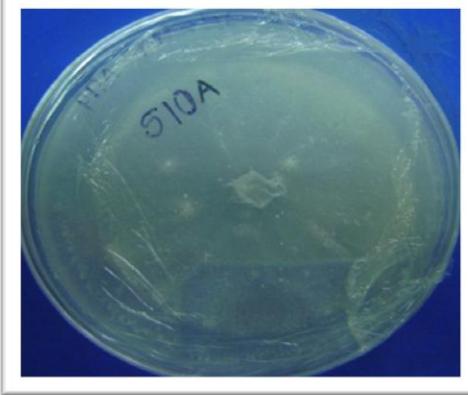
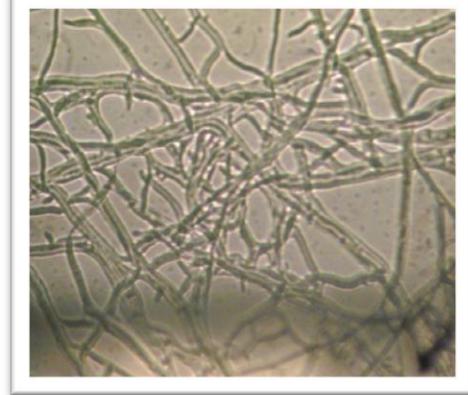
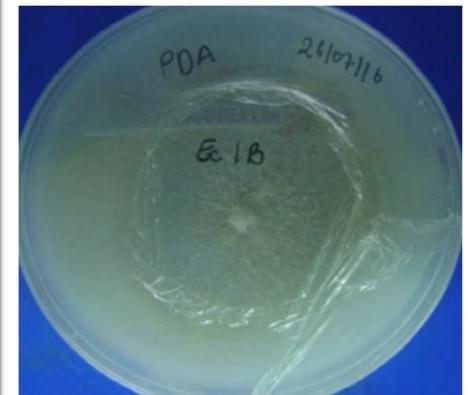
Macroscópicamente se caracterizó por la presencia de colonias blancas aunque dependiendo de la especie pueden presentar tonalidades cremas amarillentas con textura esponjosa (crecimiento en forma horizontal) y algodonoso (crecimiento en forma superpuesta y en dirección vertical) y presentan una morfología radial (la biomasa presenta un crecimiento circular al inoculo) y ramificada (la biomasa presenta un crecimiento irregular con diversas prolongaciones al lugar del inoculo( Moreno, 2013; Hoyos *et al.*, 2013 ; Mosquera *et al.*, 2010).

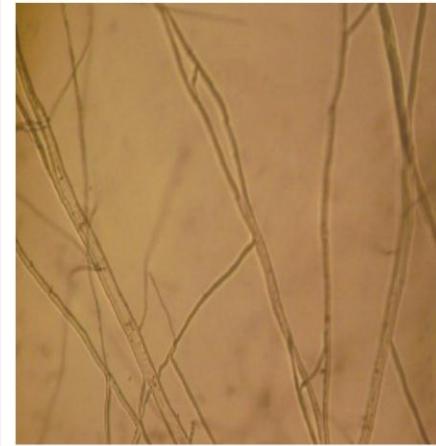
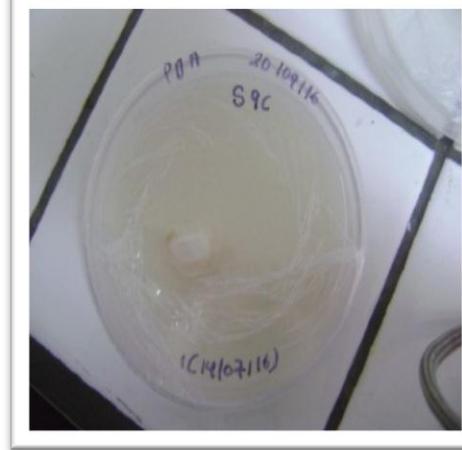
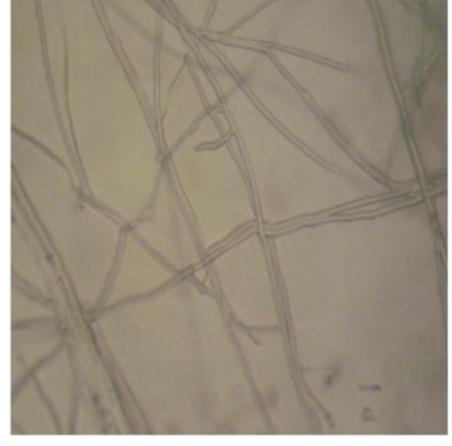
A continuación en la **Tabla 10** se describe macroscópicamente y microscópicamente las 14 colonias aisladas de las especies *Trichoceros antennifer*, *Elleanthus amethystinoides*, *Stelis sp*, *Epidendrum chioneum*.

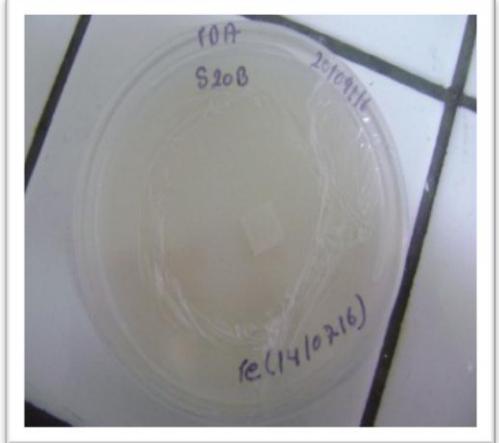
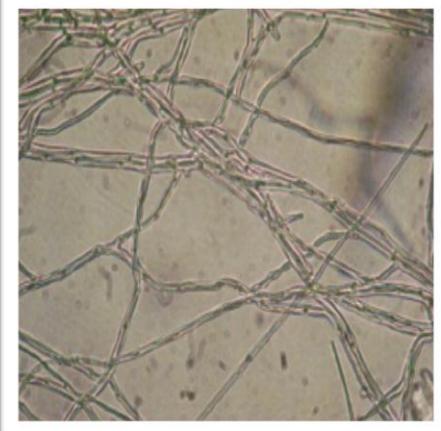
**Tabla 10. Características morfológicas de los hongos posiblemente micorrízicos.**

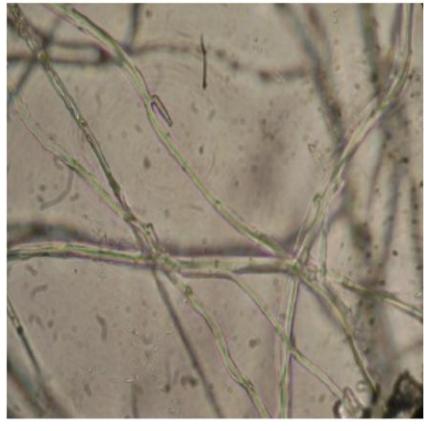
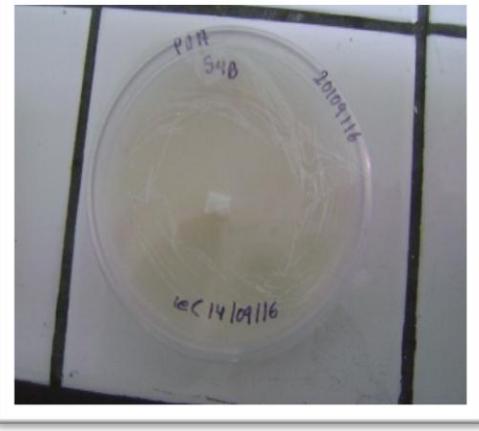
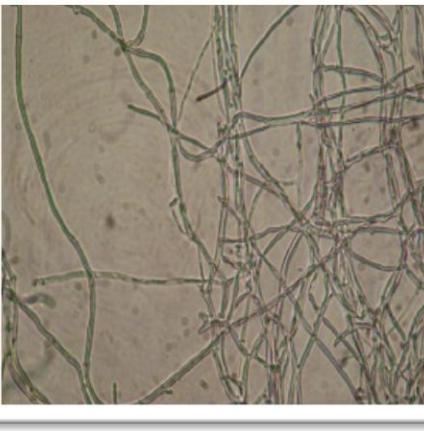
Nombre de la orquídea/código	Medio :PDA	MICROCULTIVO
<i>Elleanthus amethystinoide</i> Código: Ea6C	 <b>COLONIA:</b> Crecimiento en 4 días, colonia grande de color blanco, ligeramente esponjosa con bordes algodonosos.	 <b>MICROSCÓPICA:</b> Crecimiento en 3 días, hifas alargadas, anchas, ángulo de 90, ausencias de células monilioides, sin hifas septadas <b>GÉNERO PROBABLE:</b> <i>Tulasnella</i>

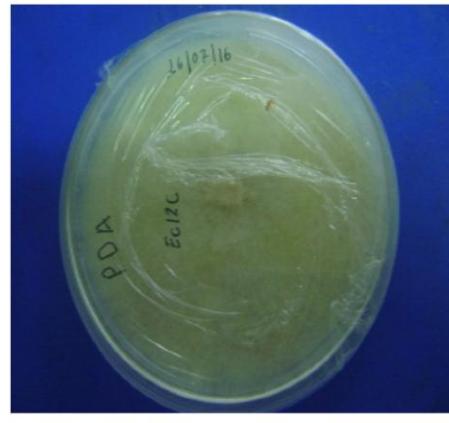
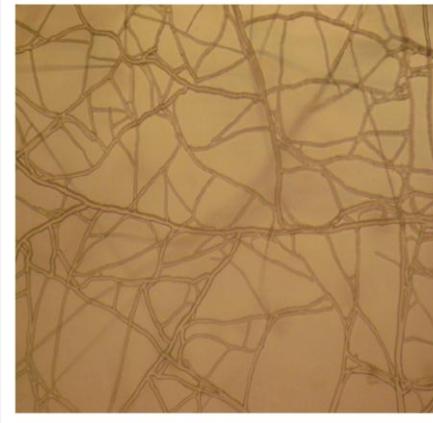
<p><i>Trichoceros antennifer</i> Código: T3B</p>		 <p><b>COLONIA:</b> Crecimiento en 4 días, colonia pequeña de color blanco, ligeramente algodonosa en el centro y crecimiento vertical de adentro hacia afuera, con bordes esponjosos</p> <p><b>MICROSCÓPICA:</b> Crecimiento en 3 días, hifas alargadas, delgadas, ángulo de 90 °, ausencias de células monilioides, hifas septadas.</p> <p><b>GÉNERO PROBABLE:</b> <i>Tulasnella</i></p>
<p><i>Stelis sp.</i> Código: S7C</p>		 <p><b>COLONIA:</b> Crecimiento en 5 días, colonia grande de color blanco cremoso, aterciopelado de crecimiento vertical de adentro hacia afuera, con bordes color blanco algodonoso.</p> <p><b>MICROSCÓPICA:</b> Crecimiento en 3 días, hifas alargadas, delgadas, ausencia de ángulo de 90 °, ausencias de células monilioides, hifas septadas.</p> <p><b>GÉNERO PROBABLE:</b> <i>Tulasnella</i></p>

<p><i>Stelis</i> sp. Código: S10A</p>		 <p><b>COLONIA:</b> Crecimiento en 5 días, colonia grande de color blanco cremoso, aterciopelado de crecimiento vertical de adentro hacia afuera, con bordes definidos.</p> <p><b>MICROSCÓPICA:</b> Crecimiento en 3 días, hifas alargadas, anchas y delgadas, ausencia de ángulo de 90 °, ausencias de células monilioides, ausencia de hifas septadas.</p> <p><b>GÉNERO PROBABLE:</b> <i>Tulasnella</i></p>
<p><i>Epidendrum chionaeum</i> Código: Ec1B</p>		 <p><b>COLONIA:</b> Crecimiento en 5 días, colonia grande de color beige marrón de crecimiento vertical de adentro hacia afuera con bordes definido cremoso.</p> <p><b>MICROSCÓPICA:</b> Crecimiento en 3 días, hifas alargadas, delgadas, presencia de ángulo de 90 °, células monilioides, hifas septadas.</p> <p><b>GÉNERO PROBABLE:</b> <i>Tulasnella</i></p>

<p>Stelis sp Código: S19B</p>		
<p>Stelis sp Código: S9C</p>		 <p><b>MICROSCÓPICA:</b> Crecimiento en 3 días, hifas alargadas, delgadas, presencia de ángulo de 90 °, células monilioides.</p> <p><b>GÉNERO PROBABLE:</b> <i>Tulasnella</i></p> <p><b>MICROSCÓPICA:</b> Crecimiento en 3 días, hifas alargadas, anchas, ángulo de 90°, ausencias de células monilioides, con hifas septadas.</p> <p><b>GÉNERO PROBABLE:</b> <i>Tulasnella</i></p>

<p><i>Stelis sp</i> Código: S20B</p>	 <p><b>COLONIA:</b> Crecimiento en 3 días, colonia pequeña de color blanco, ligeramente esponjosa.</p>	 <p><b>MICROSCÓPICA:</b> Crecimiento en 3 días, hifas alargadas, delgadas, ángulo de 90° y 45°, ausencias de células monilioides, sin hifas septadas.</p> <p><b>GÉNERO PROBABLE:</b> <i>Tulasnella</i></p>
<p><i>Epidendrum sp</i> Código: E19B</p>	 <p><b>COLONIA:</b> Crecimiento en 3 días, colonia de color blanco poco algodonoso, crecimiento vertical de adentro hacia afuera, con bordes definidos.</p>	 <p><b>MICROSCÓPICA:</b> Crecimiento en 3 días, hifas alargadas, delgadas, presencia de ángulo de 90 °.</p> <p><b>GÉNERO PROBABLE:</b> <i>Tulasnella</i></p>

<p>Trichoceros antennifer Código: T2A</p>		 <p><b>MICROSCÓPICA:</b> Crecimiento en 3 días, hifas alargadas y gruesas con ángulos de 90° y 45°, ausencias de células monilioides, sin hifas septadas.</p> <p><b>GÉNERO PROBABLE:</b> <i>Tulasnella</i></p>
<p>Stelis sp Código: S4B</p>		 <p><b>MICROSCÓPICA:</b> Crecimiento en 3 días, hifas alargadas y delgadas con ángulos de 90° y 45°, ausencias de células monilioides, sin hifas septadas.</p> <p><b>GÉNERO PROBABLE:</b> <i>Tulasnella</i></p>

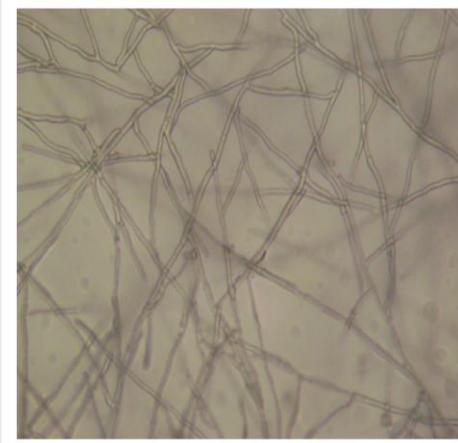
<p><i>Epidendrum chionaeum</i> Código: Ec 12C</p>		
<p><i>Elleanthus amethystinoides</i> Código: Ea 1B</p>		

*Epidendrum chioneum*

Código: Ec 12B



**COLONIA:** Crecimiento en 4 días, colonia pequeña de color crema, ligeramente algodonosa en el centro.



**MICROSCÓPICA:** Crecimiento en 3 días, hifas alargadas, delgadas, ángulo de 90° y 45°, con hifas septadas.

**GÉNERO PROBABLE:** *Tulasnella*

Elaborado por: Vicenta Guamás y Gabriela Ochoa.

## DISCUSIÓN

En la presente investigación se realizó el aislamiento de hongos potencialmente micorrízicos a partir de las raíces procedentes de seis especies de orquídeas terrestres, las mismas que fueron recolectadas en el Cerro Abuga, localizada en la parroquia Bayas del Cantón Azogues en la Provincia del Cañar, a una altura 3090 msnm. Según investigaciones realizadas por Endara, (2009) comprueba que en Ecuador existen orquídeas en todos los pisos altitudinales comprendidos entre 0 y 4500 msnm. Sin embargo Guzmán y Moreno, (2014) demostraron que la altitud no influye en la distribución de los hongos micorrízicos.

Es muy importante conocer que la fase de recolección y selección de las raíces de orquídeas que van a ser sembradas para aislar los hongos micorrízicos constituye una etapa crucial, ya que de esto depende la eficacia del aislamiento (Zettler, 2010). Razón por la cual se realizó el aislamiento de los hongos potencialmente micorrízicos en su mayoría a partir de raíces de orquídeas jóvenes. En estudios realizados por Benzing, (1981) menciona que la colonización de los hongos micorrízicos de las orquídeas se mantiene en mayor porcentaje entre las partes más jóvenes. De la misma manera existen estudios que demostraron que el aislamiento del hongo se puede realizar a partir de raíces de plantas maduras y plántulas recién germinadas en estado silvestre, ya que al encontrarse en su medio natural la colonización del hongo ocurre de manera apropiada. (Zhu *et al.*, 2008; Zettler, 2010).

En la presente investigación se aislaron 14 hongos potencialmente micorrízicos que según sus características morfológicas pertenecen al género-forma *Rhizoctonia*. Los teleomorfos presentes en el género-forma *Rhizoctonia* corresponden generalmente a los géneros *Thanatephorus*, *Ceratobasidium*, *Sebacina* y *Tulasnella* (Otero, 2009) por eso no es de extrañar que se pueda presumir la presencia de éste último en los 14 aislamientos, en donde se puede observar características semejantes a este tipo de hongo, ya sea por el aspecto macroscópico que presentan las colonia en el medio PDA de cultivo como también por las características de sus hifas al ser observadas al microscopio; por presentar hifas septadas, medianamente gruesas, dispuestas en 45° o 90 °. ( Moreno, 2013 ; Gonçalves *et al.*, 2014; Otero *et al.*, 2015).

En nuestra investigación el aislamiento de los hongos potencialmente micorrízicos fueron de las especies de orquídeas *Stelis sp* y *Epidendrum chioneum* por presentar el mayor porcentaje con 32% y 20%, respectivamente. Dichos hongos potencialmente micorrízicos aislados correspondieron al género *Tulasnella sp*. Existen estudios donde demostraron la presencia de estos hongos en estas especies (Hoyos y Rodríguez 2013; Guzmán y Moreno, 2014; Ordoñez *et al.*, 2016), en este sentido Suárez *et al.*, 2006 reportaron la presencia de *Tulasnella sp* en tres especies de orquídeas (*Stelis hallii*, *Stelis superbiens*, *Stelis concinna*) muestreadas de una montaña en el sur de Ecuador, demostrando que *Tulasnella sp* como la más frecuente e importante género implicado en la simbiosis de micorrizas de orquídeas (McCormick *et al.*, 2004; Suárez *et al.*, 2008; Kottke *et al.*, 2009; Guzmán y Moreno, 2014), de esta manera las dos especies son consideradas como las más indicadas para el aislamiento de hongos potencialmente micorrízicos.

La presencia de los demás telemorfos, *Ceratobasidium* y *Sebacina* no se evidenció en nuestro estudio, ya que hasta el momento los dos géneros son comúnmente reportados en orquídeas epífitas (Dearnaley *et al.*, 2012). En nuestro país no se ha evidenciado la presencia del género *Ceratobasidium* (Suárez *et al.*, 2008), sin embargo en otros países de América de Sur como Brasil y Colombia se ha demostrado como hongos formadores en orquídeas (Pereira *et al.*, 2005; Mosquera-Espinosa, 2010). De igual manera en Puerto Rico (Otero *et al.*, 2002, 2004, 2007). El género *Sebacina* es reportado como poco frecuente en el Ecuador (Suárez *et al.*, 2008), lo que indica que este género no representa una alta diversidad en ecosistemas montanos y subandinos (Setaro *et al.*, 2012; Sigisfred *et al.*, 2013).

En cuanto a la siembra de las raíces en el laboratorio se tomaron 3 segmentos de 1 cm de cada raíz muestreada obtenidas de 3 zonas de la raíz: basal (A), intermedia (B), apical (C), de acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro estudio demostraron que el aislamiento de hongos micorrízicos fueron de la zona intermedia (B) con un porcentaje de 48%. Por lo que suponemos de acuerdo a nuestros resultados que en la parte (B) hay la presencia de estos hongos potencialmente micorrízicos. Para entender la posible razón, es importante conocer que el crecimiento de la raíz se da gracias a tres zonas que esta presenta, siendo estas: meristemo apical (parte C) en donde se producen las células debido a la división celular, la zona de elongación (parte B) en donde las células no se dividen, sino que se alargan y zona de diferenciación o maduración (parte A). Es así que gracias a la zona de elongación la raíz aumenta de tamaño, sin embargo para que este proceso se lleve a cabo, necesitan de la presencia de hongos que proporcionan la absorción de agua y nutrientes, ya que además producen diversa hormonas (auxinas y citoquininas) que son importantes para este proceso (Dubrovsky & Shishkova, 2007; Hoyos y Rodríguez 2013). Además es la parte que se encuentra en contacto directo con el sustrato (Zettler, 2010). Sin embargo no existe estudios que nos permita evidenciar en

que parte de la raíz hay más micorrizas (Zettler *et al.*, 2013; Ordoñez *et al.*, 2015; Suárez *et al.*, 2016).

Es importante mencionar que a partir de los resultados obtenidos en esta investigación es necesario la realización de un análisis molecular de los aislamientos que se piensa son positivos para una identificación completa, posteriormente estos hongos micorrízicos se emplearán en investigaciones que puedan incluir pruebas de inoculación *in vitro* de plántulas de orquídeas para mejorar su sobrevivencia durante la aclimatación y también considerando una estrategia de conservación de esta familia ( Zettler *et al.*, 2013; Guzmán y Moreno, 2014; McCormick *et al.*, 2004).

## CONCLUSIONES

- En la presente investigación se consiguió aislar 14 colonias probablemente micorrízicas, que fueron aislados de las raíces de *Trichoceros antennifer*, *Elleanthus amethystinoides*, *Stelis sp*, *Epidendrum chioneum*.
- El mayor número de hongos posiblemente micorrízicos fueron aislados de las raíces *Stelis sp*, *Epidendrum chioneum*, por presentar el mayor porcentaje 32% y 20%, respectivamente.
- La zona intermedia (B) presento el mayor número de aislamientos de hongos posiblemente micorrízicos, con el porcentaje de 48% de los tres fragmentos analizados.
- Las características morfológicas (ángulo de 45° o 90 °, hifas septadas) que presentaron los hongos aislados, sugieren pertenecer al teleomorfo perteneciente al género-forma *Rhizoctonia* que se definen como micorrízicos de orquídeas en la mayoría de los casos. Cuyo teleomorfo posiblemente aislado es *Tulasnella sp*.
- En el proceso de aislamiento se corrobora la eficacia del método utilizado (Zettler, 2013) ya que los resultados fueron favorables; es decir los hongos lograron crecer y desarrollarse eficazmente, mostrando colonias definidas y microscópicamente haciéndose observables sus estructuras.

## RECOMENDACIONES

- Es de gran importancia utilizar raíces jóvenes recién germinadas con apariencia sana de coloración amarillento u opaco y que este en contacto directo con el suelo, para asegurar una mayor probabilidad de la presencia de hongos asociados a la raíz; pero también que hayan tenido un proceso de desinfección adecuado para evitar cualquier tipo de crecimiento extraño a las células corticales de la raíz.
- Realizar un corte transversal de la raíz en estudio y observar al microscopio para determinar la presencia de los pelotones, con la finalidad de asegurar crecimiento de hongos micorrízicos en el medio FIM.
- Para futuros estudios de micorrizas enfocados al hongo formador de micorriza *Rhizoctonia*, se recomienda realizar estudios moleculares de las cepas aisladas para ubicarlos dentro de las especies que correspondan, con la finalidad de fomentar en posteriores investigaciones la creación de bancos de hongos micorrízicos, generando así una potencial estrategia de conservación *Ex situ* de esta gran familia de orquídeas.

## BIBLIOGRAFÍA

**Ackerman, J. D., & del Castillo, M. (1992).** *Las orquídeas de Puerto Rico y Las Islas Vírgenes*. La Editorial, UPR.

**Arévalo R. Figueroa J. Madriñán S. (2011).** LANKESTERIANA. Anatomía foliar de ocho especies de Orquídeas epífitas. Disponible en:

**Agencia Pública de Noticias del Ecuador y Suramérica Andes. (2014).** Una orquídea es el nuevo emblema del Norte Andino Ecuatoriano. Disponible en: <http://www.andes.info.ec/es/noticias/orquidea-es-nuevo-emblema-norte-andino-ecuatoriano.html>

**Agencia Pública de Noticias del Ecuador y Suramérica Andes. (2014).** Una orquídea es el nuevo emblema del Norte Andino Ecuatoriano. Disponible en: <http://www.andes.info.ec/es/noticias/orquidea-es-nuevo-emblema-norte-andino-ecuatoriano.html>

**Arbo, M; González, A. 2006.** Botánica Morfológica. Morfología de las plantas vasculares. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina. Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema20/20-9micorrizas.htm>

**Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. & Blackwell, M. 1996.** Introductory Mycology. John Wiley & Sons, (Vol. 6) New York.

**Bourdöt, H. & Galzin A. (1928).** Hymenomycetes. Orden Tulasnellales. Micología, pag 23. Colombia

**Barnett, H. (1998).** *Illustrated genera of imperfect fungi* (cuarta ed.). Virginia, United States of America.

**Benzing, D. (1981)** Why is Orchidaceae so large, its seeds so small, and its seedlings mycotrophic? Selbyana 5: 241–242.

**Bernal, G; y Morales, R. 2 006.** Micorrizas: Importancia, Producción e investigación en el Ecuador. ANCUPA. Quito-Ecuador. 56p.

**Calaway, D. (2000).** Native Ecuatorian Orchids (Vol. 2). Florida: Dotson Trust.

**Calaway, D. (2002).** Nativ Ecuatorian Orchids (Vol. 3). Florida: Dotson Trust.

**Cribb P. Endara L. Jost L. Narváez E. Tobar F. Zelenko H. (2007)** Actividades de la Asociación de Orquideología de Quito (AOQ). El Jardín Botánico de Quito y las Orquídeas. Disponible en: [http://jardinbotanicoquito.com/es/wp-content/uploads/2015/03/boletin\\_No\\_2\\_JBQ.pdf](http://jardinbotanicoquito.com/es/wp-content/uploads/2015/03/boletin_No_2_JBQ.pdf)

**Córdoba A. Günter G. Otero T. (2015).** Hongos endófitos de *Stanhopea tricornis* (orchidaceae) en Colombia. Revista Orquideología- Open Journal Systems. Disponible en:[https://www.researchgate.net/publication/281748116\\_Hongos\\_endofitos\\_de\\_Stanhopea\\_tricornis\\_Orchidaceae\\_en\\_Colombia](https://www.researchgate.net/publication/281748116_Hongos_endofitos_de_Stanhopea_tricornis_Orchidaceae_en_Colombia)

**Cruz P. (2011).** Evaluación de diferentes dosis de auxinas (ANA-IBA) y citoquinina(BA) para el desarrollo de meristemos en *Maxillaria grandis* Rchd.f .Universidad de Cuenca.

**Cameron D, Leake J, Read D, 2006.** Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant–fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytologist* 171: 405–416.

**De la vega, J. 2006.** Suelos y Ecosistemas. Las Micorrízas de mayor importancia son: Endomicorras, Ectomicorras lo cual facilita su producción masiva para uso en la agricultura. Disponible en: <http://j.delavegal.googlepages.com>

**Dearnaley, J. D. W., Martos, F., & Selosse, M. A. (2012).** 12 Orchid Mycorrhizas: Molecular Ecology, Physiology, Evolution and Conservation Aspects. In Fungal associations (pp. 207-230). Springer Berlin Heidelberg.

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

**Díaz A. (2010).** El ciclo vital de una orquídea. Orquídeas del temple. Disponible en:<http://orquideasdeltemple.blogspot.com/2006/05/el-ciclo-vital-de-una-orquidea.html>

**Ding, R., Chen, X. H., Zhang, L. J., Yu, X. D., Qu, B., Duan, R., & Xu, Y. F. (2014).** Identity and specificity of Rhizoctonia-like fungi from different populations of *Liparis japonica* (Orchidaceae) in Northeast China. *PLoS one*, 9(8), e105573.

**Duchicela, J; y González Ma. del C.** 2003. La Micorriza Arbuscular en el Contexto de la Agricultura Sustentable. Monografía CEINCI – 02 – 03. 19p.

**Endara L. (2006).** El Jardín Botánico de Quito y las Orquídeas. Hojas para hojear Disponible en: [http://jardinbotanicoquito.com/es/wp-content/uploads/2015/03/boletin\\_No\\_2\\_JBQ.pdf](http://jardinbotanicoquito.com/es/wp-content/uploads/2015/03/boletin_No_2_JBQ.pdf)

**Endara L. (2008).** Patrones generales de endemismo de las orquídeas ecuatorianas. Orquídeas endémicas del ecuador. Disponible en: [https://www.flmnh.ufl.edu/ecuadororchids/cores\\_brasil.pdf](https://www.flmnh.ufl.edu/ecuadororchids/cores_brasil.pdf)

**Granda T. (2007).** Diversidad Orquideológica de la Reserva Ecológica Buenaventura de la parroquia Moromoro, cantón Piñas, provincia de El Oro. Clases de orquídeas. Disponible en: <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/5042>

**Granada F. (2007).** Diversidad Orquideológica de la Reserva Ecológica Buenaventura de la parroquia Moromoro, Cantón Piñas, Provincia de El Oro. Disponible en:file /Diversidad%20Orquideol%C3%B3gica%20de%20la%20Reserva%20Ecol%C3%B3gica%20Buenaventura%20(2).pdf

**Gamarra R. Galán P. Álvarez S. (2014).** Orquídeas Ibéricas. Características generales. Disponible en: <http://www.orquideasibericas.info/features>

**Gelpí C. (2012).** Hongos y orquídeas de Almaraz Bellos desconocidos. Guía fotográfica para distinguir especies del Cerro “El SIERRO”. Disponible en: [http://www.cnat.es/cnatweb/pdfs/Hongos\\_orquideas.pdf](http://www.cnat.es/cnatweb/pdfs/Hongos_orquideas.pdf)

**Gonçalves, F. J., Nunes, C. D., Filippi, M. C., de Araújo, L. G., Gonçalves, L. D. A., & Sibov, S. T. (2014).** Isolation and characterization of mycorrhizal fungi in *Cyrtopodium*

vernun Rchb. F. & warm (Orchidaceae). Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences, 57(3), 244-249.

**González Y. Cueva A. (2014).** Effects of photoperiod, plant growth regulators and culture media on in vitro growth of seedlings of *Cyrtochilum loxense* (Lindl.) Kraenzl. an endemic and endangered orchid from Ecuador. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1727-99332014000200012&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1727-99332014000200012&script=sci_arttext)

**Guzmán A. Moreno J. (2014).** Efecto de la altitud en la composición y riqueza de hongos micorrízicos de orquídeas epífitas en bosques montano altos del sur del Ecuador(tesis). Universidad del Azuay. Disponible en: <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/4239/1/10798.pdf>

**Hoyos Carrera, L. R., & Rodríguez Cabrera, A. D. (2013).** Aislamiento de micorrizas en seis especies de orquídeas nativas de ecuador para la elaboración de un biofertilizante potencialmente útil en rusticación de orquídeas. Disponible en: <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6012/1/UPS-QT04342.pdf>

**Honrubia, Mario. (2009).** Las micorrizas una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. Departamento de biología Vegetal (Botánica). Facultad de biología. Murcia España.

**Kottke I. & Suárez, J. P. 2009.** Mutualistic, root-inhabiting fungi of orchids—identification and functional types. In Proc. Second Scientific Conf. on Andean Orchids (eds A. M. Pridgeon & J. P. Suárez), pp. 84–99. Loja, Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja.(ISBN 978-9942-00-502

**McCormick, M. K., Whigham, D. F., & O'Neill, J. (2004).** Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist*, 163(2), 425-438.

**McKendrick S. (2000).** Manual para la germinación in vitro de orquídeas. Ceiba Foundation for Tropical Conservation. Disponible en: [http://www.ceiba.org/documents/CFTCpropman\(SP\).pdf](http://www.ceiba.org/documents/CFTCpropman(SP).pdf)

**Mateos A. (2006).**Guía de orquídeas de Extremadura. Disponible en:  
[http://extremambiente.gobex.es/files/biblioteca\\_digital/Guia\\_orquideas.pdf](http://extremambiente.gobex.es/files/biblioteca_digital/Guia_orquideas.pdf)

**Menchaca A. (2011).** Manual para la propagación de orquídeas .Universidad Veracruzana .Primera edición. Disponible en:  
[http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/documentos/manual\\_para\\_la\\_propagacion\\_de\\_orquideas.pdf](http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/documentos/manual_para_la_propagacion_de_orquideas.pdf)

**Moreno M. (2013).** Aislamiento de hongos micorrízicos de algunas especies del género *Bletia* en dos municipios del estado de México. Disponible en: [http://aislamiento\\_de\\_hongos\\_micorr%2593icos\\_de\\_algunas\\_especies\\_del\\_g%2593nero\\_bletia\\_en\\_dos\\_municipios.pdf](http://aislamiento_de_hongos_micorr%2593icos_de_algunas_especies_del_g%2593nero_bletia_en_dos_municipios.pdf)

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

**Narrea, M. (2006).** *Agar dextrosa papa.* Retrieved Julio 16, 2015, from <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/entomologia/v45/pdf/a25v45.pdf>

**Navarro F. (2009).** Efectos beneficiosos de las micorrizas sobre las plantas. Disponible en: [http://www.bioscripts.net/col/Apuntes/Nutricion\\_Vegetal/Trabajo\\_de\\_nutricion\\_vegetal.pdf](http://www.bioscripts.net/col/Apuntes/Nutricion_Vegetal/Trabajo_de_nutricion_vegetal.pdf) 2009.

**Nodo (2010,01 14).** Identificación de *Rhizoctonia*. Retrieved from. Disponible en: [www.nodo50.org/.../IDENTIFICACIÓN%20DE%20RHIZOCTONIA.pdf](http://www.nodo50.org/.../IDENTIFICACIÓN%20DE%20RHIZOCTONIA.pdf)

**Otero Ospina, J. T., & Bayman, P.** Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epifitas. *Acta Agronómica*; Vol. 58, núm. 4 (2009); 270-276 2323-0118 0120-2812.

**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.

**Ordoñez, N. F., Díez, M. C., & Otero, J. T. (2015).** LA VANILLA Y LOS HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS. *Orquideología*, 29(1), 56.

**Pereira, O. L., Kasuya, M. C. M., Borges, A. C., & Araújo, E. F. D. (2005).** Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. *Canadian Journal of Botany*, 83(1), 54-65. **Peñaloza, J. (2012).** *Micorrizas*. Bogotá, Colombia: Produmedios.

**Rivas, M., Warner, J., & Bermúdez, M. (1998).** Presencia de micorrizas en orquídeas de un jardín botánico neotropical. *Revista de biología tropical*, 46(2), 211-216.

**Roberts P, 1999.** Great Britain. Rhizoctonia-forming fungi, A taxonomic guide. Edit. Whitstable Litho Printers Ltd. Whitstable, Kent. 1-5

**Rueda, D. (2004).** Módulo Biotecnología aplicada, Universidad Xamorano, carrera de ciencia y producción Agropecuaria. Chile.

**Setaro, S. D., Garnica, S., Herrera, P. I., Suárez, J. P., & Göker, M. (2012).** A clustering optimization strategy to estimate species richness of Sebacinales in the tropical Andes based on molecular sequences from distinct DNA regions. *Biodiversity and Conservation*, 21(9), 2269-2285.

**Suárez, J. P., Weiβ, M., Abele, A., Garnica, S., Oberwinkler, F., & Kottke, I. (2006).** Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycological research*, 110(11), 1257-1270.

**Suárez, J. P., Weiβ, M., Abele, A., Oberwinkler, F., & Kottke, I. (2008).** Members of Sebacinales subgroup B form mycorrhizae with epiphytic orchids in a neotropical mountain rain forest. *Mycological Progress*, 7(2), 75-85.

**Sigisfredo, G., Kai, R., Robert, B., Franz, O., & Michael, W. (2013).** Phylogenetic diversity and structure of sebacinoid fungi associated with plant communities along an altitudinal gradient. *FEMS microbiology ecology*, 83(2), 265-278.

**Suárez, J. P., & Kottke, I. (2016).** Main fungal partners and different levels of specificity of orchid mycorrhizae in the tropical mountain forests of Ecuador. *Lankesteriana*, 16(2).

**Silvia L. Ordoñez, Dora P. Pillacela, Jazmín M. Salazar, Denisse F. Peña. (2016).** Especificidad del hongo micorrízico (Rhizoctonia sp.) en Phalaenopsis sp., Cymbidium sp., Trichoceros antenifer, Oncidium excavatum, y Cyrtochilum sp. Disponible en: <http://192.188.48.56/ojs/index.php/maskana/article/view/915/812>

**Trópicos. (2015).** Retrieved from Missouri Botanical Garden:

<http://www.tropicos.org/Name/23501504>

**Vargas L, Manrique M. (2015).** Caracterización morfológica y de las secuencias ITS de aislamientos de hongos asociados a raíces de orquídeas en la región del sumapaz. Disponible en: <http://dspace.unicundi.edu.co/FINAL.pdf>

**Velasco, L. Beltran P. (2008).** Orquídeas de la Serranía de Grazalema. España: Consejería de Medio Ambiente. Disponible en: [http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/web/Bloques\\_Tematicos/Patrimonio\\_Natural\\_Uso\\_Y\\_Gestion/Espacios\\_Protegidos/publicaciones\\_renpa/orquideas\\_grazalema/01\\_presentacion\\_agradecimientos.pdf](http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/web/Bloques_Tematicos/Patrimonio_Natural_Uso_Y_Gestion/Espacios_Protegidos/publicaciones_renpa/orquideas_grazalema/01_presentacion_agradecimientos.pdf)

**Warcup JH (1981).** The mycorrhizal relationships of Australian orchids. *New Phytologist* 87, 371–381.

**Warcup J. H, & Talbot P. H. B, 1967.** Perfect States of Rhizoctonias Associated with Orchids, 631-641.

**Zelenko H. Bermúdez P. (2009).** Orchids species of Perú. *Trichoceros antennifer*. Volumen: 2 ISBN096613446X.

**Zettler, L. (2007).** Conservation-driven Propagation of an Epiphytic Orchid. *Hort Science*, 135-139

**Zettler, L. (2010).** Symbiotic seed germination and mycorrhizae of Federally Threatened *Platanthera praecox*. Departamento de Horticultura de la Universidad de Iowa State

**Zettler, L. W., Corey, L. L., Jacks, A. L., Gruender, L. T., & Lopez, A. M. (2013).** *Tulasnella irregularis* (Basidiomycota: Tulasnellaceae) from roots of *Encyclia tampensis* in south Florida, and confirmation of its mycorrhizal significance through symbiotic seed germination. *Lankesteriana*.

**Zettler, L. (2013).** Revistas Académicas, Universidad de Costa Rica. Retrieved Octubre 5, 2014, from <http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/lankesteriana>

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

**Anexo.**

**Anexo1.** Sitio de muestreo de las seis especies de orquídeas en el Cerro Abuga (Parroquia Bayas).



Tomando de Google Earth



## ANEXOS

**Anexo 1:** Localización del lugar de muestreo georreferenciado