

# UCUENCA

## Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

### Identificación molecular de hongos potencialmente micorrízicos, aislados de tres especies de orquídeas nativas del cantón Gualaceo


Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Bioquímica Farmacéutica

**Autor:**

Pamela Fernanda Abril Cuesta


**Director:**

María Elisa Durán López

ORCID:  0000-0003-1642-656X

**Asesor**

Rodrigo Sebastián Caroca Cáceres

ORCID:  0000-0002-1405-0872

Cuenca, Ecuador

2023-10-16

## Resumen

Ecuador es uno de los países más biodiversos del mundo, gracias a su ubicación, geología, topografía, clima y múltiples factores biológicos. Entre su gran diversidad de flora destacan las orquídeas, las que son cotizadas comercialmente debido a su gran belleza, lo cual vuelve vulnerables al tráfico ilegal. Adicionalmente, existe interés científico por la relación entre las orquídeas y sus huéspedes fúngicos, lo que permite que sus semillas puedan germinar. Los hongos micorrízicos proveen a los embriones de macronutrientes importantes como el fósforo y nitrógeno que extraen del suelo; mientras los hongos obtienen beneficio del carbono orgánico en forma de azúcares, producidos en la fotosíntesis. De esta manera, es fundamental comprender la relación simbiótica entre orquídeas y hongos. En el presente trabajo, se identificaron molecularmente diez cepas fungales aisladas de tres especies de orquídeas nativas del cantón Gualaceo, se aplicó la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para amplificar parte del ADN ribosomal mediante los cebadores ITS y NL, con el fin de identificar hongos micorrízicos aislados de raíces de orquídeas. Estos productos de PCR fueron secuenciados y la secuencia obtenida se comparó con la base de datos GenBank del NCBI para identificar las especies de los hongos analizados. Se identificó una cepa de hongo micorrízico perteneciente a *Ceratobasidium* sp. que podrá emplearse en posteriores ensayos de germinación simbiótica.

*Palabras clave:* orquídeas epífitas, hongos micorrízicos, identificación molecular



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

### Abstract

Ecuador is one of the most biodiverse countries in the world, thanks to its location, geology, topography, climate, and multiple biological factors. Among its great diversity of flora, orchids stand out, which are commercially valued due to their great beauty, making them vulnerable to illegal trafficking. In addition, there is scientific interest in the relationship between orchids and their fungal hosts, which allows their seeds to germinate. Mycorrhizal fungi provide the embryos with important macronutrients such as phosphorus and nitrogen that they extract from the ground; while fungi benefit from organic carbon in the form of sugars produced in photosynthesis. Thus, it is essential to understand the symbiotic relationship between orchids and fungi. In the presents work, ten fungal strains isolated from three native orchid species from the Gualaceo canton were molecularly identified, the polymerase chain reaction (PCR) molecular technique was applied to amplify part of the ribosomal DNA using the ITS and NL primers, in order to identify mycorrhizal fungi isolated from orchid roots. These PCR products were sequenced and the sequence obtained was compared with the NCBI GenBank database to identify the species of fungi analyzed. A strain of mycorrhizal fungus belonging to *Ceratobasidium* sp. was identified that can be used in subsequent symbiotic germination assays.

*Keywords:* epiphytic orchids, mycorrhizal fungi, molecular identification



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

**Institutional Repository:** <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

## Índice de contenido

|   |    |
|---|----|
| <b>Introducción</b> .....   | 10 |
| <b>Objetivo general y específicos</b> .....                             | 12 |
| Objetivo General .....  | 12 |
| Objetivos específicos .....   | 12 |
| <b>Capítulo I</b> .....   | 13 |
| 1. Orquídeas .....  | 13 |
| 1.1. Generalidades de las orquídeas.....                                | 13 |
| 1.2. Importancia de las orquídeas .....                                 | 14 |
| 2. Hongos micorrízicos.....   | 15 |
| 2.1. Generalidades.....   | 15 |
| 2.2. Fisiología de la simbiosis micorrízica .....                       | 16 |
| 2.3. Género Rhizoctonia .....   | 16 |
| 2.4. Clasificación de las micorrizas .....                              | 17 |
| 2.5. Relación simbiótica entre hongos y orquídeas .....                 | 18 |
| 2.6. Importancia de las micorrizas en las orquídeas.....                | 19 |
| 3. Técnicas de caracterización molecular.....                           | 19 |
| 3.1. Generalidades.....   | 19 |
| 3.2. Espaciadores transcritos internos (ITS).....                       | 21 |
| 3.3. PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) .....                    | 23 |
| 3.4. Electroforesis en gel de agarosa .....                             | 24 |
| 3.5. Secuenciación de ADN e identificación taxonómica .....             | 25 |
| <b>Capítulo II</b> .....  | 27 |
| 4. Materiales y métodos .....   | 27 |
| 4.1. Origen de los aislados fungales .....                              | 27 |
| 4.2. Subcultivos de hongos potencialmente micorrízicos .....            | 27 |
| 4.3. Extracción de ADN.....   | 28 |
| <b>Capítulo III</b> .....   | 32 |
| 5. Resultados .....   | 32 |
| 5.1. Repiques de especímenes de hongos potencialmente micorrízicos..... | 32 |
| 5.2. Identificación Molecular.....                                      | 33 |
| <b>Capítulo IV</b> .....  | 43 |
| 6. Discusión .....  | 43 |
| <b>Capítulo V</b> .....   | 47 |
| 7. Conclusiones.....  | 47 |

# UCUENCA

5

|                            |    |
|----------------------------|----|
| <b>Capítulo VI</b> .....   | 48 |
| 8. Recomendaciones .....   | 48 |
| <b>Capítulo VII</b> .....  | 49 |
| 9. Referencias .....       | 49 |
| <b>Capítulo VIII</b> ..... | 58 |
| 10. Anexos .....           | 58 |

## Índice de figuras

- Figura 1.** Representación gráfica de los dos espaciadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) 21
- Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa de los 10 aislados fungales de *Cyrtochilum* sp., *Pleurothallis* sp. y *O. pardinum*, según su designación numérica en cada carril, como se muestra en la Tabla 4. 34
- Figura 3.** Electroforesis de la amplificación de los productos de PCR junto con sus primers ITS y NL de los aislados fungales. A cada producto de PCR se le asignó un número de acuerdo al orden en el que fueron colocados en los carriles del gel de agarosa. 35
- Figura 4.** Electroforesis de la purificación de los productos de PCR juntos con sus primers ITS y NL de los aislados fungales. A cada producto de PCR se le asignó un número. 36
- Figura 5.** Alineamiento de la secuencia de la muestra (A2) *Odontoglossum pardinum*; Raíz 3, sección B junto con los primers ITS en la base de datos Gen-Bank. 39
- Figura 6.** Alineamiento de la secuencia de la muestra (A2) *Odontoglossum pardinum*; Raíz 3, sección B junto con los primers NL en la base de datos Gen-Bank. 40
- Figura 7.** Secuencias con los primers ITS en las especies de orquídeas *Pleurothallis* sp., *Odontoglossum pardinum* y *Cyrtochilum* sp. 68
- Figura 8.** Secuencias con los primers NL en las especies de orquídeas *Pleurothallis* sp., *Odontoglossum pardinum* y *Cyrtochilum* sp. 70

## Índice de tablas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Iniciadores empleados para la amplificación.   | 22 |
| <b>Tabla 2.</b> Códigos asignados para cada tubo de los aislados fungales de las tres especies de orquídeas epífitas.  | 28 |
| <b>Tabla 3.</b> Repiques de aislados fungales obtenidos de raíces de orquídeas <i>Cyrtorchilum</i> sp., <i>Pleurothallis</i> sp., y <i>O. pardinum</i>   | 32 |
| <b>Tabla 4.</b> Designación numérica por carril de las muestras de ADN fúngico provenientes de las tres especies de orquídeas del cantón Gualaceo.   | 33 |
| <b>Tabla 5</b> Cuantificación de los primers ITS y NL en las 20 muestras fungales de las especies <i>O. pardinum</i> , <i>Cyrtorchilum</i> sp y <i>Pleurothallis</i> sp.   | 36 |
| <b>Tabla 6.</b> Identificación taxonómica de los hongos aislados de las especies de orquídeas <i>Cyrtorchilum</i> sp., <i>Pleurothallis</i> sp., y <i>Odontoglossum pardinum</i> junto con los primers ITS y NL. | 38 |
| <b>Tabla 8.</b> Procedimiento del medio Potato Dextrose Agar   | 58 |
| <b>Tabla 9.</b> Cepas de hongos potencialmente micorrízicos aisladas de tres orquídeas epífitas en el orquideario de la Universidad de Cuenca, utilizadas para su posterior identificación molecular.            | 59 |
| <b>Tabla 10.</b> Características Macroscópicas de las 10 cepas fungales  | 60 |
| <b>Tabla 11.</b> Equipos utilizados durante el desarrollo del trabajo experimental.  | 65 |

## Dedicatoria

A mi padre, Marcelo, quiero expresar mi eterno agradecimiento por ser mi apoyo incondicional en cada paso de este camino. A pesar de la distancia, siempre supiste animarme y mantenerme firme en la búsqueda de mis metas.

A mis abuelitas Blanca y Livia, les dedico mi logro con todo mi corazón. Gracias por brindarme su amor y cuidado, y por ser fuente de inspiración que me motivó a alcanzar mis anhelos.

A mi mejor amiga, Cinthya, agradezco tu presencia en mi vida. Eres mi fuerza absoluta, mi luz y mi apoyo incondicional. Gracias por ser el pilar que me impulsa a soñar en grande para el futuro.

A mi madre, mi ángel que me guía en cada paso, aunque ya no te tengo físicamente a mi lado, siempre te he sentido presente en cada día y en cada logro. Este éxito también es tuyo, pues llevas un pedacito de mí.

A mi hermano, Marcelo, gracias por tu apoyo inquebrantable en este largo trayecto. Espero seguir acompañándote en tus propios sueños y éxitos.

A todos ustedes, mi familia y amigos, mi más profundo agradecimiento. Han sido parte fundamental en este camino de crecimiento y logros, y sin su aliento y respaldo, nada de esto hubiera sido posible.



## Agradecimiento

Primeramente, agradezco a Dios y a mi familia por su inquebrantable apoyo durante todo este viaje. Su aliento y perseverancia han sido fundamentales para alcanzar esta meta.

En especial deseo agradecer a mis tutores: MSc. María Elisa Durán, cuyo apoyo, dedicación, paciencia y compromiso me han guiado y brindado conocimientos invaluable a lo largo de la investigación; y al Dr. Rodrigo Caroca, por sus enseñanzas y recomendaciones que han enriquecido mi desarrollo académico.

También quiero extender mi gratitud al equipo que conforma el departamento de investigación de la Universidad del Azuay. Gracias por abrirme las puertas y proporcionarme acceso a sus equipos y reactivos, lo que ha sido esencial para el desarrollo de este trabajo.

Agradezco de manera especial a mis compañeros y amigos de carrera. Hemos compartido muchos momentos significativos y nos hemos apoyado en este largo y desafiante camino académico.

Sin el apoyo de todas estas personas, esta investigación y mi crecimiento personal no serían posibles. A cada uno de ustedes, ¡muchas gracias de corazón!

## Introducción

Ecuador, uno de los países más biodiversos del mundo, alberga una gran diversidad de especies nativas de orquídeas; estas se encuentran en microhábitats diferentes, que van desde zonas montañosas hasta zonas altas y bajas de la Amazonía. La familia Orchidaceae, perteneciente a la clase Magnoliophyta, destaca como la más numerosa en el reino vegetal, comprendiendo alrededor de 32000 especies y, aproximadamente, 800 géneros (Alghamdi, 2019). Estas fascinantes plantas se encuentran en diversos ecosistemas terrestres, aunque su mayor diversidad se concentra en climas tropicales. A pesar de ello, las orquídeas también han demostrado su capacidad de adaptación en entornos con limitada disponibilidad de agua, gracias a órganos especializados capaces de almacenarla y administrar nutrientes para asegurar su supervivencia (Fernández-Fernández et al., 2018).

La reproducción de las orquídeas involucra un ciclo complejo, debido a las peculiaridades de sus semillas. Estas semillas son extremadamente pequeñas y carecen de endospermo y cotiledones, lo que implica que dependen de nutrientes externos para su germinación y desarrollo (Salgado y Peñaranda, 2019). Para obtener estos nutrientes, se establece una relación simbiótica con hongos específicos, lo que se conoce como micorriza. A través de la fotosíntesis, la planta brinda a los hongos carbono orgánico, en forma de azúcares; mientras que, los hongos, le proporcionan a las plantas, agua y nutrientes esenciales como fósforo, cobre y zinc (Arancibia et al., 2022). Entre los hongos micorrízicos más comunes se encuentran los pertenecientes a la división Basidiomycota, con órdenes como *Tulasnellales*, *Sebacinales*, *Ceratobasidiales* y *Atractielalles* (Alghamdi, 2019).

Desafortunadamente, la familia Orchidaceae se ve afectada por problemas como la sobreexplotación de recursos naturales, falta de compromiso respecto a proyectos de protección y conservación de fauna y flora, entre otros. El 44,1 % de la superficie de la provincia del Azuay tiene algún tipo de intervención por actividades humanas, incluyendo la deforestación y crecimiento poblacional (Prefectura del Azuay, 2022). Además, el cultivo de orquídeas se ha convertido en una fuente económica relevante, lo que, lamentablemente, ha impulsado su tráfico ilegal (Baquero y Galarza Verkovitch, 2019).

Se han establecido proyectos a nivel cantonal y provincial para la conservación de la biodiversidad, sin embargo, la falta de control y seguimiento de estos proyectos los ha vuelto vulnerables. A esto se suma la ausencia de un plan provincial de forestación y

reforestación, por parte del Gobierno provincial del Azuay, así como la falta de priorización de áreas para la recuperación, protección y conservación forestal. Es crucial ejecutar este tipo de proyectos y de este modo evitar la pérdida de recursos ambientales y contribuir con su conservación (Prefectura del Azuay, 2022).

En este sentido, las técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), desempeñan un papel fundamental. Entre numerosas aplicaciones, la PCR permite obtener información precisa para la identificación taxonómica de los hongos, a nivel molecular. Al combinar la PCR con herramientas informáticas, que contienen información de secuencias de ADN generadas en laboratorios de todo el mundo, es posible establecer con mayor certeza la especie de hongo objeto de estudio (Fuentes-Flores et al., 2018). Estas herramientas brindan una perspectiva más completa y confiable sobre la diversidad fúngica, lo cual es crucial al momento de implementar estrategias efectivas de conservación y de manejo de recursos naturales.

Con este proyecto se busca aportar información crucial sobre la diversidad fúngica, a través de la identificación molecular de diez cepas de hongos, potencialmente micorrízicos, que fueron aislados de tres especies de orquídeas epífitas, nativas del cantón Gualaceo. Este estudio permitirá conocer los tipos de hongos micorrízicos que se encuentran asociados a estas raíces, sirviendo como una herramienta invaluable para investigaciones futuras sobre la conservación de orquídeas nativas, a través de asociaciones micorrízicas. Estas asociaciones desempeñan un papel fundamental al promover, mejorar y preservar especies únicas de la región. Mediante este proyecto, se prevé generar conocimiento científico que respalde estrategias efectivas de conservación y manejo de orquídeas nativas, garantizando así su protección y preservación a largo plazo.

## Objetivo general y específicos

### Objetivo General

Identificar hongos potencialmente micorrízicos aislados de tres especies de orquídeas nativas del cantón Gualaceo por medio de herramientas moleculares.

### Objetivos específicos

- Identificar especies fungales de hongos micorrízicos mediante amplificación de regiones de ADN y comparación de secuencias con bases de datos específicas.
- Incorporar al cepario fungal del Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas, hongos micorrízicos identificados a nivel de género y especie.

## Capítulo I

### 1. Orquídeas

#### 1.1. Generalidades de las orquídeas

El término "orquídea" se deriva del vocablo griego "orchis", que significa "testículo", debido a la forma de los pseudobulbos presentes en algunas especies (Castellanos y Torres, 2018). Las orquídeas pertenecen a la familia Orchidaceae, la que por su gran capacidad de adaptación se distribuye en una amplia gama de hábitats, especialmente en regiones tropicales. Esta familia, es una de las más diversas y numerosas, contando con alrededor de 800 géneros y más de 32000 especies en todo el mundo (Castro y Morales, 2018; Sedano et al., 2015).

La morfología de las orquídeas se relaciona al hábitat, resultando en una extensa variedad de tamaños y formas; además, tienen la capacidad de crecer en la superficie de árboles, suelos y rocas (Fernández-Fernández et al., 2018; Santana y Alonso, 2021). Entre ellas, las orquídeas epífitas suelen crecer en árboles, se caracterizan por poseer tallos engrosados, también llamados pseudobulbos; además, exhiben una exuberante belleza floral con colores llamativos y fragancias intensas (Bonilla Loor y Solórzano Zambrano, 2019).

Las orquídeas pueden tener raíces aéreas o terrestres; las aéreas, obtienen nutrientes y agua del aire y de la humedad; por otro lado, las terrestres, forman asociaciones simbióticas con hongos micorrízicos, obteniendo a través de ellos nutrientes adicionales (Vicción Esquivel et al., 2021). Sus órganos reproductivos femeninos se encuentran en una estructura llamada columna, donde los granos de polen forman masas compactas denominadas polinias, permitiendo así polinizar miles de óvulos. Mientras que, los frutos son cápsulas que contienen miles de diminutas semillas, constituidas por un embrión pequeño que generalmente carece de endospermo, haciendo difícil su germinación; por lo que para su desarrollo es necesaria la intervención de hongos micorrízicos (Bonilla Loor y Solórzano Zambrano, 2016).

Debido a sus características morfológicas, en especial sus flores, aromas y colores, las orquídeas se consideran símbolos de belleza y siempre han despertado un gran interés comercial (Rivera, 2002). Estas características únicas han llevado a la explotación y comercialización de las orquídeas a lo largo de la historia, tanto en el ámbito ornamental como en la industria de la perfumería.

## 1.2. Importancia de las orquídeas

Las orquídeas desempeñan un papel fundamental en los ecosistemas, ya que atraen a numerosos polinizadores como insectos y aves, colaborando en la estabilización y equilibrio del hábitat. Por otro lado, la presencia de las orquídeas en el ecosistema puede ser un indicador de su estado de conservación, debido a que la relación de las orquídeas junto con sus polinizadores es esencial para su perpetuación (Santana y Alonso, 2021).

En la medicina tradicional, se utilizan diversas especies de orquídeas para tratar dolencias como la disentería, tos, problemas gastrointestinales, hemorragias, dolores de cabeza, fiebre y heridas (Emeterio-Lara et al., 2016). Según Beltrán Capote & Martínez Betancourt (1996), al menos ocho especies de la familia Orchidaceae, entre ellas *Bletia purpurea*, *Cyrtopodium punctatum*, *Encyclia cochleata*, *E. phoenicia*, *Oncidium luridum*, *Vanilla dilloniana*, *V. phaeantha* y *V. planifolia*, tienen propiedades antiasmáticas, parasitarias y estimulantes.

Son de importancia económica en el área de la horticultura y floristería, pues sus distintivas flores, con variados colores y aromas, son motivos de interés comercial; adicionalmente, constituyen oportunidades de negocio en comunidades que tengan invernaderos, ya que pueden emplearse como atractivo turístico (Téllez Velasco & Tejada Sartorius, 2017).

### 1.2.1. Orquídeas en el Ecuador y sus amenazas

Ecuador es uno de los países más biodiversos del mundo, en donde se encuentran tres de los diez puntos calientes de biodiversidad o *hotspots*. El Chocó Darién al occidente del Ecuador, es uno de estos *hotspots*, posee los bosques lluviosos más húmedos de la Tierra; otro, los Andes Tropicales, tiene la particularidad de constituir la región más rica y más diversa del planeta (Perfil de la biodiversidad, 2018).

En esta diversidad destacan las orquídeas, pues Ecuador alberga el 16% de las orquídeas del mundo, aproximadamente 4500 especies, de las cuales 1700 son endémicas (Alvarado, et al., 2020; Suárez et al., 2016). Por tal motivo en 2013, fue declarado como “País de las orquídeas”, mediante un Acuerdo Ministerial en el que se resalta la presencia de cuatro de las cinco subfamilias de orquídeas a nivel global (Borja, 2020).

La sorprendente variedad de orquídeas que existe en el país se debe a su ubicación en

el Neotrópico. La gran actividad volcánica que originó la cordillera de los Andes, sumada a las corrientes fría de Humboldt y cálida de El Niño, originaron diferentes hábitats (Dodson, 2016). Siendo posible encontrarlas en las zonas montañosas de la Sierra ecuatoriana, entre los 1500-3000 m.s.n.m.; y, en las zonas altas y bajas de la Amazonia (Guamán Cobos, 2021).

Una serie de problemas ponen en peligro la diversidad de las orquídeas, como la falta de planes de forestación y reforestación, tala indiscriminada de los bosques para expandir zonas ganaderas y agrícolas, incendios forestales, actividad minera, petrolera, construcción de carreteras, expansión territorial y sobreexplotación comercial (Montaño, 2021).

Ecuador es uno de los 177 países signatarios de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES), cuyo objetivo es instaurar un marco legal para regular la comercialización de especies en extinción. Las orquídeas ecuatorianas se encuentran en el Apéndice I y II de la CITES; en el Apéndice I se hallan especies en peligro de extinción por lo que prohíbe su comercialización; las orquídeas del Apéndice II no están en peligro de extinción, por lo que se pueden comercializar de forma regulada (Herrera, 2022).

## **2. Hongos micorrízicos**

### **2.1. Generalidades**

Los hongos forman uno de los mayores grupos de organismos en la naturaleza, juegan un papel muy importante en la diversidad del suelo, debido a su capacidad de descomponer la materia orgánica y de reciclar nutrientes, permitiendo el mantenimiento de los ecosistemas. Algunos de estos organismos pueden formar relaciones simbióticas con las raíces de las plantas, llamadas micorrizas; constituyendo una estrategia para su supervivencia (Romero-Salazar et al., 2022).

En 1885, el patólogo alemán B. Frank estableció el término “micorriza”, que proviene del griego “myces” que significa hongo y “rhiza” raíz, para referirse a la asociación simbiótica entre las raíces de las plantas con los hongos del suelo (Camarena Gutiérrez, 2011). Esta asociación permite obtener nutrientes útiles para su germinación y desarrollo, como el fósforo, cobre y zinc; además, actúa como agente protector frente a patógenos, sequías y elementos tóxicos. En ciertas ocasiones, las micorrizas se conservan hasta su estado adulto, especialmente aquellas que no son fotosintéticas (Romero-Salazar et al., 2022; Camarena Gutiérrez, 2011).

Los organismos más comunes en esta asociación son los de las clases Basidiomicetos, Ascomicetos y Zigomicetos. Las hifas septadas de los hongos forman ovillos intracelulares en las raíces, lo que permite el intercambio de compuestos carbonatados, entre la planta y el hongo, y la liberación de nutrientes. Estos hongos micorrízicos pueden influir en la biodiversidad, debido a que actúan en la regulación del ciclo del carbono, también en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (Camarena Gutiérrez, 2011).

## 2.2. Fisiología de la simbiosis micorrícica

Las micorrizas se forman cuando los hongos viven dentro de las raíces, rizomas o tallos de las plantas terrestres, acuáticas o epífitas; actúan como órganos de absorción, que permite a las plantas obtener agua y nutrientes útiles para su germinación y desarrollo, mientras que al hongo le proporcionan carbono orgánico (Arancibia et al., 2022).

Alrededor del 80 % de las familias de plantas, son capaces de establecer micorrizas arbusculares. El establecimiento de esta simbiosis depende de la interacción entre el hongo, la planta y las condiciones ambientales (Carrillo Sánchez, 2015). La simbiosis inicia cuando la planta estimula al hongo, por medio de exudados radiculares, para que emita sus hifas y entre en contacto con la raíz, formando una especie de apresorio; a partir de esto se inicia la colonización, donde la hifa penetra la corteza y forma hifas intra e intercelulares, arbusculos y vesículas (Harrison, 2012). Posteriormente, el micelio del hongo crece fuera de la raíz, extendiéndose por el suelo, para poder absorber nutrientes, y colonizar otras plantas (Lanfranco et al., 2016).

## 2.3. Género *Rhizoctonia*

La mayoría de hongos formadores de micorrizas orquidoides pertenecen al género *Rhizoctonia*, incluyendo *Tulasnella*, *Ceratobasidium* y *Thenatephorus*. El género *Rhizoctonia* se encuentra distribuido ampliamente en el mundo; muchos son patógenos, pero también tienen comportamientos saprobios y, como ya se mencionó, incluso son capaces de establecer relaciones simbióticas con otros organismos, como las orquídeas (Ordoñez et al., 2016).

Se caracterizan por ser hongos filamentosos que no producen esporas asexuales y comparten caracteres morfológicos generales (Ordoñez et al., 2016). Presentan células multinucleadas en hifas, forman micelio de crecimiento rápido con coloración marrón clara y oscura, dependiendo de qué tan antigua sea su colonia; generalmente, su



coloración clara corresponde a hifas jóvenes aseptadas y finas, por el contrario, la coloración parda se asocia con esclerocios de estructura uniforme. Estas estructuras también pueden formarse a partir de micelios secundarios por el cruzamiento de hifas, originando un micelio diploide, ángulos rectos en las hifas principales y la ausencia de conidio (Romero-Salazar et al., 2022).

La identificación de las especies del género *Rhizoctonia* es difícil, pues tiene pocos caracteres morfológicos distintivos y sus características son variadas entre individuos. Un punto importante para su determinación, es el número de núcleos en las células de las hifas jóvenes, las que pueden ser uni-, bi- o multinucleadas. Los parámetros más usados hasta ahora se basan en técnicas moleculares por amplificación de su ADN, con primers específicos, para distinguir los aislamientos de las especies dentro de este grupo (Cazar Iza & Pérez Reyes, 2019).

#### **2.4. Clasificación de las micorrizas**

La mayoría de hongos formadores de micorrizas se encuentran dentro del género *Rhizoctonia*, incluyen amorfos de *Tulasnella*, *Ceratobasidium* y *Thanatephorus* (Arditti, 1992). Según su estructura pueden distinguirse tres formas: ectomicorrizas, endomicorrizas y ectendomicorrizas.

##### **2.4.1. Ectomicorrizas**

Las orquídeas establecen una simbiosis entre los hongos y sus raíces, formando una micorriza, la cual establece una red que cubre las células de la raíz sin penetrarlas. Esta relación simbiótica involucra estructuras como el micelio, manto fúngico, conocido como red de Hartig, y las hifas extrarradicales. El hongo, que envuelve la raíz, participa en el transporte de agua, nutrientes y minerales, así como en la protección contra metales pesados y organismos patógenos. Se encuentra comúnmente en diferentes climas y, por lo general, se asocia con árboles. Los hongos involucrados en esta simbiosis pertenecen a los grupos Basidiomycota y Ascomycota (García Rodríguez, 2018).

##### **2.4.2. Endomicorrizas**

Las micorrizas vesículo-arbusculares, son una forma de simbiosis entre las raíces de las plantas y los hongos del grupo Glomeromycota. Constituyen el grupo más abundante en la naturaleza, siendo comunes en selvas tropicales y suelos pobres, como las praderas (Aguirre Medina, 2022; Rivas et al., 2015).

A diferencia de las ectomicorrizas, las endomicorrizas colonizan intracelularmente el córtex radical, sin formar un manto de micelio visible (Rivas et al., 2015). Las hifas fúngicas se introducen dentro de las células de la raíz, formando vesículas alimenticias y arbusculos, pero también se extienden fuera de la raíz, almacenando nutrientes y facilitando el intercambio entre el hongo y la planta hospedera (Aguirre Medina, 2022).

#### **2.4.3. Ectendomicorrizas**

Este tipo de micorriza tiene características similares a las dos anteriores; presenta hifas en forma de manto externo, como las Ectomicorrizas, y también, las hifas septadas penetran al interior de las células, como en las Endomicorrizas, sin embargo, no presentan vesículas o arbusculos. Se presenta en hongos de la división Basidiomycota y Ascomycota, expresándose más en angiospermas que en gimnospermas (Vladés et al., 2020).

#### **2.5. Relación simbiótica entre hongos y orquídeas**

El proceso de germinación de las orquídeas es complejo y deficiente debido al tamaño minúsculo de sus semillas, ya que carecen de endospermo y cotiledones. De un millón de semillas, solo de 10 a 15 germinan por sí solas, de las cuales 1 o 2 llegan a la adultez. Adicionalmente, demandan de ciertas condiciones ambientales para obtener nutrientes que les ayuden a germinar y desarrollarse (J. M. Salgado y Peñaranda, 2019).

Anteriormente se consideraba que esta relación simbiótica se daba de forma unidireccional, es decir, que solo las semillas de las orquídeas recibían beneficios de los hongos micorrízicos como agua, carbono y minerales; pero, ahora se conoce que el beneficio es mutuo, ya que también el hongo recibe carbono y nutrientes, cuando la orquídea se desarrolla y realiza la fotosíntesis (Dearnaley y Cameron, 2016; Yeh et al. 2019).

La asociación simbiótica entre hongos y plantas es importante para mantener el equilibrio ecológico (Billard et al., 2014). Los hongos micorrízicos les brindan ciertos beneficios a las orquídeas, como la provisión de nutrientes minerales como el fósforo, cobre, zinc y níquel, fijación de nitrógeno, incremento en los niveles osmóticos en tiempos de sequías, incrementan la resistencia a las plagas y al estrés ambiental (Arancibia et al., 2022). Los hongos son un punto clave para la absorción del fósforo, puesto que este mineral es inmóvil y solo una pequeña fracción se encuentra en el suelo, su absorción directa es lenta; por lo que los hongos les permiten a las plantas absorber cantidades suficientes de fósforo.

La asociación micorrízica se realiza, principalmente, con hongos Basidiomicetos del género *Rhizoctonia*. La identificación de este género se basa en el número de núcleos, binucleadas y multinucleadas, característica que permite distinguir entre diferentes especies. De acuerdo al número de núcleos, pueden ser teleomorfos binucleados *Ceratobasidium spp.* y *Tulasnella spp.* y en los multinucleados *Thanatephorus spp.* (Romero-Salazar et al., 2022).

La reproducción del género *Rhizoctonia* consta de dos fases, asexual y sexual. La fase asexual se caracteriza por tener un micelio estéril, cuya asociación con el hongo forma células moniloides y permiten desarrollar esclerocios; por otra parte, existe una fase sexual, formada por basidiocarpos que desarrollan basidiosporas, esta clase de reproducción incluye a *Ceratobasidium spp.*, *Tulasnella spp.*, *Rhizotonia sp.*, *Sebacina* y *Thanatephorus* (Romero-Salazar et al., 2022).

## **2.6. Importancia de las micorrizas en las orquídeas**

Los hongos tienen un papel muy importante en el crecimiento y desarrollo de las orquídeas, ya que permiten que las semillas puedan germinar, también contribuyen con la resistencia de las plantas frente a estrés biótico y abiótico, facilitan la asimilación de nutrientes del suelo y absorben azúcares para poder transformar minerales como el fósforo, potasio, sodio, calcio, azufre, zinc, cobre etc. (Zak et al., 1995; Smith y Read, 1997).

Las hifas llegan hasta lugares donde las raíces no pueden, influyendo en la absorción de agua, mejorando la eficiencia de localización y absorción de este líquido, especialmente en lugares con condiciones ambientales difíciles. Pueden conectar sus raíces con otras plantas, estableciendo un sistema de transferencia de nutrientes. También, son importantes en la resistencia de las orquídeas para enfermedades, porque le permiten adquirir una mayor cantidad de nutrientes, incrementando su resistencia frente a organismos patógenos (Akhtar et al., 2008; Medina y Azcón, 2010).

## **3. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN MOLECULAR**

### **3.1. Generalidades**

Existen diferentes formas para la identificación de hongos micorrízicos, entre ellas, las características morfológicas solo permiten clasificarlos en categorías, mientras que las técnicas de biología molecular posibilitan conocer su estructura genética y a través de esta, llegar a una clasificación taxonómica más detallada. Con las técnicas de biología

molecular se obtienen secuencias de regiones específicas del ADN del hongo, facilitando su comparación con bases de datos, logrando su identificación; en esta técnica no influyen factores ambientales o alteraciones de ciertas características morfológicas del hongo por la asociación simbiótica con la planta (Fuertes-Flores et al., 2018).

El ADN es una molécula que se puede encontrar en todos los seres vivos, se encuentra ubicada en el núcleo de la célula, específicamente en los cromosomas y, en menor medida, en las mitocondrias. El ADN está formado por una doble hélice enrollada entre sí, con una serie de nucleótidos constituidos por las bases nitrogenadas adenina, citosina, timina y guanina. Esta molécula contiene a los genes, siendo la unidad básica de información genética (Llorens et al., 1997).

El ADN que se encuentra dentro de las mitocondrias se denomina ADN mitocondrial (mtDNA), contiene aproximadamente 16500 pares de bases; es una molécula pequeña ampliamente usada como marcador genético en relaciones taxonómicas y filogenéticas, especialmente en hongos. El ADN mitocondrial evoluciona a su propia tasa, en relación con el genoma nuclear, particularmente en animales y hongos que evolucionan más rápido que el ADN nuclear. Todos los genomas mitocondriales estudiados hasta la fecha, pertenecientes a hongos, poseen un número similar de genes (Pandiella, 2018)

La mayor parte del ADN se sitúa dentro del núcleo de las células eucariotas, las que configuran a los animales, plantas y hongos. Su tamaño puede variar en algunos organismos, especialmente en plantas y hongos, desde unos pocos millones de nucleótidos en algunos hongos, hasta más de cien mil millones en ciertos tipos de plantas (Fuertes-Flores et al., 2018).

En eucariotas, la secuencia más repetida en tándem es el ADN ribosomal, el cual codifica el ARN ribosomal (ARNr). El ARNr se puede encontrar en los ribosomas, en el núcleo y cloroplastos. El ADN ribosomal se divide en dos familias de genes: ADNr 5S y ADNr 45S; la región del ADNr 5S codifica para ARN 5S, junto con ARN 5,8S y 25S alrededor de 50 proteínas ribosomales, quienes constituyen la región grande de los ribosomas (Uribe y Khachatourians, 2007). Los genes de ARNr 5S se encuentran en grandes cantidades en el genoma nuclear, son de fácil uso para el diseño de primers universales, permitiendo comparar una amplia variedad de organismos y reconocer especies. La familia de ADNr 45S consiste en tres regiones codificantes 18S, 5,8S y (25S y 26S) para las plantas, junto con dos espaciadores intergénicos (Megías & Antonio, 2014).

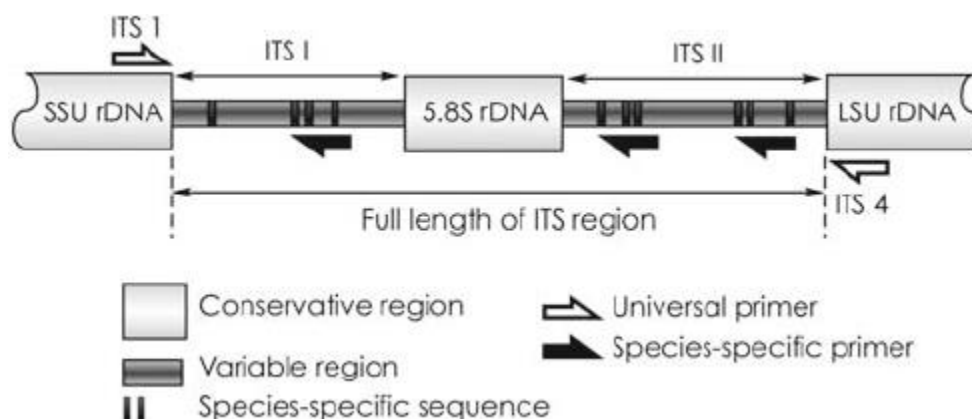
### 3.2. Espaciadores transcritos internos (ITS)

El espaciador transcrito interno (ITS por sus siglas en inglés), constituye un fragmento del ADN espaciador y se encuentra entre genes del ADN ribosómico. En eucariontes, se encuentran dos espaciadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) que separan las subunidades 18S, 5,8S y 28S (Figura 1); ITS1 se localiza entre los genes de ARNr 18S y 5,8S, mientras que ITS2 entre los genes ARNr 5,8s y 28S en hongos y otros eucariontes (Rosero, 2012).

El ITS es el locus más conocido en la investigación de microorganismos, siendo muy exitoso para la identificación de un gran número de hongos. Se ha designado como un marcador de ADN universal para hongos, debido a un alto grado de variación en su secuencia, siendo muy útil para analizar una gran diversidad genética e identificación taxonómica (Villalobos Arámbula et al., 2005).

#### Figura 1.

*Representación gráfica de los dos espaciadores internos transcritos (ITS1 e ITS2).*



*Nota.* Horisawa, S., Sakuma, Y., & Doi, S. (2009)

Las regiones de ADNr comúnmente estudiadas son tres genes codificantes: 18S (llamada subunidad pequeña SSU) 5.8S y, 28S (o subunidad grande LSU). Además, entre estas se encuentran dos espaciadores internos: ITS1 e ITS2. Este conjunto de regiones codificantes y espaciadores internos son lo que permiten realizar estudios filogenéticos (Rosero, 2012). Las subunidades SSU y LSU permiten la unión de cebadores universales para amplificar regiones espaciadoras y, el ITS1 e ITS2, intervienen para establecer relaciones filogenéticas (Quijada Mascareñas, 1988).

White et al. (1990), manifiestan que los iniciadores específicos (ITS1 e ITS4) sirven para amplificar y secuenciar múltiples segmentos de ADNr mitocondrial y nucleico de hongos.

La región ITS es usualmente de una extensión entre 600 a 800 pb, puede amplificarse fácilmente con iniciadores universales, posibilitando su amplificación incluso con muestras de ADN pequeñas, diluidas o degradadas (Tabla 1).

A través de la PCR es posible amplificar estas regiones, obteniendo una secuencia de nucleótidos; pero para poder compararla con otras conocidas y almacenadas en una base de datos, es necesario respaldarlas con otros cebadores. Se pueden presentar dificultades en la identificación de especies al usar únicamente los primers ITS, debido a una ambigüedad o una baja calidad de las secuencias al ingresar en la base de datos. En el presente trabajo, la identificación se basó fundamentalmente en el análisis de las regiones de ADN ribosómico: secuenciación de la región ITS (ITS1 e ITS2) con primers ITS1 e ITS4; y, la secuenciación de los dominios D1/D2 del extremo 5' del gen rRNA y la subunidad LSU, con los primer NL1 y NL4.

O'Donnell et al. (1998), mencionan que los cebadores NL1 y NL4 posibilitan identificar con mayor precisión la mayoría de especies de levaduras analizadas, en función de su secuencia de nucleótidos en LSU. El análisis de dos regiones del ADNr, refuerza la identificación genotípica de los hongos en estudio ya que, si se obtuviera ambigüedad en los resultados de ITS, se reforzaría el análisis obtenido con los primers NL y así verificar los resultados (Carvajal, 2008).

**Tabla 1.**

*Iniciadores empleados para la amplificación.*

| <b>Iniciadores</b> | <b>Secuencia</b>             | <b>Fragmentos de amplificación</b> |
|--------------------|------------------------------|------------------------------------|
| ITS-1              | TCCGTAGGTGAACCTGCGG          | 600 a 800 pb                       |
| ITS-4              | TCCTCCGCTTATTGATATGC         |                                    |
| NL-1               | GCATATCAATAAGCGGAGGAAA<br>AG | 600 a 800 pb                       |
| NL-4               | GGTCCGTGTTTCAAGACGG          |                                    |

*Nota.* Por White & Bruns, (1990); O'Donnell et al. (1998)

### 3.3. PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), desarrollada por el Dr. Kary Mullis en 1985, es una reacción enzimática *in vitro* de síntesis del ADN. Es una técnica, se fundamenta en la obtención de múltiples copias del fragmento de ADN, a través de varios ciclos de periodos y temperaturas de incubación diferentes, en presencia de una enzima polimerasa termoestable, que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN (Santana & Alonso, 2021).

Los productos sintetizados, que se obtienen de la extensión de los cebadores en un ciclo, sirven como molde para el siguiente ciclo; por lo cual, la cantidad resultante de copias de ADN en cada ciclo se duplica para el siguiente (Bolívar et al., 2014). Además de la enzima de ADN polimerasa, en la reacción se usan elementos importantes como nucleótidos o desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPS: adenina, timina, citosina y guanina), oligonucleótidos o primers, agua y una solución amortiguadora o también llamada buffer. Todos estos elementos interactúan en tres etapas:

1. Desnaturalización: implica la separación de la doble cadena de ADN, en dos cadenas simples. La temperatura se eleva por encima del punto de fusión (92 °C a 96 °C), produciendo la separación de las hebras de ADN y permitiendo obtener cadenas separadas para el siguiente paso.
2. Hibridación: se refiere al anillamiento de los cebadores o primers en las cadenas de la molécula original de ADN, para la síntesis de una nueva cadena; los primers se unen al extremo 3' de la cadena previamente separada, haciendo posible la hibridación con su secuencia complementaria. En este proceso desciende la temperatura (50 °C a 60 °C), facilitando que los cebadores se unan a los segmentos del ADN.
3. Extensión: la extensión de la nueva cadena se da a partir de los puntos de unión de los cebadores. La ADN polimerasa realiza esta reacción, produciendo la síntesis de la fracción deseada de ADN. La extensión de las cadenas se da en dirección 5' a 3', y es necesario elevar la temperatura (72 °C). Esto posibilita que la ADN polimerasa extienda a los cebadores, añadiendo nucleótidos y sintetizando los nuevos productos (Delidow et al., 1993).

Los primers o cebadores son secuencias cortas de moléculas de ácidos nucleicos (18 a 24 pares de bases), se utilizan para amplificar un fragmento de ADN de interés. En la PCR, estos primers se hibridan con el ADN original y limitan la región amplificada, produciendo millones de copias (Sánchez y Barrera Saldaña, 2004).

El ADN polimerasa es una enzima que se encarga de la catálisis de la reacción; favorece la unión de moléculas individuales, llamados monómeros, para formar una cadena grande, llamada polímero; este polímero formado es el ADN. La enzima más usada es la *Taq* ADN polimerasa, la cual soporta altas temperaturas, gracias a que proviene de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* (Sánchez y Barrera Saldaña, 2004).

Cuando se repite por segunda vez el ciclo, se obtienen cuatro moléculas, generando el tercer ciclo ocho moléculas. Los tres pasos de desnaturalización se repiten por “n” veces, duplicándose en cada ciclo. Generalmente, se amplifica entre 30 a 50 ciclos, dependiendo de la cantidad de la muestra. La amplificación se da exponencial o logarítmicamente, las cadenas que fueron previamente sintetizadas sirven de molde para las futuras amplificaciones (Cazar Iza y Pérez Reyes, 2019).

### 3.4. Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis es un método de separación, elaborado por Matubara y Takagi en 1962, que se utiliza para separar moléculas según su carga, tamaño y forma. Se ejecuta en una cámara de electroforesis, compuesta de una banda de gel de agarosa y conectada a una fuente de poder (Montalvo Navarro y Lugo Flores, 2016).

El gel que se utiliza es de agarosa, polisacárido que se obtiene de las algas rojas marinas, integrado por unidades de agarobiosa. Este polímero se gelifica rápidamente y es soluble en agua a temperaturas superiores de 65 °C. Forman pequeños capilares que actúan como tamiz, que posibilitan que las moléculas pequeñas se muevan más rápido que las moléculas grandes, debido a una mayor resistencia al interior del gel. La distancia recorrida es inversamente proporcional al tamaño del ADN, es decir, a mayor tamaño, menor es la distancia recorrida. En un extremo, el gel tiene ranuras o pocillos que se colocan las muestras de ADN. El ADN posee una carga negativa por sus grupos fosfatos, lo que permite que, mediante la aplicación de un campo eléctrico, las moléculas puedan migrar en dirección al ánodo de carga positiva. La migración también depende de la concentración de agarosa (Sandoval Rodríguez y López de la Mora, 2016).

Igualmente, la cantidad de voltaje aplicado interviene con la migración, ya que, con un bajo voltaje, la velocidad de migración de las bandas más pequeñas no será visible; mientras que, a altos voltajes, el gel se puede derretir y dar una mayor velocidad de corrimiento, sin embargo, se presentan curvaturas en las bandas, impidiendo su correcto análisis (Sandoval Rodríguez y López de la Mora, 2016). Otro parámetro que puede afectar la migración de bandas es la composición y fuerza iónica del buffer; los más



utilizados son el TAE (Tris, Ácido Acético, EDTA) y TBE (Tris, Borato, EDTA) (Pérez Cardona y Gómez, 2015).

Para la visualización de los ácidos nucleicos se utilizan colorantes fluorescentes como SYBR Safe (Invitrogen), SYBR Gold (Invitrogen), SYBR Green I (Bio Rad), Vista Green (Bio Rad), Ez visión, Syto60 (Invitrogen), que son menos tóxicos que el bromuro de etidio. Estos colorantes se incorporan en el gel, antes de que se solidifique. El SYBR Safe se une de manera no covalente a los ácidos nucleicos, facilitando observar el ADN mediante luz azul, en un rango de 470 a 530 nm. De este modo, se puede estimar su concentración al compararlo con patrones de peso molecular conocidos (Pérez Cardona y Gómez, 2015).

### 3.5. Secuenciación de ADN e identificación taxonómica

La secuenciación de Sanger, también denominado como método por terminación de cadena, es aquel que permite conocer la secuencia de bases nitrogenadas que conforman la cadena de ADN. El método, desarrollado por el bioquímico británico Frederick Sanger en 1975, se basa en la síntesis enzimática de ADN usando una ADN polimerasa con nucleótidos modificados, dideoxynucleótidos trifosfato (ddNTPs), cada uno marcado con pigmentos diferentes. Los ddNTPs carecen de hidroxilo en el carbono 3' del azúcar, esencial para realizar el enlace fosfodiéster entre los nucleótidos (Valderrama et al., 2020). La ADN polimerasa incorpora bases a una cadena sencilla de ADN; esta reacción se ve interrumpida al incorporar dideoxynucleótido, ya que al no poseer el grupo hidroxilo, no se añaden otras bases, resultando múltiples fragmentos de ADN de diferentes tamaños (Garrigues, 2023).

El objetivo de la secuenciación es determinar el orden de los nucleótidos en un fragmento de ADN. Para ello se necesita de una mezcla con un ADN molde, primer, ADN polimerasa, los cuatro tipos de nucleótidos o deoxynucleótidos (dNTPs) y, en cada una de las reacciones, se añade uno de los ddNTPs marcados con fluorocromo (Valderrama et al., 2020). La mezcla se calienta para desnaturalizar el molde de ADN y separar las cadenas; una vez separadas, la reacción se enfría para que el *primer* se una al molde de la cadena; posteriormente, se sube la temperatura para que la ADN polimerasa pueda sintetizar nuevo ADN, añadiendo nucleótidos a la cadena hasta que sea capaz de incorporar los ddNTPs, deteniéndose al no poder añadir más nucleótidos; así, se crea un fragmento de ADN cuyas cadenas terminan con el nucleótido dideoxi, de esta forma, se generan múltiples fragmentos de ADN de diferentes tamaños,

obteniendo un patrón de bandas que permite leer la secuencia de bases (Reguero Reza, 2014).

El resultado de la reacción debe ser revelado por electroforesis capilar, empleando un voltaje alto para producir la suficiente corriente eléctrica que permita separar los fragmentos de ADN. Los fragmentos de ADN cortos, a diferencia de los fragmentos largos, se movilizan más rápido a través de los poros del gel. A medida que las moléculas pasan por la línea de meta o la ventana de detección, en los capilares al final del tubo, se iluminan con un láser y, los fluorocromos asociados a los fragmentos de ADN, emiten una señal fluorescente. Esta fluorescencia es detectada e interpretada por un software especializado (como SnapeGene), generando un cromatograma que representa la secuencia de ADN (Fuertes-Flores et al., 2018).

Tras obtener las secuencias de ADN, es posible efectuar la identificación taxonómica, utilizando la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI). GenBank forma parte de una colaboración internacional de bases de datos de secuencias de nucleótidos, que brinda información detallada sobre secuencias de ADN. Esta base de datos permite comparar la secuencia de ADN obtenida mediante el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), con las secuencias almacenadas y así identificar la especie en estudio, de manera precisa y confiable.

## Capítulo II

### 4. Materiales y métodos

#### 4.1. Origen de los aislados fungales

El presente trabajo, se realizó a partir de una colección de hongos potencialmente micorrízicos que se encuentran en el orquideario de la Universidad de Cuenca en el campus Balzay. Estos hongos fueron aislados de tres orquídeas epífitas nativas del cantón Gualaceo: *Cyrtochilum* sp., *Pleurothallis* sp., y *Odontoglossum pardinum* en el año 2022. Dichas orquídeas forman parte de la flora del Bosque Protector Aguarongo que se localiza en la parroquia de Jadán (Gualaceo, provincia del Azuay). La temperatura atmosférica de este sitio oscila entre los 11,5 y 12 °C, que permite el óptimo desarrollo de plantas epífitas. Dentro de sus 2082 hectáreas, alberga una gran diversidad de plantas, entre las que destacan nueve especies de la familia Orchidaceae (Duque et al., 2019; Loyola, 2019).

#### 4.2. Subcultivos de hongos potencialmente micorrízicos

En total, se trabajó con 10 cajas Petri que contenían los hongos potencialmente micorrízicos: 3 cajas de aislados la especie de *Cyrtochilum* sp., 2 cajas de aislados de la especie de *Pleurothallis* sp., y 5 cajas de aislados de la especie de *O. pardinum*. Estos hongos fueron repicados en medio Potato Dextrose Agar (PDA), con un pH de 5.6 (Anexo A). El medio se esterilizó a una temperatura de 120 °C y una presión de 0,15 MPa, durante 15 minutos. Los subcultivos se realizaron en condiciones asépticas dentro de la cámara de flujo laminar, cámara que previamente fue expuesta a radiación UV por 15 minutos. Luego de culminado el proceso de siembra, se incubó en la estufa a 35 °C (Anexo A). En el (Anexo B) se observa los códigos asignados por el orquideario a los aislados de los hongos potencialmente micorrízicos.

Para obtener los subcultivos, se trabajó en la cabina de flujo laminar en condiciones asépticas. Empleando un bisturí estéril número 20, se extrajeron muestras de las 10 cajas que contenían los aislados fungales de *Cyrtochilum* sp., *Pleurothallis* sp. y *O. pardinum*; luego, se inocularon en cajas Petri con agar PDA. Con la finalidad de conseguir un respaldo adecuado, se realizó un triplicado de cada caja cultivada, resultando 30 cajas en total. Las muestras se sellaron y se incubaron en la estufa a 37 °C con su respectiva codificación (Tabla 2), para su posterior análisis.

Para el análisis molecular, inicialmente se trabajó con cuatro cajas: dos pertenecían a las especies *O. pardinum* una a la especie *Cyrtochilum* sp., y otra a la especie *Pleurothallis* sp. (Anexo C). En estas cajas, después de ocho días de incubación a 37°C, se evidenció el crecimiento de micelios de coloración blanquecina con bordes irregulares, así como micelios con estrías irregulares de tonos cremosos e incoloros, y otros de color pardo. Para extraer los micelios descritos se trabajó en una cámara de flujo laminar, utilizando un bisturí número 20, cuidando de raspar solo el micelio sin el agar, ya que esto podría interferir con el análisis molecular.

**Tabla 2.**

Códigos asignados para cada tubo de los aislados fungales de las tres especies de orquídeas epífitas.

| Especie de orquídea           | Código de la colonia aislada en 2022 | Código de las colonias para extracción del ADN |
|-------------------------------|--------------------------------------|--|
| <i>Cyrtochilum</i> sp.        | CSP-M1 C                             | CMC  |
|                               | CSP-M6RA                             | A1   |
|                               | CSP-M6R B                            | M6   |
| <i>Odontoglossum pardinum</i> | OS-M1 A                              | A4   |
|                               | OS-M5 B                              | M5   |
|                               | OS- M9 C                             | A3   |
|                               | OS-M3R B                             | A2   |
|                               | OS-M7R C                             | M7   |
| <i>Pleurothallis</i> sp.      | PSP-M9 B                             | M9   |
|                               | PSP-M2 B                             | PMB  |

Nota. Elaboración propia

### 4.3. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de 10 repiques que contenían los hongos en el medio PDA. Una vez obtenidos los micelios en tubos Eppendorf de 1,5 ml, se inició la

extracción, utilizando el kit PureLink® Genomic DNA (Invitrogen), el cual garantiza extracciones de ADN con alto rendimiento y pureza, mediante un procedimiento de lisis celular. El micelio se mezcló con el tampón de digestión junto a 10 perlas de acero y se procedió con una lisis mecánica utilizando un molino (Retsch MM400). A partir de este punto, se siguieron las indicaciones restantes según lo establecido por el fabricante. Las muestras de ADN fueron conservadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para su posterior amplificación mediante PCR.

#### 4.3.1. Electroforesis de ADN

Para determinar la calidad del ADN, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1,2 % p/v, al que se añadieron 4  $\mu\text{L}$  de Sybr Safe (Invitrogen) por cada 50 mL de TAE 1X. De cada una de las muestras de ADN genómico se cargaron 4  $\mu\text{L}$  y se mezclaron con 1  $\mu\text{L}$  del reactivo Blue Juice (Invitrogen), para visualizar su posición en el gel. Las muestras se colocaron en el gel, junto con el marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen) y se sometieron a electroforesis en una cámara a 300 mA y 110V, durante aproximadamente 45 minutos. Terminada la corrida del gel, para poder apreciar la calidad del ADN extraído de cada hongo, se reveló el gel mediante luz UV; para lo cual se empleó un transiluminador y un foto-documentador (Enduro™ GDS), donde se comparó el tamaño de las bandas obtenidas con las del marcador molecular de peso.

#### 4.3.2. PCR, Reacción en Cadena de la Polimerasa

Para la amplificación de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 y parte de la región 28S rADN se aplicaron los primers universales para eucariotas ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') / ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC) y los primers NL-1 (5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAA AG 3') / NL-4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3'), respectivamente. Al aplicar los primers NL se reforzó la identificación genotípica de los hongos en estudio y se aseguraron los resultados obtenidos.

Para realizar la reacción de PCR, se utilizaron tubos de 0,2 mL donde se mezclaron los siguientes componentes: 25  $\mu\text{L}$  de Dream Taq Green (Master Mix), 2,5  $\mu\text{L}$  del cebador ITS1 Forward, 2,5  $\mu\text{L}$  del cebador ITS4 Reverse, 5  $\mu\text{L}$  de ADN y 15  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas. Esto dio como resultado un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ . Se llevó a cabo el mismo procedimiento con los cebadores NL, incluyendo también un control blanco para los cebadores NL e ITS. En total, se obtuvieron 10 productos utilizando los cebadores NL y

10 productos utilizando los cebadores ITS, junto con sus respectivos controles en blanco.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador (MiniAmp Plus, Applied Biosystem), con el siguiente programa para la desnaturalización inicial se comenzó con una temperatura de 94 °C por cinco minutos; 35 ciclos, cada uno incluyendo una desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, un anillamiento a 57.4 °C por 45 segundos, una extensión inicial a 72 °C por 45 segundos; y para terminar se aplicó una extensión final a 72 °C por siete minutos.

Los productos obtenidos del PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa, como se menciona en la sección 4.5.1. A diferencia del procedimiento anterior, en este caso de PCR ya no se colocó el reactivo de Blue Juice (Invitrogen) para teñir las muestras, porque ya presentaron coloración debido al reactivo Dream Taq Green (Master Mix).

#### **4.3.3. Purificación del producto de PCR**

Para purificar el ADN del producto de PCR, se utilizó el KIT Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Se midió el volumen del producto final de PCR, obteniendo un total de 50 µL en cada una de las muestras, tanto de NL como de ITS. A los 50 µL de la muestra de PCR se le añadieron 50 µL de nucleasa free wáter (Invitrogen), lo que resultó en un volumen total de 100 µL; y, se procedió a seguir todos los pasos descritos en el kit. El producto final purificado, se conservó en tubos Eppendorf de 1,5 ml a una temperatura de -20 °C. Posteriormente, se realizó una electroforesis para confirmar que se había realizado una buena purificación, siguiendo los pasos descritos en la sección 4.5.1. Una vez que se observaron las bandas de ADN, en el gel de agarosa mediante el foto-documentador, se aseguró que el proceso de purificación se había llevado a cabo correctamente, y se procedió con la cuantificación.

Para esto se añadió 1 µL de ADN junto con 3 µL de Buffer de Elution, y se realizó la lectura en el lector de microplacas EPOCH (Biotek), el cual permitió la cuantificación de ADN a través de la medición de la absorbancia a 260 nm.

Respecto a la cuantificación se determina la pureza de las muestras por medio de la relación de absorbancia a 260/280 (ADN/proteínas). Una relación mayor a 2.1 indica contaminación del ADN con ARN y una relación menor indica contaminación con

proteínas considerando que las proteínas y el fenol se absorben a 280 nm, mientras que los ácidos nucleicos se absorben a 260nm.

#### 4.3.4. Secuenciación y análisis de secuencias

Para su secuenciación, los productos obtenidos de la purificación de la PCR fueron enviados a la empresa MacroGen, en Corea del sur (<https://dna.macrogen.com/>). Siguiendo la guía de preparación de muestras para el servicio de secuenciación de Sanger, se añadió un volumen final de 15 µL de muestra, a una concentración de 60 ng/µL en cada tubo Eppendorf de 1,5 mL. Considerando que el ADN contiene dos hebras, una “Forward” y otra “Reverse”, se enviaron dos tubos de 15 µL para la secuenciación de cada muestra, lo que resultó en un total de 40 tubos, es decir, 20 tubos para los productos de PCR obtenidos con los primers ITS y 20 tubos para los productos obtenidos con los primers NL.

#### Análisis de secuencias

Luego de que todos los fragmentos fueron secuenciados, se accedió al programa PRABI-Doua, CAP3 Sequence Assembly Program (<https://doua.prabi.fr/software/cap3>) para ensamblar las secuencias “Forward” y “Reverse” de cada muestra. Una vez obtenidas las secuencias alineadas, se ingresó a la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI), para compararlas con las secuencias de ADN disponibles públicamente en el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Mediante la herramienta bioinformática BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se analizó cada una de las secuencias para su asignación taxonómica.

Los datos obtenidos se organizaron con ayuda del software Microsoft Excel®, donde se incluyó el nombre de la secuencia, la secuencia Forward y Reverse junto con sus CONTIGS, el porcentaje de identidad y su cantidad de GAP, para una mejor identificación y entendimiento.

## Capítulo III

## 5. Resultados

## 5.1. Repiques de especímenes de hongos potencialmente micorrízicos

Se trabajó con 10 hongos obtenidos del orquideario de la Universidad de Cuenca, los cuales fueron aislados en el año 2022 de tres orquídeas epífitas nativas del cantón Gualaceo, provincia del Azuay. En la Tabla 3 se observa el total de cajas obtenidas de los aislados fungales de cada especie durante el tiempo de estudio y en el (Anexo C) se describen sus características macroscópicas.

**Tabla 3.**

*Repiques de aislados fungales obtenidos de raíces de orquídeas *Cyrtochilum* sp., *Pleurothallis* sp., y *O. pardinum**

| Código del aislado Fungal | Orquídea de origen y sección de la raíz           | Número de cajas en total obtenidas |
|---------------------------|---|------------------------------------|
| CSP-M6R A                 | <i>Cyrtochilum</i> sp.; Raíz 6, sección A         | 3                                  |
| OS-M3R B                  | <i>Odontoglossum pardinum</i> ; Raíz 3, sección B | 3                                  |
| OS-M9 C                   | <i>Odontoglossum pardinum</i> ; Raíz 9, sección C | 3                                  |
| OS-M1 A                   | <i>Odontoglossum pardinum</i> ; Raíz 1, sección A | 7                                  |
| CSP-M6R B                 | <i>Cyrtochilum</i> sp.; Raíz 6, sección B         | 6                                  |
| OS-M7R C                  | <i>Odontoglossum pardinum</i> ; Raíz 7, sección C | 1                                  |
| PSP-M9 B                  | <i>Pleurothallis</i> sp.; Raíz 9, sección B       | 5                                  |



|          |  |    |
|----------|--|----|
| OS-M5B   | <i>Odontoglossum pardinum</i> ;<br>Raíz 5, sección B | 1  |
| PMP-M2-B | <i>Pleurothallis</i> sp.; Raíz 2,<br>sección B       | 4  |
| CMP-M1 C | <i>Cyrtorchilum</i> sp.; Raíz 1,<br>sección C        | 18 |

Nota. Elaboración propia

## 5.2. Identificación Molecular

### 5.2.1. Extracción de ADN y verificación del ADN fúngico

El ADN fúngico fue extraído siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.3, y permitió obtener ADN con un tamaño aproximado de 15000 pb. La integridad del ADN extraído se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa, confirmando la calidad de la extracción al observar las bandas de ADN, como se muestra en la Figura 2. Estas bandas de ADN sirvieron como base para su posterior amplificación mediante PCR.

A cada muestra de ADN se le asignó un número de acuerdo al orden en el que fueron colocados en los diferentes carriles del gel de agarosa (Tabla 4).

#### Tabla 4.

Designación numérica por carril de las muestras de ADN fúngico provenientes de las tres especies de orquídeas del cantón Gualaceo.

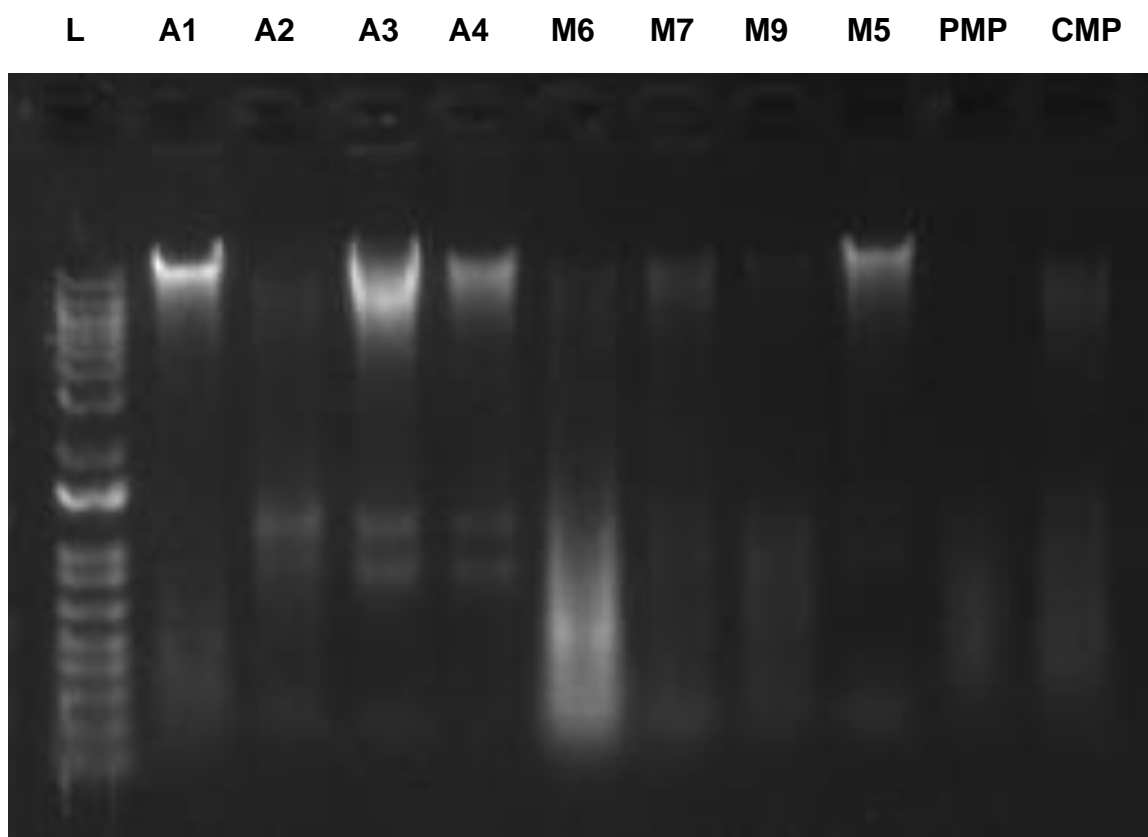
| Código del aislado fungal | Código del ADN fúngico | Orquídea de origen y sección de la raíz              |
|---------------------------|------------------------|--|
| CSP-M6R A                 | A1                     | <i>Cyrtorchilum</i> sp.; Raíz 6, sección A           |
| OS-M3R B                  | A2                     | <i>Odontoglossum pardinum</i> ;<br>Raíz 3, sección B |
| OS-M9 C                   | A3                     | <i>Odontoglossum pardinum</i> ;<br>Raíz 9, sección C |
| OS-M1 A                   | A4                     | <i>Odontoglossum pardinum</i> ;<br>Raíz 1, sección A |
| CSP-M6R B                 | M6                     | <i>Cyrtorchilum</i> sp.; Raíz 6, sección B           |

|          |     |  |
|----------|-----|--|
| OS-M7R C | M7  | <i>Odontoglossum pardinum</i> ;<br>Raíz 7, sección C |
| PSP-M9 B | M9  | <i>Pleurothallis</i> sp.; Raíz 9,<br>sección B       |
| OS-M5B   | M5  | <i>Odontoglossum pardinum</i> ;<br>Raíz 5, sección B |
| PMP-M2-B | PMP | <i>Pleurothallis</i> sp.; Raíz 2,<br>sección B       |
| CMP-M1 C | CMP | <i>Cyrtochilum</i> sp.; Raíz 1,<br>sección C         |

Nota. Elaboración propia

**Figura 2**

Electroforesis en gel de agarosa de los 10 aislados fungales de *Cyrtochilum* sp., *Pleurothallis* sp. y *O. pardinum*, según su designación numérica en cada carril, como se muestra en la Tabla 4.



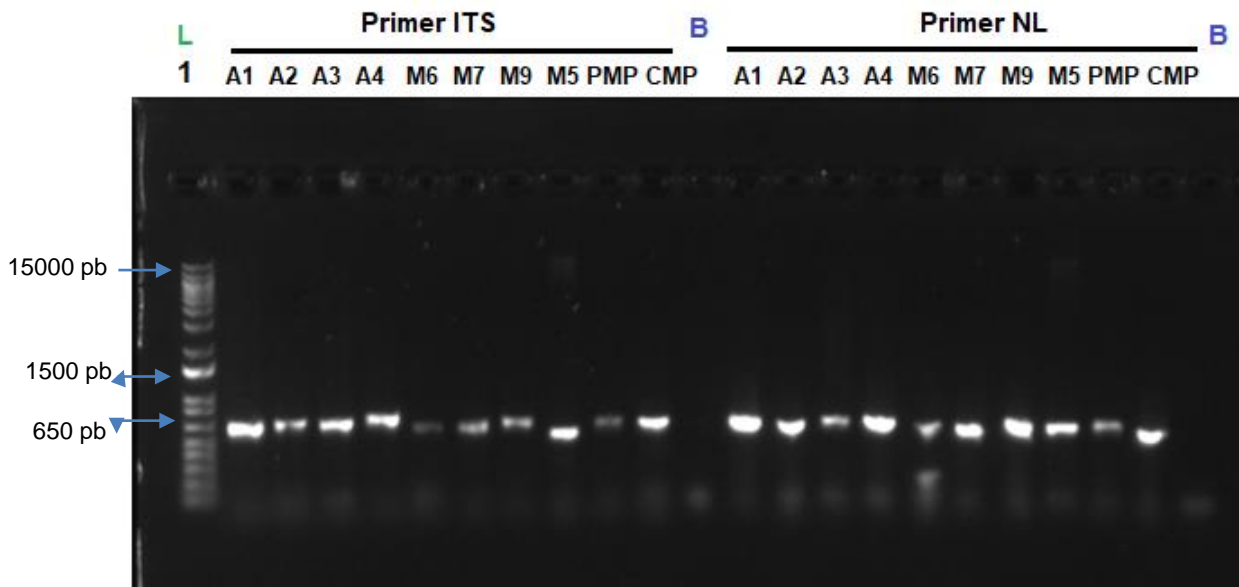
Nota. Elaboración propia

**5.2.2. Amplificación de las regiones ITS y NL mediante la técnica de PCR**

Para la amplificación mediante PCR se utilizaron las parejas de primers ITS1 /ITS4 y NL1 / NL4 junto con el ADN molde descrito en la sección anterior. Mediante los primers ITS1-ITS4 se comprobó la amplificación del ADN, apreciando bandas de 600 a 650 pb. Estos resultados se reforzaron utilizando los primers NL1-NL4, los cuales generaron fragmentos de ADN de tamaño similar a los obtenidos con los cebadores ITS

**Figura 3**

*Electroforesis de la amplificación de los productos de PCR junto con sus primers ITS y NL de los aislados fungales. A cada producto de PCR se le asignó un número de acuerdo al orden en el que fueron colocados en los carriles del gel de agarosa.*



Nota. Elaboración propia

Se lograron buenos resultados utilizando los primers ITS y NL, ya que fue posible amplificar todas las muestras. En todos los carriles se observaron bandas, tanto en las tres muestras de *Cyrtoschilum* sp., como en las cinco muestras de la especie *O. pardinum* y en las dos muestras de *Pleurothallis* sp. .

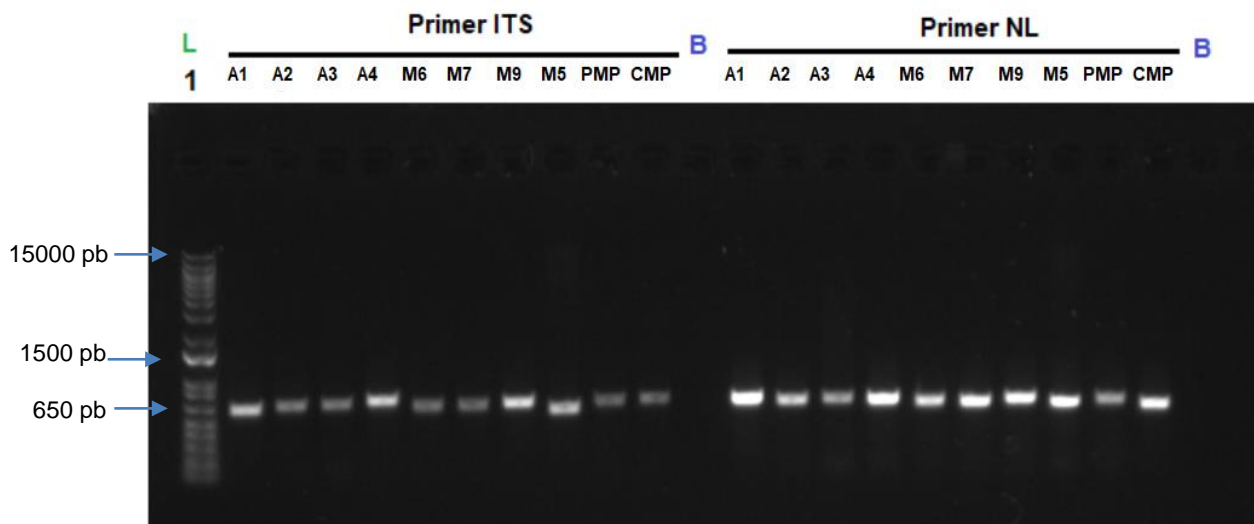
**5.2.3. Purificación y cuantificación de los productos de PCR**

La purificación de los productos de PCR se realizó para eliminar cualquier compuesto que pudiera interferir en el análisis de las secuencias. Para ello, se siguieron los pasos descritos en la sección 4.3.3. Posteriormente, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1,2 %, para verificar el éxito del proceso de purificación y obtener bandas

claras de los productos de PCR, junto con los cebadores ITS y NL, tal como se muestra en la Figura 4.

### Figura 4

Electroforesis de la purificación de los productos de PCR juntos con sus primers ITS y NL de los aislados fungales. A cada producto de PCR se le asignó un número.



Nota. Elaboración propia

Las 10 muestras de PCR (10 provenientes de la amplificación con los primers ITS y 10 de la amplificación con primers NL), fueron evaluadas en el lector de microplacas EPOCH de Biotek. En la Tabla 5 se muestran los valores para los amplicones obtenidos con los primers ITS, los cuales se encuentran por debajo de la relación 2,1 (260/280).

### Tabla 5

Cuantificación de los primers ITS y NL en las 20 muestras fungales de las especies *O. pardinum*, *Cyrtochilum sp* y *Pleurothallis sp*.

| Código del ADN fúngico | Well ID          | Primer ITS             | Primer NL              |
|------------------------|------------------|------------------------|------------------------|
| A1                     | 260/280<br>ng/μL | 1,90<br><b>60,414</b>  | 1,887<br><b>64,407</b> |
| A2                     | 260/280<br>ng/μL | 1,940<br><b>56,487</b> | 1,855<br><b>68,907</b> |
| A3                     | 260/280<br>ng/μL | 1,91<br><b>51,573</b>  | 1,93<br><b>52,152</b>  |
| A4                     | 260/280<br>ng/μL | 1,861<br><b>50,394</b> | 1,894<br><b>102,21</b> |

|     |                        |                        |                        |
|-----|------------------------|------------------------|------------------------|
| M5  | 260/280<br>ng/ $\mu$ L | 2,156<br><b>53,253</b> | 1,996<br><b>69,813</b> |
| M6  | 260/280<br>ng/ $\mu$ L | 2,246<br><b>43,854</b> | 1,94<br><b>76,986</b>  |
| M7  | 260/280<br>ng/ $\mu$ L | 1,953<br><b>44,847</b> | 1,931<br><b>64,506</b> |
| M9  | 260/280<br>ng/ $\mu$ L | 1,915<br><b>51,612</b> | 1,908<br><b>66,582</b> |
| PSP | 260/280<br>ng/ $\mu$ L | 1,946<br><b>48,747</b> | 1,931<br><b>68,199</b> |
| CSP | 260/280<br>ng/ $\mu$ L | 1,912<br><b>53,094</b> | 1,923<br><b>64,692</b> |

Nota. Elaboración propia

#### 5.2.4. Análisis de la secuencias obtenidas

Se alinearon las secuencias obtenidas de las 20 muestras fungales, 10 con los primers ITS y 10 con los primers NL, utilizando la base de datos universal GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y la herramienta bioinformática BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Anexo E). Posteriormente, se analizó su designación taxonómica, en la que se obtuvo los siguientes resultados (Tabla 6).

**Tabla 6**

Identificación taxonómica de los hongos aislados de las especies de orquídeas *Cyrtochilum* sp., *Pleurothallis* sp., y *Odontoglossum pardinum* junto con los primers ITS y NL.

| Especie de Orquídea                              | Código | Primers ITS                   |     |       | Primers NL |                                 |     |     |         |
|--|--------|-------------------------------|-----|-------|------------|---------------------------------|-----|-----|---------|
|  |        | Tipo de hongo identificado    | %ID | GAP % | E-value    | Tipo de hongo identificado      | %ID | GAP | E-value |
| <i>Cyrtochilum</i> sp.<br><b>CSP-M6R A</b>       | A1     | <i>Trametes hirsuta</i>       | 99  | 0     | 0,0        | <i>Trametes hirsuta</i>         | 99  | 0   | 0,0     |
| <i>Odontoglossum pardinum</i><br><b>OS-M3R B</b> | A2     | <i>Ceratobasidium</i>         | 95  | 0     | 0,0        | <i>Ceratobasidiaceae</i><br>sp. | 99  | 0   | 0,0     |
| <i>Odontoglossum pardinum</i><br><b>OS-M9 C</b>  | A3     | <i>Psathyrella coprophila</i> | 99  | 0     | 0,0        | <i>Psathyrella coprophila</i>   | 99  | 0   | 0,0     |
| <i>Odontoglossum pardinum</i><br><b>OS-M1 A</b>  | A4     | <i>Coprinellus</i> sp.        | 99  | 0     | 0,0        | <i>Coprinellus</i> sp.          | 100 | 0   | 0,0     |
| <i>Odontoglossum pardinum</i><br><b>OS-M5B</b>   | M5     | <i>Elaphocordyceps</i><br>sp. | 98  | 0     | 0,0        | <i>Elaphocordyceps</i><br>sp.   | 98  | 0   | 0,0     |
| <i>Cyrtochilum</i> sp.<br><b>CSP-M6R B</b>       | M6     | <i>Trametes</i> sp.           | 99  | 0     | 0,0        | <i>Trametes</i> sp.             | 100 | 0   | 0,0     |
| <i>Odontoglossum pardinum</i><br><b>OS-M7R C</b> | M7     | <i>Metapochonia bulbilosa</i> | 97  | 3     | 0,0        | <i>Metapochonia goniodes</i>    | 100 | 0   | 0,0     |
| <i>Pleurothallis</i> sp.<br><b>PSP-M9 B</b>      | M9     | <i>Phlebia acerina</i>        | 99  | 0     | 0,0        | <i>Phlebia rufa</i>             | 100 | 0   | 0,0     |
| <i>Pleurothallis</i> sp.<br><b>PMP-M2-B</b>      | PMB    | <i>Schizophyllum commune</i>  | 99  | 0     | 0,0        | <i>Schizophyllum commune</i>    | 100 | 0   | 0,0     |
| <i>Cyrtochilum</i> sp.<br><b>CMP-M1 C</b>        | CMP    | <i>Virgaria</i> sp.           | 95  | 4     | 0,0        | <i>Virgaria nigra</i>           | 99  | 0   | 0,0     |

Nota. Elaboración propia

El ID: porcentaje de identidad; GAP: alineamiento de las secuencias cuando existe una delección o inserción; E-value: probabilidad de que los alineamientos sean por azar.

## Secuencias de productos de PCR, obtenidos con Primers ITS y NL.

### Secuencia: Producto de PCR obtenido con el primer ITS1/ITS4

TTATGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTTGAGATCAGATCATAA  
 AGTATTTGTCTAATTTAATAGACTGTTTGAAGCGGTTTCATCCGCAATCCCGGCCAC  
 CTTTTTACGGGTGTCCTCAGCGAGTGATACTTATCACGCCGAGTGGAACCGAGT  
 TACTGAGATCCAGCTAATGCATTTAGGAGGAGCAGACGTGAATCTGCAGACCTC  
 CAAGTCCAAAACAAAGTCGACCGAGTTAACAAAAGACTTGCTTTGATAATTTTCATG  
 AACTCAAACAGGCATGCTCCAAGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAG  
 ATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTC  
 TTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAACTTAGTTTATAGATGCGTT  
 ACATCAATTACATTCAGTTTAAAATATATGAGTTTATGTATTGGCAGACGAAACCCC  
 TCCTCTCGCGAAAGAGAAAGACCTCCGTCTCACAAGTGACAGGTGTGTGTGGAT  
 GAAAGAGAAGGCGTGACATGCCTCGGTGAAGAGGCCAGCGACAACCAACTCTA  
 CATTCAATCAATAATGATCCTTCCGCGT

En la Figura 5 se describe la secuencia de la muestra (A2) con los primers ITS, perteneciente a la especie *O. pardinum*; raíz 3, sección B alineada con la base de datos universal GenBank; mostró un porcentaje de identificación del 99 %, para el género *Ceratobasidium* sp., el cual es un hongo micorrízico que pertenece al género-forma *Rhizoctonia*.

### Figura 5

Alineamiento de la secuencia de la muestra (A2) *Odontoglossum pardinum*; Raíz 3, sección B junto con los primers ITS en la base de datos Gen-Bank.

| Description  | Scientific Name                     | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident |
|--|-------------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|
| <a href="#">Uncultured Ceratobasidium clone Am Cer-6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...</a>    | <a href="#">uncultured Cerat...</a> | 996       | 996         | 99%         | 0.0     | 94.84%     |
| <a href="#">Ceratobasidium sp. clone G73 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1...</a>    | <a href="#">Ceratobasidium sp.</a>  | 990       | 990         | 99%         | 0.0     | 93.58%     |
| <a href="#">Ceratobasidium sp. isolate SP1C internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, compl...</a>   | <a href="#">Ceratobasidium sp.</a>  | 977       | 977         | 93%         | 0.0     | 96.17%     |
| <a href="#">Ceratobasidium sp. isolate pb2s3e small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...</a> | <a href="#">Ceratobasidium sp.</a>  | 977       | 977         | 93%         | 0.0     | 96.17%     |
| <a href="#">Ceratobasidium sp. isolate pb2s2h small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...</a> | <a href="#">Ceratobasidium sp.</a>  | 977       | 1163        | 93%         | 0.0     | 96.17%     |
| <a href="#">Ceratobasidium sp. F10 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal tra...</a>  | <a href="#">Ceratobasidium s...</a> | 965       | 965         | 95%         | 0.0     | 94.87%     |

Nota. Elaboración propia

## Secuencia: Producto de PCR obtenido con el primer NL1/NL4

ATACGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGA  
 AGAGCTCAAATTTAAAATCTGGCGGTGATTCCGTCCGAGTTGTAGTCTAGAGAAG  
 CATCATCCGCGCCGGACCATGTACAAGTCTCTTGGAACAGAGCGTCATAGAGGGT  
 GAGAATCCCGTCCTTGACATGGACTCCCGGTGCTTTGTGTTGTGCTCTCAACGAG  
 TCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAA  
 TATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACT  
 TTGGAGAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAATGGAAACGATTGAAGTCA  
 GTCGCGTTCTCTGGGATTCAGCCTTGCTTATGCTTGGTGCATTTCTAGTCTACGG  
 GCCAGCATGGATTTGACCGTTGGAAAAGGGCTGGGGGAATGTGGCACCTTCGG  
 GTGTGTTATAGCCCCTTGTCGCATGCATCGGTTGGGATCGAGGACCTCAGTGCAC  
 GCTTCGGTTGTGCTTTGATGCTGGCGTAATGGCTTTAAACGACCCGTCTTGA

En la Figura 6 se describe la secuencia de la muestra (A2) con los primers NL, pertenecientes a la especie *Odontoglossum pardinum*; raíz 3, sección B alineadas con la base de datos universal mostró así mismo un porcentaje del 99% de identificación para el género *Ceratobasidium* sp. que, junto con los primers ITS, permitió reforzar su identificación genotípica.

### Figura 6

Alineamiento de la secuencia de la muestra (A2) *Odontoglossum pardinum*; Raíz 3, sección B junto con los primers NL en la base de datos Gen-Bank.

| Descripción   | Nombre científico                   | Maximo puntaje | Puntaje total | Cubierta de consulta | valor E | Por. Identificador | Cuenta Len |
|---|-------------------------------------|----------------|---------------|----------------------|---------|--------------------|------------|
| <a href="#">Ceratobasidiaceae sp. aislado pff14.2-ITS88 gen de ARN ribosomal 5.8S, secuencia parcial; espaci...</a> | <a href="#">Ceratobasidiac...</a>   | 1092           | 1092          | 99%                  | 0.0     | 99,34%             | 1114       |
| <a href="#">Cultivo de rizodes de Ceratorhiza CBS:321.68 cepa CBS 321.68 gen de ARN ribosomal de subunid...</a>     | <a href="#">rizodes de Cera...</a>  | 1086           | 1086          | 99%                  | 0.0     | 99,17%             | 917        |
| <a href="#">Cultivo de rizodes de Ceratorhiza CBS:126.13 cepa CBS 126.13 gen de ARN ribosomal de subunid...</a>     | <a href="#">rizodes de Cera...</a>  | 1086           | 1086          | 99%                  | 0.0     | 99,17%             | 917        |
| <a href="#">Clon de hongo no cultivado B02C06 gen de ARN ribosomal 28S, secuencia parcial</a>                       | <a href="#">hongo no cultiv...</a>  | 1086           | 1086          | 99%                  | 0.0     | 99,17%             | 638        |
| <a href="#">Clon de hongo sin cultivar BOTU012 espaciador interno transcrito 2, secuencia parcial</a>               | <a href="#">hongo no cultiv...</a>  | 1086           | 1086          | 99%                  | 0.0     | 99,17%             | 1011       |
| <a href="#">Cultivo de Rhizoctonia alpina CBS:309.35 cepa CBS 309.35 gen de ARN ribosomal de subunidad.gr...</a>    | <a href="#">Rhizoctonia alpi...</a> | 1085           | 1085          | 99%                  | 0.0     | 99,17%             | 918        |

Nota. Elaboración propia

La secuencia con el código OS-M3R B, correspondiente a *O. pardinum*, aislada de la réplica de la raíz 3, sección B, se identificó como el género *Ceratobasidium* sp. Se identifica como el único hongo micorrízico; este tipo de hongo genera una relación simbiote que se establece en las orquídeas, permitiendo así la posibilidad de germinación (López et al., 2019).



Las secuencias con el código CSP-M6R A, correspondiente a *Cyrtochilum* sp., aislada de la réplica de la raíz 6, sección A, se identificó como la especie *Trametes hirsuta*; es un patógeno vegetal, que se encuentra en la madera muerta (Hernández Calderón, 2018).

Las secuencias de la especie *O. pardinum*, codificada como OS-M9 C, aislada de la raíz 9, sección C, se identificó como la especie *Psathyrella coprophila*. Este hongo se encuentra sobre los excrementos equinos (caballo, asno, mula), prados húmedos por la lluvia o riego, caracterizándose por ser tóxica, pero no alucinógena (Heykoop et al., 2017).

El análisis de las secuencias codificadas como OS-M1 A, de la especie *O. pardinum*, aislada de la raíz 1, sección A, se identificó como la especie *Coprinellus* sp. Este hongo crece en grupos cerca o sobre tocones de madera en descomposición o en las raíces subterráneas de los árboles; las setas son comestibles, antes de que las láminas se ennegrezcan y disuelvan (Hussain et al., 2018).

Para la identificación molecular de la cepa fúngica de la especie *O. pardinum*, con codificación OS-M5B y aislada de la raíz 5, sección media B, se identificó como la especie *Elaphocordyceps* sp. Dicho hongo se encuentra dentro del grupo de los *Cordyceps* spp., los que se caracterizan por ser hiperparásitos de hongos de *Elaphomyces* spp. (González Reyes, 2014).

Tras la caracterización de CSP-M6R B, equivalente con la cepa fúngica de *Cyrtochilum* sp., la cual fue aislada de la réplica de la raíz 6, sección media B; se identificó como la especie *Trametes* sp. Este hongo saprófito, se desarrolla en bosques templados sobre madera muerta (Rojas Franco et al., 2015).

Respecto a la cepa fúngica OS-M7R C, especie *O. pardinum*, aislada de la réplica de la raíz 7, sección C, en su identificación molecular se reportaron las especies *Metapochonia bulbillosa* y *Metapochonia gonoides*. Estas dos especies de hongos son entomopatogénicos, localizadas en el suelo y rizosferas de diferentes variedades vegetales (González Pimentel, 2019).

En la identificación molecular de la cepa *Pleurothallis* sp., codificada como PSP-M9 B y aislada de la raíz 9, sección B; se identificó las especies *Phlebia acerina* y *Phlebia rufa*. Ambas especies de hongos son patógenos vegetales, que pudren la madera (Kumar et al., 2018).

Las secuencias con el código CMP-M1C, correspondiente a *Cyrtochilum* sp., aislada de la raíz 1, sección C, se identificó como la especie *Virgaria* sp.; es un patógeno vegetal, que se encuentra en la madera muerta (Hernández Calderón, 2018).

Los porcentajes de identificación molecular de la cepa de *Pleurothallis* sp., con código PMP-M2-B, la misma que aislada de la raíz 9, sección B; se identificó como la especie *Schizophyllum commune*. Esta especie de hongo descompone la madera de los árboles, después de las temporadas de lluvia (Mahajam, 2022).

## Capítulo IV

### 6. Discusión

En el presente estudio, se aplicaron técnicas moleculares para analizar 10 cepas de hongos potencialmente micorrízicos obtenidas de las especies de orquídeas epífitas *Cyrtorchilum* sp., *Pleurothallis* sp., y *Odontoglossum pardinum*. Se observó que, de las 10 colonias analizadas, solo una de ellas correspondía a un hongo potencialmente micorrízico perteneciente al género *Ceratobasidium* sp. el cual fue aislado de la raíz de la especie *Odontoglossum pardinum*.

Cueva y Moya, (2015) mencionan que el género *Odontoglossum* sp. cuenta con alrededor de 60 especies en Ecuador y son características de entornos fríos o regiones montañosas. Además, Cevallos et al., (2018) señalan que las especies representativas del género *Odontoglossum* sp. habitan en los Andes Ecuatorianos, así como en las zonas montañosas de Colombia y norte de Perú. Un estudio realizado por Beltrán (2010) indicó que el crecimiento de hongos micorrízicos se presenta en mayor cantidad en zonas frías y húmedas principalmente *Ceratobasidium* sp. por lo tanto, se puede concluir que este tipo de hongo micorrízico muestra una mayor afinidad por la especie *Odontoglossum* sp., lo cual concuerda con los datos obtenidos en nuestra investigación.

En el presente estudio, se encontró que el hongo micorrízico colonizó la sección media de la raíz *Odontoglossum pardinum*. Investigaciones previas, como el estudio realizado por Matsumata et al., (2009) determinaron que la mayor colonización de hongos micorrízicos en las raíces de las orquídeas ocurre en los extremos distales radiculares. Por otro lado, la colonización micorrízica en la raíz puede también estar influenciada por la difusión de nutrientes (Bertolini et al. 2014), así como por factores externos variables como la temperatura, humedad, pH también juegan un papel importante (McCormick et al., 2018). Aunque la colonización de la región media de la raíz es menos mencionada en la literatura, se debe tener en cuenta que la distribución y colonización de los hongos micorrízicos puede verse afectada por factores ambientales temporales, como los mencionados anteriormente. Así mismo, Jiménez Peña et al., (2018) menciona que, con el tiempo, estos factores podrían modificar la distribución de la colonización micorrízica alrededor de la raíz, lo que podría llevar a encontrar hongos micorrízicos en otras secciones, como la basal, media y apical.

La especie *Ceratobasidium* sp. ha sido encontrada en climas tropicales como en los países de Colombia, Puerto Rico y Brasil, asociadas con orquídeas neotropicales, lo

que sugiere una amplia diversidad de estos hongos para colonizar diferentes especies de orquídeas (Mosquera et al., 2010, Jacquemyn et al., 2017, Suárez et al., 2016). Li et al., (2021) señalan que en bosques con climas templados, boreales y tropicales hay una mayor cantidad de micorrizas asociadas a las familias *Tulasnellaceae* y *Ceratobasidiaceae*, siendo este último género más dominante en hábitats secos y con mayor resistencia a la sequía.

Además, según las investigaciones de Ercole et al., (2015) confirman que *Ceratobasidium* tiende a dominar en climas fríos, templados y cálidos, lo que indica que las orquídeas están estrechamente relacionadas con la estación y los cambios climáticos. Estos datos respaldan la obtención del hongo micorrízico perteneciente al género *Ceratobasidium* en el área de estudio, que está ubicado en el Bosque Protector Aguarongo, en el cantón Gualaceo. Cabe destacar que la recolección de raíces se llevó a cabo en marzo, correspondiente a una estación lluviosa, la cual favorece el desarrollo de hongos micorrízicos.

Es relevante tener en cuenta que la prevalencia de los hongos micorrízicos en las plantas puede variar según su etapa de desarrollo. Beltrán-Nambo *et al.*, (2018) mencionan que las plantas adultas presentan un grado más alto de micotrofia con hongos micorrízicos, lo que podría influir en la presencia y relación de *Ceratobasidium* con las orquídeas en el área de estudio.

La identificación de hongos micorrízicos es un aspecto crítico para comprender su diversidad y función en los ecosistemas. Sin embargo, Nilsson et al., (2019) mencionan que la identificación tradicional basada en la morfología de las estructuras fúngicas puede ser difícil y a menudo lleva a confusiones entre especies cercanas. Aquí es donde las herramientas moleculares desempeñan un papel clave en la identificación precisa de los hongos micorrízicos. La importancia de las técnicas moleculares ofrece la posibilidad de realizar la identificación taxonómica de una manera más rápida, sensible y confiable, mediante las secuencias de ADN, que a través de estas permite la identificación de microorganismos en estudio.

A través de la utilización de los primers ITS1 - ITS4 y NL 1 - NL4 se logró amplificar con éxito la región ITS del ADN genómico de los productos de PCR de los hongos potencialmente micorrízicos aislados de las especies de orquídeas *Cyrtorchilum* sp., *Pleurothallis* sp., y *Odontoglossum pardinum*. En los geles de agarosa, se observaron bandas con una amplitud aproximada de 600 a 650 pares de bases (pb) para ambos juegos de primers. Cabe mencionar que los primers ITS son reconocidos como

universales y son ampliamente utilizados en la investigación de hongos, considerados como código de barras para la identificación de estos organismos (Schoch et al., 2012). Esto coincide con el estudio realizado por Fuertes y Mallitasing (2018), quienes también encontraron una extensión variable de la región ITS en el rango de 500 a 750 pb, lo que es consistente con nuestras observaciones.

La eficacia de la amplificación con estos primers se demostró claramente en todas las cepas analizadas, con bandas bien definidas. Estos resultados respaldan el uso de los primers ITS1-ITS4 y NL1-NL4 como herramienta confiable para la amplificación e identificación de especies de orquídeas. La combinación de primers ITS1 - ITS4 con NL1 - NL 4 permite la amplificación de las regiones ITS-5.8S-ITS2 y 28S, estas regiones son las más usadas en el análisis filogenéticos, aportando información suficiente para clasificar tanto entre género y especie. Schoch et al., (2012), de esta forma existe mayor posibilidad de identificar de una forma más verídica los aislados fungales.

El análisis de las secuencias fue realizado mediante la base de datos GenBank, obteniendo porcentajes de identidad del 99 a 100% de especies descritas para cada una de las cepas. Esta base de datos permite la identificación rápida del linaje de los hongos al comparar con cepas que se encuentran dentro de esta base. Un porcentaje de identidad igual o superior de 99% permite establecer su clasificación taxonómica a nivel de especie. Estos valores fueron considerados correctos de acuerdo con Paredes & Yugi (2016), quienes mencionan que los parámetros aceptados para verificar la especie de un microorganismo se encuentran en el rango del 97 a 100% de identidad.

En Ecuador se han analizado hongos presentes en raíces de orquídeas, logrando identificar con éxito aproximadamente 50 unidades taxonómicas operacionales (OTUs) de hongos micorrízicos, incluyendo el género *Ceratobasidium* sp. Para la amplificación de la región ITS y 28S y, a partir de los resultados obtenidos por PCR, realizaron un análisis BLAST binarios en el servidor NCBI, determinando las especies de los hongos micorrízicos; las orquídeas de donde se aislaron los hongos pertenecen al Sur Tropical y Andes Ecuatoriano (Novotná et al., 2018). Existen múltiples estudios en el Ecuador sobre el uso de herramientas moleculares que han permitido identificar hongos micorrízicos comunes de orquídeas como Tulasnellaceae y Ceratobasidiaceae (Suárez et al., 2016, Flores y Quishpe, 2018, Novotná et al., 2018, López et al., 2019 ).

Existe un estudio realizado en la Universidad de California, en donde Marshall et al., (2003) mencionan el uso de primers NL para el análisis en la comunidad microbiana mediante PCR y electroforesis en gel, obteniendo buenos resultados tras la obtención

de bandas claras para cada cultivo puro que se usó. Con respecto, al empleo de primer NL para la identificación de hongos micorrízicos, no se han reportado estudios previos que emplean esta técnica en el territorio ecuatoriano tras búsquedas exhaustivas en distintos idiomas y algunas bases de datos no se han reportado datos con anterioridad.

Uno de los hallazgos significativos de nuestro estudio es la identificación del grupo Ceratobasidiaceae en la especie de orquídea *Odontoglossum pardinu*. Existen datos muy escasos sobre la asociación de *Ceratobasidium* con *O. pardinum* en Ecuador. Un estudio previo realizado por Guzmán Salinas y Moreno Coronado,(2014) menciona que para *O. pardinum* se obtuvieron cinco OTUs pertenecientes a Tulasnellaceae, Ceratobasidiaceae y Ascomycota, sugiriendo una cierta preferencia *Ceratobasidium* por *O. pardinum*, lo cual concuerda con nuestros resultados.

Nuestro estudio contribuye con nuevos conocimientos sobre la identificación de hongos micorrízicos en especies de orquídeas en Ecuador utilizando los primers NL, como herramienta complementaria a la clásica región ITS, permitiendo una mejor identificación con mayor exactitud sobre su estructura genética y población fungica

Los resultados obtenidos, especialmente la identificación de Ceratobasidiaceae en *O. pardinum*, aportan información sobre la microbiota que se encuentra asociada a estas raíces, que servirá como herramienta para estudios posteriores sobre la conservación de orquídeas nativas mediante estas asociaciones micorrícicas que permitirán promover, mejorar y preservar especies únicas de nuestra región.

## Capítulo V

### 7. Conclusiones

A partir de los aislados fungales de la orquídea *O. pardinum*, se obtuvo el hongo micorrízico *Ceratobasidium* sp. a partir de la sección media (B). Por lo general, la colonización de las micorrizas ocurre en los extremos de las raíces, pero existen ciertos factores ambientales que pueden alterar la distribución de la colonización micorrízica alrededor de la raíz.

Se obtuvo una alta concentración de ADN genómico al aplicar el Kit PureLink® Genomic DNA (Invitrogen), con las modificaciones pertinentes se obtuvo ADN genómico en buena calidad y cantidad. En cuanto con los productos de PCR obtenidos con los primers ITS y NL también se consiguió la concentración adecuada para su secuenciación, además que se observó una relación correcta de la relación  $A_{260}/A_{280} = 2,1$ , lo cual se encuentra dentro de los valores normales para determinar ADN de buena calidad.

La combinación de los primers universales ITS junto con cebadores específicos como los NL mostró buenos resultados para la identificación de hongos potencialmente micorrízicos. La filogenia molecular de las secuencias obtenidas permitió identificar el género *Ceratobasidium* sp. alcanzando un porcentaje de identificación del 99%. Sin embargo, también se observó la amplificación de secuencias de contaminantes y hongos no micorrízicos, que ocasionalmente colonizan las raíces de las orquídeas durante cierto periodo de tiempo, debido a su mejor adaptabilidad ecológica que facilita su distribución.

Este estudio contribuye con nuevos conocimientos sobre la identificación de hongos micorrízicos en especies de orquídeas en Ecuador, utilizando los primers NL como herramienta de confirmación de los primers ITS para la identificación de hongos micorrízicos, en este caso para la identificación de Ceratobasidiaceae a partir de la especie de orquídea *O. pardinum*.

## Capítulo VI

### 8. Recomendaciones

Se sugiere emplear técnicas moleculares adicionales para amplificar regiones específicas del ADN, lo que permitiría una identificación más precisa de hongos micorrízicos y brindaría información más detallada sobre los tipos de micorrizas presentes en nuestro país.

Es recomendable explorar otros cebadores específicos, ya que existen cebadores diseñados para identificar ciertas especies particulares de hongos micorrízicos, lo que podría mejorar la especificidad de las identificaciones.

Además, se sugiere continuar con investigaciones adicionales sobre hongos potencialmente micorrízicos en diferentes estaciones del año en la misma zona donde se recolectaron las raíces. Esto permitiría verificar si el clima tiene algún efecto en el desarrollo de estos hongos y proporcionaría una visión más completa de su distribución.



## Capítulo VII

## 9. Referencias

- Aguirre Medina, J. F. (2022). Endomicorriza: Su aplicación en la agricultura. *Agro-Divulgación*, 2(1), pp. 43-45.
- Akhtar M. y Siddiqui Z. 2008. Arbuscular mycorrhizal fungi as potential bioprotectants against plant pathogens. *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*, 61-97.
- Alghamdi, S. A. (2018). Influence of mycorrhizal fungi on seed germination and growth interrestrial and epiphytic orchid. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26, pp. 495-502.
- Alvarado, J., Katya Romoleroux, M., Zapata, N., Cevallos, D., Yela, H., Lou Jost, & Tobar, F. (2020). Nuevo registro, redescubrimiento y notas taxonómicas de Orchidaceae de Ecuador. *Neotropical Biodiversity*, 6(1), pp. 88-97.
- Arancibia, R., Flores, M. E., Cabrera, T., Sánchez Beiza, J. & Obando, J. (2022). Evaluación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la rehabilitación ecológica de ecosistemas con actividad minera. *Ecosistemas*, 31(2), 2304.
- Arditti, J. (1992). *Fundamentals of orchid biology*. New York, John Wiley & Sons. 691-720.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman J.G., Smith J.A. & Struhl, K (2004). *Current Protocols in Molecular Biology*, 5(1).
- Beltrán, M. (2010). *Aislamiento y caracterización de hongos micorrízicos asociados a orquídeas terrestres del género Bletia (Orchidaceae) en la reserva Natural Barranca del Cupatitzio* [Tesis de Maestría]. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Beltrán-Nambo, M., Montero-Castro, J. C., Martínez-Trujillo, M., Salgado-Garciglia, R., OteroOspina, J. T., & Carreón-Abud, Y. (2018). Characterization of mycorrhizal fungi of the genus *Tulasnella* (Tulasnellaceae, Basidiomycota) in the genus of orchids *Bletia* from Barranca del Cupatitzio Natural Reserve, Mexico. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 75(2).

- Bertolini V, Cruz-Blasi J, Damon A, Valle-Mora J (2014) Estacionalidad y colonización micorrízica en tres especies de orquídeas epífitas en el sureste de México. *Acta Botánica Brasilica*, 28 (1), pp. 512-518.
- Bonilla Loor, M. J., & Solórzano Zambrano, L. J. (2019). Evaluación de la infectividad de comunidades de hongos micorrízicos arbusculares. *Pro-Sciencias: Revista de producción, ciencias e investigación*, volumen 3(21), pp 1-5.
- Baquero, L. E., & Galarza Verkovich, D. (2019). Dos nuevas especies y nuevos registros de platystele(Pleurothallidinae: Orchidaceae) de los cedros reserva en Ecuador. *Revista Internacional de Orquidología Lankesteriana*, 19(1), pp. 5-13.
- Beltrán Capote, M. C., & Martínez Betancourt, J. I. (1996). Orquídeas medicinales en la flora Cubana. *Natura Medicatrix*, 43(1).
- Billard, C. E., Dalzotto, C. A., & Lallana, V. H. (2014). Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*. *Polibotánica*, 38, 145-157. <https://www.scielo.org.mx/pdf/polib/n38/n38a8.pdf>
- Bolívar, A. M., Rojas, A., & García Lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina ULA*, 3(1), pp. 25-33.
- Borja, S. (2020). *Ecuador: la lucha para proteger a las orquídeas de la minería*. Mongabay.
- Camarena Gutiérrez, G. (2011). Interacción planta hongos micorrízicos arbusculares. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 8 (1), pp. 409-421.
- Castro, C. C., & Morales, G. T. (2018). *Orquídeas de Cundinamarca: Conservación y aprovechamiento sostenible*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica.
- Carvajal, S. (2008). *Avances en la investigación científica*. CUCBA, (1).TAGIT-Orgánica Diseño Editorial.
- Carrillo Sánchez, L.E. (2015). Micorrizas para principiantes. *Herbario CICY*, 7(1), pp.177-179.

- Cazar Iza, M. A., & Pérez Reyes, D. B. (2019). *Identificación molecular de hongos endófitos y micorrízicos presentes en la relación simbiótica de la especie Caucaea pichinchae (orchidaceae) con su respectivo hospedero*. [Trabajo de Titulación]. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito.
- Cevallos, S., Herrera, P., Sánchez-Rodríguez, A., Declerck, S. y Suárez, JP (2018). Factores desenredantes que impulsan la composición de la comunidad de endófitos fúngicos asociados a la raíz de orquídeas epífitas neotropicales. *Ecología fúngica*. 34 (1), pp. 67–75.
- Delidow, B., Lynch, J., Peluso, J. and White, A. (1993). Polymerase chain reaction: Basic protocols. *Methods in molecular biology*, 15, 1 – 30.
- Dearnaley, J.D.W., Cameron, D.D. (2016). Nitrogen transport in the orchid mycorrhizal symbiosis-further evidence for a mutualistic association. *New Phytologist*. 213(1), pp. 10-12.
- Duque, P., Cajamarca, R., Wemple, B., & Delgado, M. (2019). Estimación del Balance Hídrico de una Cuenca Andina. *LA GRANJA: Revista de Ciencias de la Vida*, 29(1), pp. 56-69.
- Durán-López, M. E., Caroca-Cáceres, R., Jahreis, K., Narváez-Vera, M., Ansaloni, R., & Cazar, M. E. (2019). The micorrryzal fungi *Ceratobasidium* sp. and *Sebacina vermifera* promote seed germination and seedling development of the terrestrial orchid *Epidendrum secundum* Jacq. *Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Plantkunde [South African Journal of Botany]*, 125, 54–61
- Dodson, C. H. (2016). Why are there so many orchid species? *Lankesteriana*, 3(2).
- Emeterio-Lara, A., Palma-Linares, V., Vázquez-García, L. M., & Mejía-Carranza, J. (2016). Usos y comercialización de orquídeas silvestres en la región sur del estado de México. *Polibotánica*, 10(42).
- Fernández-Fernández, Tobar-Suárez, Garzón-Santomaro, Yáñez-Muñoz, Mena-Jaén & González-Romero. (2018). Orquídeas y bromelias de la provincia de Oro. En *una guía de identificación para los principales géneros y especies del páramo al manglar*. Publicación Miscelánea N°9. Serie de publicaciones GADPEO - INABIO.

- Fuertes Flores, B. G., & Mallitasig Quishpe, D. A. (2018). *Identificación morfológica y molecular de hongos micorrízicos de especies del género Draculo y Epidendrum (Orchidaceae)* [Trabajo de grado]. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito.
- Garrigues, F. (2023). *Secuenciación de Sanger - Genotipia*. Genotipia.
- González Reyes, J. A. (2014). *Análisis metagenómico de hongo en suelos cultivados con maíz en el norte de Tamaulipas* [Tesis de Grado]. Instituto Politécnico Nacional.
- González Pimentel, J. L. (2019). *Microorganismos de las cuevas volcánicas de la palma (Islas Canarias)* [Tesis Doctoral]. Universidad de Sevilla.
- Guamán Cobos, L. V. (2021). *Análisis del comportamiento de las exportaciones del sector florícola del Ecuador: caso de estudio las orquídeas antes y después del Covid-19 periodo 2019-2021* [Trabajo de Titulación]. Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca.
- Harrison, M. (2012). Cellular programs for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current opinion in plant biology*, 15, pp. 691-698.
- Hernández Calderón, C. E. (2018). *Deslignificación de bagazo de sorgo dulce con un extracto enzimático de Trametes hirsuta bm-2 para la producción de azúcares fermentables* [Tesis de Grado]. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México.
- Herrera, K. (2022, 16 noviembre). ¿Qué es CITES, la convención sobre el comercio de especies? *Periodismo que cruza fronteras*. <https://gk.city/2022/09/27/que-es-cites-convencion-comercio-especies/>
- Heykoop, M., Moreno, G., Alvarado, P., & Raventos, F. (2017). El género Psathyrella en España especies nuevas o raras y reevaluación de otras. *Sociedad de Biología y Micología*, 47(2).
- Hussain, S., Usman, M., Afshan, N. S., Ahmad, H., Khan, J. A., & Khalid, A. N. (2018). The genus Coprinellus (Basidiomycota; Agaricales) in Pakistan with the description of four new species. *MycKeys*, 39, pp. 41-61.

- Jacquemyn, H., Duffy, KJ y Selosse, M.-A. (2017a). "Biogeografía de las micorrizas de las orquídeas", *Biogeografía de la simbiosis micorrízica: estudios ecológicos*. edición L. Tedersoo, pp. 159–177.
- Jiménez Peña, N., Sandoval Villa, M., Volke Haller, V. H., Pedraza Santoss, M. E., & Fernández Herrera, E. (2018). Colonización micorrízica de *Laelia autumnalis* [Trabajo de Titulación]. En *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 5 (15), pp. 547-533). Universidad de Cuenca.
- Kumar, R., Negi, S., Sharma, P., Prasher, I. B., Chaudhary, S., Dhau, J. S., & Umar, A. (2018). Wastewater cleanup using *Phlebia acerina* Fungi: An insight into mycoremediation. *Journal of Environmental Management*, 228, pp.130-139.
- Lanfranco, L., Bonfante, P. y Genre, A. (2016). The mutualistic interaction between plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *Microbiol Spectrum*, 4(6).
- Llorens, V., Martín, M.P., Hidalgo Hernando, E. (1996). PCR: una nueva herramienta para el estudio de hongos ectomicorrízicos. *Revista Catalana de Micología*, 20, 187-197.
- Loyola, J. (2019). *Guía de Flora. Bosque Protector Aguarongo*. Universitaria Abya-Yala.
- Mahajam, M. (2022). Enfermedades infecciosas emergentes. *Comuna de Schizophyllum*, 28(3), pp. 725-730.
- Megías, G., & Antonio, J. (2014). *Estudio de la evolución del espaciador ribosomal intergénico 45S (IGS45S) y otras familias de ADN repetido en plantas, mediante técnicas moleculares y citogenéticas*. [Tesis Doctorales]. Universidad de Murcia.
- Matsumata Y., Amira, A. y S.Ito. (2009). Colonization pattern of mycorrhizal fungi associated with two rare orchids, *Cephalanthera falcata* and *C. erecta*. 24 (1), pp. 1023- 1031.
- McCormick, MK, Whigham, DF y Canchani-Viruet, A. (2018). Los hongos micorrízicos afectan la distribución y la dinámica de población de las orquídeas. *Fitol nuevo*. 219 (1), pp. 1207–1215.
- Montalvo Navarro, C. A., & Lugo Flores, M. A. (2016). Electroforesis: Fundamentos, avances y aplicaciones. *Epistemus*, 26, pp. 48-54.

- Montaño, D. (2021, 18 marzo). Nuevo estudio: en los últimos 26 años Ecuador ha perdido más de 2 millones de hectáreas de bosque. *Noticias ambientales*.
- Mosquera Espinosa, AT, Bayman, P., & Otero, JT (2010). Ceratobasidium como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia. *Acta Agronómica*, 59 (3), pp. 316-326.
- Nilsson, RH, Anslan, S., Bahram, M., Wurzbacher, C., Baldrian, P. y Tedersoo, L. (2019). Diversidad de micobiotas: secuenciación de alto rendimiento e identificación de hongos. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 95–109.
- Novotná, A., Benítez, Á., Herrera, P., Cruz, D., Filipczyk, E., & Suárez, J. P. (2018). High diversity of root-associated fungi isolated from three epiphytic orchids in southern Ecuador. *Mycoscience*, 59(1), 24–32.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E. & Nirenberg, H. I. (1998). *Molecular systematics and phylogeography of the Gibberella fujikuroi species complex*. *Mycologia*, 90(1), pp. 465–493.
- Ongay Larios, L., & Códiz Huerta, G. (2021). Secuenciación de ADN por el método de terminación de la cadena de Sanger. *Mensaje Bioquímico*, 45(1), pp. 23-34.
- Ordoñez, S.L., Pillacela, D.P., Peña, D.F & Salazar, J.M. (2016). Especificidad del hongo micorrízico (*Rhizoctonia* sp.) en *Phalaenopsis* sp., *Cymbidium* sp., *Trichoceros antenifer*, *Oncidium excavatum* y *Cyrtochilum* sp. *DOAJ: Directory of Open Access Journals – DOAJ*, 7(1), pp. 83-86.
- Otero, T., Flanagan, N., Herre, A., Ackerman, J. & Batman, P. (2007). Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Utricularia*. *American Journal of Botany*. 94 (1), pp. 1944-1950
- Pandiella, S. R. (2018). *Desarrollo de métodos para la extracción de ADNmt de carpóforos de basidiomicetes [Trabajo de Grado]*. Universidad de Coruña
- Pérez Cardona, A., & Gómez, L. M. (2015). *Del campo al laboratorio: integración de procedimientos para el estudio de moscas: Electroforesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) en gel de agarosa*. Tecnológico de Antioquia.
- Perfil de la biodiversidad*. (2018). INABIO.

- Prefectura del Azuay. (2022). Plan de desarrollo y ordenamiento territorial del cantón Cuenca - Actualizado 2022. Pp. 81-99.
- Quijada Mascareñas, A. (1988). *La región de los espaciadores internos transcritos (ITS) del DNA ribosomal del núcleo (nrDNA): Detección de hibridación y variación intraespecífica en pinos* [Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México].
- Reguero Reza, M. T. (2014). La secuenciación del ADN: consideraciones históricas y técnicas. *Revista Colombiana Biotecnología*, 16(1).
- Riveras Dueñas, R. A. (2002). *Guía ilustrada de 55 especies de Orquídeas encontradas en la Reserva Biológica de Yuscarán, Honduras* [Trabajo de titulación]. Universidad de Zamorano.
- Rodrigo Sánchez, I. P., & Barrera Saldaña, H. A. (2004). La reacción en cadena de la Polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, 1(3), pp. 323-332.
- Rojas Franco, P., Cano Europa, E., Ortiz Butron, R., Valenzuela Garza, R., Blas Valdivia, V., & Franco Colín, M. (2015). Efecto hepatoprotector del micelio de *Trametes versicolor* en un modelo de ratón de la cepa NIH. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 46(1), pp. 56-63.
- Romero-Salazar, N. C., Galvis-Gratz, J. M. & Moreno-López, J. P. (2022). Hongos formadores de micorrizas aislados a partir de raíces de la orquídea *Rodriguezia granadensis* (LINDL.) RCHB. F. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 25(1).
- Rosero, N. S. (2012). *Extracción de ADN genómico y amplificación de la región ITS por PCR en el ascomicete marino *Lulwarthia grandispora** [Tesis de Grado]. Universidad de Guayaquil.
- Salgado, J. M., & Peñaranda, L. (2019). Modificaciones en medios de cultivo aplicadas en conservación y producción in-vitro de orquídeas. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, volumen 6(1), pp. 16-28.
- Sandoval Rodríguez, A. S., & López de la Mora, D. A. (2016). *Electroforesis | Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. McGraw-Hill Interamericana.

- Santana, H. G., & Alonso, C. (2021). Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa: del "Nobel" a la actualidad. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, volumen 35(4), pp. 41-56.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K.-D., Bai, F.-Y., Barreto, R. W., Begerow, D., Bergeron, M.-J., Blackwell, M., (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), pp. 6241–6246.
- Sedano, G., Manzo, A., Roldán, R., & Castellanos, J. (2015). Propagación in vitro de orquídeas y otras ornamentales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, pp. 451-456.
- Smith, S.E., Read, D.J. , (1997). Mycorrhizal symbiosis. New York, Academic Press, 605.
- Suárez, J. P., Eguiguren, J. S., Herrera, P. & Jost, L. (2016). Do mycorrhizal fungi drive speciation in *Teagueia* (Orchidaceae) in the upper Pastaza watershed of Ecuador? *Symbiosis*, 69(3), pp. 161-168.
- Suárez, J. P., Weiß, M., Abele, A., Oberwinkler, F., & Kottke, I. (2008). Members of Sebaciniales subgroup B form mycorrhizae with epiphytic orchids in a mountain rain forest. *Mycological Progress neotropical res*, 7(2), pp. 75-85
- Téllez Velasco, M. A. A., & Tejada Sartorius, O. (2017). Importancia y aprovechamiento sustentable de productos forestales no maderables en bosques de niebla: Estudio de casos en orquídeas. *Agro productividad*, volumen 10(6), pp.46-53.
- Uribe, D., & Khachatourians, G. G. (2007). Análisis y aplicaciones de la tipificación molecular del genoma mitocondrial de *Beauveria bassiana*. *Revista Colombiana De Entomología*, 33(2), pp. 89-97.
- Valderrama, J. M., Ortigosa, F., & Cañas, R. A. (2020). Métodos de secuenciación de ácidos nucleicos: Primera Generación. *Encuentro en la Biología*, 13(173).



- Valdés, F. E., Abarca, C. L., Colombo, R., & Silvani, V. A. (2020). *Micorrizas arbusculares: Biología y aplicaciones en el sector agro-forestal* (5.ª ed.). Editorial de la Universidad de La Plata.
- Villalobos Arámbula, A. R., Escobar Ibañez, M., Santerre, A., Guzmán Huerta, G., Gándara Zamorano, E., & Guzmán Dávalos, L. (2005). *Extracción de DNA y amplificación de secuencias de ITS en Psilocybe (Agaricales, Fungi)* (1.ª ed.). Cuba.
- Vicción Esquivel, J., Castañeda Zarate, M., Castro Cortés, R., & Cetzal Ix, W. (2021). *Las Orquídeas de Veracruz: Universidad Veracruzana* 1,(6).
- White, & Bruns. (1990). Amplification and Direct Sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.
- Yeh, C.M.; Chug, K.; Liang, C.K.; Tsail, W.C. (2019). New insights into the symbiotic relationship between orchids and fungi. *Applied Sciences*. Volumen 9(3):585.
- Zak, J.C., Sinsabaugh, R., MacKay, W.P., (1995). Windows of opportunity in desert ecosystems: their implications to fungal development. *Can. J. Bot*, pp. 1407-1414.

## Capítulo VIII






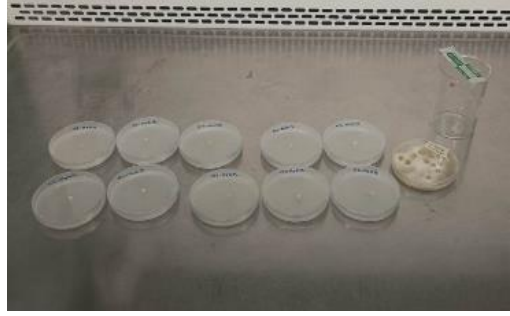
### 10. Anexos

#### Anexo A.

*Elaboración de medio PDA para la siembra de hongos potencialmente micorrízicos.*

**Tabla 8**

*Procedimiento del medio Potato Dextrose Agar*

|   |   |
|---|---|
| <p>1.- Peso de los reactivos para la elaboración del medio</p>                      | <p>2.- Ajuste de pH del medio, con pHmetro/ionómetro marca SevenCompact™</p>                              |
|    |                         |
| <p>3.- Proceso de calentamiento del medio hasta punto de ebullición</p>             | <p>4.- Proceso de esterilización del medio PDA, en autoclave vertical marca Tuttnauer modelo 2540 MLV</p> |
|  |                       |
| <p>5.- Medio PDA en cajas Petri</p>   | <p>6.- Siembra de los hongos en el medio PDA</p>  |
|  |                       |

Nota. Elaboración propia

## Anexo B.

*Codificación de cepas fúngicas de las tres especies de orquídeas, cuyo aislamiento se dio de las raíces, divididas en tres secciones: sección basal (A), sección media (B) y sección apical (C); con sus respectivas réplicas.*

**Tabla 9.**

*Cepas de hongos potencialmente micorrízicos aisladas de tres orquídeas epífitas en el orquideario de la Universidad de Cuenca, utilizadas para su posterior identificación molecular.*

| <b>Especie de orquídea</b>    | <b>Código</b> | <b>Tipo de muestra para las colonias aisladas</b> | <b>Sección de raíz</b>           |
|-------------------------------|---------------|---|----------------------------------|
| <i>Cyrtochilum sp.</i>        | Csp           | Muestra (M) Muestra<br>Réplica (MR)               | basal (A) media(B)<br>apical (C) |
| <i>Pleurothallis sp.</i>      | Psp           | Muestra (M) Muestra<br>Réplica (MR)               | basal (A) media(B)<br>apical (C) |
| <i>Odontoglossum pardinum</i> | OS            | Muestra (M) Muestra<br>Réplica (MR)               | basal (A) media(B)<br>apical (C) |

Nota: Chamba & Palacios (2022)



*Codificación de cepas fúngicas de las tres especies de orquídeas, cuyo aislamiento se dio de las raíces, divididas en tres secciones: sección basal (A), sección media (B) y sección apical (C); con sus respectivas réplicas.*


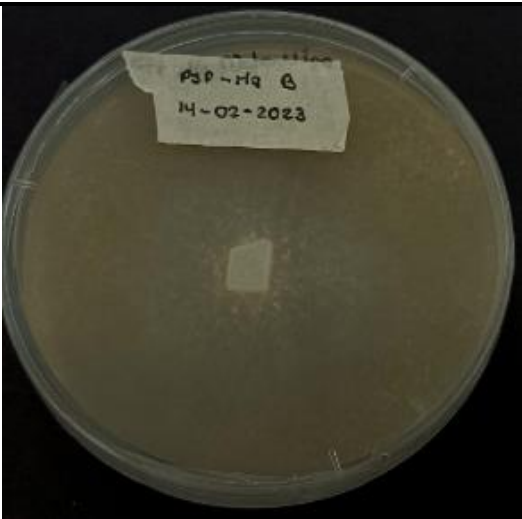
## Anexo C

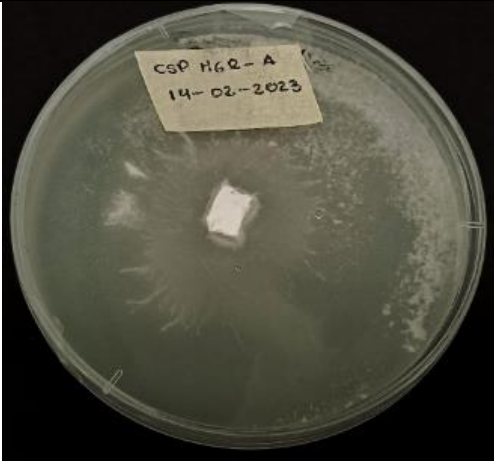

Características macroscópicas de hongos potencialmente micorrízicos aislados de las raíces de orquídeas *Pleurothallis sp.*, *Odontoglossum pardinum* y *Cyrtochilum sp*

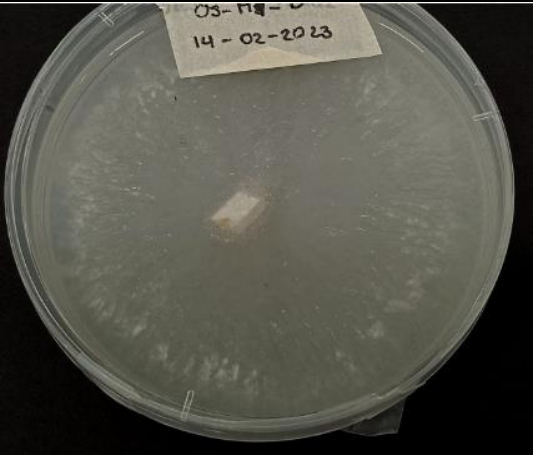

**Tabla 10**

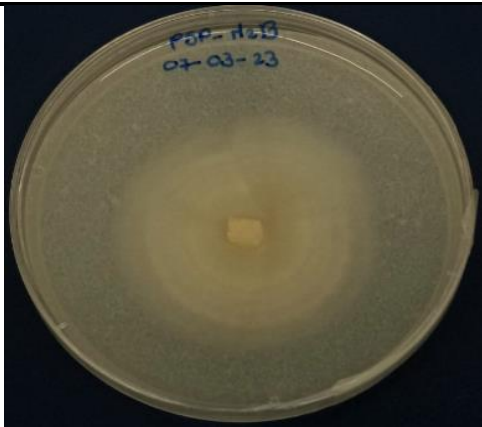

Características Macroscópicas de las 10 cepas fungales

| Características macroscópica de los cuatro primeros hongos potencialmente micorrízicos   |   |  |
|--|---|--|
| CÓDIGO   | COLONIA MEDIO PDA   | DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA   |
| <p><b>ORQUÍDEA:</b> <i>Odontoglossum pardinum</i></p> <p><b>CÓDIGO DE COLONIA:</b> OS-M5-B</p> <p><b>CÓDIGO DE ADN:</b><br/>M5</p> |   | <p><b>Coloración del micelio:</b><br/>Blanco-Pardo</p> <p><b>Características de la colonia:</b><br/>Colonia grande Blanquecina-parda de textura aterciopelada con crecimiento de tipo radial.</p>      |
| <p><b>ORQUÍDEA:</b> <i>Cyrtochilum sp.</i></p> <p><b>CÓDIGO DE COLONIA:</b> CSP-M6R-B</p> <p><b>CÓDIGO DE ADN:</b><br/>M6</p>      |  | <p><b>Coloración del micelio:</b><br/>Blanco-Pardo</p> <p><b>Características de la colonia:</b><br/>Colonia grande Blanquecina-parda con micelio de textura algodonosa y de crecimiento irregular.</p> |

|   |   |   |
|---|---|---|
| <p><b>ORQUÍDEA:</b> <i>Odontoglossum pardinum</i></p> <p><b>CÓDIGO DE COLONIA:</b> OS-M7R-C</p> <p><b>CÓDIGO DE ADN:</b><br/>M7</p> |   | <p><b>Coloración del micelio:</b><br/>Blanco-Pardo</p> <p><b>Características macroscópicas de la colonia:</b><br/>Colonia grande Blanquecina-parda de textura aterciopelada con crecimiento de tipo radial.</p>       |
| <p><b>ORQUÍDEA:</b> <i>Pleurothallis sp.</i></p> <p><b>CÓDIGO DE COLONIA:</b> PSP-M9-B</p> <p><b>CÓDIGO DE ADN:</b><br/>M9</p>      |  | <p><b>Coloración del micelio:</b><br/>Pardo</p> <p><b>Características macroscópicas de la colonia:</b><br/>Colonia grande parda de textura lisa con bordes irregulares, se aprecia un crecimiento de tipo radial.</p> |

| Características macroscópica de los cuatro siguientes hongos potencialmente micorrízicos   |   |  |
|--|---|--|
| CÓDIGO   | COLONIA MEDIO PDA   | DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA   |
| <p><b>ORQUÍDEA:</b> <i>Cyrtochilum sp.</i></p> <p><b>CÓDIGO DE COLONIA:</b> CSP-M6RA</p> <p><b>CÓDIGO DE ADN:</b><br/>A1</p>         |   | <p><b>Coloración del micelio:</b><br/>Blanco</p> <p><b>Características macroscópicas de la colonia:</b><br/>Colonia pequeña blanca ligeramente algodonosa en los bordes, con estrías irregulares.</p>                |
| <p><b>ORQUÍDEA:</b> <i>Odontoglossum pardinum.</i></p> <p><b>CÓDIGO DE COLONIA:</b> OS-M3R B</p> <p><b>CÓDIGO DE ADN:</b><br/>A2</p> |  | <p><b>Coloración del micelio:</b><br/>Blanco-Pardo</p> <p><b>Características macroscópicas de la colonia:</b><br/>Colonia grande Blanquecina-parda con micelio de textura algodonosa y de crecimiento irregular.</p> |

|   |   |   |
|---|---|---|
| <p><b>ORQUÍDEA:</b> <i>Odontoglossum pardinum</i></p> <p><b>CÓDIGO DE COLONIA:</b> OS- M9 C</p> <p><b>CÓDIGO DE ADN:</b><br/>A3</p> |   | <p><b>Coloración del micelio:</b><br/>Blanco</p> <p><b>Características macroscópicas de la colonia:</b><br/>Colonia blanca con extremos ligeramente algodonoso, de crecimiento radial impregnada en el agar.</p>  |
| <p><b>ORQUÍDEA:</b> <i>Odontoglossum pardinum</i></p> <p><b>CÓDIGO DE COLONIA:</b> OS-M1 A</p> <p><b>CÓDIGO DE ADN:</b><br/>A4</p>  |  | <p><b>Coloración del micelio:</b><br/>Blanquecino verdoso</p> <p><b>Características macroscópicas de la colonia:</b><br/>Colonia grande blanquecina de textura lisa verdosa, impregnada en el agar con bordes irregulares ligeramente algodonosa, se aprecia un crecimiento de tipo radial.</p> |

| Características macroscópica de los dos siguientes hongos potencialmente micorrízicos   |   |   |
|---|---|---|
| CÓDIGO  | COLONIA MEDIO PDA   | DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA  |
| <p><b>ORQUÍDEA:</b> <i>Pleurothallis sp.</i></p> <p><b>CÓDIGO DE COLONIA:</b><br/>PSP-M2 B</p> <p><b>CÓDIGO DE ADN:</b><br/>PMB</p> |   | <p><b>Coloración del micelio:</b><br/>Pardo</p> <p><b>Características macroscópicas de la colonia:</b><br/>Colonia parda de tamaño medio, con textura lisa. Se observa un tipo de crecimiento radial.</p> |
| <p><b>ORQUÍDEA:</b> <i>Cyrtochilum sp.</i></p> <p><b>CÓDIGO DE COLONIA:</b><br/>CSP-M1 C</p> <p><b>CÓDIGO DE ADN:</b><br/>CMC</p>   |  | <p><b>Coloración del micelio:</b><br/>Pardo</p> <p><b>Características macroscópicas de la colonia:</b><br/>Colonia media parda con micelio de textura algodonosa y de crecimiento irregular.</p>          |

Nota. Elaboración propia








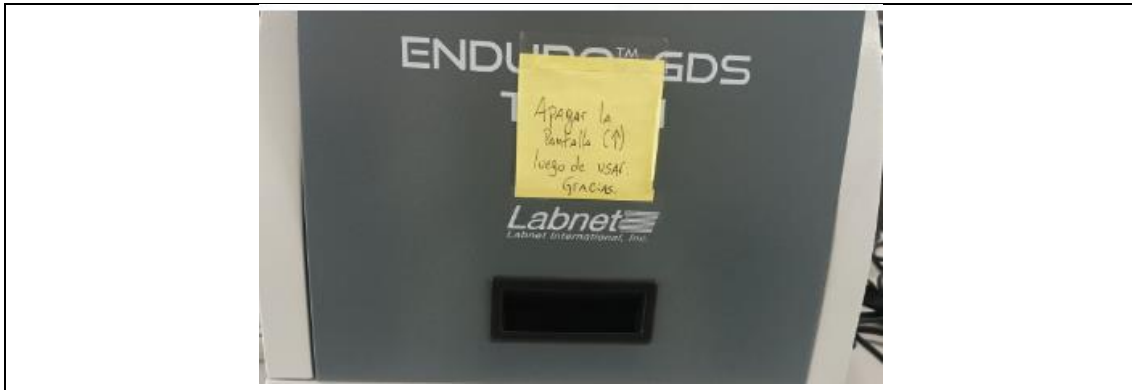
## Anexo D

Equipos utilizados para la extracción, electroforesis y amplificación de ADN.

**Tabla 11.**

Equipos utilizados durante el desarrollo del trabajo experimental.

| <b>Equipos utilizados para la extracción del ADN</b>   |  |
|--|--|
| 1.- Kit PureLink® Genomic DNA, marca invitrogen.   | 2. Cámara de flujo laminar marca CB 120.   |
|                       |    |
| 3.- Molino de perlas Tissuelyzer.  | 4.- Centrifugadora marca Thermo Scientific.  |
|                     |  |
| <b>Equipos utilizados para la electroforesis de ADN</b>  |  |
| 1.- Materiales usados para la electroforesis: TAE 1X, reactivo Blue Juice (Invitrogen) y agarosa 1,2%. | 2. Fuente electrica para electroforesis marca PowerEase™ de 300 W.                   |
|                     |  |
| 3.- Transiluminador y fotodocumentar marca Enduro™ GDS.  |  |



**Equipos utilizados para la reacción en cadena de polimera y cuantificación**

1.- Termoreciclador marca MiniAmp™.

2.- Lector de microplacas para la absorbancia y cuantificación de ADN/ARN EPOCH marca Biotek.



Nota. Elaboración propia

## Anexo E

Secuencias de las especies *Pleurothallis* sp., *Odontoglossum pardinum* y *Cyrtochilum* sp

### Figura 7

Secuencias con los primers ITS en las especies de orquídeas *Pleurothallis* sp., *Odontoglossum pardinum* y *Cyrtochilum* sp

| ESPECIE DE ORQUÍDEA           | NOMBRE    | SECUENCIA   | ANOTACIÓN  | %ID   | GAP   | E-value                             |                   |
|-------------------------------|-----------|-------------|--|---|---|-------------------------------------|-------------------|
| <i>Odontoglossum pardinum</i> | OS-M3R B  | IA2_R ITS4  | GACTGTTTGAAGCGGTTTCATCCGCAATCCCGGCCACCTTTTTACGGGTGCCTCAGCGAGT  |   |   |                                     |                   |
|                               |           | IA2_F ITS1  | GCTGGCCTTTCACCGAGGCATGTGCACGCCTTCTCTTTCATCCACACACACCTGTGCACCTT   |   |   |                                     |                   |
|                               |           |             | TCACATTACTTATCGCATTTCCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAAGAGATCCGTT<br>GTTGAAACTTAGTTTATAGATGCGTTACATCAATTACATTCAGTTAAAAATATAGATT<br>TATGTATTGGCAGACGAAACCCCTCCTCGCGAAAGAGAAAGACCTCCGTCTCACAAAGT<br>GCACAGGTGTGTGGATGAAAGAGAAGCGGTGCACATGCCTCGGTGAAGAGGCCAGCGA<br>CAACCAACTCTACATTCATTCAATAATGATCCTTCCGCGT  | Clon de <i>Ceratobasidium</i> no cultivado<br><i>Ceratobasidium</i> sp. clon G73 gen de                               | 606/639 (95%)<br>598/639(94%)                   | 2/639(0%)<br>2/639(0%)              | 0.0<br>0.0        |
|                               |           | IA2 ITS     |  | Clon de <i>Ceratobasidium</i> no cultivado  | 606/639 (95%)                                   | 2/639(0%)                           | 0.0               |
| <i>Cyrtochilum</i> sp         | CSP-M6R A | >IA1_F ITS1 | CTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTAGTTGGG   |   |   |                                     |                   |
|                               |           | >IA1_R ITS4 | GGACGGTTAGAAGCTTGCCAAAACGCTTACGGTCCACAGCGTAGACAATTATCACACTGAGA   |   |   |                                     |                   |
|                               |           |             | TGAAATTCTCAACCCATAAGTCTTGTGATCTATGGGCTTGGATTTGGAGGCTTGCTGGC<br>CCTAGCGGTGCGCTCCTCTTGAATGCATTAGCTTATTCCGTGCGGATCGGCTCAGTG<br>TGATAATTGTCTACCGTGTGACCGTGAAGCGTTTGGCAAGCTTCTAACCGTCCATTAGG<br>ACAATCTTTCACATCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTAAGCATATC<br>AATAAGCCGGAAAGGAACATTAACGAGTTTGGAAA  | TTATGATATGCTTAAGTTCAGCGGG<br>TTTGTCTAATTAATAGACTGTTGA<br>CGGGTGTCTCAGCGAGTGATACT                                      | 615/617 (99%)<br>613/616 (99%)<br>613/616 (99%) | 1/617(0%)<br>2/616(0%)<br>2/616(0%) | 0.0<br>0.0<br>0.0 |
|                               |           | IA1 ITS     |  | Basidiomiceto sp. gen de ARN ribos  | 613/616 (99%)                                   | 2/616(0%)                           | 0.0               |
| <i>Odontoglossum pardinum</i> | OS-M9 C   | IA3_F ITS1  | GATTGTCTTGGCACTCTCCTTGAATTTCCAGGTCTATGTATTACATACCCCAATTGAATGAT   |   |   |                                     |                   |
|                               |           | >IA3_R ITS4 | AGAAGCAAGTCTAAGTCCAATCCACGGCGTAGATAATTATCACACCAATAGACGGAGCTCAGT  |   |   |                                     |                   |
|                               |           |             | AATATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA<br>TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTG<br>CGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCAATTAATTCTCAACTTCAAC<br>ATTTTTGTTGAAGCTTGGATGTGGGGTCTGTCAGAACGCTTCGGTGTCTGCTCCCTT<br>AAATGTATTAGCGAGTTCAAACTGAGCTCCGCTATTGGTGTGATAATTATCTACGCCGT<br>GGATTGGACTTAGACTTGTCTTAACCGTCCGCAAGGACAACCTTTGACAATTTGACCTC<br>AAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAA                                     | Psathyrella coprophila comprobante<br>cultivo de Psathyrella coprophila CE<br>cultivo de Psathyrella obtusata CBS     | 638/642 (99%)<br>635/639 (99%)<br>635/639 (99%) | 0/642(0%)<br>0/639(0%)<br>0/639(0%) | 0.0<br>0.0<br>0.0 |
|                               |           | >IA3 ITS4   |  |   |   |                                     |                   |
| <i>Odontoglossum pardinum</i> | OS-M1 C   | >IA4_F ITS1 | CGGAGCAATGTGCACGCCCGCCATTTTATCTTTCCACCTGTGCACCGACTGTAGGCTGGAT  |   |   |                                     |                   |
|                               |           | >IA4_R ITS4 | CGAGTCTGATCCTCGTCCACGGCGTAGATAAATTATCACACCAATAGACGGAAGTTACGATGA  |   |   |                                     |                   |
|                               |           |             | GCCTATAAAACACTATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGA<br>ACGCAGCGAAATGCAGATAAGTGAATGTGAATTTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTG<br>AACGCACCTTCCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCAATTAATT<br>TCAACCTCACCAGTTTCTGAACTGTCTTTCGAGGCTTGGATGTGGGGGTTTGTGCAGGC<br>TGCCCTACGGCGGTCTGCTCCCTGAAATGCATTAGCGAGGTTCACTGCTGAACTTCCGTC<br>TATTGGTGTGATAATTATCTACGCCGTGGACGAGGATCAGACTCGCTTCAACCGTCCGC<br>AAGGACAATACCTTGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTAAGC<br>ATATCATAA | Coprinellus sp. aislado WW33 espacio<br>Coprinellus sp. "radianes-IN03" aislado<br>Cupón de Coprinellus radians INAT; | 661/669 (99%)<br>658/665 (99%)<br>658/665 (99%) | 1/669(0%)<br>1/665(0%)<br>1/665(0%) | 0.0<br>0.0<br>0.0 |
|                               |           | >IA4 ITS4   |  |   |   |                                     |                   |
| <i>Odontoglossum pardinum</i> | OS-M5 B   | >IM5_F ITS1 | ACCAGCCCCGGCGCCCTCACCGGCCGGAACAGGCGCCCGCGGGAGGCCAAACTCTT   |   |   |                                     |                   |
|                               |           | >IM5_R ITS4 | ACGGGGCGTGACCGTCTCCGCGCTCCGGTGCAGGTTGTGCTACTACGCAGGGGAGGCTG  |   |   |                                     |                   |
|                               |           |             | TCGCTGCGCTGCTGCGCTGCGCTGCGCTGCGCTGCGCTGCGCTGCGCTGCGCTGCGCTGCGCT<br>TGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGCGCCCGCCAGTA<br>TTCTGGCGGCCATGCCTGTTTCGAGCGTCAATTCACCCCTCAAGCCCATGGCTTGGTGT<br>GGGGACCGGCCCGTGGCCGCCCTAAATGCAGTGGCGACCTCGCCGAGCCTCCCTCGCTC<br>GTAGTAGCACAACCTCGCACCGGAGCGGAGACGGTCAACGCCGTAACAAACGCCCAACTTT<br>TTTAGAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCT   | Elaphocordyceps sp. JDF-2013a cep<br>Elaphocordyceps sp. 20102558A Ge<br>Elaphocordyceps sp. 20102506X Ge             | 518/527 (98%)<br>518/527 (98%)<br>518/527 (98%) | 3/527(0%)<br>3/527(0%)<br>3/527(0%) | 0.0<br>0.0<br>0.0 |
|                               |           | IM5 ITS4    |  |   |   |                                     |                   |

| ESPECIE DE ORQUÍDEA           |           | NOMBRE                              | SECUENCIA  | ANOTACIÓN  | %ID           | GAP           | E-value |
|-------------------------------|-----------|-------------------------------------|--|--|---------------|---------------|---------|
| <i>Cyrtorchilum</i> sp        | CSP-M6R B | >IM6_R ITS4                         | CGGTCTAGAAGCTTGCCAAAACGCTTACGGTCCACAGCGTAGACAATTATCACACTGAGAGCG  |  |               |               |         |
|                               |           |                                     |  | Basidiomycota sp. cepa WZ-226 gen                                | 532/533 (99%) | 1/533(0%)     | 0.0     |
|                               |           |                                     |  | Basidiomycota sp. aislar el gen del A                            | 532/533 (99%) | 1/533(0%)     | 0.0     |
|                               |           | >IM6 ITS4                           |  | Trametes sp. espaciador interno trar                             | 532/533 (99%) | 1/533(0%)     | 0.0     |
| <i>Odontoglossum pardinum</i> | OS-M7R C  | >IM7_F ITS1                         | CTCCCAAACCCCTGGTGAACCTTATACCTTTACTGTTGCTTCGGCGGGTTAACGCCCCGGAAG  |  |               |               |         |
|                               |           | >IM7_R ITS4                         | GGACGGGGCCTGCGTCGCGCTCCGCTGCGAGGTTGTGCTACTACGCAGAGGAGGCCGCG  |  |               |               |         |
|                               |           |                                     |  | Metapochonia bulbillosa isolate REE                              | 539/558(97%)  | 17/558(3%)    |         |
|                               |           | >IM7_F ITS1                         |  | Pochonia sp. isolate TTC241 interna                              | 539/558(97%)  | 17/558(3%)    |         |
|                               |           |                                     |  | Pochonia sp. AD1A internal transcri                              | 539/558(97%)  | 17/558(3%)    |         |
|                               |           | >IM7_R ITS4                         |  | Metapochonia bulbillosa strain L2-7-1 small subunit ribosomal RN |               |               | 0.0     |
|                               |           | Metapochonia bulbillosa isolate REE | 503/505(99%)   | 1/505(0%)  | 0.0           |               |         |
|                               |           | Metapochonia bulbillosa isolate REE | 503/505(99%)   | 1/505(0%)  | 0.0           |               |         |
| <i>Pleurothallis</i> sp       | PSP-M9 B  | >IM9_F ITS1                         |  |  |               |               |         |
|                               |           | >IM9_R ITS4                         | GAGCATGTTGTGCCTCGCGGGACGATTGTAAGCACGAACACTGTAATACTGCACGTCTACGG   |  |               |               |         |
|                               |           |                                     |  | Phlebia acerina voucher DR60sp gen                               | 575/579 (99%) | 4/579(0%)     | 0.0     |
|                               |           | >IM9 ITS4                           |  | Phlebia rufa cepa DR-60 18S gen de                               | 575/579 (99%) | 4/579(0%)     | 0.0     |
|                               |           |                                     |  | Phlebia acerina cepa MR-4280 18S g                               | 575/579 (99%) | 4/579(0%)     | 0.0     |
| <i>Pleurothallis</i> sp       | PMP-M2B   | >IPMB_F ITS1                        | CTTTGTTTCTGATCCTGTGCACCTTATGTAGTCCCAAAGCCTTACGGGTGGCGGTTGACTAC   |  |               |               |         |
|                               |           | >IPMB_R ITS1                        | CTCAATCAAGAGACAGTTAGAAGCAGACTCCTATTGAAACTGACCAAGGTCAGCCCCGAGATC  |  |               |               |         |
|                               |           |                                     | CTCTAAATGTTATAGCGGATTTCCCTTGCGGGATCGCGTCTCCGATGTGATAATTTCTA<br>CGTCGTTGACCATCTCGGGGCTGACCTTGGTCAGTTTCAATAGGAGTCTGCTTCTAACTG<br>TCTCTTGATTGAGACTAGCGACTTGCAGCGCTAACTTTGACTTGACCTCAAATCAGGTAG<br>GACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCCGGAAGGAAGATAATTAACGAATCAA<br>CAAGTTCATCTTGTCTGATCCTG | Gen de ARN ribosómico de subunid                                 | 634/641 (99%) | 4/641(0%)     | 0.0     |
|                               |           | >IPMB ITS4                          |  | Schizophyllum commune aislado P4                                 | 622/625 (99%) | 1/625(0%)     | 0.0     |
|                               |           |                                     |  | Gen de ARN ribosómico de subunid                                 | 640/652 (98%) | 640/652 (98%) | 0.0     |
| <i>Cyrtorchilum</i> sp        | CMP-M1 C  | >ICMC_F ITS1                        | TGTGAACATACCTCGTGTTCGCTCGGGGCGAGCGTAGTGCTCGGTAGGCACCTACCTGGTC  |  |               |               |         |
|                               |           | >ICMC_R ITS1                        | AAAGAAATCTACTACGCTTAGAGTGACCATAACCCCTGCCACTGACTTTGAGGAGTTACCGTA  |  |               |               |         |
|                               |           |                                     | CGTCGTTGACCATCTCGGGGCTGACCTTGGTCAGTTTCAATAGGAGTCTGCTTCTAACTG<br>TCTCTTGATTGAGACTAGCGACTTGCAGCGCTAACTTTGACTTGACCTCAAATCAGGTAG<br>GACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCCGGAAGGAAGATAATTAACGAATCAA<br>CAAGTTCATCTTGTCTGATCCTG  | Virgaria sp. Genes HMF-084 para 18                               | 609/644(95%)  | 26/644(4%)    | 0.0     |
|                               |           | >ICMC ITS4                          |  | Genes de Ascovirgaria occulta para                               | 612/659(93%)  | 30/659(4%)    | 0.0     |
|                               |           |                                     |  | Genes de Virgaria nigra para 18S rR                              | 612/659(93%)  | 30/659(4%)    | 0.0     |
| <i>Cyrtorchilum</i> sp        | CSP-M6R A | >NA1_F_NL1                          | CCTGTTAGGCCGTCGAGTTGTAGTCTGGAGAAGCGTTTCCGCGTTGGACCGTGACAAGT  |  |               |               |         |
|                               |           | >NA1_R_NL4                          | GCGTTCCTCGATCCCAACCGCTGTATGCGACTGAAGGCTATAACACACCCGAAGGTGCCACA   |  |               |               |         |
|                               |           |                                     | TGGTGCACTTCCGGATGACGGGGCAGCATCGATTTGACCGCTGAAAAAGGGCTGGAGG<br>AATGTGGCACCTTCGGGTGTGTTATAGCCTTCAGTCGCATACAGCGTTGGGATCGAGGA<br>ACGCAGCACGCCTTATGGCTGGGGTTCGCCACATTCGTGCTTAGGATGCTGGCATAATG<br>GCTTTAAACGACCCGCTTGA   | Trametes sp. Gen JCM 28423 para A                                | 621/621(100%) | 0/621(0%)     | 0.0     |
|                               |           | >NA1_NL4                            |  | Trametes sp. cepa WML2020-100 gen                                | 621/621(100%) | 0/621(0%)     | 0.0     |
|                               |           |                                     |  | Gen Trametes hirsuta para 28S rRNA                               | 621/621(100%) | 0/621(0%)     | 0.0     |

Nota. Elaboración propia

Figura 8

Secuencias con los primers NL en las especies de orquídeas *Pleurothallis sp.*, *Odontoglossum pardinum* y *Cyrtorchilum sp*

| ESPECIE DE ORQUÍDEA           | NOMBRE    | SECUENCIA  | ANOTACIÓN  | %ID   | GAP       | E-value |
|-------------------------------|-----------|------------|--|---|-----------|---------|
| <i>Odontoglossum pardinum</i> | OS-M3R B  | >NA2_F_NL1 | TCTGGCGGTGATTCCGTCGAGTTGTAGTCTAGAGAAGCATCATCCGCGCCGGACCATGTA   |   |           |         |
|                               |           | >NA2_R_NL4 | TCGATCCCAACCGATGCATGCGACAAGGGGCTATAACACACCCGAAGGTGCCACATTC   |   |           |         |
|                               |           |            | GCTTGGTGCATTTCTAGTCTACGGGCCAGCATGGATTCGACCCTGGAAAAGGGCTGG<br>GGGAATGTGGCACCTTCGGGTGTGTTATAGCCCTTGTGCGCATGCATCGGTTGGGATCGA<br>GGACCTCAGTGACGCTTCGGTTGTGCTTTGATGCTGGCGTAATGGCTTTAAACGACCCG<br>TCTTGA   | Ceratobasidiaceae sp. aislado pff14, 599/603(99%)   | 0/603(0%) | 0.0     |
|                               |           | >NA2_NL4   |  | Cultivo de rizodes de Ceratorhiza CE 598/603 (99%)  | 0/603(0%) | 0.0     |
| <i>Odontoglossum pardinum</i> | OS-M9 D   | >NA3_F_NL1 | TCTGGTGGTCTTTGGCCATCCGAGTTGTAATCTAGAGAAGTGTACC   |   |           |         |
|                               |           | >NA3_R_NL4 | CGTGCTGAGTTCCTCAGTCCCAACCGATGATACGACTAGAGGCTATAACACATCCGAAGATG   |   |           |         |
|                               |           |            | CTTGGTGTACTTTCTGGTTGACGGGCCAGCATCAGTTTTGACC  | Psathyrella coprophila CBS 177.72 g 617/619 (99%)   | 0/619(0%) | 0.0     |
|                               |           | >NA3_NL4   | GGAAAGTGTAGAGGAGTGGCATCTTCGGATGTTATAGCCCTCAGTGCATACATCGGTTGGGACTGAG<br>GAACTCAGCAGCCGCAAGGCCGGTCTTTGACCACGTTCTGTCTTAGGATGCTGGCATA<br>ATGGCTTTAATCGACCCGTC  | Psathyrella rybergii comprobante LC 617/619 (99%)   | 0/619(0%) | 0.0     |
| <i>Odontoglossum pardinum</i> | OS-M1 A   | >NA4_F_NL1 | GGCCGTCGAGTTTGAATCTAGAGAAGTGTACC   |   |           |         |
|                               |           | >NA4_R_NL4 | GTGCTCGAGTTCCTCAGTCCCAACCGATGATACGAAACGAGGGCTATAACACACCCGGAGGT   |   |           |         |
|                               |           |            | TGTTGGTGTACTTCTGGTGCAGGGGCCAGCATCAGTTTTGACC  | Coprinellus ellisii cultivo CBS:181.6 624/624(100%) | 0/624(0%) | 0.0     |
|                               |           | >NA4_NL4   | AGGGAATGTGGCACCTTCGGGTGTGTTATAGCCCTCAGTGCATACATCGGTTGGGACTG<br>AGGAACTCAGCAGCCGCAAGGCCGGATTCGTCACGTTCTGTCTTAGGATGCTGGCAT<br>AATGGCTTTAATCGACCCGTC  | Clon de hongo no cultivado A1h116 624/624(100%)     | 0/624(0%) | 0.0     |
| <i>Cyrtorchilum sp</i>        | CMP-M1 C  | >NCMC_F_NL | GCGCGACTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGCCGAATTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGG  |   |           |         |
|                               |           | >NCMC_R_NL | TATTACGGAAGGGACTATAACACTCCCGAAGAGCCACGTTCCCGAGCCTTTATCCCCCTAC  |   |           |         |
|                               |           |            | AGGGAAGCGCTTATGACCAGACTTTACCCTGCGGATCATCTGGTGTCTCACCGGTGCA<br>CTTCCGCTTGGTTAGGCCAGCGTCAATTTGGTAGGGGATAAAGGCTCGGGAAACGTGG<br>CTCTCCGGGAGTGTATAGTCCCTTCGTAATACCCTACC   | Gen de Ascovirgaria occulta para AF 579/582 (99%)   | 0/582(0%) | 0.0     |
|                               |           | >NCMC_NL4  | CTGCAAGGACGCTGGCATAATGGTCATCAGTGACCCGTC  | Gen de Virgaria nigra para ARN ribo 578/582 (99%)   | 0/582(0%) | 0.0     |
| <i>Odontoglossum pardinum</i> | OS-M5 B   | >NM5_F_NL1 | TGTAATTTGCAGAGGATGCTTTTGGCGCGGTGCCTCCGAGTTC  |   |           |         |
|                               |           | >NM5_R_NL4 | TACGCTCGGGCTATAACACTCCCGAGGGAGCCAGTTC  |   |           |         |
|                               |           |            | GTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGGGTTAAACAGTACGTGAAATTTGTA<br>AGGGAAGCACTTATGACCAGACTTGGCCCGGTGAATCATCCAGCGTTCTCGCTGGTGA<br>CTTCCCGGGCTCAGGCCAGCATCAGTTCCGTCGCGGGGATAAAAAGCTTCGGGAACGTGG<br>CTCCCTCGGGAGTGTATAGCCGTTGCATAATACCCTGCGGTGGACTGAGGTTCCGCGCT<br>CCGCAAGGATGCTGGCGTAATGGTCATCAGCGACCCGTC | Tolypocladium ophioglossoides aisl 581/596 (97%)    | 1/596(0%) | 0.0     |
|                               |           | >NM5_NL4   |  | Tolypocladium sp. RKAG 373 28S ge 581/596 (97%)     | 1/596(0%) | 0.0     |
| <i>Cyrtorchilum sp</i>        | CSP-M6R B | >NM6_F_NL1 |  |   |           |         |
|                               |           | >NM6_R_NL4 | GCGTGCTGCGTTCCTCGATCCCAACCGCTGTATGCGACTGAAGGCTATAACACACCCGAAGG   |   |           |         |
|                               |           |            |  | Polyporales sp. strain HUTPL(CF)22 554/554(100%)    | 0/554(0%) | 0.0     |
|                               |           | >NM6_NL4   |  | Trametes sp. JCM 28423 gene for 28 554/554(100%)    | 0/554(0%) | 0.0     |
|                               |           |            | Trametes sp. voucher biocode09-284 554/554(100%)   | 0/554(0%)   | 0.0       |         |

| ESPECIE DE ORQUÍDEA           | NOMBRE   | SECUENCIA  | ANOTACIÓN  | %ID                                 | GAP           | E-value   |     |
|-------------------------------|----------|------------|--|-------------------------------------|---------------|-----------|-----|
| <i>Odontoglossum pardinum</i> | OS-M7R C | >NM7_R_NL4 | GGAGGAGCCACATTCCCAAAGCCTTTATCCCCGGGGCAAAGTATGCTGGCCTGAGCCCG  |                                     |               |           |     |
|                               |          |            | GCTCCTCCGGGAGTGTATAGCCATTGCATAATATCCTGGGGCGGACTGAGGTTGCGCG<br>ATCTGCAAGGATGCTGGCGTAATGGTCATCAGCGACCCGCTCT  | Metapochonia goniodes CBS 891.72    | 579/579(100%) | 0/579(0%) | 0.0 |
|                               |          |            |  | Cultivo de Lecanicillium fusisporum | 579/579(100%) | 0/579(0%) | 0.0 |
|                               |          | >NM7_NL4   |  | Cultivo de Metapochonia bulbilosa   | 579/579(100%) | 0/579(0%) | 0.0 |
| <i>Pleurothallis sp</i>       | PSP-M9 B | >NM9_F_NL1 | TCTGGCGGTCTTCGATCGTCCGAGTTGATGCTGGAGAAGCGTCTCCGCGCTGGACCGTG  |                                     |               |           |     |
|                               |          | >NM9_R_NL4 | CGTGCTGCGGTCTCAGTCCCAACCGTCGTATACGACCCAAGGCTATAACACACCCGAAGGT  |                                     |               |           |     |
|                               |          |            | GGCTCGGTGCATTTCTAGTTGACGGGCCAGCATCAGTTTTGACCGTTGGAAAAAGGTCC<br>TTGGAATGTGGCACCTTCGGGTGTGTTATAGCCTTGGGTCGTATACGACGGTTGGGACTG<br>AGGACCGCAGCACGCCCTTATGGCCGGGTTGCCCCAGTACGTGCTTAGGATGCTGGCG<br>TAATGGCTTTAAACGACCCGCTCTTGA | Phlebia rufa aislado DR60 gen de AF | 625/625(100%) | 0/625(0%) | 0.0 |
|                               |          | >NM9_NL4   |  | Phlebia rufa aislado MR4280 gen de  | 625/625(100%) | 0/625(0%) | 0.0 |
|                               |          |            | Aislado de Hyphodontia crustosa H  | 625/625(100%)                       | 0/625(0%)     | 0.0       |     |
| <i>Pleurothallis sp</i>       | PMP-M2-B | >NPMB_F_NL | TCTGGCGGTCTCCGGCCGTCGAGTTGTAATTTAGAGAAGCGTTATCCGTGCTGGACCGTG   |                                     |               |           |     |
|                               |          | >NPMB_R_NL | GCGGCGTGCTGAGTTCCTCAGTCCCAACCGCAGCATATGACAGGAGGCTATAACACACCCGA   |                                     |               |           |     |
|                               |          |            | CTTGGCGTATTTCCCGGTGGATGGGTCAGCATCAGTTTTGACCGCAGTTGAAAGGCTGGA<br>GGAATGTGGCACCTTCGGGTGTGTTATAGCCTCCTGTCATATGCTGCGGTTGGGACTGAG<br>GAACTCAGCACGCCCAAGGCCGGGATTCGTCCAGTTGCTGCTTAGGATGCTGGCATAA<br>TGTCTGTAACCGACCCGCTCTTGA   | Gen parcial de ARNr 28S de Schizop  | 623/623(100%) | 0/623(0%) | 0.0 |
|                               |          | >NPMB_NL4  |  | Schizophyllum commune aislado (V    | 623/623(100%) | 0/623(0%) | 0.0 |
|                               |          |            | Cultivo comunal de Schizophyllum C   | 622/623 (99%)                       | 0/623(0%)     | 0.0       |     |

Nota. Elaboración propia