



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

“ Aislamiento y purificación de hongos micorrícicos asociados a seis especies de orquídeas de la parroquia Molleturo (Azuay) en un piso altitudinal de 1400 a 1800 msnm ”

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

AUTORAS:

Tania Fernanda Bermeo Sangurima

C.I. 0106631245

Jessica Maribel Sarmiento Sarmiento

C.I. 0302706189

DIRECTORA:

Dra. María-Elena Cazar Ramírez, Ph.D

C.I. 0602243800

ASESORA:

Dra. Raffaella Ansaloni.

C.I. 0103969432

CUENCA- ECUADOR

2017



RESUMEN.

En este proyecto se aislaron y purificaron hongos micorrícicos en seis especies de orquídeas. Se tomaron muestras de raíces de: *Cyrtorchilum serratum*, *Epidendrum secundum*, *Odontoglossum sp*, *Oncidium abortivum*, *Pleurothallis sp* y *Sobralia bimaculata*, en la parroquia Molleturo, Azuay, en un piso altitudinal de 1400 a 1800 msnm.

Inicialmente se seleccionaron e identificaron seis especies de orquídeas para esta investigación. Se muestrearon raíces de las especies en estudio, procediendo a su tratamiento y posterior obtención de aislados fungales según la metodología de Zettler (2011) y Zhu (2008). Los aislamientos se realizaron en dos medios: FIM (Fungi Isolation Medium) y PDA (Patata Dextrosa Agar). Después se monitoreó el crecimiento en medio PDA para finalmente purificar el cultivo de hongos posiblemente micorrícicos.

Se obtuvieron 25 aislados fungales asociados a raíces de *Cyrtorchilum serratum*, *Epidendrum secundum*, *Odontoglossum sp*, *Oncidium abortivum*, *Pleurothallis sp* y *Sobralia bimaculata*. La comparación con claves morfológicas permitió relacionar a los aislados con el género *Tulasnella*.

Los asilados fungales obtenidos, serán utilizados en la segunda etapa del proyecto “Estudio de la relación simbiótica orquídea-micorriza en la provincia del Azuay, Ecuador”, en el que se empleará herramientas de biología molecular para la identificación de género y especie. Además este proyecto contribuirá a la formación de un banco de microorganismos, los cuales se utilizarán como posibles factores de enriquecimiento para la germinación y propagación de orquídeas.

Palabras clave: Hongos, micorriza, orquídea.



ABSTRAC.

In this project the mycorrhizae fungi was isolated and purified in six orchid species. The samples of roots were taken of: *Cyrtochilum serratum*, *Epidendrum secundum*, *Odontoglossum sp*, *Oncidium abortivum*, *Pleurothallis sp* and *Sobralia bimaculata*, in the Molleturo town, Azuay, from altitude of 1400 to 1800 msnm.

At the beginning it was selected and identified six orchid species to do this investigation. The roots of the species for the study were sampled and treated to obtain the fungal isolates according to the methodology of Zettler (2011) and Zhu (2008). The isolates realized with two mediums: FIM (Fungi Isolation Medium) and PDA (Patata Dextrosa Agar). After that it was monitored the growth in PDA and so finally purifying the fungal culture possibly mycorrhizal.

It got 25 fungal isolates associated to the roots of the *Cyrtochilum serratum*, *Epidendrum secundum*, *Odontoglossum sp*, *Oncidium abortivum*, *Pleurothallis sp* and *Sobralia bimaculata*. The comparison with morphological clues permitted to relate to the isolates with the *Tulasnella* taxon.

The fungal isolates obtained will be used in the second phase of the project “Estudio de la relación simbiótica orquídea-micorriza en la provincia del Azuay, Ecuador”, in which it will employ tools of molecular biology in order to categorize the taxon and specie. Also this project will contribute to the formation of a bank of microorganism; these will use as possible factors to promote the seed germination and propagation of orchids.

Key words: fungi, mycorrhiza, orchid.



ÍNDICE

RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN.....	15
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVOS.....	16
1. Objetivo general.....	16
2. Objetivos específicos.....	16
CAPÍTULO I.....	17
1. Marco teórico.....	17
1.1. Orquídeas.....	17
1.1.1. Generalidades.....	17
1.1.2. Estructura.....	18
1.1.3. Tipos de orquídeas.....	21
1.1.4. Descripción de las especies en estudio.....	24
1.2. Micorrizas.....	28
1.2.1. Generalidades.....	28
1.2.2. Importancia de las micorrizas.....	29
1.2.3. Clasificación de micorrizas.....	29
CAPÍTULO II.....	32
2. Metodología.....	32
2.1. Área de estudio y muestreo.....	32
2.2. Métodos.....	33
CAPÍTULO III.....	39
3. Resultados.....	39
3.1. Crecimiento en medio Fungi Isolation Medium (FIM).....	39
3.2. Resultados del replante en medio PDA.....	42
3.3. Resultados del microcultivo.....	44
CAPÍTULO IV.....	56



4. Discusión, conclusiones y recomendaciones.	56
4.1. Discusión.....	56
CONCLUSIONES.....	60
RECOMENDACIONES.	61
BIBLIOGRAFÍA.	62
ANEXOS.....	65



ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.

Figura 1: <i>Flor de orquídea</i>	17
Figura 2: <i>Raíz de orquídea</i>	18
Figura 3: <i>Pseudobulbos de odontoglossum sp.</i>	19
Figura 4: <i>Hojas conduplicadas de cyrtochilum serratum.</i>	19
Figura 5: <i>Hojas cilíndricas de trichocentrum sp.</i>	20
Figura 6: <i>Estructura de la flor de orquídea</i>	21
Figura 7: <i>Tipos de inflorescencias de las orquídeas.</i>	21
Figura 8: <i>Orquídea terrestre</i>	22
Figura 9: <i>Orquídea epífita.</i>	23
Figura 10: <i>Cyrtochilun serratum</i>	24
Figura 11: <i>Epidendrum secundum.</i>	25
Figura 12: <i>Odontoglossun sp.</i>	25
Figura 13: <i>Oncidium abortivum.</i>	26
Figura 14: <i>Pleurothallis sp.</i>	27
Figura 15: <i>Sobralia bimaculata</i>	28
Figura 16: <i>Morfología de las hifas (e, f, g, h) y presencia de células monilioides (i).</i> (atala et al. 2015)	31
Figura 17: Google earth. (08/21/2015). [mapa de azuay, ecuador en google earth]	32
Figura 18: Área de muestreo. Adaptado de google earth.....	33
Figura 20: <i>Esquema de muestreo de las raíces de orquídeas.</i>	34
Figura 21: <i>Fracciones de la raíz. Parte A (apical), parte B (intermedia) y parte C</i> (basal).....	35
Figura 22: <i>Esquema de cultivo en medio patata dextrosa agar.</i>	36
Figura 23: <i>Esquema de siembra en tubo aplicando la técnica de punción</i>	37
Figura 24: <i>Esquema de proceso para realizar el microcultivo</i>	38
Figura 25: <i>Resultados de crecimiento en medio FIM por fragmentos (A, B y C) de las</i> <i>raíces de las seis especies de orquídeas.</i>	41
Figura 26: <i>Resultados de la siembra en medio FIM por especie de orquídea.</i>	41
Figura 28: <i>Replante en medio PDA por sección de raíz</i>	43
Figura 29: <i>Resultado del replante en medio PDA por especies de orquídeas.</i>	44
Figura 30: <i>Resultados del microcultivo por especie de orquídea.</i>	55
Figura 31: <i>Preparación de la cámara de flujo con los materiales a utilizar. [fotografía]</i>	66
Figura 32: <i>Pelotón observado con lente 20x [fotografía].</i>	67



Índice de tablas.

Tabla 1: Esquema de codificación de cajas para los cultivos.....	35
Tabla 2: Resultados del cultivo en el medio FIM.....	39
Tabla 3: Resultados del cultivo en el medio FIM.....	40
Tabla 4: Resultados del replante en medio PDA.....	42
Tabla 5: Hongos potencialmente micorrícicos obtenidos en el estudio.	54



CLÁUSULAS DE DERECHO DE AUTOR.



Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

Yo Tania Fernanda Bermeo Sangurima, autora del Trabajo de Titulación "Aislamiento y purificación de hongos micorrícicos asociados a seis especies de orquídeas de la parroquia Molleturo (Azúay) en un piso altitudinal de 1400 a 1800 msnm", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora

Cuenca, 12 de Mayo del año 2017

Tania Fernanda Bermeo Sangurima

C.I: 0106631245



Yo Jessica Maribel Sarmiento Sarmiento, autora del Trabajo de Titulación "Aislamiento y purificación de hongos micorrízicos asociados a seis especies de orquídeas de la parroquia Molleturo (Azuay) en un piso altitudinal de 1400 a 1800 msnm", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora

Cuenca, 12 de Mayo del año 2017

Jessica Maribel Sarmiento Sarmiento

C.I: 0302706189



CLÁUSULAS DE PROPIEDAD INTELECTUAL.



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

Yo Tania Fernanda Bermeo Sangurima, autora del Trabajo de Titulación "Aislamiento y purificación de hongos micorrizicos asociados a seis especies de orquídeas de la parroquia Molleturo (Azúay) en un piso altitudinal de 1400 a 1800 msnm", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 12 de Mayo del año 2017

Tania Fernanda Bermeo Sangurima

C.I: 0106631245



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

Yo Jessica Maribel Sarmiento Sarmiento, autora del Trabajo de Titulación "Aislamiento y purificación de hongos micorrizicos asociados a seis especies de orquídeas de la parroquia Molleturo (Azúay) en un piso altitudinal de 1400 a 1800 msnm", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 12 de Mayo del año 2017

Jessica Maribel Sarmiento Sarmiento

C.I: 0302706189



DEDICATORIA.

A mi amado padre Celestial, amada madre María, amados maestros y a toda la divinidad que a cada instante me proveen de misericordia, amor, paz, protección, guía y luz divina.

A mis abnegados padres, Segundo Pedro y Rosa Elena, quienes me amparan desde que llegue a este mundo y que con su sacrificio, día a día me dieron lo suficiente y necesario para poder cumplir este logro, que es parte de ellos.

A mis hermanas Diana Janeth y María Isabel, quienes son un ejemplo a seguir, por su fortaleza, amor, compasión, cariño y sobretodo tolerancia, que me han transmitido desde que tengo los primeros recuerdos de mi vida.

A mis hermanos Luis Alberto y Edgar Fabián, a quienes los llevo en mis pensamientos por su amor, cariño y apoyo incondicional que me entregan a pesar de la distancia.

A mis familiares, en quienes siempre encontré una palabra de apoyo y ánimo en especial a mi prima Gabriela Lorena, mi tía María Imelda, mi abuelita María Hermelinda y mi padrino Issac Andrés.

A mis compañeros, quienes con el pasar del tiempo fueron dejando huellas en mi camino hacia este logro y ahora forman parte de mi vida, en especial a Mayra Isabel, María Verónica, Mónica Patricia, Diana Beatriz y Jaime Alfredo.

A mi compañera Jessica Maribel, quien me permitió realizar este proyecto junto con ella, para alcanzar nuestro anhelado logro.

A ti cariño mío S.A., a quien sin querer encontré en el camino a este logro y hoy formas parte de mi vida.

Tania.



DEDICATORIA.

Este proyecto de investigación va dedicado a Dios que me ha dado la fortaleza para llegar a este momento tan importante de mi vida.

A mis padres José y Gloria, quienes siempre han estado brindándome su amor y apoyo incondicional, gracias a sus esfuerzos he podido llegar a completar una de mis metas. Siempre han confiado y creído en mí, ustedes han sido mi inspiración para nunca darme por vencida cuando se han presentado momentos difíciles.

A mis hermanos Javier, Braulio y Wilma que a pesar de la distancia siempre me han estado apoyándome y me han enseñado que todo es posible con perseverancia y dedicación.

A mis amigos por siempre creer en mí y estar siempre alentándome para conseguir mis metas.

A mi compañera Tania que con mucha voluntad y perseverancia hemos logrado nuestro objetivo.

A todas las personas que han contribuido directa o indirectamente en la realización de este proyecto de investigación.

Jessica.



AGRADECIMIENTOS.

A nuestra directora de tesis Dra. María Elena Cazar, quien nos dedicó parte de su tiempo y conocimientos para poder culminar este logro. Gracias por su paciencia, dedicación, motivación y aliento. Ha sido un privilegio poder contar con su guía y ayuda.

A la Dra. Rafaella Ansaloni, Blga. María Elisa Durán y Dr. Rodrigo Caroca, quienes nos permitieron formar parte del proyecto “Estudio de la relación simbiótica orquídea micorriza en la provincia del Azuay, Ecuador” y además nos proporcionaron sus conocimientos y tiempo para llevar a cabo este trabajo. Gracias por su atención y amabilidad durante la realización de este trabajo de investigación.

Gracias a BQF. Mónica Narváez y Sr. Servando Morocho, quienes nos facilitaron las herramientas necesarias para el desarrollo de nuestro proyecto y por compartir su valioso tiempo y conocimiento con nosotras ya que su aporte fue fundamental el desarrollo de nuestro trabajo. Sin ustedes este proyecto no hubiera sido el mismo.

Gracias a todas las personas que directa o indirectamente contribuyeron a la realización de nuestro proyecto.

Tania y Jessica.



INTRODUCCIÓN.

Las orquídeas son plantas exóticas reconocidas por su gran diversidad. Hasta la actualidad se han descrito alrededor de 25000 especies; sin embargo los estudios no abarcan todas las regiones geográficas donde pueden existir orquídeas (Fischer 2007, Freuler 2008).

Para la germinación y propagación de especies de orquídeas se generan asociaciones simbióticas, a nivel de raíz, con ciertos tipos de hongos. Esta unión simbiótica se denomina micorriza y se caracteriza porque las dos especies se benefician de la misma, ya que tanto la planta como el hongo obtienen los nutrientes necesarios para su desarrollo (Curtis & Schnek 2008).

Ecuador es uno de los 17 países megadiversos del mundo. Cuenta con grandes recursos naturales, sin embargo, estos recursos se han ido deteriorando debido a las demandas de la población ya que no existe una normativa que regule la conservación, uso y aprovechamiento sostenible de estos recursos (Ministerio del Medio Ambiente del Ecuador 2012).

Las orquídeas constituyen una de las familias más numerosas y evolucionadas del reino vegetal. A pesar que en el Ecuador existe gran diversidad de las mismas, existen ciertas especies en peligro de extinción, por lo que la investigación de hongos con actividad micorrícica, puede ser de utilidad en la propagación y conservación de éstas.

Según el Ministerio del Ambiente, en la provincia del Azuay la tasa aproximada de deforestación anual promedio entre el año 2000 a 2008, es de 1,085 ha/año. La asociación planta – micorriza puede favorecer los procesos de germinación y absorción de nutrientes. Por este motivo el estudio de hongos micorrícicos reviste importancia ya que se trata de una estrategia para preservar y conservar las diferentes especies de orquídeas existentes en nuestro medio.

En el presente estudio se aislaron e identificaron por claves morfológicas hongos posiblemente micorrícicos a partir de seis especies de orquídeas de la parroquia de Molleturo de la provincia del Azuay. Los resultados de este estudio se aplicarán en investigaciones posteriores orientadas a la identificación molecular de los hongos micorrícicos obtenidos y en la evaluación de la germinación simbiótica en las semillas de orquídeas.



HIPÓTESIS.

Algunos de los hongos aislados y purificados asociados a las orquídeas seleccionadas en la parroquia Molleturo de la provincia del Azuay en el piso altitudinal bajo comprendido entre 1400 a 1800 metros sobre el nivel del mar son micorrizas.

OBJETIVOS.

1. Objetivo general.

Aislar y purificar hongos tipo micorriza en seis especies de orquídeas de la parroquia Molleturo, Azuay ubicada entre 1400 a 1800 msnm.

2. Objetivos específicos.

- Identificar y seleccionar seis especies de orquídeas en la parroquia Molleturo.
- Aislar y caracterizar hongos que probablemente son micorrizas.
- Purificar los cultivos obtenidos.

CAPÍTULO I.

1. Marco teórico.

1.1. Orquídeas.

1.1.1. Generalidades.

La palabra orquídea que significa ‘testículo’ proviene del latín *orchis*, apareció por primera vez en el manuscrito del filósofo griego Teophrastus (371-285 a.C.). Este nombre hace referencia a los pseudobulbos de algunas especies de orquídeas; y al uso medicinal que se le asignaba a sus flores como afrodisíaca y potenciadora de la fertilidad.

Las orquídeas constituyen una de las familias más numerosas y evolucionadas del reino vegetal. Se caracterizan por poseer flores con una gran diversidad de colores y formas; además tienen la capacidad de adaptarse y crecer en diferentes ambientes como rocas, lava volcánica, desiertos, etc. Sin embargo la mayoría de orquídeas crecen sobre árboles sin que lleguen a considerar como plantas parásitas.

Las orquídeas constituyen una familia de gran variabilidad y en la actualidad se han descrito alrededor de 25000 especies; sin embargo todavía no se han estudiado todos los campos fitogeográficos en especial en el continente americano. En el Ecuador se ha observado que cuatro de cada diez plantas son orquídeas (Fischer 2007, Freuler 2008).



Figura 1: Sarmiento, J. (2017). *Flor de orquídea*. Cuenca, Ecuador.

1.1.2. Estructura.

Las orquídeas son una familia de plantas con una gran variedad. Sin embargo su estructura es siempre la misma: sus flores tiene seis partes y la nervadura de sus hojas siempre discurre en paralelo. Sus brotes desarrollan primero de una sola hoja (Röllke 2010). A continuación se describen cada una de las partes de las orquídeas:

- **Raíces.**

Por lo general las raíces son alargadas, cubiertas por un tejido esponjoso y blanquecino llamado velamen. Este cumple la función de captar agua y nutrientes.

Las características de la raíz varían según el tipo de crecimiento así las orquídeas epífitas poseen velamen, mientras que las litófitas y terrestres carecen del mismo (Perú 2015).

Las raíces son de color blanco pero las puntas son de color verde, cuando están en buenas condiciones (Fischer 2007).

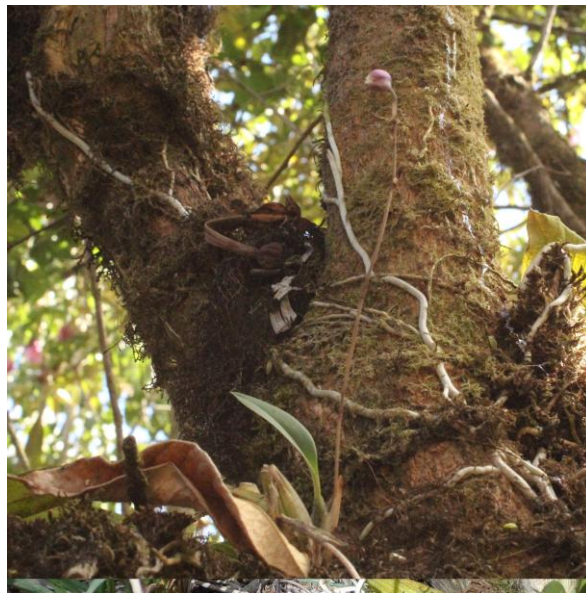


Figura 2: Bermeo, T. (2016). *Raíz de orquídea*. Molleturo, Ecuador.

- **Pseudobulbo.**

Se trata de un tallo modificado, este puede ser alargado y estar constituido de varios entrenudos. Otros tallos no presentan entrenudos y son lisos o arrugados. Por lo general, están cubiertos parcialmente en el estado adulto por brácteas (hojas modificadas). Algunos ejemplos de orquídeas con pseudobulbo son: *Oncidium*, *Odonthoglossum*, *Cattleya* etc.



Figura 3: Bermeo, T. (2016). *Pseudobulbos de Odontoglossum sp.* Molleturo, Ecuador

- **Hojas.**

La mayoría presentan hojas con venación paralela y algunas con venación reticulada. Los bordes siempre son enteros.

Se puede observar por lo general dos tipos de hojas:

a) Hojas conduplicadas.

Por lo general tienen todas las venas del mismo tamaño o con una vena central principal. Usualmente, estas hojas son gruesas o coriáceas.



Figura 4: Bermeo, T. (2016). *Hojas conduplicadas de Cyrtochilum serratum.* Molleturo, Ecuador.

b) Hojas cilíndrica o terete

Son hojas alargadas y cilíndricas. Tienen la apariencia de las hojas de cebolla (Perú 2015).



Figura 5: Hojas cilíndricas de *Trichocentrum* sp. (Perú 2015).

- **Flor.**

La flor de las orquídeas varían en tamaño y forma, puede ser única o en espiga.

La flor se compone de seis partes que son tres sépalos (cáliz) que protegen los órganos reproductores de los golpes y del viento; y tres pétalos (corola), dos laterales idénticos y un tercero que se diferencia de los dos primeros por su forma y color, al que se conoce con el nombre de labelo. El labelo sirve para que posen los insectos.

En las orquídeas monopodiales, las flores nacen de las axilas de las hojas, mientras que en las orquídeas simpodiales las inflorescencias brotan en la base de los pseudobulbos a lo largo del tallo, en los nodos (Freuler 2008, Martija 2012).

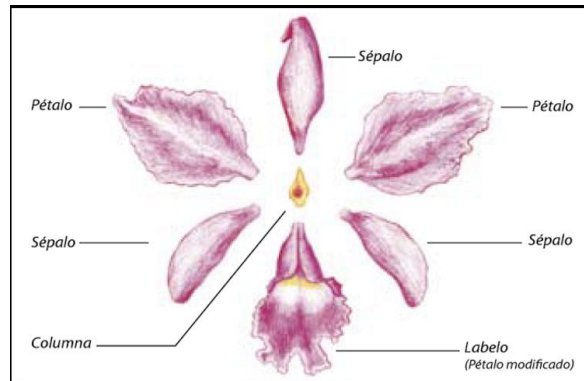


Figura 6: Estructura de la flor de orquídea (Freuler 2008).

- **Inflorescencias.**

Es muy común que las flores se agrupen en inflorescencias, es decir sobre un tallo o raquis. Según la posición sobre el raquis, la flor puede ser basal, axilar o apical (Freuler 2008).



Figura 7: Tipos de inflorescencias de las orquídeas (Freuler 2008).

- **Fruto.**

Los frutos de las orquídeas son las cápsulas. En éstas se encuentran contenidas las semillas, las cuales son muy pequeñas y pueden contener miles por cápsula. Su tamaño puede ser menor a un grano de arena. El número de semillas varía dependiendo de la especie pudiendo ser de cientos o miles (Freuler 2008).

1.1.3. Tipos de orquídeas.

La familia Orchidaceae es una de las más evolucionadas dentro del reino vegetal. Se caracteriza por su gran capacidad de adaptarse a diferentes ambientes y presentan los siguientes hábitats dependiendo del lugar en el crecen (López & Pulido 2007).

- **Terrestres**

Las orquídeas terrestres están ampliamente distribuidas por el planeta, desde el desierto australiano hasta casi el círculo polar.

Son plantas vivaces. Su sistema radicular es subterráneo y se desarrolla en forma de tubérculo, rizoma o de pseudobulbo, o incluso como raíces más finas. Tienen un periodo de latencia en el que todos sus órganos aéreos desaparecen y conservan solo bajo tierra los bulbos que pueden tener distintas formas dependiendo de la especie de orquídea.

Las orquídeas terrestres son imprevisibles en su floración. Pueden permanecer ausentes durante muchos años y cubrir campos enteros sin aviso previo y no volver a resurgir hasta el cabo de unos años (Martija 2012).



Figura 8: Bermeo, T. (2017). *Orquídea terrestre*. Cuenca, Ecuador.

- **Litófitas**

Las orquídeas litófitas aparecen y se desarrollan en suelos rocosos y en condiciones climáticas a menudo extremas (acantilados cretáceos al borde del mar); sus raíces crecen a menudo bajo el musgo que cubren las rocas que colonizan.

Su comportamiento es similar al de las orquídeas epífitas; también necesitan tener una estación de lluvias. No obstante, presentan una gran resistencia a la sequía, desarrollando un follaje más espeso.

- **Epífitas**

Las orquídeas epífitas son aquellas que tienen la capacidad de crecer sobre los árboles. Se alimentan únicamente de lo que las rodea: detritus acumulado en las ramas y excrementos de pájaros, y las riegan las aguas de lluvia, ya que el árbol constituye sólo un soporte.

Las raíces son aéreas y absorben la humedad del aire. Las flores de las orquídeas epífitas son muy diversas y sorprendentes, tanto en su aspecto como por sus colores.

Cada una de ellas, para asegurar su propia supervivencia, se han adaptado para que las polinice un solo insecto.

Su crecimiento está organizado en dos sistemas principales:

- ✓ Orquídeas de crecimiento simpodial: las flores se desarrollan a partir de un tallo horizontal y rastrero que se llama rizoma; la mayoría producen pseudobulbos cuya función es almacenar agua, un pseudobulbo vive de cinco a seis años, y su forma y tamaño varía según la especie de orquídea (cónica, alargada, redonda, acanalada); además de su función como reserva, los pseudobulbos sirven como punto de salida de las hojas; las hojas son muy variadas en sus formas (largas y estrechas, más o menos redondas) y número; las raíces pueden ser fibrosas, finas o carnosas.
- ✓ Orquídeas de crecimiento monopodial: las hojas se desarrollan alternativamente en el tallo, que crece vertical; las flores proceden de las raíces aéreas que derivan de la axila de las hojas (Martija 2012).



Figura 9: Sarmiento, J. (2017). *Orquídea epífita*. Cuenca, Ecuador.

1.1.4. Descripción de las especies en estudio.

1.1.4.1. *Cyrtochilum serratum*



Figura 10: Bermeo, T. (2016). *Cyrtochilum serratum*. Molleturo, Ecuador.

Etimología.- El nombre proviene del género de voces griegas que hacen referencia al labelo curvado que poseen estas plantas.

Descripción.- Las plantas de *Cyrtochilum* presentan los pseudobulbos de forma variable, por lo general ampliamente espaciados, y son en su mayor parte cubiertos por vainas largas y bandas de hojas.

Posee inflorescencias de gira que a veces llegan a medir hasta 3 metros de largo, sus flores son llamativas y son de color amarillo con manchas marrones. Los sépalos son anchos y esparcidos, con bordes ondulados; los pétalos son ligeramente más pequeños pero con la misma coloración. Los labios son relativamente cortos, flechados, su punta elongada y acurrucada; en la base del labio se encuentra una masa verticilada o dentada de tejido (Meisel, Kaufmann, & Pupulin 2014).

1.1.4.2. *Epidendrum secundum*.



Figura 11: Sarmiento, J. (2016). *Epidendrum secundum*. Molleturo, Ecuador.

Etimología.- proviene del griego “*epi*”, que significa sobre; y “*dendron*”, árbol, refiriéndose a los hábitos de epífitas de las especies aquí incluidas.

Descripción.- Es la más común, se puede encontrar en Centroamérica y la costa tropical de Suramérica. Produce racimos cortos con flores amarillas púrpuras. Requiere condiciones cálidas y húmedas. Produce racimos cortos de color verde amarillento a flor púrpura. La mayoría de las especies tienen caña como tallos y por lo general tienen cuatro polinios. La mayoría crecen bien a temperaturas intermedias (5°-15° C por la noche), con sombra ligera y humedad durante todo el año. Crecen naturalmente en musgo o en rocas cubiertas de humus (Pridgeon 2006).

1.1.4.3. *Odontoglossum sp.*



Figura 12: Bermeo, T (2016). *Odontoglossum sp.* Molleturo, Ecuador.

Etimología.- Proviene del griego *odonto*, diente; *glossa*, lengua, en referencia al callo parecido a un diente en un labio tipo tonel.

Descripción.- son plantas epífitas simpodiales, el género se caracteriza por la presencia de: pseudobulbos comprimidos, inflorescencia que proviene de las axilas de las vainas, sépalos y pétalos libres; el labio generalmente grande y paralelo a la columna, el callo generalmente compuesto de lamelas carnudas con dientes, la columna sin un pie y generalmente con alas laceradas. La mayor parte de estas plantas se sitúan en altitudes comprendidas entre los 1500 y 3000 metros (Pridgeon 2006).

El género *Odontoglossum* incluye alrededor de 300 especies. En Ecuador existen alrededor de 60 especies por lo que es necesario que la planta se encuentre en etapa de floración para la identificación de la especie (Cueva & Moya 2015).

1.1.4.4. *Oncidium abortivum*.



Figura 13: Sarmiento, J. (2017). *Oncidium abortivum*. Molleturo, Ecuador.

Etimología.- Proviene del latín *abortivus*, atrofiado o abortivo, ya que esta especie produce numerosas flores abortivas además de las normales.

Descripción.- planta epífita, rizoma corto, pseudobulbo aovado, comprimido lateralmente, de dos filos, una hoja apical y estrechamente elíptica. Inflorescencia paniculada, ascendente a erguido. Las flores suelen ser de color amarillo claro a amarillo marrón. El pedúnculo más corto que el raquis, ramas a menudo ramificadas y ocupadas con 1-3 flores (fértil) normales y 2-3 flores abortivas (estériles). Sépalos laterales descendentes, casi paralelos entre sí, estrechamente lanceolados. Pétalos replicados hacia fuera, lanceolados, los lóbulos laterales muy grandes, redondeados apicalmente. Es

considerado una especie endémica de Venezuela pero se ha encontrado en países como Ecuador, Colombia y Perú (Koniger 2004).

1.1.4.5. *Pleurothallis* sp.



Figura 14: Bermeo, T. (2016). *Pleurothallis* sp. Molleturo, Ecuador.

Etimología.- Su nombre proviene del término griego “pheurothalos” que significa “ramas parecidas a costillas”, esto hace referencia a la similitud de la costilla de los tallos de muchas de sus especies.

Descripción.- Las plantas de este género presentan una gran variedad de tamaño, pueden ser epífitas o terrestres, erectas o rizomatosas, agrupadas o rastreras, con tallos de hojas largos o cortos, hojas gruesas o delgadas y pueden poseer una sola flor o muchas flores en racimo. Las flores varían de gruesas a delicadas. Los sépalos pueden variar de libres a congénitos, con o sin cola. Los pétalos, el labio y la columna exhiben todo tipo de tamaños y formas. Siempre hay dos polinios. Las plantas de este género pueden crecer en distintos tipos de ambientes, algunas especies crecen en condiciones de invernadero cálido, intermedio o fresco (Pridgeon 2006).

El género *Pleurothallis* tiene alrededor de 1200 especies de orquídeas en los trópicos americanos y en Ecuador existen cerca de 473 especies por lo que es indispensable que se encuentren en floración para su identificación (Banks 2006, Rittershausen & Rittershausen 2006)

1.1.4.6. *Sobralia bimaculata*.



Figura 15: Bermeo, T. (2017). *Sobralia bimaculata*. Molleturo, Ecuador.

Etimología.- El género fue nombrado en honor al botánico español Francisco Sobral.

Descripción.- Este género se caracteriza por sus tallos de caña con hojas finas, pesadamente veteadas en los nodos, las inflorescencias pueden ser terminales o laterales desde las axilas de las hojas superiores. Los sépalos y pétalos son libres; el labio grande está conectado a la columna, la columna es delgada, estrechamente alada.

Estas plantas pueden ser epífitas o terrestres y crecen en bosques húmedos desde el nivel del mar hasta 2000 metros de altura (Pridgeon 2006).

1.2. Micorrizas.

1.2.1. Generalidades.

El término micorriza, que literalmente significa “hongo-raíz”, fue propuesto por Frank en 1885, para definir asociaciones simbióticas, mutualistas, no patógenas, entre raíces de plantas y micelios de hongos, en las que ambos resultan beneficiados. En esta asociación, la planta le proporciona al hongo carbohidratos (azúcares, producto de su fotosíntesis) y un microhábitat para completar su ciclo de vida; mientras que el hongo, a su vez, le permite a la planta una mejor captación de agua y nutrientes minerales con baja disponibilidad en el suelo (principalmente fósforo), así como defensas contra patógenos (Camargo et al. 2012).



1.2.2. Importancia de las micorrizas.

En el reino vegetal el 85% de las plantas vasculares se asocian con cierto tipo de hongos constituyendo una micorriza, que es un factor benéfico contra el estrés ambiental que permite un mejor desarrollo de la planta y de esta manera se mejora la productividad y la estabilidad vegetal. La utilización de micorrizas podría aplicarse en el sector agrícola, ya que son reconocidas como los mejores fertilizantes naturales (Izco *et al.* 2004).

La importancia de las micorrizas se debe a que esta unión simbiótica entre las raíces de las orquídeas y los hongos todavía no se ha descrito en su totalidad; sin embargo se cree que las raíces de las plantas secretan azúcares, aminoácidos y otras sustancias orgánicas necesarias para el desarrollo del hongo, mientras que los hongos por su parte favorecen la absorción de minerales y agua (Camargo *et al.* 2012).

1.2.3. Clasificación de micorrizas.

Las micorrizas se han clasificado según la estructura de la misma, conformando cuatro grupos que son los que se describen a continuación:

1.2.3.1. Ectomicorrizas.

Las ectomicorrizas o micorrizas ectotróficas se caracterizan porque desarrollan una espesa capa de micelio sobre la zona cortical de las raíces absorbentes de la planta, las hifas del hongo no penetran en el interior de las células de la raíz, sino que se ubican sobre y entre las separaciones de éstas. En este tipo de micorriza la simbiosis se produce únicamente en raíces secundarias cortas y de crecimiento limitado. Este tipo de simbiosis predomina en los árboles de zonas templadas, se produce principalmente sobre especies forestales y leñosas, siendo especialmente característico en hayas, robles, eucaliptos y pinos. Los hongos que la forman son tanto *Basidiomycota* como *Ascomycota* (Jakobsen, Varma, & Hock 1995, Izco *et al.* 2004). En las asociaciones ectomicorrícicas hay poca especificidad por el hongo simbionte o la planta hospedera (Izco *et al.* 2004).

1.2.3.2. Endomicorrizas.

Las endomicorrizas o también conocidas como micorrizas endotróficas son muy variadas estructuralmente y se establecen cuando los hongos que las producen se caracterizan por colonizar intracelularmente el córtex radical o sea que no hay manto externo que pueda verse a simple vista. Las hifas se



introducen inicialmente entre las células de la raíz, pero luego penetran en el interior de éstas, formando vesículas alimenticias y arbuscúlos. Los hongos que producen este tipo de micorrizas son simbioses obligatorios, no tienen hifas tabicadas y pertenecen al grupo de los zigomicetos. Por ello a este grupo se lo conoce también como micorrizas vesículoarbusculares (MVA), las cuales constituyen la simbiosis más extendida sobre el planeta. Los hongos que la forman pertenecen a la división *Glomeromycota* y se dan en todo tipo de plantas, aunque predominan en hierbas y gramíneas. Abundan en suelos pobres como los de las praderas y estepas, la alta montaña y las selvas tropicales (Jakobsen, Varma, & Hock 1995, Izco et al. 2004).

1.2.3.3. Ectendomicorrizas.

Presentan características intermedias entre las Ectomicorrizas y las Endomicorrizas, pues presentan manto externo, como las ectomicorrizas, pero también penetran en el interior de las células, como las endomicorrizas y no existen vesículas ni arbuscúlos. Este grupo se presenta tanto en *Basidiomycota* como *Ascomycota* y son más abundantes en angiospermas que en gimnospermas. Su distribución es restringida (Jakobsen, Varma, & Hock 1995).

1.2.3.4. Micorrizas orquidioides

Las orquídeas son micoheterotróficas en alguna fase de su ciclo biológico, forman un tipo particular de simbiosis denominada “micorriza orquidioides” principalmente con hongos basidiomicetos. La colonización del hongo se produce en un estadio muy temprano, las semillas tienen pocas reservas y cuando germinan ya cuentan con hongos micorrícicos que les aportan carbohidratos y nutrientes; la infección continúa con el crecimiento de la planta adulta (Izco et al. 2004, Mosquera 2010)

La micorriza orquidioides se caracteriza porque la mayoría de los hongos que participan en la asociación pertenecen al género-forma *Rhizoctonia*, y los géneros teleomorfos que le corresponden son: *Ceratobasidium*, *Tulasnella*, *Sebacina* y *Thanatephorus*.

El género-forma *Rhizoctonia* en su fase asexual (anamorfo) se caracteriza por presentar un micelio estéril incoloro, que se torna oscuro a medida que va madurando. Presenta células largas y ramificaciones en ángulo recto con respecto a la hifa principal; en ocasiones se estrecha ligeramente a nivel de la bifurcación y posee un septo cerca de ella. En ciertas condiciones, el

hongo produce ramilletes de células cortas y anchas, de forma oval o triangular, denominadas células monilioides, de las cuales se pueden desarrollar pequeños esclerocios.

La fase sexual (teleomorfo) que corresponde a *Rhizoctonia* incluye los géneros *Ceratobasidium*, *Tulasnella*, *Sebacina* y *Thanatephorus*, los cuales pueden diferenciarse por sus estructuras reproductivas conformadas por los basidiocarpos donde se producen las basidiosporas.

Una característica de clasificación para el género-forma *Rhizoctonia* es el número de núcleos en células de hifas jóvenes, que pueden ser uni-, bi- o multinucleadas. Muchas de las rhizoctonias micorrícicas de orquídeas son binucleadas con su teleomorfo en *Ceratobasidium* y son menos frecuentes las multinucleadas, cuyo teleomorfo se expresa en el género *Thanatephorus*; otro grupo de *Rhizoctonia* binucleada corresponde al teleomorfo *Tulasnella* (Mosquera 2010).

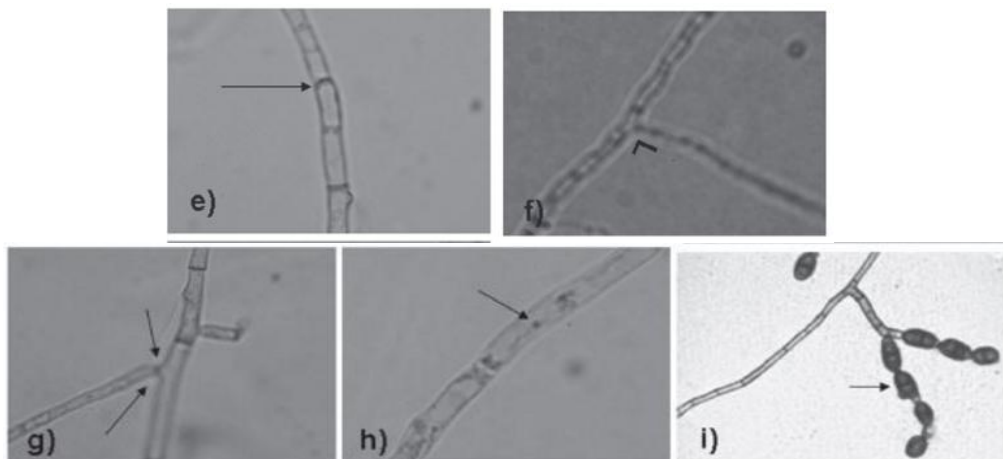


Figura 16: Morfología de las hifas (e, f, g, h) y presencia de células monilioides (i). (Atala et al. 2015)

CAPÍTULO II.

2. Metodología

2.1. Área de estudio y muestreo.

El presente estudio es experimental de tipo exploratorio transversal. El área de estudio corresponde a la comunidad “San José de Huigra” de la Parroquia Molleturo perteneciente a la provincia del Azuay, localizado a una altura de 1615 msnm. El área de muestreo fue georeferenciada, obteniendo las siguientes coordenadas X: 679583; Y: 9696380; Zona: 17.

El muestreo se realizó por duplicado y el tamaño de la muestra fue de 10 raíces jóvenes de las especies de orquídeas seleccionadas previamente.

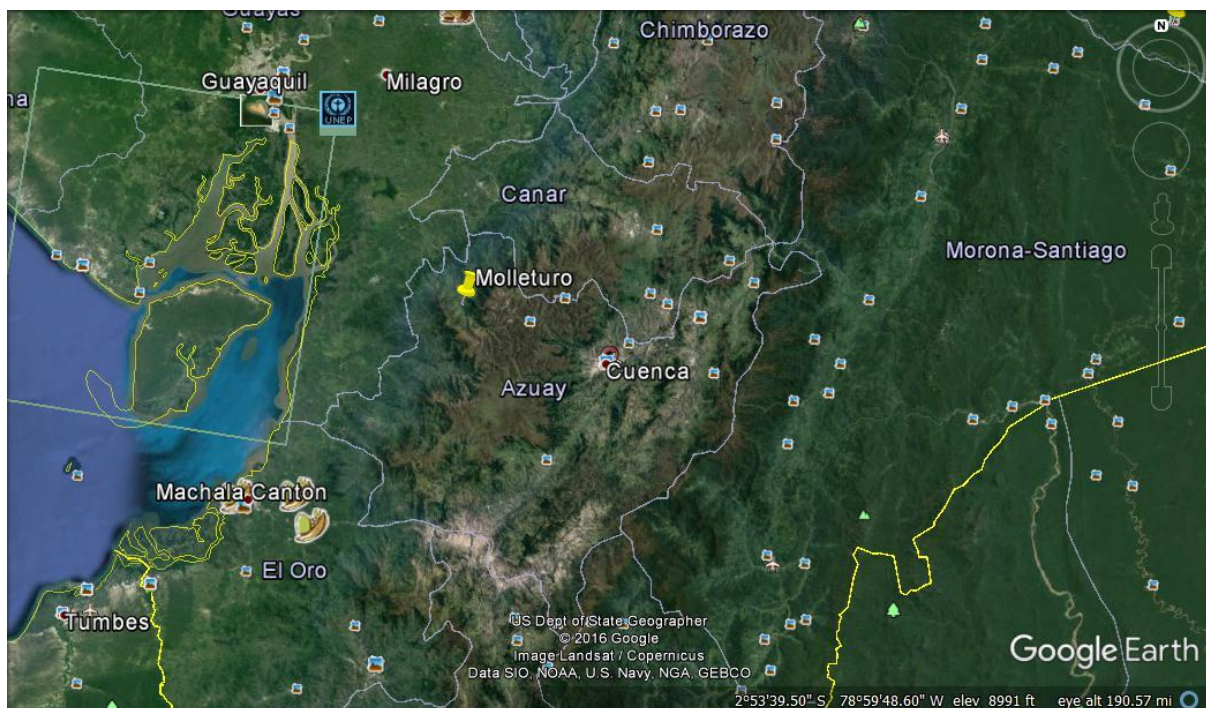


Figura 17: Google Earth. (08/21/2015). [Mapa de Azuay, Ecuador en Google Earth]



Figura 18: Área de muestreo. Adaptado de Google Earth.

2.2. Métodos.

2.2.1. Identificación de las orquídeas.

La identificación de las orquídeas se realizó mediante análisis de fotografías tomadas en el momento de la recolección de muestras. Las imágenes fueron contrastadas con criterios botánicos, con la ayuda de la Dra. Raffaella Ansaloni, Directora del Herbario Azuay y el Sr. Servando Morocho, trabajador del Orquideario de la Universidad de Cuenca, quien posee gran experiencia en lo que respecta a la identificación y recolección de orquídeas.

2.2.2. Recolección y transporte de la muestra.

Para este proceso se empleó el protocolo de Zettler *et al* (2011) que consiste en retirar la cobertura de suelo de las raíces de la orquídea y seleccionar las más jóvenes. Posteriormente se extraen las raíces seleccionadas y se depositan en una funda plástica hermética que debe ser etiquetada con el nombre de la orquídea y fecha de recolección. Finalmente se transporta al laboratorio para su análisis. El procedimiento se esquematiza a continuación.

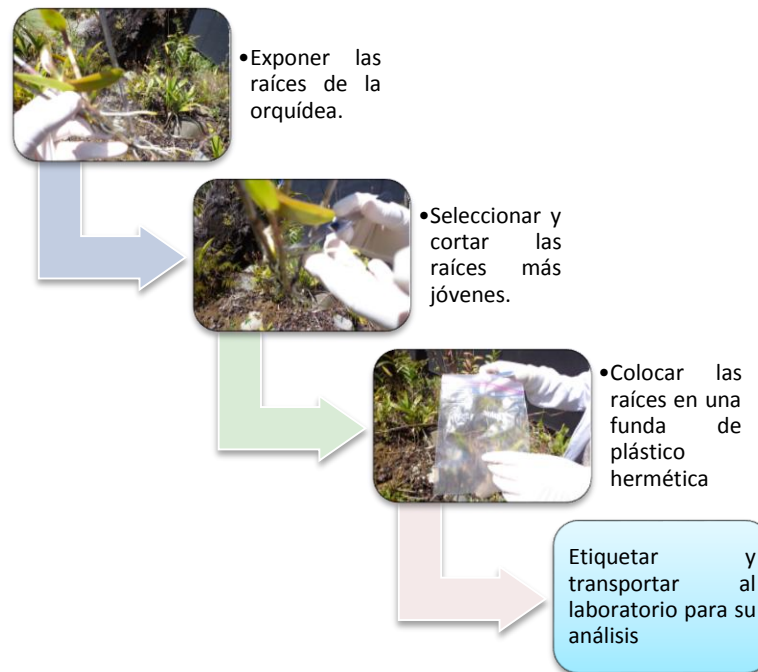


Figura 19: Sarmiento, J. (2017). Esquema de mu-estreo de las raíces de orquídeas.

2.2.3. Tratamiento de las raíces.

Se empleó el protocolo de Zhu *et.al.* (2008). Se lavan las raíces con agua corriente y agua destilada con el objetivo de eliminar los residuos del suelo. A continuación se realizan lavados sucesivos con etanol al 70% por un minuto, hipoclorito de sodio al 2,5% por 30 segundos y un enjuague final con etanol al 70% por un minuto.

2.2.4. Siembra en medio Fungi Isolation Medium (FIM).

Una vez tratadas las raíces se procede a realizar cortes de las mismas en las regiones apical (parte A), intermedia (parte B) y basal (parte C) obteniendo segmentos de un centímetro de longitud. Posteriormente se colocan estos segmentos en una caja Petri con un mililitro de agua destilada estéril y se realizan secciones finas con bisturí estéril, para aumentar la superficie de contacto con el medio de cultivo. A continuación se realiza una siembra en profundidad con medio FIM y se incuba a temperatura ambiente (20-25°C), por 48 a 72 horas.

El cultivo se monitorea hasta la observación de pelotones y colonias de hongos.



Figura 20: Bermeo, T. (2016). *Fracciones de la raíz. Parte A (Apical), parte B (intermedia) y parte C (basal).* Molleturo, Ecuador.

Los códigos que se asignaron a cada especie de orquídea para el cultivo en los distintos medios consistieron en colocar las iniciales del nombre de la orquídea, seguido del número y fragmento de la raíz y por último se colocó la abreviatura del medio de cultivo empleado.

Codificación	Ejemplo	Código
Iniciales del nombre de la orquídea.	<i>Cyrtorchilum serratum</i> (CS)	CS-1A-FIM
Número y fragmento de la raíz.	1 ^a	
Medio de cultivo	Fungi Isolation Medium	

Tabla 1: Esquema de codificación de cajas para los cultivos.

2.2.5. Siembra en medio Patata Dextrosa Agar (PDA).

La aparición de pelotones se verifica por observación directa con microscopio usando el objetivo 20x. La frecuencia de aparición de pelotones y la verificación de colonias fue registrada de acuerdo al tipo de raíz. Las colonias fungales se traspasaron al medio sólido Patata Dextrosa Agar (PDA). Para la siembra se cortó una sección de la colonia señalada y se depositó en el medio de cultivo PDA. El cultivo fue incubado a temperatura ambiente, verificándose crecimiento por observación directa.

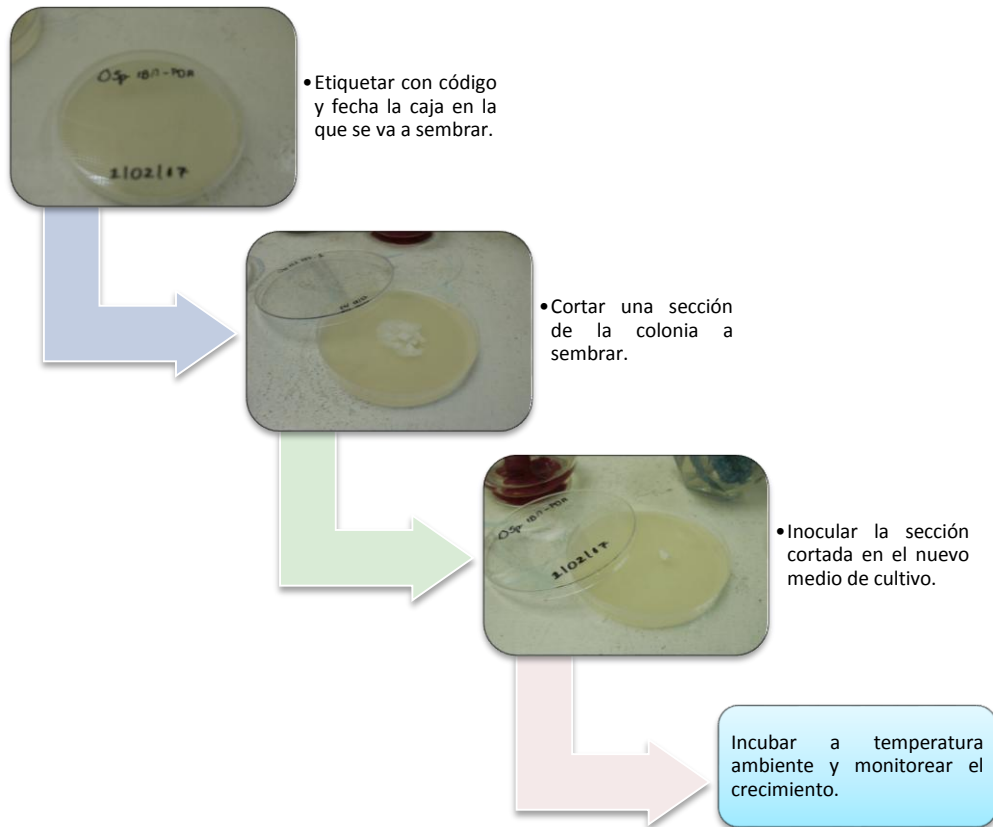


Figura 21: Sarmiento, J. (2017). *Esquema de cultivo en medio patata dextrosa agar.*

2.2.6. Purificación de cultivos y microcultivo.

Para la purificación de los cultivos se seleccionan las colonias con características macroscópicas propias de hongo micorrícico, tales como: colonias blancas algodonosas o cremosas y crecimiento radial. El repique se realizó aplicando el método de punción que consiste en tomar con un asa recta una parte de la colonia e inocular a un tubo inclinado con PDA. El cultivo se incubó a temperatura ambiente.

El microcultivo se realizó para observar las estructuras fúngicas en el hongo en crecimiento. Para el efecto se prepara un portaobjetos con una lámina de medio de cultivo sólido, el cual se inocula con repiques del hongo a observar, protegiendo la preparación con un cubreobjetos. Este sistema es colocado en una caja Petri provista de un segmento de papel filtro previamente humedecido para generar condiciones adecuadas de crecimiento microbiano. Luego de 48 horas de incubación a temperatura ambiente se observaron las características microscópicas tomando el cubreobjetos y colocándolo sobre

una placa que contiene una gota de azul de metileno. Se observó al microscopio con el lente de 20x.

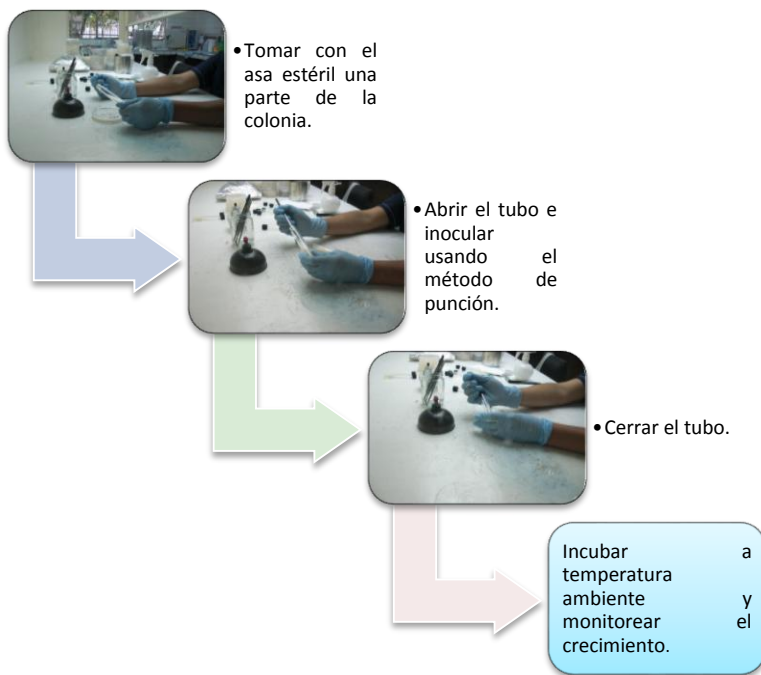


Figura 22: Sarmiento, J. (2017). *Esquema de siembra en tubo aplicando la técnica de punción.*

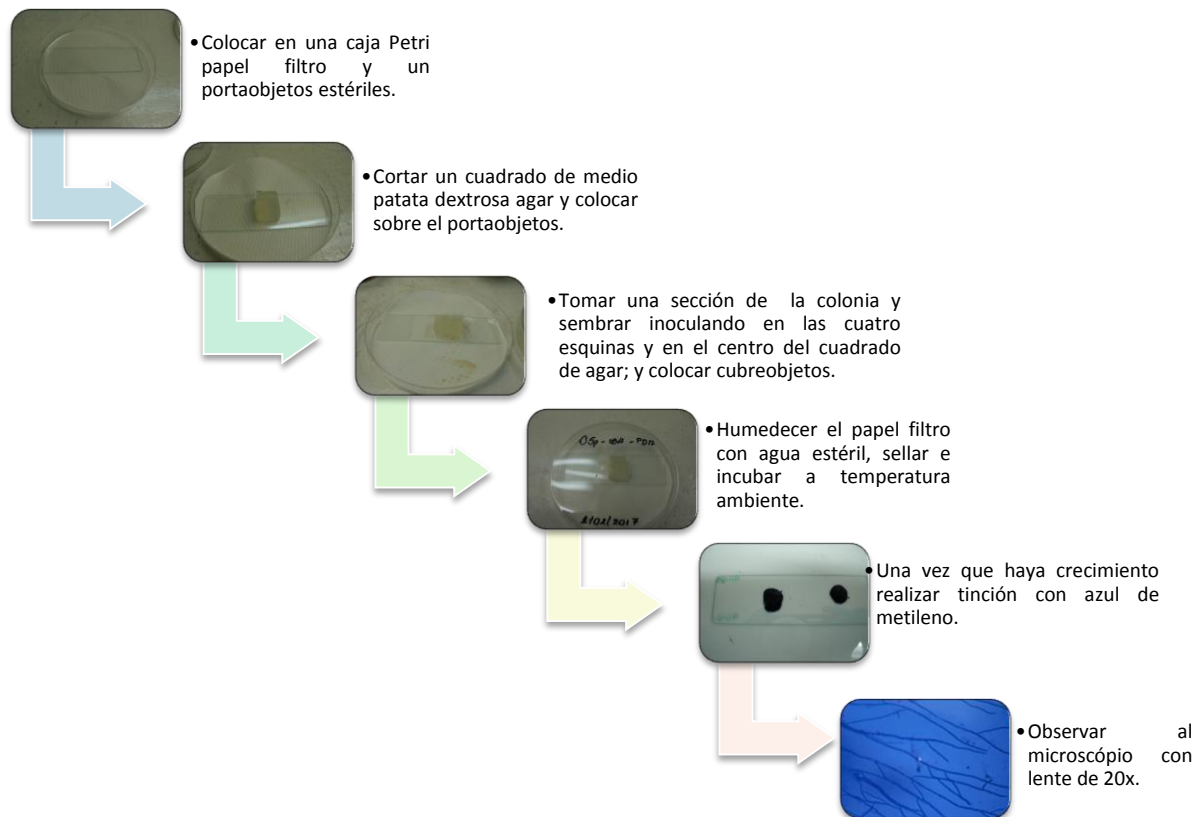


Figura 23: Sarmiento, J. (2017). *Esquema de proceso para realizar el microcultivo.*



CAPÍTULO III.

3. Resultados.

3.1. Crecimiento en medio Fungi Isolation Medium (FIM).

Se obtuvieron diez raíces por cada especie de orquídea en estudio (seis especies). Dado que las raíces fueron divididas en tres secciones y cada fragmento fue inoculado por duplicado en la fase de aislamiento se prepararon 60 cajas Petri por especie. Esto representa el análisis y evaluación de posibles hongos micorrícicos en 360 medios de cultivo.

Especie de orquídea	Sección de la raíz	Cajas con crecimiento	Cajas sin crecimiento	Cajas contaminadas
<i>Cyrtochilum serratum</i>	A	5	4	11
	B	6	3	11
	C	6	3	11
<i>Epidendrum secundum</i>	A	6	5	9
	B	4	6	10
	C	3	7	10
<i>Oncidium abortivum</i>	A	11	5	4
	B	14	2	4
	C	14	3	3
<i>Odontoglossum sp.</i>	A	14	1	5
	B	18	0	2
	C	15	1	4
<i>Pleurothallis sp.</i>	A	4	14	2
	B	4	16	0
	C	4	16	0
<i>Sobralia bimaculata</i>	A	6	0	14
	B	7	1	12
	C	1	1	18
SUBTOTALES		142 (39%)	88 (24%)	130 (36%)
TOTAL CULTIVOS		360 (100%)		

Tabla 2: Resultados del cultivo en el medio FIM.

Las cajas que registraron crecimientos visibles de pelotones y colonias fueron repicadas en medio PDA. A continuación se presentan la frecuencia de cultivos con crecimiento visible y la sección de raíz de origen.

ESPECIE DE ORQUÍDEA	Sección de raíz		
	A	B	C
<i>Cyrtochilum serratum</i>	5	6	6



<i>Epidendrum secundum</i>	6	4	3
<i>Oncidium abortivum</i>	11	14	14
<i>Odontoglossum sp.</i>	14	18	15
<i>Pleurothallis sp.</i>	4	4	4
<i>Sobralia bimaculata</i>	6	7	1
SUBTOTAL DE CULTIVOS	46 (32%)	53 (37%)	43 (30%)
TOTAL	142 (100%)		

Tabla 3: Resultados del cultivo en el medio FIM.

Del número total de cajas sembradas en medio FIM (360) se obtuvieron 142 cajas con crecimiento. Éstas fueron seleccionadas para el replante en medio PDA, obteniéndose 46 cajas del fragmento A (32%), 53 cajas del fragmento B (37%) y 43 cajas del fragmento C (30%).

En cuanto a las cajas que presentaron contaminación, se obtuvieron un total de 130 (36%). La contaminación fue por levaduras y *Penicillium sp.*

Además se obtuvieron 88 (24%) cajas sin crecimiento.

Resultados de crecimiento en medio FIM por fragmentos (A, B y C).

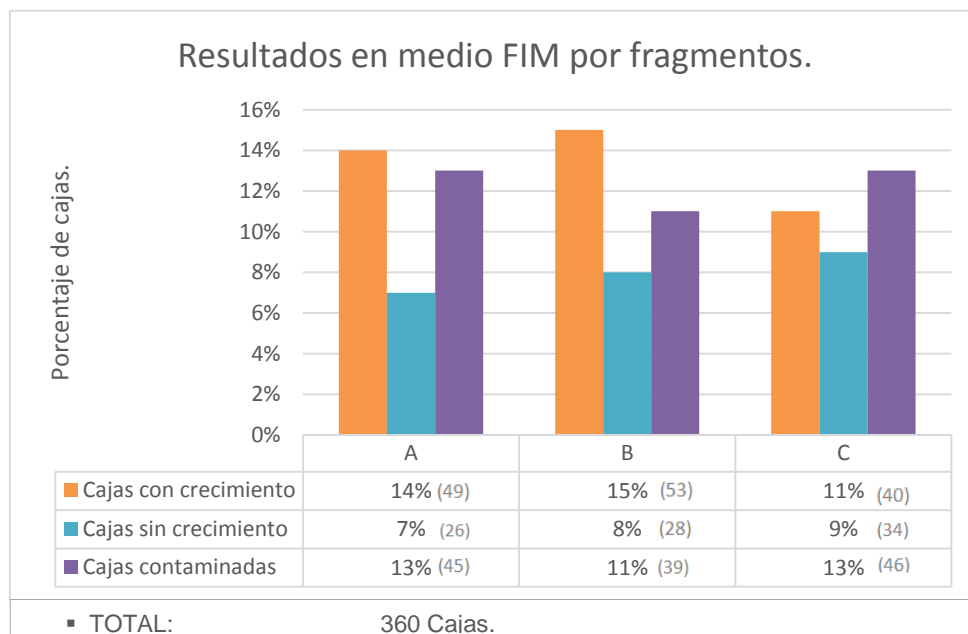


Figura 24: Resultados de crecimiento en medio FIM por fragmentos (A, B y C) de las raíces de las seis especies de orquídeas.

Resultados de crecimiento en medio FIM por especie de orquídea.

El mayor porcentaje de cajas con crecimiento (78%) correspondió a *Odontoglossum sp* mientras que el menor (20%) a *Pleurothallis sp*.

En cuanto al porcentaje de cajas contaminadas, *Sobralia bimaculata* presentó el mayor porcentaje (73%) en cambio *Pleurothallis sp* demostró el menor porcentaje (3%) de cajas contaminadas.

El porcentaje de cajas sin crecimiento fue mayor para *Pleurothallis sp* (77%), en tanto que el menor porcentaje fue para *Odontoglossum sp* (3%) y *Sobralia bimaculata* (3%).

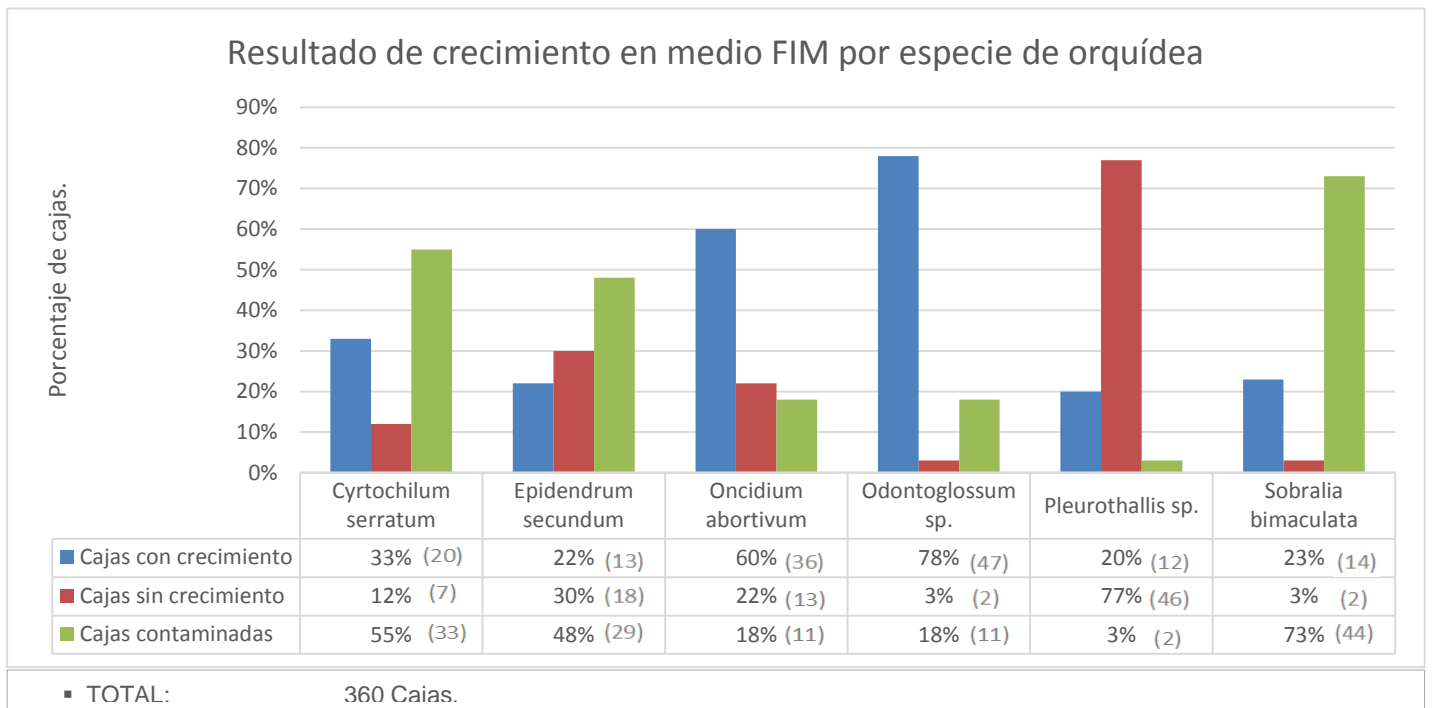


Figura 25: Resultados de la siembra en medio FIM por especie de orquídea.



3.2. Resultados del replante en medio PDA.

Especie de orquídea	Sección	N° de colonias		
		Características	No características	Contaminadas.
<i>Cyrtorchilum serratum</i>	A	1	5	2
	B	1	3	2
	C	0	5	1
<i>Epidendrum secundum</i>	A	1	3	2
	B	1	2	1
	C	0	2	1
<i>Oncidium abortivum</i>	A	2	6	3
	B	1	11	2
	C	6	4	2
<i>Odontoglossum sp.</i>	A	1	12	3
	B	2	13	2
	C	2	10	2
<i>Pleurothallis sp.</i>	A	2	2	0
	B	1	2	1
	C	1	2	1
<i>Sobralia bimaculata</i>	A	1	4	1
	B	2	3	1
	C	0	1	0
SUBTOTAL		25 (18%)	90 (63%)	27 (19%)
TOTAL		142 (100%)		

Tabla 4: Resultados del replante en medio PDA.

De las 142 cajas con crecimiento obtenidas en medio FIM, es decir el 39% del total (n=360) se realizó el replante en medio PDA. En total se obtuvieron 25 cajas con crecimiento característico (18%), y de éstas se realizó el microcultivo. Se obtuvieron ocho colonias tanto del fragmento A como B, mientras que el fragmento C presentó nueve colonias. El porcentaje fue del 6% para cada uno de los fragmentos.

En cuanto a colonias no características se obtuvieron 90 cajas (63%), estas colonias no cumplieron con las características macroscópicas y microscópicas propias de una micorriza.

El número de colonias contaminadas fue de 27 (19%). Los contaminantes fueron *Penicillium sp* y *Aspergillus sp*.

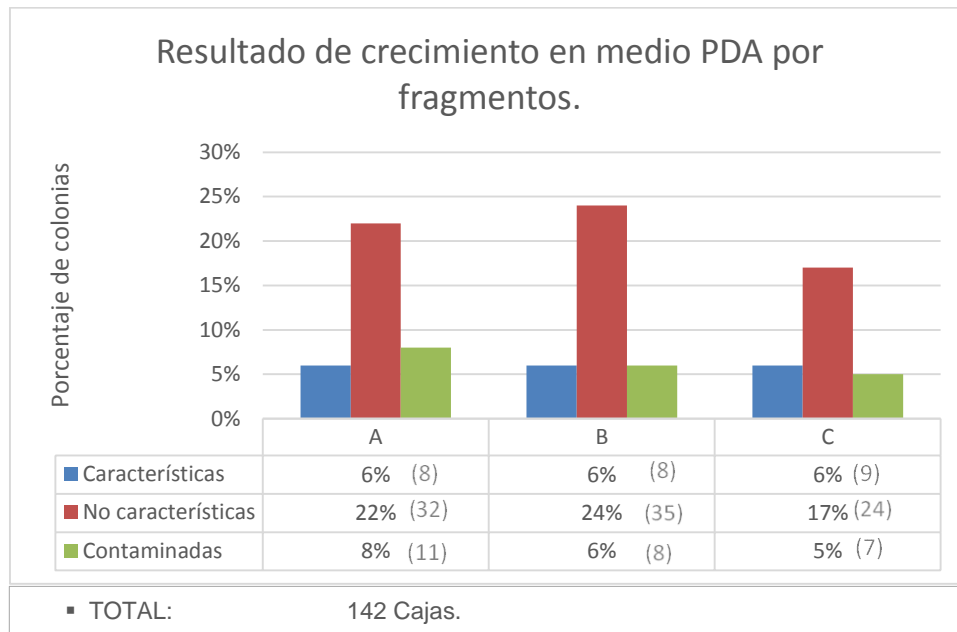


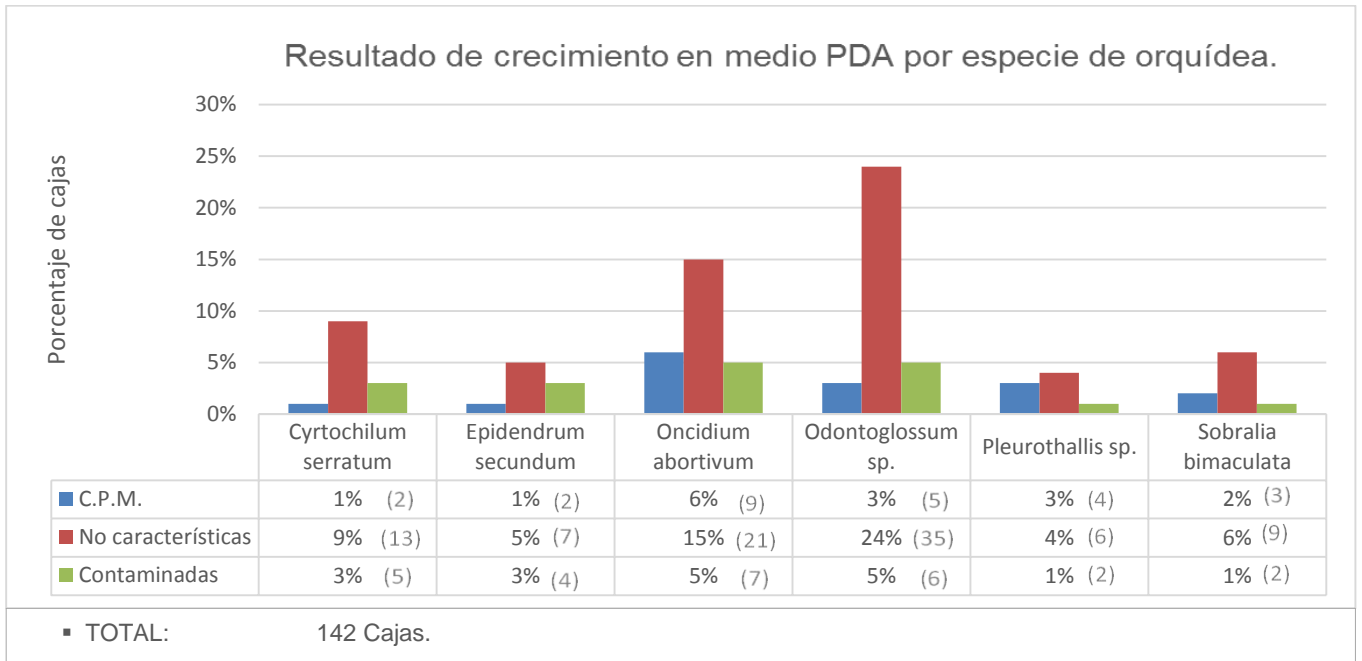
Figura 26: Replante en medio PDA por sección de raíz.

Resultado del replante en medio PDA por especies de orquídeas.

Se obtuvieron colonias con características micorrícicas de las seis especies de orquídeas estudiadas. *Oncidium abortivum* presentó el mayor número de colonias que fue de nueve (6%). *Odontoglossum sp* presentó cinco (3%) y *Pleurothallis sp*, cuatro (3%) colonias, en tanto que de *Sobralia bimaculata* se obtuvieron tres (2%) colonias, y en el caso de *Cyrtochilum serratum* y *Epidendrum secundum* presentaron el menor número de colonias, dos (1%) cada una.

Odontoglossum sp presentó el mayor porcentaje de colonias no características (24%) mientras que *Pleurothallis sp* demostró el menor porcentaje (4%).

Las especies *Oncidium abortivum* y *Odontoglossum sp* presentaron el mayor porcentaje de contaminación (5%) mientras que el menor porcentaje correspondió a *Pleurothallis sp* y *Sobralia bimaculata* (1%).



(CPM: Características potencialmente micorrícicas).

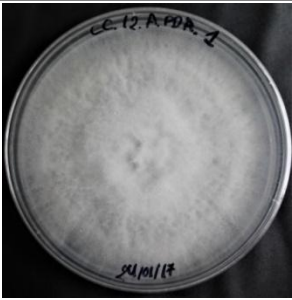


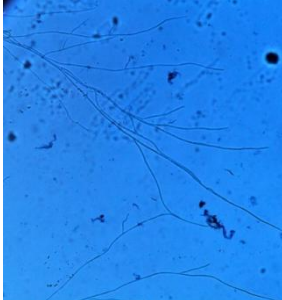
Figura 27: Resultado del replante en medio PDA por especies de orquídeas.

3.3. Resultados del microcultivo.

De las colonias características obtenidas en el medio PDA (n=25) (17%) se realizó el microcultivo, técnica en la que se demostró las características microscópicas de las colonias.

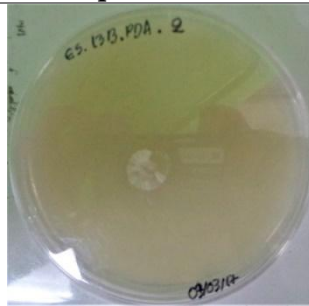
Las colonias seleccionadas para el microcultivo presentan el micelio de color blanco a pardo, su aspecto es algodonoso o filamentoso y las colonias son radiales. En cuanto a las características microscópicas se observó que tienen hifas hialinas, delgadas y que sus ramificaciones forman ángulos de 45° y 90° con respecto a la hifa principal.

Cyrtochilum serratum.

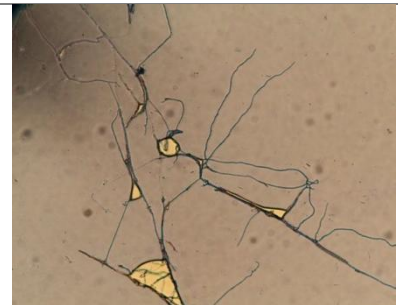
Código	Imagen de colonia	Imagen de microcultivo (20X)
CS-12A-PDA		
Descripción.	Características macroscópicas: Colonia blanca algodonosa con bordes definidos.	Características microscópicas: Hifas hialinas con ángulos de 90°.
Género probable	<i>Tulasnella sp.</i>	
CS-14B-PDA		
Descripción.	Características macroscópicas: Colonia blanca filamentososa.	Características microscópicas: Hifas hialinas con ángulos de 45°.
Género probable	<i>Tulasnella sp.</i>	

Epidendrum secundum.

ES-13B-PDA

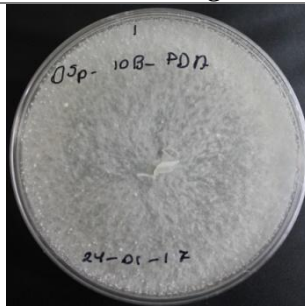
**Descripción.****Características macroscópicas:**
Colonia blanca filamentososa con
borde definido.**Características microscópicas:**
Hifas hialinas con ángulos de 45°.**Género probable***Tulasnella sp.*

ES-20A-PDA

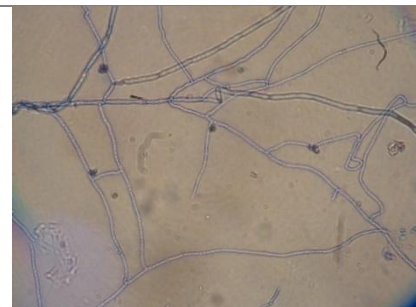
**Descripción.****Características macroscópicas:**
Colonia blanca filamentososa con
borde definido.**Características microscópicas:**
Hifas hialinas con ángulos de 45°.**Género probable***Tulasnella sp.*

Odontoglossum sp.

OSP-10B-PDA

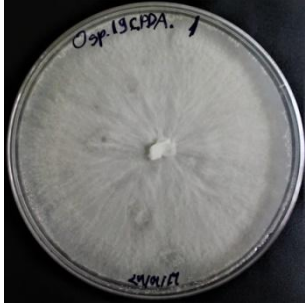
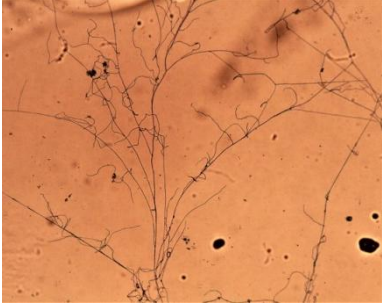
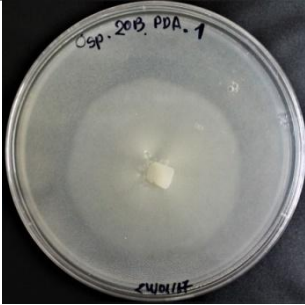
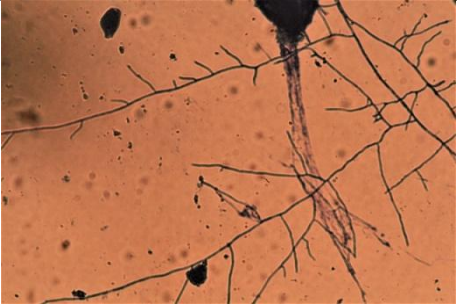
**Descripción.****Características macroscópicas:**
Colonia blanca filamentososa con
borde definido.**Características microscópicas:**
Hifas hialinas con ángulos de 45°.**Género probable***Tulasnella sp.*

OSP-16C-PDA

**Descripción.****Características macroscópicas:**
Colonia blanca filamentososa con
borde definido.**Características microscópicas:**
Hifas hialinas septadas con
ángulos de 45°.**Género probable***Tulasnella sp.*

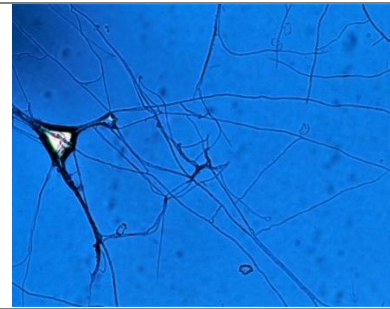
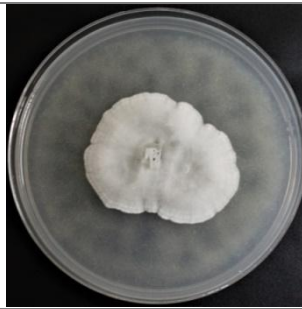
OSP-18A-PDA

**Descripción.****Características macroscópicas:**
Colonia blanca algodonosa con
borde definido.**Características microscópicas:**
Hifas hialinas con ángulos de 45° y
90°.**Género probable***Tulasnella sp.*

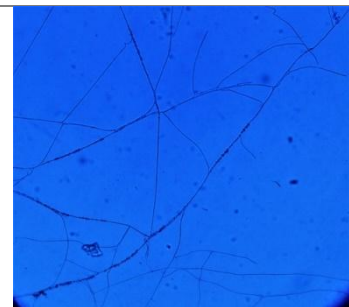
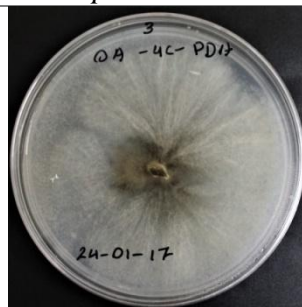
OSP-19C-PDA		
Descripción.	Características macroscópicas: Colonia blanca algodonosa con borde definido.	Características microscópicas: Hifas hialinas con ángulos de 45° y 90°.
Género probable	<i>Tulasnella sp.</i>	
OSP-20B-PDA		
Descripción.	Características macroscópicas: Colonia blanca cremosa con borde definido.	Características microscópicas: Hifas hialinas con ángulos de 45° y 90°.
Género probable	<i>Tulasnella sp.</i>	

Oncidium abortivum.

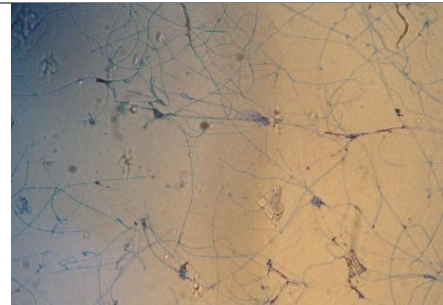
OA-1C-PDA



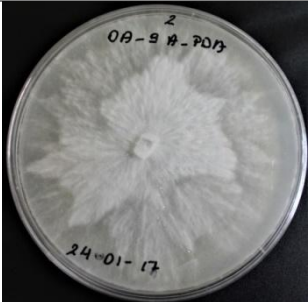
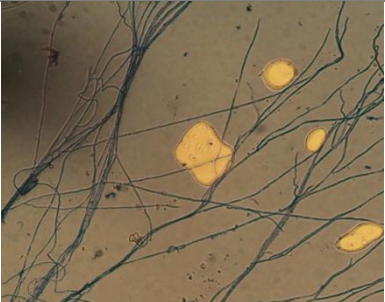

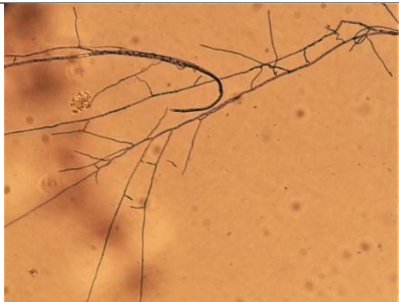
**Descripción.****Características macroscópicas:**
Colonia blanca algodonosa con borde definido.**Características microscópicas:**
Hifas hialinas con ángulos de 90°.**Género probable***Tulasnella sp.*



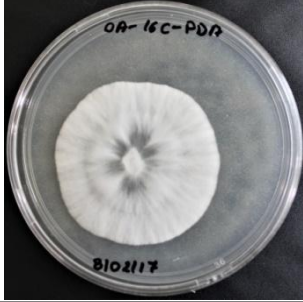


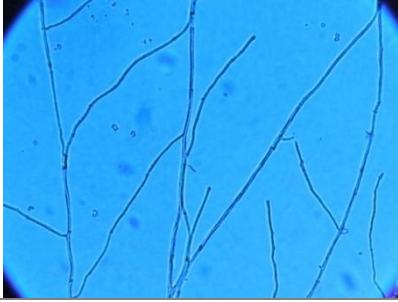
OA-4C-PDA

**Descripción.****Características macroscópicas:**
Colonia marrón filamentosa sin borde definido.**Características microscópicas:**
Hifas hialinas con ángulos de 45° y 90°.**Género probable***Tulasnella sp.*

OA-8B-PDA

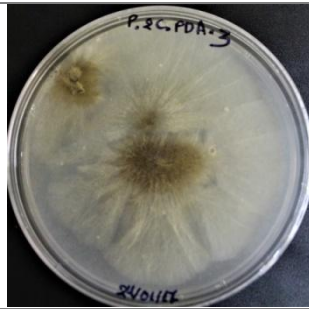
**Descripción.****Características macroscópicas:**
Colonia blanca filamentosa sin borde definido.**Características microscópicas:**
Hifas hialinas con ángulos de 45°.**Género probable***Tulasnella sp.*

OA-8C-PDA		
Descripción.	Características macroscópicas: Colonia blanca filamentosa sin borde definido.	Características microscópicas: Hifas hialinas con ángulos de 45°.
Género probable	<i>Tulasnella sp.</i>	
OA-9A-PDA		
Descripción.	Características macroscópicas: Colonia blanca filamentosa sin borde definido.	Características microscópicas: Hifas hialinas con ángulos de 45°.
Género probable	<i>Tulasnella sp.</i>	
OA-11C-PDA		
Descripción.	Características macroscópicas: Colonia blanca filamentosa sin borde definido.	Características microscópicas: Hifas hialinas con ángulos de 45° Y 90°.
Género probable	<i>Tulasnella sp.</i>	

OA-16A-PDA		
Descripción.	Características macroscópicas: Colonia blanca filamentosa sin borde definido.	Características microscópicas: Hifas hialinas con ángulos de 45°.
Género probable OA-16C(1)-PDA	<i>Tulasnella sp.</i>	
		
Descripción.	Características macroscópicas: Colonia blanca filamentosa con borde definido.	Características microscópicas: Hifas hialinas con ángulos de 45°.
Género probable OA-16C(2)-PDA	<i>Tulasnella sp.</i>	
		
Descripción.	Características macroscópicas: Colonia blanca filamentosa sin borde definido.	Características microscópicas: Hifas hialinas con ángulos de 45°.
Género probable	<i>Tulasnella sp.</i>	

Pleurothallis sp.

P-2C-PDA



Descripción.

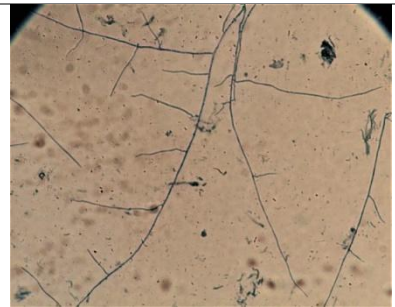
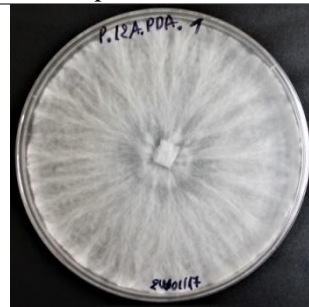
Características macroscópicas:
Colonia marrón filamentososa sin
borde definido.

Características microscópicas:
Hifas hialinas con ángulos de 45°.

Género probable

Tulasnella sp.

P-12A-PDA



Descripción.

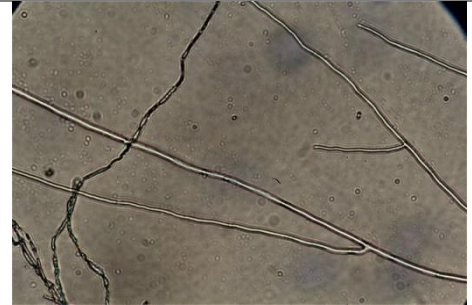
Características macroscópicas:
Colonia blanca filamentososa con
borde definido.

Características microscópicas:
Hifas hialinas con ángulos de 90°.

Género probable

Tulasnella sp.

P-14B-PDA




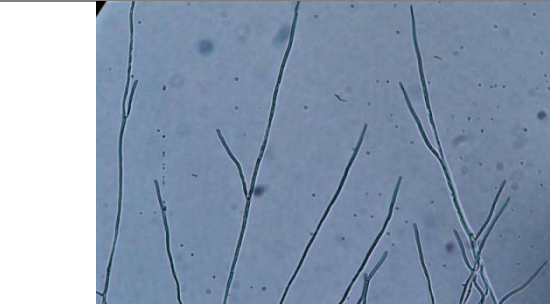
Descripción.

Características macroscópicas:
Colonia blanca con borde
definido.

Características microscópicas:
Hifas hialinas con ángulos de 45°.

Género probable

Tulasnella sp.

P-19A-PDA		
Descripción.	Características macroscópicas: Colonia blanca filamentososa con borde definido.	Características microscópicas: Hifas hialinas con ángulos de 45°.
Género probable	<i>Tulasnella</i> sp.	

Sobralia bimaculata.


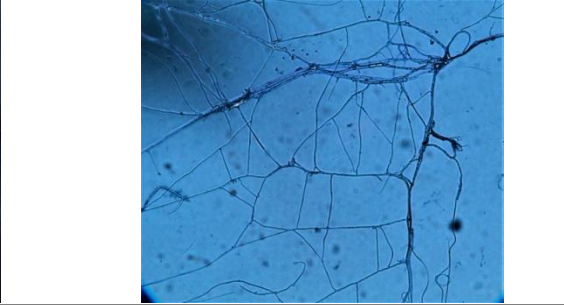

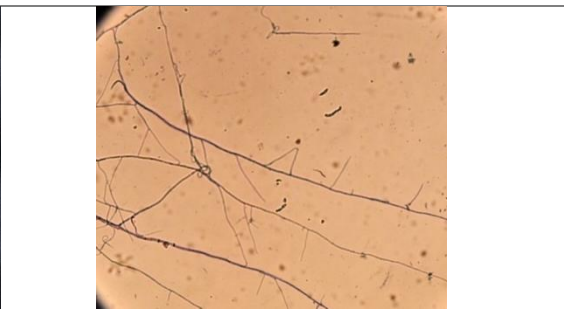

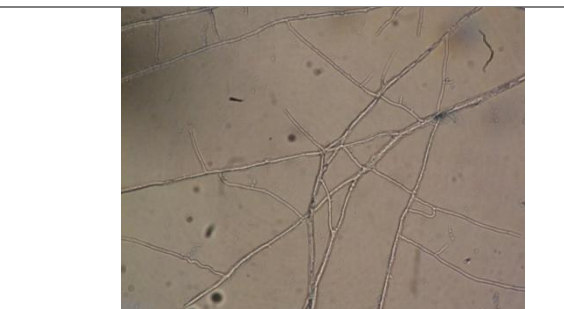
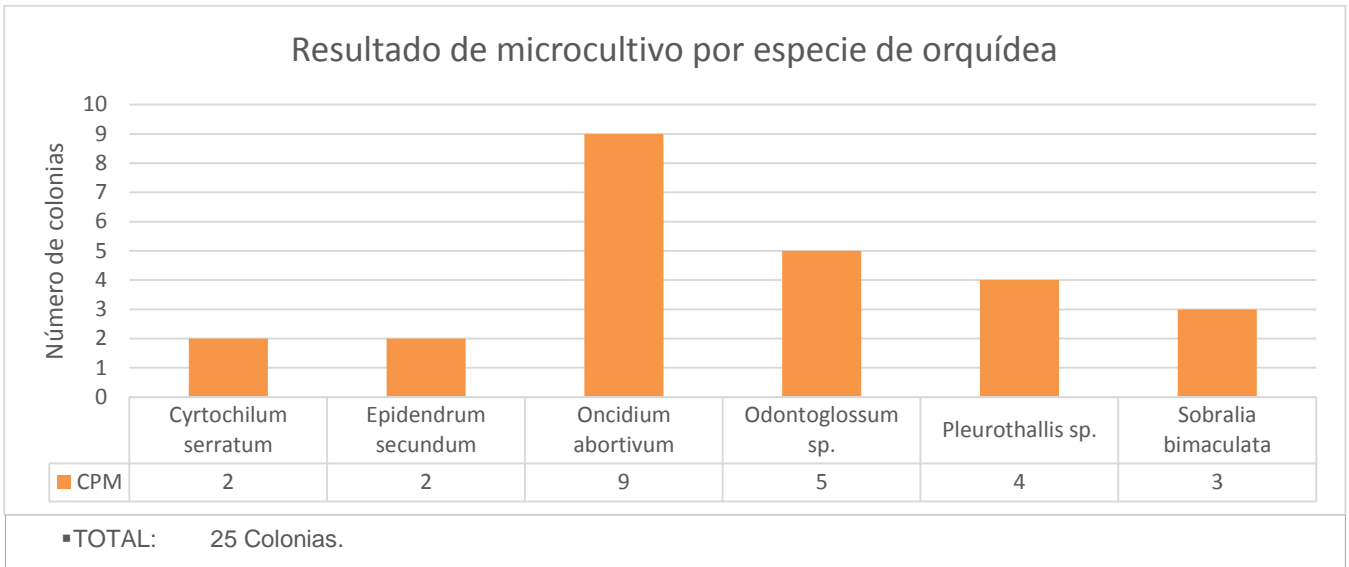
<p>SB-12B-PDA</p>		
<p>Descripción.</p>	<p>Características macroscópicas: Colonia blanca filamentososa con borde definido.</p>	<p>Características microscópicas: Hifas hialinas con ángulos de 90°.</p>
<p>Género probable</p>	<p><i>Tulasnella sp.</i></p>	
<p>SB-13A-PDA</p>		
<p>Descripción.</p>	<p>Características macroscópicas: Colonia blanca algodonosa con borde definido.</p>	<p>Características microscópicas: Hifas hialinas con ángulos de 90°.</p>
<p>Género probable</p>	<p><i>Tulasnella sp.</i></p>	
<p>SB-15B-PDA</p>		
<p>Descripción.</p>	<p>Características macroscópicas: Colonia blanca algodonosa con borde definido.</p>	<p>Características microscópicas: Hifas hialinas con ángulos de 90°.</p>
<p>Género probable</p>	<p><i>Tulasnella sp.</i></p>	

Tabla 5: Hongos potencialmente micorrícicos obtenidos en el estudio.



(CPM: Características potencialmente micorrícicas).

Figura 28: Resultados del microcultivo por especie de orquídea.

La especie que presentó mayor número de colonias con características de micorriza fue *Oncidium abortivum* (36%) (9) mientras el menor porcentaje (8%) (2) correspondió a *Cyrtochilum serratum* y *Epidendrum secundum* cada una.



CAPÍTULO IV.

4. Discusión.

4.1. Discusión.

El presente trabajo describe el proceso de aislamiento y purificación de hongos asociados a raíces de orquídeas de presencia frecuente en regiones de la Provincia del Azuay, en un piso altitudinal de 1400 a 1800 msnm. El proceso de obtención e identificación de aislados fungales se discute a continuación.

En el aislamiento en medio FIM se observó la presencia de pelotones en 142 cajas de las 360 empleadas para el aislamiento fúngico primario, cada una de las cuales contenía un fragmento de raíz de orquídea. La observación de pelotones es indispensable para el aislamiento de hongos probablemente micorrícicos como se corrobora en el estudio “Caracterización molecular de micorrizas de orquídeas del género *Teagueia spp.*” realizado en la Universidad Técnica Particular de Loja (Torres 2012).

En este estudio se emplearon raíces jóvenes de las seis especies de orquídeas, dividiéndolas en tres fragmentos: fragmento A (apical), B (intermedio) y C (basal). La frecuencia de hongos potencialmente micorrícicos aislados en cada uno de los fragmentos no difiere significativamente. La colonización del hongo se produce en un estadio muy temprano, las semillas cuentan con pocas reservas y cuando germinan ya cuentan con hongos micorrícicos y esta colonización continua durante el crecimiento de la planta por lo que el hongo puede estar colonizando toda la raíz (Izco *et al.*, 2004, Mosquera, 2010). Para aislar *Rhizoctonia* se requiere de tejidos vegetales colonizados, ya que gracias a la metodología universalmente empleada (fracciones colonizadas por pelotones o porciones de raíces previamente desinfectadas, que se transfieren a medios de cultivo) se obtienen colonias en condiciones axénicas. Aunque existen hongos micorrícicos que no son fácilmente cultivables y otros que no se han podido cultivar (Mosquera, 2010).

El replante en PDA de las 142 colonias, donde se observó la presencia de pelotones, con la finalidad de desarrollar las características macroscópicas del micelio (coloración, textura, tamaño, morfología y la presencia de esclerocios) y se seleccionaron 25 aislados fungales con características de hongos probablemente micorrícicos. El color de micelio puede variar de blanco a pardo dependiendo del estado de madurez de la colonia y a veces puede presentar esclerocios (Mosquera, 2010). Los hongos micorrícicos pertenecientes al género-forma *Rhizoctonia* aislados



en medio PDA forman colonias esponjosas, de color blanco y con presencia de esclerocios, lo cual se puede constatar en el estudio “Aislamiento de micorrizas en seis especies nativas de Ecuador para la elaboración de un biofertilizante potencialmente útil en la rusticación de orquídeas” (Hoyos & Rodríguez 2013).

Los 25 hongos posiblemente micorrícicos aislados corresponden al género *Tulasnella*, estos han sido identificados por su morfología. Las características se observaron en el cultivo en medio PDA y el microcultivo. Para la familia Orchidaceae el género-forma *Rhizoctonia* (*Ceratobasidiales*, *Exidiales*, *Tulasnellales*) ha sido reportada como el hongo formador de micorrizas. (Mosquera Espinoza 2010). El género-forma *Rhizoctonia* se caracteriza por presentar hifas hialinas y sus ramificaciones están dispuestas en ángulos de 45° y 90° (Izco et al., 2004).

El proyecto DIUC XIV: “*Estudio de la relación simbiótica orquídea – micorriza en la Provincia del Azuay, Ecuador*” se realiza en tres pisos altitudinales. En el piso altitudinal alto (3000 - 3100 msnm), en el sector San Pedro de Yumate, Parroquia Molleturo, se aisló 28 hongos posiblemente micorrícicos, dos pertenecientes al género *Ceratobasidium* y 26 correspondientes a *Tulasnella* (Chuñir & Romero 2017). Hasta el momento el género *Ceratobasidium* en zonas tropicales ha sido reportado en Brasil, Puerto Rico y Colombia. Es probable que *Ceratobasidium* esté presente en Ecuador; sin embargo se necesita caracterizar este género con herramientas de biología molecular. No obstante, podría formar asociaciones simbióticas con orquídeas epífitas (Guzmán & Moreno, 2014).

En el piso altitudinal medio (2000 – 2500 msnm), el estudio se desarrolló en el cantón Gualaceo y se obtuvo seis aislados fungales posiblemente micorrícicos pertenecientes a *Tulasnella* (Cando & Cárdenas 2017). El presente proyecto se realizó en el piso altitudinal bajo (1400 - 1800 msnm) en la comunidad San José de Huigra, Parroquia Molleturo, y se aislaron 25 hongos posiblemente micorrícicos referentes a *Tulasnella*. Además en el estudio realizado en el cantón Azogues (Cañar), ubicado a una altura de 3090 msnm, se aislaron 14 hongos pertenecientes *Tulasnella* (Guamán & Ochoa 2016). Los estudios realizados en cada uno de los pisos altitudinales y en el cantón Azogues, evidencia la presencia de hongos cuyo género probable es *Tulasnella*, ya que éste es el más común en nuestro medio y podría ser el principal formador de micorrizas orquidiodes (Guzmán & Moreno, 2014).

La altura no influye en la colonización de la raíz por hongos micorrícicos, debido a que está definido por la afinidad y especificidad del hongo por la especie de orquídea a la que coloniza (Guzmán & Moreno 2014), es por ello que a un mismo



piso altitudinal se puede obtener diferencias en el número de hongos aislados como se demuestra en los estudios realizados en Azuay y Cañar donde se obtuvieron 28 y 14 aislados fungales respectivamente (Chuñir & Romero 2017, Guamán & Ochoa 2016, Torres 2012).

En el lugar de muestreo ubicado en la parroquia Molleturo (Azuay) se estudiaron seis especies de orquídeas, que son: *Cyrtochilum serratum*, *Epidendrum secundum*, *Oncidium abortivum*, *Odontoglossum sp*, *Pleurothallis sp* y *Sobralia bimaclata*. De las seis especies de estudiadas, todas presentaron hongos con características de micorriza. Las orquídeas terrestres y epífitas requieren la presencia de un hongo compatible para la germinación de semillas y un crecimiento sostenido. Los hongos micorrícicos, responsables de estos efectos, pertenecen al anterior género *Rhizoctonia*, un grupo diverso de hongos patógenos, saprófitos, endófitos y micorrícicos. Estos hongos son difíciles de clasificar debido a la escasez de esporulación sexual y las similitudes morfológicas entre géneros anamórficos (Bonnardeaux *et al.*, 2007).

El menor porcentaje de aislamiento de hongos posiblemente (8%) (2) correspondió a las especies de *Cyrtochilum serratum* y *Epidendrum secundum*. Las especies del género *Cyrtochilum* crecen en bosques de tierras bajas y húmedas a elevaciones de 40 a 1500 msnm (Cueva 2014). En nuestro proyecto, el área de estudio está ubicado a 1615 msnm, por lo que la planta al no encontrarse en su hábitat natural puede dificultar el aislamiento de los hongos micorrícicos. Lo contrario ocurrió con *Oncidium abortivum*, especie que presentó mayor número de hongos con características de micorriza (36%) (9). El género *Oncidium* se encuentra distribuido a lo largo de los Andes (desde Bolivia hasta Venezuela) a una altura de 200 a 1800 msnm (Szlachetko *et al* 2006), lo cual indica que ésta se halla en su hábitat natural, permitiendo un óptimo desarrollo de la planta, lo que a su vez proporciona una mayor probabilidad de aislar hongos micorrícicos en raíces.

Epidendrum secundum fue la única orquídea terrestre estudiada mientras que las demás fueron orquídeas epífitas. En el estudio realizado en el piso altitudinal medio, a partir de *Epidendrum secundum*, se obtuvo un aislado fungal mientras que en nuestro estudio, se obtuvieron dos (Cando & Cárdenas 2017). Las orquídeas epífitas presentan mayores desventajas ambientales debido a que poseen poca disponibilidad de agua, nutrientes e irradiación por lo que es más probable que se presenten interacciones con micorrizas verdaderamente mutualistas comparadas con las orquídeas terrestres (Guzmán & Moreno, 2014).



La asociación entre orquídea y hongo micorrícico especializado determina su capacidad de germinación y desarrollo. Los esfuerzos orientados en caracterizar los hongos asociados a estas especies y su relación en las diferentes etapas del metabolismo vegetal están enfocados a acciones de conservación de estas especies amenazadas. La evaluación de relaciones orquídea – micorriza en las especies más frecuentes, encontradas en el piso altitudinal de 1400 a 1800 msnm, nos permitió obtener aislados fungales con características de hongos micorrícicos, analizados por sus características morfológicas. Esta investigación provee de material de estudio para la siguiente etapa del proyecto DIUC XIV: *“Estudio de la relación simbiótica orquídea – micorriza en la Provincia del Azuay, Ecuador”*. La confirmación del género y asignación de especie de estos hongos se realiza al momento mediante estrategias de biología molecular.



CONCLUSIONES.

En este proyecto se logró aislar 25 hongos probablemente micorrícicos en seis especies de orquídeas de la parroquia Molleturo en la provincia del Azuay ubicada a una altura de 1615 msnm, los mismos que pueden pertenecer al género *Tulasnella* según sus características macroscópicas y microscópicas observadas.

Se obtuvieron nueve hongos posiblemente micorrícicos de *Oncidium abortivum*, siendo la especie que presentó mayor frecuencia de aislamiento (36%) a diferencia de *Epidendrum secundum* y *Cyrtorchilum serratum*, de las cuales se lograron aislar dos hongos en cada especie (8%).

En el fragmento C, que corresponde a la parte basal de la raíz, se logró aislar el mayor número de hongos posiblemente micorrícicos siendo en total nueve (36%) mientras que en el fragmento A y B se obtuvieron ocho (32%) hongos en cada uno. El porcentaje en cada fragmento no difiere significativamente lo que indica que el hongo se encuentra colonizando toda la raíz.

La caracterización morfológica de los hongos aislados se realizó mediante la observación de las estructuras fúngicas ya que el género-forma *Rhizoctonia* (*Tulasnella*) se caracteriza por presentar hifas hialinas y sus ramificaciones están dispuestas en ángulos de 45° y 90° mientras que el color de micelio puede variar de blanco a pardo dependiendo del estado de madurez de la colonia.

El aislamiento de los hongos posiblemente micorrícicos se llevó a cabo empleando la metodología de Zettler (2011) y Zhu (2008), siendo las mismas adecuadas para el aislamiento de hongos micorrícicos ya que se emplea tejidos vegetales colonizados (raíces) que permiten obtener colonias en condiciones axénicas.

Los hongos aislados en este estudio serán empleados en la segunda etapa del proyecto “Estudio de la relación simbiótica orquídea-micorriza en la provincia del Azuay, Ecuador”, en el cual se realizará un estudio molecular para comprobar que los hongos aislados pertenecen al género *Tulasnella* y posteriormente se evaluará su efecto en la germinación de las semillas de orquídeas.



RECOMENDACIONES.

Para lograr ampliar el conocimiento y caracterización de hongos micorrícicos se recomienda aplicar la metodología descrita en este trabajo para las fases preliminares de aislamiento y discriminación de hongos posiblemente micorrícicos.

Para la asignación del género y especie fungal es necesario realizar un estudio con herramientas de biología molecular para una diferenciación genética ya que no se puede establecer el género y especie de un aislado por características morfológicas.



BIBLIOGRAFÍA.

- Atala, Cristian, Guillermo Pereira, Chistian Romero, Laureana Muñoz-Tapia, Reinaldo Vargas, and Laura M. Suz. 2015. "Orchidioid fungi of the form-genus Rhizoctonia associated with the roots of *Chloraea cuneata* Lindl. from Araucanía, Chile." *Gayana. Botánica* 72:145-148.
- Banks, David. 2006. *Cultivo de orquídeas: propagación y variedades*. España: Universidad de Barcelona.
- Camargo, S, N Montaña, C De la Rosa, and S Montaña. 2012. "Micorrizas: Una gran unión debajo del suelo." *Revista digital universitaria* 13 (7):3-19.
- Cando, Mónica, and María Cárdenas. 2017. "Determinación mediante aislamiento y purificación de hongos potencialmente micorrízicos en las raíces de seis especies de orquídeas en el cantón Gualaceo, provincia del Azuay."
- Chuñir, Claudina, and Santiago Romero. 2017. "Aislamiento de hongos potencialmente micorrízicos presentes en seis especies de orquídeas nativas del sector San Pedro de Yumate, Molleturo, Azuay, Ecuador."
- Cueva, Anabel. 2014. "Caracterización molecular de hongos micorrízicos aislados a partir de cuatro especies de orquídeas epífitas, en dos pisos altitudinales de bosque montano." *Biólogo, Área Biológica, Universidad Técnica Particular de Loja*.
- Cueva, Esthela, and María Moya. 2015. "Evaluación de tres crioprotectores para el almacenamiento en nitrógeno líquido de semillas de orquídeas nativas de Ecuador de los cuatro géneros *Elleanthus*, *Epidendrum*, *Odontoglossum* y *Oncidium*."
- Curtis , Helena., and Adriana Schnek. 2008. "Relaciones simbióticas de los hongos." In *Curtis. Biología*, 530-533. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana.
- Ecuador), M. d. M. A. d. E(Ministerio del medio Ambiente del. 2012. LÍNEA BASE DE DEFORESTACIÓN DEL ECUADOR CONTINENTAL. Quito.
- Fischer, Ana Luisa. 2007. *Cultivo de Orquídeas / Cultivation of Orchids*. Buenos Aires: Imaginador.
- Freuler, Maria Julia. 2008. "De flores exóticas y cosmopolitas." In *Orquídeas*, edited by Cecilia Repetti, 7-10. Editorial Albatros.
- Guamán, María, and Laura Ochoa. 2016. "Aislamiento y selección de hongos potencialmente micorrízicos en seis especies de orquídeas nativas del cerro Abuga en la provincia del Cañar."
- Guzmán, Nubia Alejandra, and Byron Javier Moreno. 2014. "Efecto de la altitud en la composición y riqueza de hongos Micorrízicos de orquídeas epífitas en bosques montano altos del sur del Ecuador."



- Hoyos, Luis Ricardo, and Andrea Daniela Rodríguez. 2013. "Aislamiento de micorrizas en seis especies de orquídeas nativas de Ecuador para la elaboración de un biofertilizante potencialmente útil en rusticación de orquídeas."
- Izco, Jesús, Eva Barreno, Monserrat Brugués, Manuel Costa, Juan Devesa, Federico Fernández, Tomás Gallardo, Xavier Llimona, Carmen Prada, Salvador Talavera, and Benito Valdés. 2004. "Micorrizas." In *Botánica*, 316-320. Madrid: Mc Graw Hill.
- Jakobsen, I, A Varma, and B Hock. 1995. "Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology." *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology*.
- Koniger, Willibald. 2004. *Oncidium*. Munich: Verlag Helga Koniger.
- López, Ana, and Griselda Pulido. 2007. "Orquídeas terrestres de la Sierra Las Navajas, Hidalgo, México." In *Simposio de Biodiversidad Y Conservacion de Algunos Recursos Floristicos en El Estado de Hidalgo*, 27- 28. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Martija, Magali. 2012. "La orquídea, una planta en todo el mundo." In *30 Orquídeas Descripción, cuidados y cultivo, fichas prácticas* Barcelona: DE VECCHI S.A.
- Meisel, Joe, Ronald Kaufmann, and Franco Pupulin. 2014. "Cyrtochilum." In *Orchids of Tropical America : An Introduction and Guide*, 90. New York: Cornell University Press.
- Mosquera, Ana Teresa. 2010. "Evaluación del efecto biocontrolador de Rhizoctonia de orquídeas sobre Rhizoctonia solani Kühn patógeno del suelo en arroz (Oryza sativa L.)." Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.
- Perú, Ministerio del Ambiente de. 2015. "Guía de identificación de orquídeas con mayor demanda comercial." EDITORA IMAGE PRINT PERU EIRL, accessed 15 de Febrero
- Pridgeon, Alec. 2006. *THE ILLUSTRATED ENCYCLOPEDIA OF ORCHIDS OVER 1100 ESPECIES ILLUSTRATED AND IDENTIFIED*. . Australia: The Illustrated Encyclopedia of Orchids.
- Rittershausen, Wilma, and Brian Rittershausen. 2006. *Orquídeas*. Barcelona.
- Röllke, Frank. 2010. "Las características típicas de las orquídeas." In *Jardín Práctico Orquídeas*. Barcelona: HISPANO EUROPEA.
- Szlachetko, DARIUSZ L, JOANNA Mytnik-Ejsmont, and Agnieszka Romowicz. 2006. "Genera et species orchidaceae. 14. Oncidieae." *Polish Botanical Journal* 51 (1):53-55.



Torres, Rony Vladimir. 2012. "Caracterización molecular de micorrizas de orquídeas del género *Teagueia* spp." TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO, UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA.

**ANEXOS.****Composición de los medios de cultivo empleados.****1. Medio Fungi Isolation Medium (FIM)**

Reactivo	Cantidad
Nitrato de sodio	0,3g
Cloruro de potasio	0,1g
Fosfato acido de potasio	0,2g
Sulfato de magnesio	0,1g
Extracto de levadura	0,1g
Azúcar	2,5g
Agar	8g
Estreptomicina	0,5ml
Agua	1L

El pH del medio medio debe ser 6,8.

El medio Fungi Isolation Medium es un medio que sirve para el aislamiento inicial de hongos.

2. Patata dextrosa agar (PDA)

Reactivo	Cantidad
Agar	20g
Puré de patata	10g
Glucosa	20g
Agua	1L

El pH del medio debe ser 5,6

Preparación de la cámara de flujo.

Los cultivos se realizaron en condiciones asépticas y dentro de una cámara de flujo laminar.



Figura 29: Sarmiento, J. *Preparación de la cámara de flujo con los materiales a utilizar.* [Fotografía]

Observación de pelotones después de la siembra de las raíces en medio FIM.

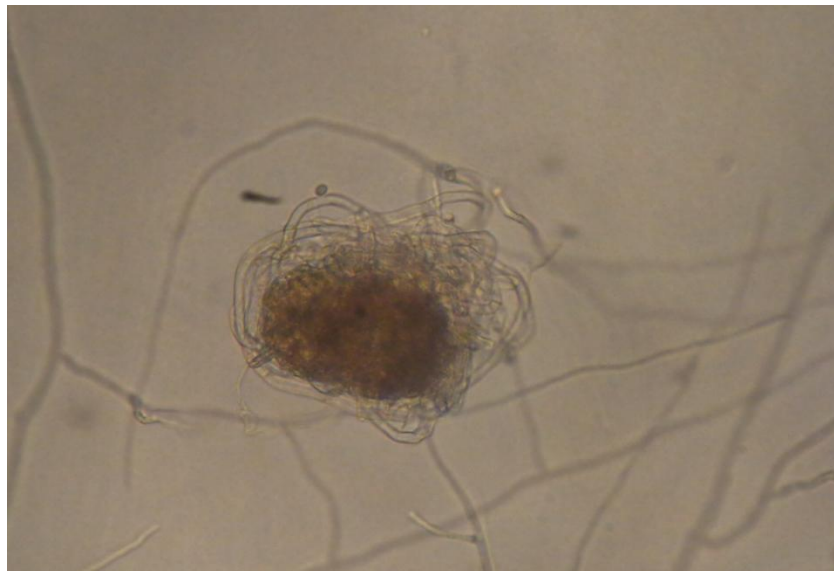


Figura 30: Bermeo, T. (2016). *Pelotón observado con lente 20X* [Fotografía].