



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

**“Identificación de Hongos Micorrízicos mediante herramientas de biología  
molecular”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIA A  
LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AUTORES:**

**ANA GABRIELA CRESPO AUQUILLA**

**C.I. 0106567506**

**JOSÉ ANTONIO SINCHE GORDILLO**

**C.I. 0104306808**

**DIRECTORA:**

**Prof. DRA. MARÍA ELENA CAZAR RAMÍREZ**

**C.I. 0602243800**

**ASESOR:**

**DR. RODRIGO SEBASTIAN CAROCA CAZARES**

**C.I. 0151581089**

**CUENCA –ECUADOR**

**2017**



## RESUMEN

El presente estudio se enfocó en la caracterización molecular de un grupo de aislados fungales potencialmente micorrízicos que fueron provistos por la Universidad de Cuenca. Se trata de hongos aislados a partir de diez especies de orquídeas nativas del Ecuador de dos regiones: de las cuales cinco corresponde al sector Remigio Crespo Toral Cantón Gualaceo (Provincia del Azuay), y cinco fueron recolectadas del Cerro Abuga en la parroquia Bayas del Cantón Azogues (Provincia del Cañar). El ADN objeto de estudio fue obtenido a partir del repique de la colección de hongos que se mantiene en el orquideario de la Universidad de Cuenca ubicada en el campus de Balzay. La región ITS de los genes ribosomales nucleares se amplificó por PCR usando la combinación de primers ITS1 y TW14 que dan un producto alrededor de 1200pb. Estos productos fueron analizados mediante electroforesis y secuenciados en el Departamento de Genética de la Universidad de Osnabrück, Alemania. Finalmente, se compararon con bases de datos disponibles en el GenBank, mediante una búsqueda a través de la herramienta bioinformática BLAST. Los resultados reportan dos especies micorrízicas, *Ceratobasidium sp.* asociada a la raíz de *Trichoceros antenniferum*, recolectada a (2.330 m.s.n.m.), y *Sebacina vermifera* asociada a la raíz de *Epidendrum sp.* recolectada a (3.090 m.s.n.m.). Esta investigación se podría integrar para posteriores estudios de germinación de dichos hongos micorrizicos con diferentes orquídeas para la conservación de la misma.

**Palabras claves:** Hongos micorrízicos, orquídea, ADN fúngico, PCR.



## ABSTRACT

This study focused on the molecular characterization of a group of potentially mycorrhizal fungal species were provided for University of Cuenca. It is fungi isolated from ten species of native orchids of Ecuador in two regions: five of which corresponds to the sector Remigio Crespo Toral Canton Gualaceo (Azuay province), and the other five were collected from Cerro Abuga berries in Canton Azogues (Cañar Province) parish. DNA under study was obtained from the peeling of the collection of fungi remains at Orquideario University of Cuenca located on the campus of Balzay, using methods based on different protocols established procedures for obtaining. The ITS region of nuclear ribosomal genes were amplified by PCR using the combination of primers ITS1 and TW14 giving a product around 1200pb. These products were analyzed by electrophoresis and sequenced at the Department of Genetics at the University of Osnabrueck, Germany. Finally, they were compared to databases available in GenBank, by searching through tool BLAST bioinformatics have. The results report two mycorrhizal species, *Ceratobasidium* sp. associated with the root of *Trichoceros antenniferum*, collected (2330 meters) and *Sebacina vermifera* associated with the root of *Epidendrum* sp. collected (3,090meters). *Vermifera Sebacina* findings and *Ceratobasidium* sp. This research could be integrated for later studies of germination of said mycorrhizal fungi with different orchids for the conservation of the same.

**Key words:** Mycorrhizal fungi, orchid, fungal DNA, PCR.



## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	2
ABSTRACT.....	3
Cláusula de Licencia y Autorización para Publicación en el Repositorio Institucional.....	7
CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL.....	10
DEDICATORIA .....	12
AGRADECIMIENTOS .....	14
INTRODUCCIÓN.....	15
OBJETIVO GENERAL.....	16
OBJETIVOS ESPECIFICOS:.....	16
CAPÍTULO I .....	17
1. ORQUÍDEAS .....	17
1.1. Características Generales de las orquídeas .....	17
1.2. Partes principales de las flores.....	17
1.3. Tipos de orquídeas .....	17
1.4. Orquídeas y otros organismos .....	18
1.5. Ciclo de vida .....	18
1.5.1 Germinación.-.....	18
1.5.2 Protocormo.-.....	19
1.6. Importancia de las orquídeas.....	19
1.7. Distribución y amenazas de las orquídeas en el Ecuador .....	19
2. Micorrizas.....	20
2.1 Generalidades .....	20
2.2. Fisiología de la simbiosis micorrícica. ....	21
2.3. Distribución de micorrizas en la naturaleza.....	21
2.4. Clasificación de las Micorrizas.....	22
a. Ectomicorrizas .....	22
b. Endomicorrizas.....	22
2.5. Micorrizas de orquídeas.....	22
2.6. Beneficios de la micorrización en las orquídeas .....	23
2.7. Relación micorriza-orquídea .....	23



2.8. Género – forma Rhizoctonia .....	24
2.8.1. <i>Morfología de Rhizoctonia</i> .....	25
3. Técnicas de caracterización molecular .....	25
3.1. Generalidades .....	25
3.2. Espaciadores transcritos internos (ITS).....	26
3.3 PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) .....	28
3.4. Análisis del producto de amplificación mediante electroforesis en geles de agarosa .....	29
3.5. Secuenciación de ADN.....	29
CAPÍTULO II .....	32
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	32
4.1. Origen de los aislados fungales.....	32
4.2. Extracción de ADN.....	35
4.2.1. <i>Tinción de ADN</i> .....	35
4.3. <i>PCR, Reacción en Cadena de la Polimerasa</i> .....	35
4.3.1 <i>Determinación del tamaño de fragmentos de ADN</i> .....	36
4.4. <i>Tratamiento de Datos</i> .....	36
CAPÍTULO III. ....	37
5. RESULTADOS .....	37
5.1. Repique de especímenes de hongos micorrízicos .....	37
5.2. Identificación Molecular .....	37
5.2.1. <i>Extracción de ADN y verificación de la integridad del ADN fúngico</i> .....	37
5.2.2. Amplificación de las regiones ITS mediante la técnica de PCR. ....	40
5.2.3. Análisis de la PCR obtenida de los aislados fúngicos. ....	43
5.2.4. <i>Análisis y comparación de las secuencias obtenidas.</i> .....	44
5.2.4.1. <i>Análisis de secuenciación de regiones ITS para la identificación de Ceratobasidium sp.</i> .....	44
5.2.4.2. <i>Análisis de secuenciación de regiones ITS para la identificación de Sebacina vermifera.</i> .....	45
5.2.5. <i>Resultados generales del análisis de las secuencias</i> .....	46
5.2.6. Identificación de hongos micorrízicos mediante análisis molecular. ....	47
CAPÍTULO IV .....	50
6. Discusión .....	50
7. CONCLUSIONES .....	53



8. Recomendaciones .....	53
9. Bibliografía .....	55
10. Anexos.....	63
11. GLOSARIO.....	73

### ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cymbidium, estructura de una flor de orquídea .....	17
<b>Figura 2.</b> Secciones de la raíz (A, B, C). .....	33
<b>Figura 3.</b> Electroforesis en Gel de Agarosa, de ADN genómico de los aislados fungales de Gualaceo.....	38
<b>Figura 4.</b> Electroforesis en Gel de Agarosa, de ADN genómico de los aislados fungales de Cañar. La designación de los carriles se corresponde con lo que se muestra en el cuadro 5.....	40
<b>Figura 5.</b> Electroforesis en Gel de Agarosa, producto de la PCR de los aislados fungales de Gualaceo. La designación de los carriles se corresponde con lo que se muestra en el cuadro 5.....	41
<b>Figura 6.</b> Electroforesis en Gel de Agarosa, producto de la PCR de los aislados fungales de Cañar. La designación de los carriles se corresponde con lo que se muestra en el cuadro 6.....	42
<b>Figura 7.</b> Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra IM7B con la base de datos universal del GenBank.....	45
<b>Figura 8.</b> Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra E19B con la base de datos universal del GenBank.....	46

### ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1</b> .Iniciadores empleados para la amplificación.....	27
<b>Cuadro 2.</b> Ejemplo del código (1M7B). .....	33
<b>Cuadro 3.</b> Códigos de los aislados fungales de la zona Remigio Crespo Toral Cantón Gualaceo (Provincia del Azuay) (2.330 m.s.n.m.).....	34
<b>Cuadro 4.</b> Códigos de los aislados fungales de la zona Cerro Abuga en la parroquia Bayas del Cantón Azogues (Provincia del Cañar) (3.090 m.s.n.m.).....	34



<b>Cuadro 5.</b> Designación de las muestras de ADN de los aislados fungales procedentes de Gualaceo, por número de carril.....	37
<b>Cuadro 6.</b> Designación de las muestras de ADN de los aislados fungales procedentes de Cañar, por número de carril.....	38
<b>Cuadro 7.</b> Designación de los productos de la PCR de los aislados fungales procedentes de Gualaceo, por número de carril.....	41
<b>Cuadro 8.</b> Designación de las muestras de ADN de los aislados fungales procedentes de Cañar, por número de carril.....	42
<b>Cuadro 9.</b> Resultados de la PCR, de los aislados fúngicos; (+) amplificación, (-) no amplificación, (+/-) resultado no concluyente.....	43
<b>Cuadro 10.</b> Identificación de especies micorrízicas de orquídeas en Ecuador según las búsquedas BLAST (en GenBank).....	47

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Análisis general de la siembra en el medio PDA.....	63
<b>Anexo 2.</b> Plant PureLink kit extration (Invitrogen), utilizado para la extracción de ADN.....	68
<b>Anexo 3.</b> Termociclador utilizado para la PCR.....	68
<b>Anexo 4.</b> Electroforesis en Gel de Agarosa, producto de la PCR de los aislados fungales de Cañar.....	69
<b>Anexo 5.</b> Análisis general de la Identificación molecular de las Cepas fúngicas de Gualaceo.....	70
<b>Anexo 6.</b> Análisis general de la Identificación molecular de las Cepas fúngicas de Cañar.....	71

## Cláusula de Licencia y Autorización para Publicación en el Repositorio Institucional



UNIVERSIDAD DE CUENCA

**Cláusula de Licencia y Autorización para Publicación en el Repositorio Institucional**

Ana Gabriela Crespo Auquilla, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **“Identificación de Hongos Micorrizicos mediante herramientas de biología molecular”**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

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

Cuenca, 10 Noviembre de 2017

Ana Gabriela Crespo Auquilla

C.I: 0106567506





UNIVERSIDAD DE CUENCA

**Cláusula de Licencia y Autorización para Publicación en el Repositorio Institucional**

José Antonio Sinche Gordillo, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "**Identificación de Hongos Micorrízicos mediante herramientas de biología molecular**", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

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

Cuenca, 10 de Noviembre del 2017

José Antonio Sinche Gordillo

C.I: 0104306808



UNIVERSIDAD DE CUENCA

## CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

### CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

**Ana Gabriela Crespo Auquilla**, autora del trabajo de titulación “**Identificación de hongos micorrízicos mediante herramientas de biología molecular**”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 10 de Noviembre de 2017

A handwritten signature in blue ink, reading 'ANA GABRIELA CRESPO AUQUILLA', written over a horizontal line.

Ana Gabriela Crespo Auquilla  
C.I: 0106567506



UNIVERSIDAD DE CUENCA

#### CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

**José Antonio Sinche Gordillo**, autor del trabajo de titulación “**Identificación de hongos micorrízicos mediante herramientas de biología molecular**”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 10 de Noviembre del 2017

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized initials and a surname, written over a horizontal line.

José Antonio Sinche Gordillo  
C.I: 0104306808



## DEDICATORIA

Todos estos años de esfuerzo y trabajo son dedicados a mi Padre Dios, sin ti nada sería posible en mí, eres la fuerza que sostiene mi vida, gracias por bendecirme cada día y enseñarme que mis gustos y preferencias no se deben escribir en cortas líneas, gracias por permitirme vivir esta alegría de cumplir mi meta profesional.

Le agradezco a Dios por haberme dado la mejor familia del mundo, que ha sido mi fortaleza y apoyo en este camino. A mis padres por sacrificarse tanto, para darme todo lo que ellos no pudieron tener y por todo su amor.

A mi madre le agradezco por ser esa guerrea, esa mujer valiente que con su lucha diaria es la fuente de inspiración de mis hermanos y especialmente la mía. Anita, mi hermosa madre la que siempre estuvo a mi lado incondicionalmente, esperándome en casa con ese abrazo y esa sonrisa que día a día me han motivado a seguir luchando. La que me daba ánimos cuando todo parecía complicarse, jamás podré pagarle todo lo que ha hecho por mí y este logro va por las dos, mamita te amo.

Andrés, más que un hermano, un amigo para toda la vida, gracias por todas las risas, por tu amor incondicional, por amanecerte conmigo haciendo deberes, por poner siempre una sonrisa en mi rostro en los días más difíciles, gracias por acompañarme con tus chistes, tus locuras y ocurrencias en esta vida hermano.

A mi más grande orgullo, a mi profe favorito, mi campeón, mi inspiración, el que me ha enseñado a tener el coraje y el valor de luchar por mis sueños, el que siempre tiene un consejo para dar, la palabra justa para consolar y una mano en la cual sé que puedo sostenerme, gracias por cuidarme y consentirme hermanito, gracias por tanto y por todo Kevin.

A mi niño de buen corazón Mateo, nos enseñas lo más importante de la vida, que es el amor, no tengo palabras para describir lo que significas en mi vida, para mí eres un guerrero hermano, te admiro y te respeto, tu lucha es diaria, pero Dios te acompaña

Quiero agradecer a mis abuelos, a mis tíos y tías, especialmente a mí tío Marcelo quien me ha brindado su apoyo, todos han sido fuente de amor y apoyo incondicional, para hoy poder cumplir con este sueño.

Ana Gabriela



UNIVERSIDAD DE CUENCA

## DEDICATORIA

A Dios por iluminarme y darme la fortaleza suficiente, guiándome por la senda de la sabiduría.

A mis padres, por ser esa guía constante día a día a lo largo de mi vida, en especial mi madre Laura, quien con su sacrificio, abnegación se convirtió en el pilar fundamental de mi esfuerzo y superación personal, ya que para cada momento de mi vida siempre tuvo las palabras correctas y un consejo adecuado para ser mejor día a día, y gracias a su apoyo y esfuerzo he llegado a culminar mi formación académica. Siempre la recordare con un cariño infinito.

A mis hermanos dos hermanos Leonardo y Juan, que siempre me brindaron su apoyo incondicional y siempre se sintieron orgullosos de mí.

A mis amigos y compañeros por ser el punto de apoyo, y de comprensión, en el transcurso y culminación de mi carrera, para ellos mi respeto y gratitud.

Y a mi familia, quienes siempre han estado dispuestos a tenderme la mano cuando lo he necesitado

José Antonio



## **AGRADECIMIENTOS**

En nuestro trabajo de tesis agradecemos a Dios por bendecirnos a lo largo de nuestra vida universitaria y permitirnos cumplir esta meta profesional.

De manera especial agradecemos a nuestra querida directora de tesis Dra. María Elena Cazar, además directora del proyecto de investigación quien nos dedicó parte de su valioso tiempo y nos brindó la oportunidad de formar parte del proyecto “Estudio de la relación simbiótica orquídea micorriza en la provincia del Azuay, Ecuador”. Gracias por compartir sus conocimientos, por su paciencia, dedicación y motivación para poder culminar este logro.

No existen palabras para agradecerle al Dr. Rodrigo Caroca, nuestro asesor de tesis, un ser humano tan admirable y respetable, que gracias a sus conocimientos, experiencia y asesoramiento, esta investigación pudo realizarse exitosamente. Querido doctor, más que un excelente profesional, lo consideramos un amigo y para nosotros ha sido un honor y un privilegio poder contar con su guía, ayuda y enseñanzas. Gracias por todo el tiempo que nos ha dedicado, por la enorme paciencia que nos ha tenido, por enseñarnos tanto, por ayudarnos a buscar soluciones y brindarnos su invaluable apoyo durante toda la investigación, pero en especial por enseñarnos a trabajar con pasión, amor y dedicación.

Un agradecimiento especial al Dr. Knut Jahreis del Departamento de Genética de la Universidad de Osnabrück, Alemania, quien nos colaboró con la parte de la secuenciación, punto clave de nuestra investigación.

A la Dra. Raffaella Ansaloni, directora del Orquideario de la Universidad de Cuenca por habernos brindado las facilidades y permitirnos el trabajo en el laboratorio del Orquideario. Gracias a la BLGA. Maria Elisa Duran, MSc. a la BQF. Mónica Narváez por su atención y amabilidad durante la realización de este trabajo de investigación. Al Dr. Geovanny Larriva, y al Dr. Diego Montero por su amabilidad y ayuda para la realización de esta tesis.

A todos los Docentes Universitarios de la Carrera de Bioquímica y Farmacia, en especial a la Dra. Carmen Lucia López y al Dr. Fausto Zaruma quienes con sus logros y enseñanzas nos motivan a ser cada día mejor.



## INTRODUCCIÓN

Ecuador está considerado como el país con la mayor diversidad de orquídeas a nivel mundial (Endara, 2009). Según Endara y Jost (2011), existen alrededor de 1714 especies de orquídeas endémicas en el Ecuador, siendo la familia Orchidaceae, la familia con el mayor número de especies endémicas de la flora nacional (Jimenez, 2014).

Las orquídeas son una de las más grandes familias de plantas terrestres, incluyendo alrededor del 10% de todas las especies de plantas con flores (Dressler, 1981). Los miembros de esta diversa familia crecen en una gran variedad de hábitats y tienen diversas estrategias de vida que van desde epífitas a terrestres y de hojas siempre verdes hasta especies no fotosintéticas. Las características únicas de esta familia y gran parte de su diversidad pueden ser atribuidas a su relación particular con hongos micorrízicos (Benzing, 1981).

La micorriza es una asociación constituida por un conjunto de hifas fúngicas (micelio) que, al entrar en contacto con las raíces de las plantas, pueden penetrarlas intercelularmente a través de las células del córtex, como en el caso de la ectomicorriza o, como en el caso de la micorriza arbuscular, penetran la raíz. Al mismo tiempo, las hifas se ramifican en el suelo, formando una extensa red de hifas capaz de interconectar, subterráneamente, a las raíces de plantas de la misma o de diferentes especies. Esta red de micelio permite, bajo ciertas condiciones, un libre flujo de nutrimentos hacia las plantas hospederas y entre las raíces de las plantas interconectadas. Así, la micorriza ofrece a la planta hospedera y al ecosistema, diferentes beneficios en términos de sobrevivencia y funcionamiento (Camargo *et al.*, 2012).

Es muy importante la identificación de los hongos que están formando micorrizas con las orquídeas ya que en el futuro se pueden mejorar las estrategias de conservación de estas plantas en su hábitat (Otero *et al.* 2002). Se sabe que los hongos pertenecientes al filo Basidiomycota, con los órdenes Tulasnellales, Sebaciniales, Ceratobasidiales y Atractielalles han sido reportados como los hongos micorrízicos más comunes de las orquídeas (Suárez *et al.* 2008, Kottke *et al.* 2010).



El presente estudio se desarrolló para probar la siguiente hipótesis “La amplificación y secuenciación de regiones de ADN ribosomal permite la clasificación a nivel de género y especie de hongos identificados como potencialmente micorrízicos por estudios morfológicos”.

### **OBJETIVO GENERAL**

- Caracterizar a nivel de género y especie los hongos de orquídeas nativas del Ecuador que forman parte de asociaciones micorrízicas por medio de herramientas de biología molecular.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

- Adaptar un protocolo que permita una extracción y purificación óptima de ADN fúngico, en concentración y pureza suficientes para amplificación y secuenciación.
- Identificar especies fungales a través de la amplificación y comparación de las secuencias obtenidas con bases de datos de ADN.
- Discutir la relevancia de los hongos identificados en la asociación micorrízica.





## CAPÍTULO I

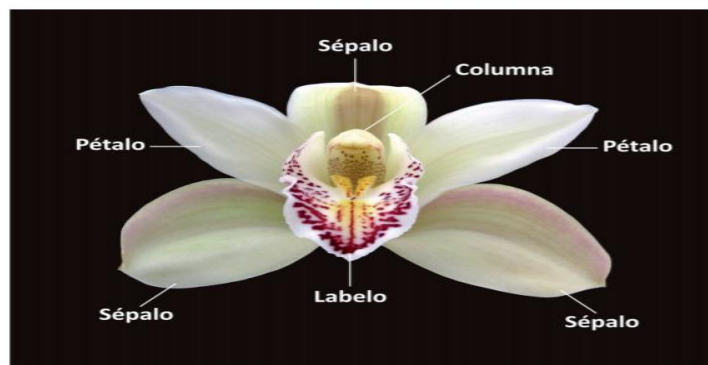
### 1. ORQUÍDEAS

#### 1.1. Características Generales de las orquídeas

Las orquídeas pertenecen a la familia botánica Orchidaceae, comprende entre 25. 000 y 30.000 especies (Menchaca, 2011). Su mayor diversidad, se encuentra en los bosques tropicales y en los páramos helados frecuentemente sobre los árboles, también pueden hallarse sobre el suelo y rocas (Salazar, 2005).

#### 1.2. Partes principales de las flores

Las flores tienen generalmente seis partes que son tres sépalos iguales entre sí, ubicados en la parte de atrás y tres pétalos que están enfrente, de los cuales dos son iguales y uno diferente; este último se encuentra al centro de la flor, siendo el labelo la parte más llamativa, en la cual se desarrolla las mayores adaptaciones y tiene como finalidad atraer a los insectos polinizadores de la flor (Menchaca, 2011). Los órganos reproductores están fusionados en una estructura que recibe el nombre de columna (Díaz, 2013).



**Figura 1.** Cymbidium, estructura de una flor de orquídea

Fuente: Díaz, 2013.

#### 1.3. Tipos de orquídeas

Existen diferentes tipos de orquídeas, clasificadas atendiendo al modo en que prosperan y sobreviven, al tipo de sustrato que necesitan (un árbol, una roca o bien crecen en el suelo), y también a las diferentes condiciones que necesitan para vivir (Banks, 2006).



- **Epifitas.**- Las orquídeas cuya evolución las ha llevado a vivir en los árboles se denominan epifitas, no obtienen nada del árbol para su crecimiento, sino que simplemente se aprovechan del porte elevado y se benefician de estar más cerca del aire y la luz, que la vegetación que crece en el suelo selvático (Banks, 2006).
- **Terrestres.**- Se desarrollan en un tallo único que surge desde uno o dos tubérculos subterráneos o de una masa de raíces rizomatosas. Pueden crecer justo bajo la superficie del manto de hierba natural o en lo profundo del suelo, según las condiciones. (Banks, 2006).
- **Litófitas.**- Estas orquídeas crean su hogar en los riscos y laderas rocosas, a veces cerca de las pendientes (Banks, 2006).

#### 1.4. Orquídeas y otros organismos

Para sobrevivir ante los cambios del clima, las orquídeas han desarrollado extrañas asociaciones con otros organismos vivos. Dentro de la estructura de las raíces de la mayoría de las orquídeas coexiste un hongo microscópico (micelio). Esta alianza establece una relación simbiótica, según la cual tanto la orquídea como el hongo se hacen completamente dependientes uno de otro para su supervivencia. El micelio libera nutrientes que son absorbidos por la orquídea, que a su vez se convierte en hospedadora del hongo. La mayoría de las orquídeas tienen micro-hongos específicos, de manera que deben existir tantos hongos diferentes como orquídeas hay en el mundo (Banks, 2006).

#### 1.5. Ciclo de vida

**1.5.1 Germinación.**- Para que la germinación tenga lugar es necesario el concurso de ciertos hongos microscópicos del suelo, generalmente del género *Rhizoctonia*, con los que las semillas entablan una relación simbiótica denominada micorrízica (Otero & Bayman, 2002).

Las semillas de las orquídeas, que sólo alcanzan unas décimas de milímetro de longitud, carecen casi por completo de sustancias de reserva, y de ahí la necesidad de un agente externo que aporte nutrientes al embrión en desarrollo. Si la especie apropiada de hongo invade la semilla, se establece una relación micorrízica, quedando rodeada la semilla de una densa maraña de hifas fúngicas (Velasco & Beltrán, 2008).



**1.5.2 Protocormo.-** Las diminutas semillas de las orquídeas constan de una cubierta seca y dura, la testa, en cuyo interior se encuentra el embrión. Este embrión es extremadamente pequeño, está poco diferenciado y consta de unos cuantos cientos de células solamente. Durante la germinación, el embrión se hincha hasta alcanzar varias veces su volumen, formando una protuberancia por una hendidura de la testa y produce largos pelos protocórmicos, que en ausencia de la radícula, tienen la misión de absorber nutrientes del medio (Velasco & Beltrán, 2008).

### **1.6. Importancia de las orquídeas**

Son muy importantes para atraer y orientar a los polinizadores que visitan sus flores en busca de néctar y polen para alimentarse (Rivas & Warner, 1998).

Si desaparecen las orquídeas, miles de especies polinizadoras de plantas estarían en peligro de extinción. De esta manera, se perdería un ciclo completo en donde las especies frutales podrían desaparecer, las plantas quedan estériles, y no podrían producirse (Hoyos & Rodriguez, 2013).

### **1.7. Distribución y amenazas de las orquídeas en el Ecuador**

Ecuador es el país con más orquídeas en el mundo. Tiene 4 de las 5 subfamilias existentes a nivel mundial, 20 tribus, 30 sub-tribus, 273 géneros, 4.032 especies clasificadas y publicadas, 1.714 especies endémicas y al menos 400 especies en proceso de estudio y consiguiente descripción. El 42,41 % de las especies clasificada de Orchidaceae del país son endémicas (Endara & Lost, 2011).

En Ecuador existen orquídeas en todos los pisos altitudinales comprendidos entre 0 y 4500 m.s.n.m. La mayor cantidad de orquídeas endémicas se encuentran en los microhábitats presentes en los sistemas montañosos entre los 1500-3000 m.s.n.m, especialmente en los bosques montano bajos y de neblina montanos (Endara, 2009).

En vista de que más de la mitad de las especies de orquídeas endémicas (58%) se encuentran en una sola unidad de vegetación, el 26% se hallan en dos tipos de bosque, el 10% en tres tipos de bosque, y solamente el 6% se encuentra en cuatro o más unidades de vegetación; se estima que 85% de las especies endémicas presentan algún tipo de amenaza: 2% en peligro crítico, 11% en peligro y 87% vulnerable (Endara, 2009).



Desafortunadamente, la mayoría de las especies de orquídeas se encuentran en peligro debido a la alta tasa de deforestación y la pérdida de hábitat consecuente (Dodson & Escobar, 1998). Esto es grave si se considera que la distribución de muchas orquídeas es conocida solo por una colección pobre, que en la mayoría de los casos corresponde a una localidad fuera del Sistema Nacional de Áreas Protegidas. Según la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la naturaleza (UICN), el 74% de las especies de orquídeas son vulnerables y el 11% están en peligro o en peligro crítico (Valencia, 2000).

En el sur de Ecuador las dos principales amenazas a la supervivencia de orquídeas son antrópicas. La primera amenaza es la deforestación, pues muchas especies de orquídeas en su medio natural requieren grandes extensiones de bosque intacto para ser reproductivamente exitosas. La segunda amenaza es la recolección de orquídeas del hábitat natural, debido al aumento de la accesibilidad a las áreas, es casi imposible determinar el volumen de las orquídeas que se extraen de los bosques en el sur del Ecuador cada año (Dodson & Escobar, 1998).

## 2. Micorrizas

### 2.1 Generalidades

El término micorriza se refiere a la relación simbiótica entre un hongo y las raíces de una planta vascular. En la mayoría de las asociaciones micorrízicas, el hongo que coloniza la raíz se beneficia con los productos de la fotosíntesis mientras que la planta incrementa la absorción de agua y nutrientes, principalmente fósforo (Rivas & Warner, 1998). El hongo beneficia a la planta al descomponer la materia orgánica presente en el suelo, con lo que hace que ciertos minerales estén disponibles para aquella. Las raíces, por su parte, proporcionan al hongo azúcares, aminoácidos y otras sustancias orgánicas útiles a este organismo heterótrofo (Cuerda, 2005).

Los hongos micorrízicos también pueden absorber minerales que no estarían disponibles para el hospedero sin su ayuda. El nitrógeno, el fósforo y el calcio, entre otros elementos necesarios, no están disponibles en forma directa a las raíces de las plantas sino que hasta que los compuestos orgánicos complejos en que se encuentran hayan sido descompuestos y formen compuestos inorgánicos solubles. Sin



embargo, los hongos micorrízicos atacan al humus, digiriendo y absorbiendo compuestos orgánicos (Cronquist, 1981).

## **2.2. Fisiología de la simbiosis micorrícica.**

Las micorrizas absorben desde los hospedantes azúcares como fructosa, glucosa o sacarosa, y los transforman en carbohidratos de reserva, como manitol o trehalosa. Gracias a ello, el hongo no comparte las reservas con la planta, sino que impide que esta las utilice y que el transporte de azúcares desde el hospedante continúe regularmente. Las hifas, incorporan rápidamente los minerales a su citoplasma y, posteriormente, los trasladan al sistema vascular de la planta hospedante. Las relaciones micorrízicas tienen un papel decisivo en la absorción del fósforo mineral, su incorporación del suelo hasta la planta esta mediatizada por los hongos, especialmente en las micorrizas versículo arbusculares (AV), y este elemento forma parte de moléculas esenciales, como ácidos nucleicos, fosfolípidos o ATP. (Izco, 2004).

## **2.3. Distribución de micorrizas en la naturaleza**

La distribución de ciertas plantas con flor parece estar controlada por la tolerancia fisiológica de sus hongos micorrízicos. Las plantas que poseen micorrizas carecen de pelos absorbentes y la función de estos la asumen las hifas de los hongos micorrízicos (Rivas & Warner, 1998).

En todas las micorrizas se produce un contacto íntimo entre las hifas del hongo y las células de la planta, como una interfaz donde se intercambian nutrientes. La planta aporta sustancias elaboradas que el hongo no es capaz de sintetizar por él mismo, y el hongo, a su vez, mejora la eficiencia de absorción de agua y nutrientes de la planta debido a la red de hifas que despliega en el perfil del suelo (Azcón & Barea, 1996).

Las micorrizas suministran nutrientes a las plantas jugando un papel fundamental en su alimentación, sobre todo en el ciclo del carbono. El fósforo, que se considera generalmente el factor limitante más importante de crecimiento de los vegetales, puede ser movilizado del suelo con mayor eficiencia por los hongos micorrízicos, quienes lo suministran a las plantas en suficiente cantidad para su desarrollo, haciendo innecesario el uso excesivo de abonos fosforados. M.C. Rillig en (2004)



descubrió las proteínas del suelo asociadas a la Glomalina (PSAG), producidas por las hifas de los hongos micorrízicos y que tienen función estructuradora del suelo, aparte de ser reservorio de carbono. En particular la Glomalina es una glicoproteína emitida por las micorrizas arbusculares (García & Quintana, 2009).

Las hifas de los hongos micorrízicos aumentan la capacidad de absorción de la raíz, debido a que se extienden más allá de la zona rizosférica. De esta manera, se permite una mejor transferencia de agua y nutrientes tales como fósforo, nitrógeno, azufre, potasio, calcio, zinc, hierro, cobre y carbono (Camargo & Montaña, 2012).

#### **2.4. Clasificación de las Micorrizas**

Las micorrizas se clasifican en base a su estructura, morfología y modo de colonización en dos tipos principales: ectomicorrizas y endomicorrizas (Salas, 1997).

##### **a. Ectomicorrizas**

Las ectomicorrizas o micorrizas ectotróficas: se establecen cuando el micelio fúngico no penetra en el interior de las células corticales, sino que organiza una envoltura de las raíces afectadas, denominada manto. Desde el manto, las hifas individuales o cordones de hifas crecen, hacia afuera, introduciéndose en el suelo, y hacia dentro, intercalan entre las células del córtex de la raíz a través de la lámina media, formándose así un entramado denominado “red de Hartig”. Aquí el micelio deja de estar tabicado, es cenocítico, lo que se interpreta como una ventaja para acelerar los procesos de intercambio (Izco, 2004).

##### **b. Endomicorrizas**

Se llaman así porque el hongo penetra en las células de la raíz y no se queda simplemente en el espacio intercelular como ocurría con las ectomicorrizas. El hongo penetra en las células corticales y no forma capa fúngica externa (Etayo, 1998).

Una endomicorriza o micorriza arbuscular, está formada por ciertos zigomicetos, los cuales no desarrollan red de Harting y colonizan intracelularmente la corteza de la raíz por medio de estructuras especializadas denominadas arbuscúlos, que actúan como órganos de intercambio de nutrimentos entre la célula vegetal y el huésped (Aguilera & Olalde, 2007).

#### **2.5. Micorrizas de orquídeas**

En las orquídeas se conocen las micorrizas orquidioides. La colonización se produce en un estadio muy temprano, las semillas tienen pocas reservas y cuando germinan ya



cuentan con hongos micorrizógenos que les aporta carbohidratos y nutrientes. La hifa penetra en el suspensor y forma rizos muy ramificados de célula en célula y así se desarrolla la plántula, hasta que alcanza el tamaño preciso para realizar la fotosíntesis. La colonización continúa con el crecimiento de la planta adulta. Muchos de los hongos implicados son basidiomicetos, como *Armillaria mellea*, capaces de utilizar la celulosa de las plantas leñosas que convierten en carbohidratos para las orquídeas (Izco, 2004).

## 2.6. Beneficios de la micorrización en las orquídeas

Los hongos micorrízicos al ser seres heterótrofos, necesitan de otros organismos para poder desarrollarse, dando lugar a una simbiosis, en donde los dos organismos resultan beneficiados (Honrubia, 2009).

Los beneficios más importantes se detallan a continuación:

- Mejora la absorción de macro y micronutrientes como fósforo nitrógeno potasio y calcio del suelo, estos son transportados mediante vacuolas móviles del hongo con ayuda de enzimas presentes en el mismo (Mosquera & Bayman, 2010).
- Las hifas son capaces de penetrar partes del suelo inaccesibles para las raíces aumentando la absorción de agua que mejora la resistencia en cuanto al estrés hídrico (Aguilar & Gonzáles, 2011).
- Incremento de la resistencia frente a hongos patógenos del suelo por su efecto antagónico. Una raíz micorrizada es difícil que sea colonizada por un hongo patógeno (Aguilar & Gonzáles, 2011).
- La importancia de las micorrizas se descubrió al observar que las orquídeas no prosperan si no están colonizadas por un determinado hongo (Cuerda, 2005).

## 2.7. Relación micorriza-orquídea

Para la familia Orchidaceae, las micorrizas son un requerimiento fundamental, al menos en los primeros estadios de la planta, para el establecimiento en diferentes



sustratos. En las semillas es determinante para iniciar los procesos de germinación, debido a que son extremadamente pequeñas (0,4 – 1,25 mm de largo y 0,08-0,27 mm de ancho), además contienen bajos niveles de proteínas, lípidos, azúcares y granos de almidón que no son suficientes para iniciar los procesos de germinación por sí solas (Ordoñez & Otero, 2012).

La micorríza orquidíode se caracteriza porque la mayoría de los hongos que participan en esta asociación son miembros del género-forma *Rhizoctonia*. En las células corticales de las raíces el hongo origina una estructura denominada pelotón que es un enrollamiento hifal, el cual es degradado por la planta para obtener nutrientes (Espinosa, 2010).

A medida que él embrión va creciendo, desarrolla sus primeras hojas y activa su maquinaria metabólica y empieza a producir su propio alimento a través del proceso de fotosíntesis (Rivas & Warner, 1998).

Desde este momento la planta se puede considerar un micótrofo facultativo porque no depende de los hongos para su sobrevivencia, aunque si están presentes, continúa aprovechando el aporte de nutrientes liberados por las hifas o por la digestión de los hongos (Rivas & Warner, 1998).

El porcentaje de germinación de semillas de orquídeas es muy bajo, logrando que sólo 10 o 15 semillas germinen de un total de un millón, y sólo una o dos lleguen a ser plantas adultas después de dos o tres años (Menchaca, 2011). Las condiciones de calor, humedad y aireación no son suficientes para la germinación de semillas de orquídeas (Moreira, 2009).

## **2.8. Género – forma Rhizoctonia**

Es un grupo heterogéneo de hongos filamentosos que no producen esporas asexuales y comparten caracteres morfológicos generales como la formación de micelio y esclerocitos de coloración parda en medios sintéticos (González, 2008).

Las colonias jóvenes forman un micelio estéril blanco en medios de cultivo (1-10 días) y se torna amarillo o de color café claro en colonias de más de 20 días. El micelio consta de células largas y produce ramificaciones que crecen en ángulo recto respecto a la hifa principal. Sin embargo, el micelio generalmente no presenta caracteres diferenciales suficientes que permitan la identificación a nivel específico. La red de hifas o micelio externo tiene acceso a abundantes fuentes de carbono en el





suelo que pueden ser asimilados y transportados a la orquídea (Ordoñez & Otero, 2012)

### **2.8.1. Morfología de *Rhizoctonia***

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 (Mosquera & Bayman, 2010).

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, pero es muy difícil conseguir estas estructuras reproductivas en condiciones de laboratorio haciendo de esta manera que su diferenciación se dificulte (Mosquera & Bayman, 2010).

Una característica de clasificación para el género-forma *Rhizoctonia* es el número de núcleos en células de hifas jóvenes, que pueden ser uní, bi, o multinucleadas. Muchas de las rhizoctonias micorrízicas 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 & Bayman, 2010).

## **3. Técnicas de caracterización molecular**

### **3.1. Generalidades**

En los estudios de las micorrizas, una meta fundamental es la identificación de la especie fúngica que forma parte de la micorriza. La observación microscópica de determinados aspectos y características morfológicas sólo permite clasificar en categorías, ya que los caracteres estudiados resultan modificados por la especie forestal con que se establece la asociación, dependen del medio ambiente (humedad en el terreno y tipo de substrato) y del criterio del investigador. Las modernas técnicas moleculares no presentan estos problemas, porque el material objeto del análisis, el



DNA, es totalmente independiente de la variación ambiental o del hospedante (V. Llorens, 1997).

El genoma fúngico presenta una miríada de regiones ADN y características que pueden ser analizadas y para estudiar la variación genética de los organismos incluyendo los hongos, se han desarrollado diversas técnicas de biología molecular (Piercey & Egger, 2001).

El verdadero inicio de la biología molecular moderna lo constituyó la propuesta de estructura en doble hélice para el ADN, formulada en 1953 por James D. Watson y Francis Crick (Herraéz, 2012).

Las moléculas de ADN mitocondrial (ADN mt) son genomas relativamente pequeños que coevolucionan a su propia tasa evolutiva en relación con genoma nuclear de los organismos en los cuales ellos están alojados. Particularmente en animales y hongos dichos genomas evolucionan más rápidamente que su contraparte de ADN nuclear (Kouvelis *et al.*, 2004).

El ADN mitocondrial es ampliamente empleado para la determinación de relaciones taxonómicas y filogenéticas entre los grupos de organismos eucarióticos que poseen dicho organelo. Las razones para su popularidad reside en características intrínsecas de esta molécula tales como su reducido tamaño, la alta tasa evolutiva, la falta de bases metiladas, el alto contenido de residuos adenina-timina (AT) y el hecho de ser una molécula haploide donde la mayoría de los alelos poseen la misma función e inclusive poseen regiones universalmente conservadas (Burns *et al.*, 1991).

El ADN ribosómico pueden encontrarse en mitocondrias, cloroplasto y en el núcleo. La razón principal para el estudio del ADN ribosomal, es que es un gen multicopia que contiene regiones que no codifican para proteínas, y estas copias están repetidas en tándem, facilitando su amplificación (Calle, 2005).

### **3.2. Espaciadores transcritos internos (ITS)**

Entre las características convenientes para el análisis de secuencias ITS en hongos, se encuentran: la región ITS completa de 600 a 800 pb puede amplificarse fácilmente con iniciadores universales; la naturaleza multicopia de las repeticiones del DNAr hace de esta región una secuencia fácil de amplificar aun cuando se utilicen muestras de DNA pequeñas, muy diluidas, o altamente degradadas (DNA obtenido de material viejo



y especímenes de herbarios). Finalmente, diversos estudios demuestran su utilidad en análisis filogenético (Villalobos & Escobar, 2005).

Las regiones del ADNr más comúnmente estudiadas son los tres genes codificantes (18S, 5.8S, y 28S) y los dos espaciadores internos (ITS1 e ITS2). La secuencia altamente conservada del gen 5.8S, ha sido utilizada como punto de unión de cebadores universales para amplificar las regiones espaciadoras flanqueantes, y el ITS1 e ITS2, que si son de gran utilidad para establecer relaciones filogenéticas. White et al., (1990) diseñaron y describieron iniciadores específicos (ITS1 e ITS4) para amplificar y secuenciar varios segmentos del ADNr mitocondrial y nucleico de hongos (White & Bruns, 1990)

La conservación de los genes ARNr permite el fácil acceso a las regiones ITS con cebadores para realizar la PCR. La variación en los espaciadores es una herramienta útil en la distinción entre una amplia diversidad de taxa difíciles de identificar. Para la detección de los ITS se hace uso de los cebadores en regiones conservadas de los genes de ARNr 28S, 5.8S y 18S (Bruns & White, 1991). Los Primers o cebadores son moléculas de entre 10 y 30 bases de ADN de cadena sencilla. Estas moléculas son los que van a delimitar el fragmento a amplificar por PCR (Rodríguez, 2004).

La región ITS completa de 600 a 800 pb puede amplificarse fácilmente con iniciadores universales. (Cuadro 1). La naturaleza multicopia de las repeticiones del ADNr, hace de esta región una secuencia fácil de amplificar aun cuando se utilicen muestras de ADN pequeñas, muy diluidas, o altamente degradadas (ADN obtenido de material viejo y especímenes de herbarios) (Gardes & Bruns, 1993).

Cuadro 1 .Iniciadores empleados para la amplificación.

Iniciadores	Secuencia	Fragmentos de amplificación
ITS-1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	600 a 800 pb
ITS-4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	600 a 800 pb
TW14	GCTATCCTGAGGGAACTTC	1200 pb

Fuente: (White & Bruns, 1990)



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

La técnica amplifica fragmentos específicos de DNA desde un pequeñísimo número de células fúngicas, de una sola espora, o aún más, de material de herbario seco, incluyendo especímenes que están extintos. La primera vez que se utilizó este tipo de análisis en micología consistió en la amplificación y secuenciación del rDNA, estableciéndose relaciones filogenéticas de hongos. Uno de los aspectos más relevantes en el desarrollo de esta metodología fue el diseño de los cebadores, los cuales fueron elaborados a partir de regiones conservadas. Ello permitió la amplificación de los fragmentos del rDNA en la mayoría de los hongos, conduciendo al desarrollo de los estudios taxonómicos y filogenéticos intra e inter especies fúngicas (Ochoa, 2008).

La replicación del DNA (autocopia) es un proceso por el cual, a partir de un doble filamento de DNA, se obtienen dos dobles cadenas idénticas entre sí e idénticas a la molécula que ha servido de molde. El mecanismo es semiconservativo, ya que la doble cadena original se desdobra en dos filamentos simples, que son copiados fielmente gracias a la complementariedad de bases, mediante unos enzimas denominados polimerasas de DNA. Estas enzimas copian la molécula original (DNA molde) en sentido 5'~ 3' a partir del extremo 3'-OH libre de un pequeño segmento de DNA, unido al molde, que se denomina cebador y de los nucleótidos trifosfato libres (dNTPs). El proceso es tan eficaz, que la probabilidad de error (mutación) es de 10-9 nucleótidos. Según la doctrina básica de la Biología Molecular, el DNA dirige la síntesis de las proteínas mediante unos complejos procesos denominados transcripción y traducción (V. Llorens, 1997).

Tres son las etapas principales de las que se compone la PCR:

1. *Desnaturalización* de la cadena doble de ADN en dos hebras simples.
2. *Anillamiento* de los primers en las hebras originales para la síntesis de una nueva hebra.
3. *Extensión* de la nueva hebra de ADN a partir los iniciadores.

Estas reacciones pueden llevarse a cabo con cualquier ADN polimerasa y dar como resultado la síntesis de porciones definidas de la secuencia de ADN original (Delidow & Lynch, 1993).



Un protocolo típico de PCR incluye de 30 a 50 ciclos, cada ciclo comprende de las tres etapas (desnaturalización, anillamiento, extensión). Cuando cada ciclo térmico se completa, los fragmentos recientemente sintetizados sirven de ADN blanco, y en los siguientes ciclos, el producto predominante será una única clase de fragmento de DNA cuya longitud corresponde a la distancia entre los oligonucleótidos iniciadores. De esta manera, la repetición del ciclo origina una acumulación exponencial de las secuencias amplificadas. (Tejeda & Baca, 1995).

Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR (también llamados amplicones) son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa (Tamay de Dios L, 2013).

### **3.4. Análisis del producto de amplificación mediante electroforesis en geles de agarosa**

El término electroforesis se usa para describir la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. La electroforesis en gel de agarosa es de las más utilizadas para analizar y caracterizar ácidos nucleicos de distintas procedencias. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de DNA de diferente tamaño van a emigrar de forma distinta en una electroforesis en gel de agarosa. Además, si en dicha electroforesis se aplican marcadores de peso molecular (fragmentos de DNA de tamaño conocido) se puede calcular el tamaño aproximado del DNA en estudio (Peña & Diez, 2006).

Los materiales más comunes para separar moléculas de ácidos nucleicos son polímeros como la poliacrilamida o la agarosa. Estos geles se colocan en la cubeta de electroforesis, sumergidos en un tampón de pH alrededor de 8. De esta forma, las moléculas de DNA o RNA sometidas a electroforesis se desplazarán al polo positivo ya que a pH superiores a 5 poseen carga negativa. Tras la electroforesis, se visualiza el gel con una lámpara de luz UV, y se verán las bandas correspondientes a las muestras de DNA aplicado y los marcadores de peso molecular (Peña & Diez, 2006).

### **3.5. Secuenciación de ADN**



El análisis más detallado de la estructura del ADN consiste en averiguar la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN. Para ello actualmente existen dos métodos que han sido los más empleados, uno de ellos es la secuenciación automática y el método enzimático de determinación de cadena de Sanger. (Alcántara, 2007). Este método de secuenciación fue desarrollado por el bioquímico británico Fred Sanger y sus colegas en 1977. En la secuenciación de Sanger, el ADN blanco es copiado muchas veces y se hacen fragmentos de diferentes longitudes. Nucleótidos fluorescentes que actúan como "terminadores de cadena" marcan los extremos de los fragmentos y permiten la determinación de la secuencia. La secuenciación de Sanger consiste en hacer muchas copias de una región blanco de ADN. Sus ingredientes son similares a los necesarios para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que copia el ADN in vitro. Los ingredientes son: Una enzima ADN polimerasa, Un cebador, que se une al molde de ADN y actúa como un "iniciador" de la polimerasa, los cuatro nucleótidos del ADN (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Vierstraete, 2000).

El propósito de la secuenciación es determinar el orden de los nucleótidos de un gen. Para la secuenciación, comenzamos a partir de fragmentos de PCR. La reacción de secuenciación comprende de tres pasos principales (como en PCR), que se repiten en 30 ó 40 ciclos. Desnaturalización a 94 ° C, anillamiento a 50 ° C: Sólo se utiliza un cebador, por lo que sólo hay una hebra copiada. (En PCR: se utilizan dos cebadores, por lo que se copian dos hebras). La polimerasa comienza a copiar la plantilla generada. Una vez que hay algunas bases incorporadas, el enlace iónico es tan fuerte entre la plantilla, que ya no se rompe y extensión a 60 ° C: normalmente es a 72 ° C (Vierstraete, 2000).

Para fines de publicación, cada secuencia de un gen tiene que ser confirmada en ambas direcciones, para lograr esto, el gen tiene que ser secuenciado con cebadores directos e inversos. Ya que sólo es posible secuenciar una parte de 750 a 800 bases en una carrera. Cuando todos estos fragmentos se secuencian, un programa de computadora intenta encajar las diferentes partes juntas y ensambla la secuencia génica total (Vierstraete, 2000).

Finalmente para la identificación una vez obtenidas las secuencias de ADN se va a realizar con un programa de computadora el ajuste apropiado de las diferentes partes ya que reúne la secuencia del gen total, lo cual finalmente podrá ser comparado (Torres, 2012), con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante el programa de análisis genético Macrogen empleando la



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**

herramienta de búsqueda de similitud de secuencia BLAST proporcionada por por GenBank (Altschul, 1997).



## CAPÍTULO II

### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1. Origen de los aislados fungales

El estudio fue realizado a partir de los aislados fungales, que forman parte de la colección de hongos del orquideario de la Universidad de Cuenca, campus de Balzay, parroquia de San Joaquín. Las orquídeas donde se presentan estas asociaciones micorrízicas corresponden a dos localidades ubicadas en el Austro Ecuatoriano.

El estudio se realizó en el sector Remigio Crespo Toral, a las orillas del río San Francisco en el cantón Gualaceo, provincia del Azuay (altura 2.330 m.s.n.m.). Su ubicación geográfica es  $38^{\circ}-37'$  y  $78^{\circ}-54'$  de longitud oeste, y en los  $02^{\circ}-49'$  y  $03^{\circ}-04'$  de latitud sur. Las especies de orquídeas recolectadas fueron: *Pleurothallis angustipetala*, *Elleanthus oliganthus*, *Trichoceros antenniferum*, *Pleurothallis gramínea*, *Epidendrum secundum* (Cando & Cardenas, 2017).

La segunda localidad de estudio fue en el Cerro Abuga, en la parroquia Bayas, cantón Azogues, provincia del Cañar (altura 3090 m.s.n.m.). Su ubicación geográfica es  $78^{\circ}-59'$  y  $36^{\circ}-44'$  de longitud oeste, y en los  $02^{\circ}-40'$  y  $06^{\circ}10'$  de latitud sur. La recolección de las especies de orquídeas fue: *Trichoceros antennifer*, *Elleanthus amethystinoides*, *Stelis sp*, *Epidendrum chioneum*, *Epidendrum sp*. (Guaman & Ochoa, 2016).

Estos sectores cuentan con una diversidad en plantas vasculares y climas templados que pueden variar entre los  $12,5^{\circ}\text{C}$  -  $18^{\circ}\text{C}$  y su diversidad forestal es ideal para la posible presencia de hongos micorrízicos (Marcatoma, 2014).

Las colonias presentan características semejantes al género *Rhizoctonia*. Estos hongos fueron repicados en medio PDA (Potato Dextrose Agar), para generar su rápido crecimiento (Anexo 1). Los hongos en estudio provienen de los fragmentos de raíces de diez especies de orquídeas nativas de origen terrestre, anteriormente nombradas de acuerdo a su lugar de origen.

Para el etiquetado de las cajas sembradas se asignó códigos que correspondieron: el número uno para las cajas con la muestra y el número dos para las cajas que contenían la repetición; la inicial del nombre científico de la orquídea o su





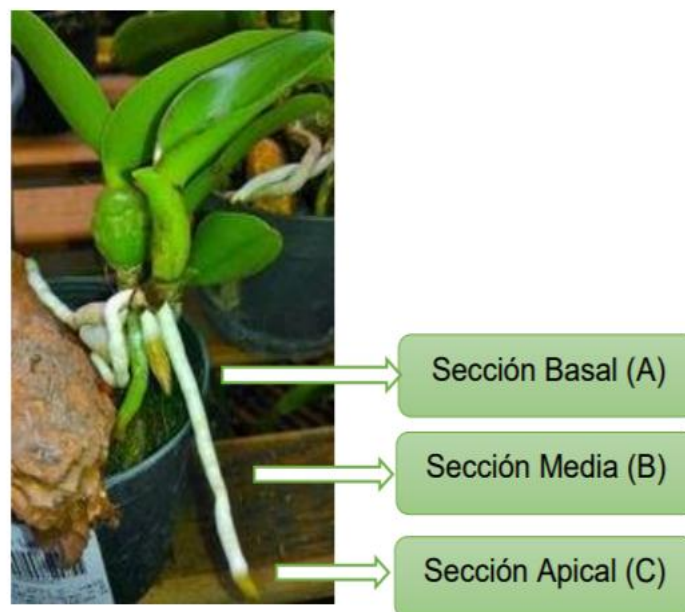
denominación tradicional; el número de raíz recolectada (como se colectaron 10 raíces por especie, se les asignaron números del 1-10) y la sección de la raíz utilizada (A, B ó C), como se observa en la tabla 3.

**Cuadro 2.** Ejemplo del código (1M7B).

Código	Denominación
1	Repetición
M	<i>Trichoceros anteniferum</i>
7	Número de raíz recolectada
B	Fragmento de la raíz utilizada

Elaborado por: Gabriela Crespo y José Sinche.

Las raíces de las orquídeas seleccionadas fueron divididas en tres secciones proporcionales de 1 cm de longitud correspondiente a la sección basal (A), sección media (B) y sección apical (C), se puede observar en la figura 1. Corresponden nueve aislados fungales a la sección media, ocho a la sección apical y tres a la sección basal. Esta investigación es un trabajo de tipo experimental.



**Figura 2.** Secciones de la raíz (A, B, C).

Fuente: León y Romero, 2017



A continuación se presenta los códigos correspondientes a los aislados fungales en estudio.

**Cuadro 3.** Códigos de los aislados fungales de la zona Remigio Crespo Toral Cantón Gualaceo (Provincia del Azuay) (2.330 m.s.n.m.)

Código del aislado fungal	Orquídea de origen	Número de raíz	Parte de la raíz	Lugar de procedencia
1M7B	<i>Trichoceros antenniferum</i>	raíz 7	B	Gualaceo
1L7B	<i>Epidendrum secundum.</i>	raíz 7	B	Gualaceo
2P7A	<i>Pleurothallis angustipetala</i>	raíz 7	A	Gualaceo
1P2C	<i>Pleurothallis angustipetala</i>	raíz 2	C	Gualaceo
1PG4C	<i>Pleurothallis gramínea</i>	raíz 4	C	Gualaceo
2E5C	<i>Elleanthus oliganthus</i>	raíz 5	C	Gualaceo

**Cuadro 4.** Códigos de los aislados fungales de la zona Cerro Abuga en la parroquia Bayas del Cantón Azogues (Provincia del Cañar) (3.090 m.s.n.m.)

Código del aislado fungal	Orquídea de origen	Número de raíz	Parte de la raíz	Lugar de procedencia
E19B	<i>Epidendrum sp.</i>	raíz 19	B	Cañar
EC12B	<i>Epidendrum chioneum</i>	raíz 12	B	Cañar
T3B	<i>Trichoceros antenniferum</i>	raíz 3	B	Cañar
EaGC	<i>Elleanthus amethystinoides</i>	raíz G	C	Cañar
S9C	<i>Stelis sp.</i>	raíz 9	C	Cañar
S19B	<i>Stelis sp.</i>	raíz 19	B	Cañar
S20B	<i>Stelis sp.</i>	raíz 20	B	Cañar
S7C	<i>Stelis sp.</i>	raíz 7	C	Cañar
T2A	<i>Trichoceros antenniferum</i>	raíz 2	A	Cañar



EC1B	<i>Epidendrum chioneum</i>	raíz 1	B	Cañar
EC12C	<i>Epidendrum chioneum</i>	raíz 12	C	Cañar
EC4C	<i>Epidendrum chioneum</i>	raíz 4	C	Cañar
S4B	<i>Stelis sp</i>	raíz 4	B	Cañar
S10A	<i>Stelis sp</i>	raíz 10	A	Cañar

## 4.2. Extracción de ADN

La extracción del ADN, se realizó a partir del repique, del cultivo puro en medio PDA. Una pequeña porción de micelio fúngico fue extraído de todos los micelios obtenidos y colocados en microtubos 1.5 ml (Eppendorf), se extrajo el ADN usando el Plant PureLink kit extration (Invitrogen) (Anexo 2), siguiendo un protocolo según las instrucciones del fabricante. La elección de este kit de extracción, se realizó basándose en los buenos resultados obtenidos ya que garantiza una lisis celular eficiente, el ADN extraído se conservó a -20°C, para luego ser amplificado mediante la técnica de PCR.

### 4.2.1. Tinción de ADN

Para determinar la calidad del ADN extraído se corrió las muestras en un gel de agarosa (UltraPure Agarose Invitrogen) al 1,2% p/v, teñidos con Sybr Safe (Invitrogen). Se corrieron las muestras con un Ladder, 100pb ADN (Invitrogen) para verificar el tamaño del producto obtenido. Una vez determinada la calidad y el tamaño del material genético obtenido se va almacenar a -20°C.

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

Las secuencias amplificadas se enfocó en las regiones ITS1-5.8S-ITS2 y parte de la región 28S rADN se amplificaron usando la combinación de primers universales para eucariotas ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White y Taylor, 1990), y con el uso de primers universales ITS1 (50-TCC GTA GGT GAACCT GCG G-30); White et al., 1990 y TW14 (50-GCTATCCTGAGGGAACTTC-30; Cullings 1994). Se empleó esta combinación de primers ya que incrementa la posibilidad de amplificar una amplia diversidad de hongos. Se empleó 1.5 µL de ADN genómico como molde, con una mezcla de los primers de concentración final 25 pmol/µl, con la Taq Phusion High-Fidelity PCR Mastermix Además se usó un blanco como control de la PCR.



La reacción de amplificación se realizó en un termociclador automático, (Multigene Labnet) (Anexo3). Las condiciones que se usaron para la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 98°C por 30 segundos; 35 ciclos de desnaturalización a 98°C por 10 segundos, anillamiento a 60°C por 30 segundos, y la elongación a 72°C por 30 segundos; y la extensión final a 72°C por 10 minutos. El volumen final de la reacción de la PCR para cada hongo fue de 25 µl.

#### **4.3.1 Determinación del tamaño de fragmentos de ADN**

La visualización de los fragmentos amplificados se efectuó por medio de electroforesis, tomando de cada reacción 5 µL de producto de PCR y colocando en geles de agarosa al 0,7% p/v disuelta en buffer TAE 1X (Ácido Acético 0.04M, 1,0 mM EDTA), teñido con Syber Safe®, junto con dos marcadores de peso molecular; TrackIT 1Kb DNA ladder (Invitrogen) y TrackIT 100 pb DNA ladder (Invitrogen). El gel se corrió bajo las siguientes condiciones: 300 mA, 100 V, aproximadamente por 30 minutos. Como control se utilizó marcador de peso molecular de 1200 pb.

Los productos de PCR fueron observadas como bandas claras bajo luz UV, en donde se comparó el tamaño de las bandas obtenidas con el tamaño de las bandas dadas por el marcador molecular. Posterior a la comprobación de la buena calidad de los productos de PCR se continuó con la secuenciación de los mismos.

La secuenciación de los productos de PCR se llevaron a cabo utilizando los primers ITS1, ITS4, ITSW14, la misma que se realizó en el Departamento de Genética de la Universidad de Osnabrück, Alemania, gracias a la colaboración desarrollada en el marco del convenio que mantiene esta institución con la Universidad de Cuenca.

#### **4.4. Tratamiento de Datos**

Una vez que todos los fragmentos han sido secuenciados, con la ayuda de un programa de computadora se ajustó apropiadamente las diferentes partes, obteniendo así la secuencia total del gen en estudio. Con los resultados obtenidos de las secuencias alineadas se realizaron asignaciones taxonómicas en NCBI comprando la similitud de nuestras secuencias con las secuencias publicadas en el GenBank, mediante una búsqueda en la base de datos provista por la herramienta bioinformática BLAST. [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Los datos obtenidos fueron organizados en cuadros y gráficos con la ayuda del software Microsoft Excel®.



### CAPÍTULO III.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Repique de especímenes de hongos micorrízicos

Partiendo de la colección de hongos del orquideario de la Universidad de Cuenca, campus de Balzay, parroquia de San Joaquín, veinte aislados fungales fueron repicados en medio PDA, para verificar las características morfológicas reportadas por Guamán & Ochoa 2016 y Cando & Cárdenas 2017 y para llevar a cabo la extracción de ADN correspondiente. Se trabajó con seis aislados fungales de Gualaceo y catorce aislados fungales de Cañar.

### 5.2. Identificación Molecular

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

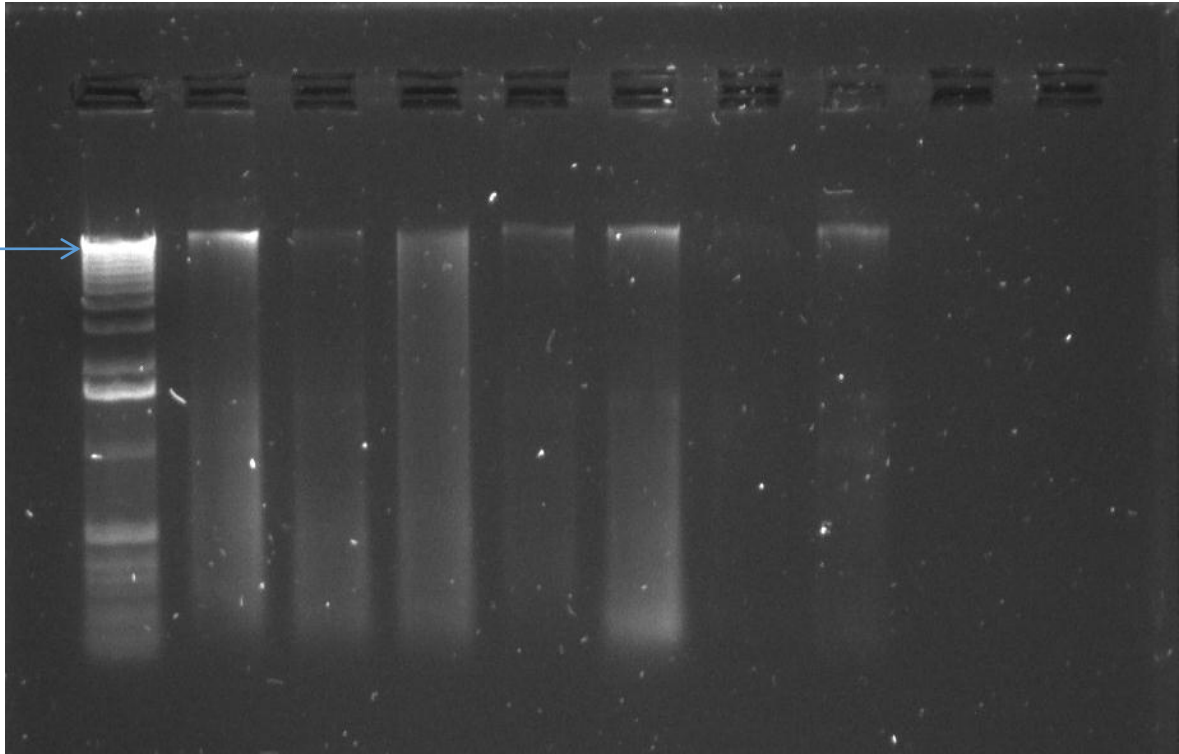
El ADN fungal fue extraído según lo descrito en 4.2. Para poder continuar con la fase de la PCR, se verificó la integridad del ADN extraído, corriendo las muestras obtenidas en gel de agarosa mediante electroforesis, como indicador de calidad para llevar a cabo la amplificación. Esta integridad fue corroborada por la obtención de bandas claras y definidas que puede observarse en la figura 2 y figura 3 a continuación.

Se asignó un número de acuerdo al orden de colocación de las muestras de ADN en los diversos carriles del gel de agarosa de la siguiente manera en los cuadros 5 y 6.

**Cuadro 5.** Designación de las muestras de ADN de los aislados fungales procedentes de Gualaceo, por número de carril.

Número de carril	Código del aislado fungal	Orquídea de Origen
1	Corresponde al Lader	
2	1M7B	<i>Trichoceros antenniferum</i> ; raíz 7, sección B
3	1L7B	<i>Trichoceros antenniferum</i> ; raíz 7, sección B
4	2P7A	<i>Pleurothallis angustipetala</i> ; raíz 7, sección A
5	1P2C	<i>Pleurothallis angustipetala</i> ; raíz 2, sección C
6	1PG4C	<i>Pleurothallis gramínea</i> ; raíz 4, sección C
7	2E5C	<i>Elleanthus oliganthus</i> ; raíz 5, sección C
8	Control positivo	

1 2 3 4 5 6 7 8



1000 pb  
aprox.

**Figura 3.** Electroforesis en Gel de Agarosa, de ADN genómico de los aislados fungales de Gualaceo. La designación de los carriles se corresponde con lo que se muestra en el cuadro 5.

Elaborado por: Gabriela Crespo y José Sinche.

**Cuadro 6.** Designación de las muestras de ADN de los aislados fungales procedentes de Cañar, por número de carril.

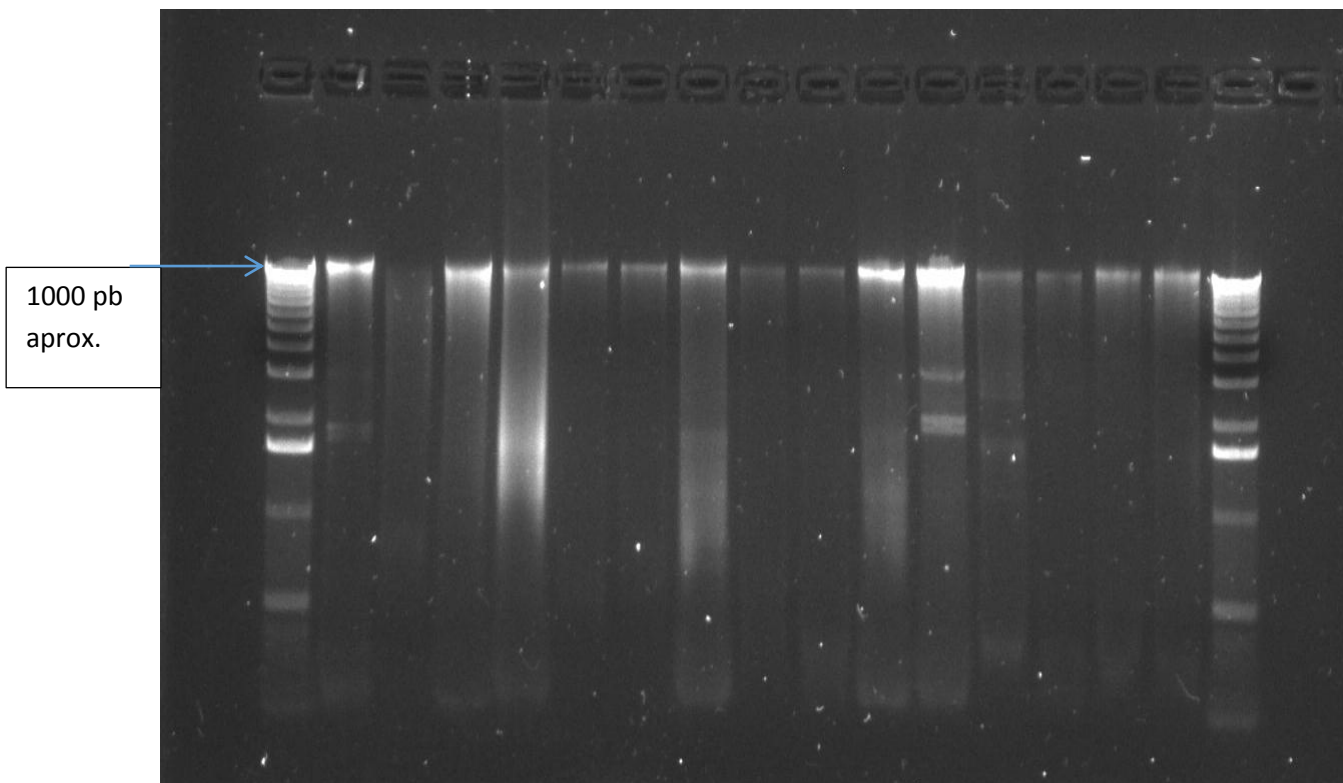
Número de carril		
1	Corresponde al Lader	
	Código del aislado fungal	Orquídea de Origen
2	E19B	<i>Epidendrum</i> ; raíz 19, parte B
3	EC12B	<i>Epidendrum chioneum</i> ; raíz 12, parte B
4	T3B	<i>Trichoceros antenniferum</i> ; raíz 3, parte B
5	EaGC	<i>Elleanthus amethystinoides</i> ; raíz G, parte C
6	S9C	<i>Stelis</i> sp; raíz 9, parte C



UNIVERSIDAD DE CUENCA

7	S19B	<i>Stelis sp</i> ; raíz 19, parte B
8	S20B	<i>Stelis sp</i> ; raíz 20, parte B
9	S7C	<i>Stelis sp</i> ; raíz 7, parte C
10	T2A	<i>Trichoceros antenniferum</i> ; raíz 2, parte A
11	EC12C	<i>Epidendrum chioneum</i> ; raíz 12, parte C
12	EC1B	<i>Epidendrum chioneum</i> ; raíz 1, parte B
13	EC4C	<i>Epidendrum chioneum</i> ; raíz 4, parte C
14	S4B	<i>Stelis sp</i> ; raíz 4, parte B
15	S10A	<i>Stelis sp</i> ; raíz 10, parte A
16	Control positivo.	
17	Corresponde al Lader.	

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17





**Figura 4.** Electroforesis en Gel de Agarosa, de ADN genómico de los aislados fungales de Cañar. La designación de los carriles se corresponde con lo que se muestra en el cuadro 6.

Elaborado por: Gabriela Crespo y José Sinche.

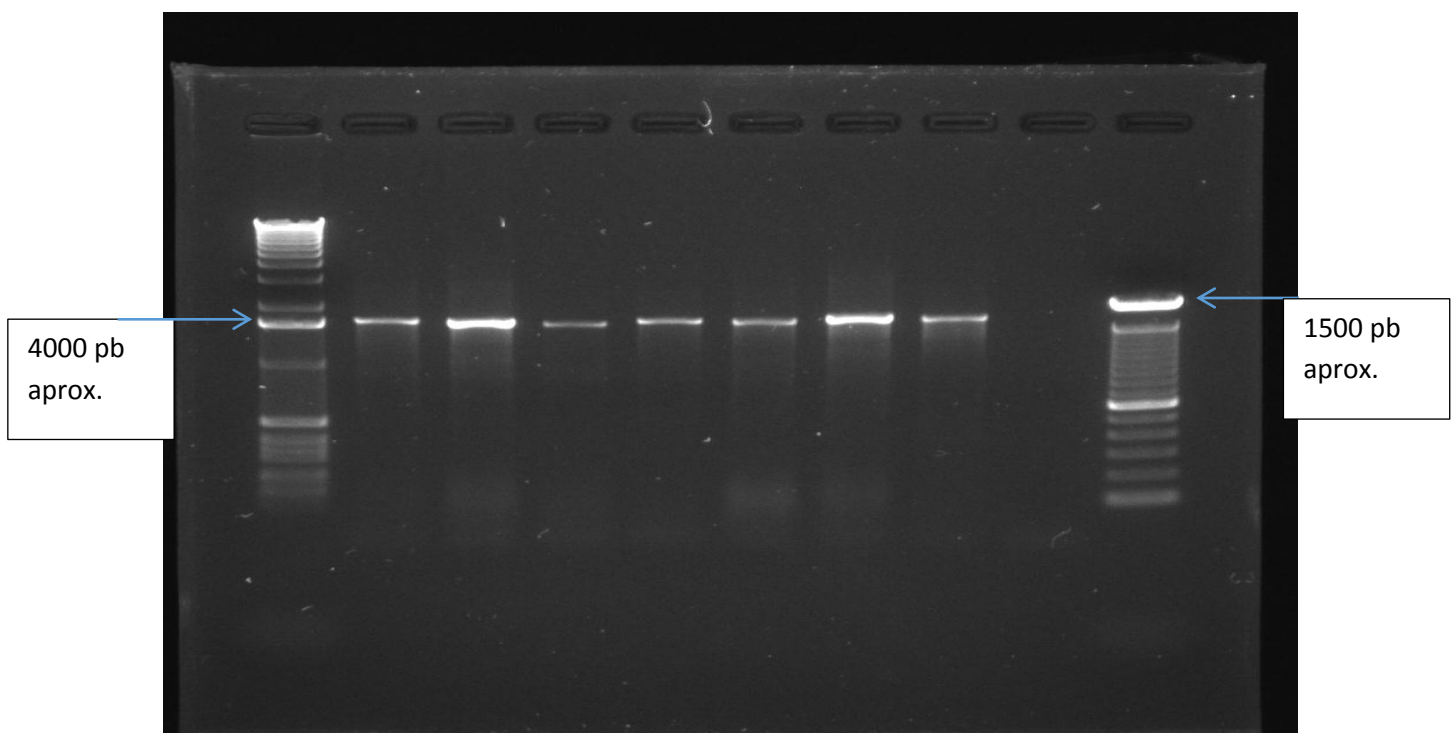
### 5.2.2. Amplificación de las regiones ITS mediante la técnica de PCR.

Para la amplificación de las regiones de interés, fueron empleados los iniciadores ITS-1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS-4(TCCTCCGCTTATTGATATGC). Estos iniciadores presentan fragmentos de amplificación de 600 a 800 pb, dado que resultan ser complementarios a los genes altamente conservados que codifican secuencias de ADN (Barbosa *et al.*, 2006). También se empleó el iniciador TW14 (GCTATCCTGAGGGAACTTC).

Los resultados de la amplificación mediante PCR, fueron corroborados mediante electroforesis en gel de agarosa, en las figuras 4 y 5 se pueden ver las bandas definidas que indican una correcta amplificación.

El orden de carga en el gel de agarosa, de los productos de la PCR obedece a los cuadros 4 y 5 anteriormente descritos para la verificación de la integridad del ADN.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10







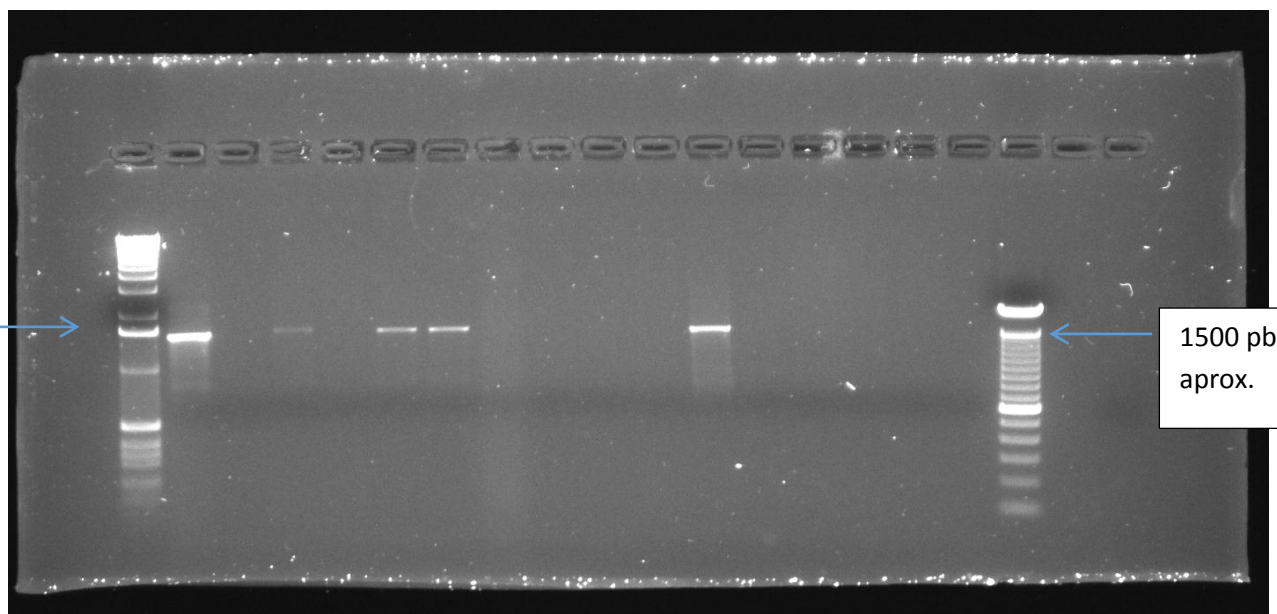
**Figura 5.** Electroforesis en Gel de Agarosa, producto de la PCR de los aislados fungales de Gualaceo. La designación de los carriles corresponde con lo que se muestra en el cuadro 7.

Elaborado por: Gabriela Crespo y José Sinche

**Cuadro 7.** Designación de los productos de la PCR de los aislados fungales procedentes de Gualaceo, por número de carril.

Número de carril		
1	Corresponde al Lader	
	Código del aislado fungal	Orquídea de Origen
2	1M7B	<i>Trichoceros antenniferum</i> ; raíz 7, parte B
3	1M7B	<i>Trichoceros antenniferum</i> ; raíz 7, parte B
4	2P7A	<i>Pleurothallis angustipetala</i> ; raíz 7, parte A
5	1P2C	<i>Pleurothallis angustipetala</i> ; raíz 2, parte C
6	1PG4C	<i>Pleurothallis gramínea</i> ; raíz 4, parte C
7	2E5C	<i>Elleanthus oliganthus</i> ; raíz 5, parte C
8	Control positivo	
9	Control negativo	
10	Corresponde al Lader	

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



4000 pb  
aprox.

1500 pb  
aprox.



**Figura 6.** Electroforesis en Gel de Agarosa, producto de la PCR de los aislados fungales de Cañar. La designación de los carriles se corresponde con lo que se muestra en el cuadro 8.

Elaborado por: Gabriela Crespo y José Sinche

**Cuadro 8.** Designación de las muestras de ADN de los aislados fungales procedentes de Cañar, por número de carril

Número de carril		
1	Corresponde al Lader	
	Código del aislado fungal	<b>Orquídea de Origen</b>
2	E19B	<i>Epidendrum</i> ; raíz 19, parte B
3	EC12B	<i>Epidendrum chioneum</i> ; raíz 12, parte B
4	T3B	<i>Trichoceros antenniferum</i> ; raíz 3, parte B
5	EaGC	<i>Elleanthus amethystinoides</i> ; raíz G, parte C
6	S9C	<i>Stelis sp</i> ; raíz 9, parte C
7	S19B	<i>Stelis sp</i> ; raíz 19, parte B
8	S20B	<i>Stelis sp</i> ; raíz 20, parte B
9	S7C	<i>Stelis sp</i> ; raíz 7, parte C
10	T2A	<i>Trichoceros antenniferum</i> ; raíz 2, parte A
11	EC12C	<i>Epidendrum chioneum</i> ; raíz 12, parte C
12	EC1B	<i>Epidendrum chioneum</i> ; raíz 1, parte B
13	EC4C	<i>Epidendrum chioneum</i> ; raíz 4, parte C
14	S4B	<i>Stelis sp</i> ; raíz 4, parte B
15	S10A	<i>Stelis sp</i> ; raíz 10, parte A
16	Control negativo.	
17	Corresponde al Lader.	

**5.2.3. Análisis de la PCR obtenida de los aislados fúngicos.**

Con el par de iniciadores ITS-1 e ITS-4 solamente no se obtuvo amplificación de la muestra 1PG4C; raíz 4, sección C perteneciente a la orquídea *Pleurothallis gramínea*, y la muestra 1P2C; de la orquídea *Pleurothallis angustipetala*; raíz 2, sección C pero con la combinación de iniciadores ITS-1 e TW14 de la misma muestra, si fue posible la amplificación. Para la muestra 1M7B, raíz 7, sección B perteneciente a la orquídea *Epidendrum chioneum*, la amplificación con los primers ITS-1/ ITS-4 no se obtuvo un resultado concluyente.

Los resultados de la PCR para cada aislado fungal, según el par de iniciadores empleados se indican a continuación en el Cuadro 6.

**Cuadro 9.** Resultados de la PCR, de los aislados fúngicos; (+) amplificación, (-) no amplificación, (+/-) resultado no concluyente

**Resultados de la PCR, de los aislados fúngicos:** (+) amplificación, (-) no amplificación, (+/-) resultado no concluyente.

Código del aislado fungal	Orquídea de origen	Número de raíz	Parte de la raíz	Lugar de procedencia	Amplificación ITS-1/ ITS-4	Amplificación ITS-1 / TW14
E19B	<i>Epidendrum</i> sp.	raíz 19	B	Cañar	+	+
1M7B	<i>Trichoceros antenniferum</i>	raíz 7	B	Gualaceo	+	+
1L7B	<i>Epidendrum secundum</i> .	raíz 7	B	Gualaceo	+	+
2P7A	<i>Pleurothallis angustipetala</i>	raíz 7	A	Gualaceo	+	+
1P2C	<i>Pleurothallis angustipetala</i>	raíz 2	C	Gualaceo	-	+
1PG4C	<i>Pleurothallis gramínea</i>	raíz 4	C	Gualaceo	-	+
2E5C	<i>Elleanthus oliganthus</i>	raíz 5	C	Gualaceo	+	+



EC12B	<i>Epidendrum chioneum</i>	raíz 12	B	Cañar	-	+
T3B	<i>Trichoceros antenniferum</i>	raíz 3	B	Cañar	+	+
EaGC	<i>Elleanthus amethystinoides</i>	raíz G	C	Cañar	-	-
S9C	<i>Stelis sp.</i>	raíz 9	C	Cañar	+	+
S19B	<i>Stelis sp.</i>	raíz 19	B	Cañar	+	+
S20B	<i>Stelis sp.</i>	raíz 20	B	Cañar	-	-
S7C	<i>Stelis sp.</i>	raíz 7	C	Cañar	-	+
T2A	<i>Trichoceros antenniferum</i>	raíz 2	A	Cañar	-	-
EC1B	<i>Epidendrum chioneum</i>	raíz 1	B	Cañar	+/-	+
EC12C	<i>Epidendrum chioneum</i>	raíz 12	C	Cañar	-	+
EC4C	<i>Epidendrum chioneum</i>	raíz 4	C	Cañar	-	-
S4B	<i>Stelis sp</i>	raíz 4	B	Cañar	-	+
S10A	<i>Stelis sp</i>	raíz 10	A	Cañar	-	+

Elaborado por: Gabriela Crespo y José Sinche.

#### **5.2.4. Análisis y comparación de las secuencias obtenidas.**

##### **5.2.4.1. Análisis de secuenciación de regiones ITS para la identificación de *Ceratobasidium sp.***

La secuencia de la muestra 11M7B alineada con la base de datos universal del GenBank presentó 1591 pares de bases apareadas con un porcentaje de identidad del 98 % para *Ceratobasidium sp.* como se observa en la figura 7.



Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Ceratosbasidium sp. AGB0 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, c</a>	1591	1591	100%	0.0	98%	<a href="#">AF354091.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Ceratosbasidium sp. AGA internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S</a>	1578	1578	100%	0.0	98%	<a href="#">AF354092.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Thanatephorus cucumeris strain AG10 isolate W45b3 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequen</a>	1522	1522	100%	0.0	97%	<a href="#">AF354111.2</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Thanatephorus cucumeris 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, c</a>	1522	1522	100%	0.0	97%	<a href="#">AF354071.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Thanatephorus cucumeris 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, c</a>	1517	1517	100%	0.0	97%	<a href="#">AF354079.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Thanatephorus cucumeris 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, c</a>	1509	1509	100%	0.0	97%	<a href="#">AF354064.1</a>

**Figura 7.** Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra IM7B con la base de datos universal del GenBank

Elaborado por: Gabriela Crespo y José Sinche.

#### **5.2.4.2. Análisis de secuenciación de regiones ITS para la identificación de *Sebacina vermifera*.**

La secuencia de la muestra E19B alineada con la base de datos universal del GenBank presentó 1701 pares de bases apareadas y con un porcentaje de identidad del 99% para *Sebacina vermifera* como se observa en la (figura 8).



Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Sebacina vermifera isolate K229 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spa</a>	1701	1701	100%	0.0	99%	<a href="#">EU625994.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Sebacina vermifera isolate K228 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spa</a>	1701	1701	100%	0.0	99%	<a href="#">EU625993.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Sebacina vermifera isolate K225 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spa</a>	1701	1701	100%	0.0	99%	<a href="#">EU625992.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Sebacina vermifera isolate K224 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spa</a>	1701	1701	100%	0.0	99%	<a href="#">EU625991.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured Sebaciniales clone 3TH2_6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1650	1650	100%	0.0	98%	<a href="#">HM451817.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured Sebaciniales clone 4EG2_6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1644	1644	100%	0.0	98%	<a href="#">HM451824.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured Sebaciniales clone 4EG2_7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1644	1644	100%	0.0	98%	<a href="#">HM451825.1</a>

**Figura 8.** Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra E19B con la base de datos universal del GenBank.

Elaborado por: Gabriela Crespo y José Sinche.

### 5.2.5. Resultados generales del análisis de las secuencias

Luego de la comparación preliminar usando BLAST (GenBank nucleotide database) se obtuvo un total de 11 secuencias de buena calidad, de las cuales, la secuencia procedente del aislado fungal con código E19B, procedente de la orquídea *Epidendrum sp.* aislada en Cañar indica la presencia de hongos del género *Sebacina vermifera* con una identidad del 99% con una cobertura de (939/948). La secuencia procedente del aislado fungal con código 1M7B procedente de la orquídea *Trichoseris antenniferum* aislada en Gualaceo indica la presencia de hongos del género *Ceratobasidium* con una identidad del 98 % con una cobertura de (895/910).

Las demás secuencias presentaron identidad con *Anthostomella leucospermi*, *Agaricus pinsitus*, *Fusarium globosum*, *Xylariaceae sp.* y *Fusarium sp.* Estas identidades taxonómicas indican la presencia de microbiota del suelo.

Para las muestras T3B, EaGC, T2A, EC1B, EC12C, IL7B, 2P7A, IP2C, IPG4C, 2E5C no fue posible realizar la identificación molecular por problemas en la calidad o pureza del ADN extraído debido al tiempo que tardó en realizarse la secuenciación o pureza del ADN extraído debido al tiempo que tardó en realizarse la secuenciación.



### 5.2.6. Identificación de hongos micorrízicos mediante análisis molecular.

Posteriormente los resultados de la secuenciación de cada aislado fungal en estudio, se introdujeron en la base de datos GenBank, para determinar de esta manera los porcentajes de identidad, comparándolas con especies fúngicas previamente ya descritas.

El análisis de secuencias permitió la aproximación al género y especie de *Sebacina vermifera* asociada a la raíz de orquídea *Epidendrum sp.* raíz 19, parte B. recolectada en Cañar a (3.090 m.s.n.m.). y la especie *Ceratobasidium sp.* asociada a la raíz de *Trichoceros antenniferum*, raíz 7, sección B recolectada en Gualaceo a (2.330 m.s.n.m.), Los resultados se presentan en el cuadro 10.

**Cuadro 10.** Identificación de especies micorrízicas de orquídeas en Ecuador según las búsquedas BLAST (en GenBank)

Código	Orquídea de origen	Número de raíz	Parte de la raíz	Lugar de recolección	Identificación molecular	% de identidad
1M7B	<i>Trichoceros antenniferum</i>	raíz 7	B	Gualaceo	<i>Ceratobasidium sp.</i>	98% (895/910)
E19B	<i>Epidendrum</i>	raíz 19	B	Cañar	<i>Sebacina vermifera.</i>	99% (939/948)

El análisis de secuencias permitió la aproximación al género y especie de seis aislados fúngicos: *Anthostomella leucospermi*, *Agaricus pinsitus* y *Fusarium globosum*. La aproximación al género de tres aislados fúngicos: *Fusarium sp.* y *Xylariaceae sp.* Los hallazgos de dicha microbiota de suelo se puede observar en el cuadro 5 en Anexos.

Las secuencias de los seis aislamientos de cinco especies de orquídeas en Gualaceo, nos mostraron según las búsquedas en BLAST (GenBank), que el organismo más cercano en el caso de la cepa fúngica aislada de la orquídea *Trichoseros antriferum*; raíz 7 sección media (B); código IM7B fue *Ceratobasidium sp.*, su porcentaje de identidad fue del 98% con una cobertura de (895/910).



En el caso de los cinco aislamientos restantes que fueron analizados, dos de ellos no pudieron ser identificados, ya que sus secuencias no están disponibles para ser usadas en BLAST( GenBank), se trata de las cepas fúngicas aisladas a partir de *Pleurotallis graminea*; raíz 4, sección apical (C), código 1PG4C y *Pleurotallis angustipetala*; aislada de la raíz 2, sección apical (C), código 1P2C, en el caso de *Epidendrum secundum* ; aislada de la raíz 7, sección media (B), código 1L7B si fue posible realizar la secuenciación molecular, con una identidad del 94%(757/802) pero no presenta género fungal definido ,sin embargo sí se logró la identificación molecular de la cepa fúngica 2P7A, según las búsquedas en BLAST (GenBank), tenemos que el organismo más cercano es *Anthostomella leucospermi* de porcentaje de identidad del 98% (801/820) y de la cepa fúngica 2E5C, que presenta una identidad del 99% (609/61) el organismo más cercano es *Agaricus pinsitus*.

Considerando que los dos aislados fueron obtenidos de una raíz distinta y de una porción diferente de la misma pero de una misma especie de orquídea, se puede considerar que están colonizadas por el mismo organismo identificado.

Estos resultados posiblemente están relacionados con el hecho de haber utilizado como medio de cultivo PDA, puesto que ciertos medios artificiales pueden limitar o excluir el crecimiento de algunos hongos micorrízicos que se encuentran presentes en las raíces de las orquídeas

Las secuencias de los 14 aislamientos de cinco especies de orquídeas en Cañar, nos mostraron según las búsquedas en BLAST (GenBank), que el organismo más cercano en el caso de la cepa fúngica aislada de la orquídea *Epidendrum sp.* ; raíz 19, sección media (B), código E19B, fue *Sebacina vermifera*, con un porcentaje de identidad del 99% (939/948) para la hebra negativa y un porcentaje de identidad del 99% (870/877) para la hebra positiva, en este caso se pudo llevar a cabo el análisis de la secuencia en las dos direcciones ya que la misma era de muy buena calidad, permitiéndonos corroborar su identificación.

En el caso de los cuatro aislamientos a partir de *Epidendrum chioneum*; que fueron analizados, dos de ellos no pudieron ser identificados, ya que las secuencias no están disponibles para ser usadas en BLAST (GenBank). Se trata de las cepas fúngicas aisladas a partir de *Epidendrum chioneum*; raíz 4, sección apical (C), código EC4C y de la raíz 1, sección media (B), código EC1B.





Sin embargo, sí se logró la identificación molecular de las cepas fúngicas EC12B y EC12 C, que según las búsquedas en BLAST (GenBank), tenemos que el organismo más cercano es *Fusarium oxysporum* con un porcentaje de identidad del (99%) 980/993, y en el caso de la cepa fúngica EC12C y *Fusarium sp.* de porcentaje de identidad del (99%) 878/880, considerando que en el caso de la cepa EC12B contamos con un un porcentaje de identidad mayor (980/993) que en la cepa EC12C (878/880).

Dado que no hay secuencia disponible , no se logró realizar la identificación molecular de los dos aislados de la especie de orquídea *Trichoceros antennifer*, raíz 3, sección media (B), código T3B y la aislada de la raíz 2, sección basal (A), código T2A y del aislado de las especie de orquídea *Eleanthus amethystinoides*; raíz G sección apical (C), código EaGC.

En cuanto a las cepas fúngicas aisladas de *Stelis sp*; raíz 9, sección apical (C), código S9C, la aislada de la raíz 19, sección media (B), código S19B y la aislada de la raíz 7, sección apical (C), código S7C, nos mostraron según las búsquedas en BLAST (GenBank), que el organismo más cercano es *Anthostomella leucospermi*, con un porcentaje de identidad entre el 99% para los tres casos con una cobertura entre (1011/1020) y (1000/1011).

Sin embargo en el caso de los aislados a partir de *Stelis sp*; raíz4, sección media (B), código S4B, y la aislada de la raíz 10, sección basal (A), código S10A, según la búsqueda en BLAST (GenBank), el organismo más cercano es *Xylariaceae sp.* con un porcentaje de identidad de (97%) 839/868.

El aislamiento de hongos de raíces de orquídeas puede incluir a microbiota del suelo. Macroscópicamente las colonias fungales de suelo no pueden diferenciarse de hongos micorrízicos, no obstante la identificación molecular en este trabajo permitió la identificación de *Anthostomella leucospermi*, *Agaricus pinsitus*, *Fusarium sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Xylariaceae sp.*



## CAPÍTULO IV

### 6. Discusión

En el presente estudio, según los resultados de las secuencias analizadas en las búsquedas en BLAST (GenBank), se reporta que se logró la identificación y aislamiento de dos especies micorrízicas, *Ceratobasidium sp.* asociada a la raíz de *Trichoceros antenniferum*, recolectada a (2.330 m.s.n.m.) y *Sebacina vermifera* asociada a la raíz de *Epidendrum sp.* recolectada a (3.090 m.s.n.m.). Este es el primer reporte de aislamiento en Ecuador en las provincias de Azuay y Cañar ya que en nuestro país no se ha evidenciado la presencia del género *Ceratobasidium* (Suárez et al., 2008), y solo en otros países de América del Sur como Brasil y Colombia se ha demostrado como hongos formadores de micorrizas (Pereira et al., 2005; Mosquera-Espinosa, 2010). De igual manera en Puerto Rico (Otero et al., 2002).

En nuestro estudio se evidencia la asociación entre las raíces de *Epidendrum sp.* y *Sebacina vermifera*. El género *Sebacina* es reportado como poco frecuente en el Ecuador, lo que indica que este género no representa una alta diversidad en ecosistemas montanos y subandinos según (Suárez et al., 2006) pero dado a que en nuestro país los géneros de orquídeas más comunes son *Pleurothallis* y *Epidendrum* (Suárez et al., 2008) y existen estudios donde se evidencia la presencia de hongos micorrízicos en estos géneros (Suárez et al., 2008; Hoyos & Rodríguez, 2013; Guzmán & Moreno, 2014), y que además hongos como *Sebacina sp.* y *Tulasnella sp.* han sido aislados de diferentes especies de *Epidendrum* se sugiere que las orquídeas del género *Epidendrum*, incluso presentando preferencia a los hongos *Tulasnella* / *Epulorhiza*, no tienen especificidad a ese género de hongo, pues también se asocian a hongos del género *Sebacina/Opadorhiza* (Pereira, 2009).

*Ceratobasidium sp.* se encontró asociada a la raíz de *Trichoceros antenniferum* una especie diferente a las orquídeas de las cuales ha sido aislada anteriormente, como es el caso de los aislados de la orquídea *Ionopsis utricularioides* y *Tolumnia variegatapparece* en Puerto Rico, orquídeas epífitas de la selva del Brasil donde se reportan los géneros anamórficos *Epulorhiza* y *Ceratorhiza* con sus teleomorfos *Tulasnella* y *Ceratobasidium*, respectivamente (Pereira et al., 2005) y finalmente en Colombia en los departamentos de Antioquia y Valle del Cauca donde se encuentran asociadas a las raíces de *Epidendrum xanthinum* y de la orquídea hemiepífitica *Vanilla*. (Otero et al., 2002, Pereira et al.2005, Otero et al., 2007). Además en un trabajo realizado con orquídeas epífitas de Puerto Rico se encontró variación en la especificidad micorrizal entre plantas y la preferencia marcada de ciertos grupos de orquídeas por hongos del género *Ceratobasidium* (Otero et al., 2002, 2007). Dichos resultados sugieren que hay variación entre especies de orquídeas en el grado de especificidad para hongos micorrízicos.

Lo anterior muestra la presencia de esta asociación en zona neotropical o templada, lo cual puede ocurrir por ubicuidad del simbionte, adaptación y requerimientos de las orquídeas (Arditti, 1992; Carling et al., 1999; Agrios, 2002) ya que las epífitas, tienen



problemas al conseguir agua y nutrientes, por lo que necesitan alguna contribución simbiótica (Dearnaley *et al.*, 2012).

Según el estudio realizado por Beltrán (2010), determina que la mayor colonización micorrízica se presenta en zonas frías y húmedas y esto se puede evidenciar al encontrar *Sebacina vermifera* a (3.090 m.s.n.m.) y dado a que no se han encontrado estudios de aislamientos en las zonas altas del Ecuador esta información puede ser de gran importancia.

Con respecto a *Ceratobasidium sp.* que se encontró a (2.330 m.s.n.m.) se debe quizás a que este es uno de los endófitos más comunes en las orquídeas de clima templado y ha sido ampliamente descrito en orquídeas tropicales Otero *et al.*, 2002, Pereira *et al.*, 2005, Otero *et al.*, 2007). Y según Guzmán y Moreno (2014), demuestran que en zonas alto andinas, existe una preferencia por *Ceratobasidium*.

Según los estudios de Guzmán y Moreno, (2014), demuestran que la altitud no influye en la distribución de los hongos micorrízicos y es importante considerar que en Ecuador existen orquídeas en todos los pisos altitudinales comprendidos entre 0 y 4500 m.s.n.m según Endara, (2009).

Suárez *et al.*, (2006) reportaron la presencia de *Tulasnella sp* en tres especies de orquídeas (*Stelis hallii*, *Stelis superbiens*, *Stelis concinna*) muestreadas de una montaña en el sur de Ecuador, demostrando a *Tulasnella sp* como la más frecuente e importante género implicado en la simbiosis de micorrizas de orquídeas. En nuestro estudio se trabajó con el género *Stelis*, sin lograr aislar alguna especie micorrízica, estos resultados posiblemente están relacionados con el hecho de haber utilizado una técnica de análisis diferente a las comúnmente empleadas. En otras publicaciones han usado aproximaciones experimentales diferentes como la identificación molecular, partiendo del análisis directo de las raíces de orquídeas, en donde no hay descarte de hongos y todos son analizados, existiendo mayor probabilidad de hallazgo. En nuestro caso otro motivo puede ser el medio de cultivo empleado, puesto que ciertos medios artificiales pueden limitar o excluir el crecimiento de algunos hongos micorrízicos que se encuentran presentes en las raíces de las orquídeas (Porrás & Bayman, 2007). Motivo por el cual no se descarta la presencia *Tulasnella* en estas zonas de estudio.

Cabe recalcar que la identificación de aislados fungales, mediante herramientas de biología molecular, contribuye de gran manera en su clasificación, ya que inicialmente se recibió una colección de hongos caracterizados morfológicamente como micorrízicos, orientados al género, *Tulasnella*, pero los resultados obtenidos mediante análisis de la secuenciación, indican que solo dos de ellos efectivamente son micorrízicos, pero ninguno pertenece al género *Tulasnella*. Esto se debe a que las características microscópicas y macroscópicas analizadas no siempre resultan ser precisas (Rasmussen, 2002). Por este motivo según (Carling *et al.*, 1999; Kristiansen, 2004) se requiere una investigación más específica mediante un análisis sistemático molecular.

Los restantes fueron identificados como microbiota del suelo, se trata de *Anthostomella leucospermi*, *Agaricus pinsitus*, *Fusarium globosum*, *Fusarium sp.*,



*Anthostomella leucospermi*, *Xylariaceae* sp. demostrándose además que existe una gran diversidad de hongos endófitos asociados a las raíces de orquídeas epífitas debido a que las especies de orquídeas recolectadas fueron terrestres.

La técnica aplicada en aislados fungales, si bien es cierto podría estar descartando la presencia de otros hongos, ya sea por técnicas de aislamiento y de cultivo es de gran importancia ya que a diferencia de técnicas comunes nos permite no solo una clasificación taxonómica sino que además nos permite el aislamiento del hongo micorrízico.

Es importante mencionar que algunas muestras causaron problemas al momento de obtener productos de PCR, una posible causa podría ser la calidad de ADN y la Taq polimerasa empleada, ya que esta resulta crucial en dicho proceso. Pese a la verificación de la integridad del ADN, mediante electroforesis en gel de agarosa, que resultó positiva, existe la posibilidad que la cantidad de ADN haya sido excesiva o escasa, en ambos casos interfiere en los resultados. Otro punto a tomar en cuenta es la existencia de primers específicos en determinadas cepas ya que inicialmente se empleó la pareja de primers ITS-1 e ITS-4, con resultados poco favorables, posterior se intentó con la pareja de primers ITS-1 y TW14 ya que incrementa la posibilidad de amplificar una amplia diversidad de hongos, obteniendo mejores resultados.

Del mismo modo para los aislados fungales de los cuales se obtuvo productos de PCR, no se obtuvo productos de secuenciación, lo que posiblemente se deba a razones de cantidad de DNA, ya que solamente se verificó su calidad mas no su cantidad, o la existencia de algún contaminante dejado por las resinas de las columnas de purificación. Finalmente puede ser una causa adicional el uso de técnicas estandarizadas por parte del laboratorio.

El análisis de secuencias obtenidas a partir de productos de PCR de aislados fúngicos, es una estrategia muy efectiva, ya que analizando las muestras de esta manera se puede identificar a los hongos a nivel de género y especie como en el caso de *Ceratobasidium* sp. asociada a la raíz de *Trichoceros antenniferum*, y *Sebacina vermifera* asociada a la raíz de *Epidendrum* sp. y puede ser de gran utilidad para seguir explorando la diversidad de hongos en esta zona del país.

La importancia de este estudio se fundamenta en que estos hongos micorrízicos, aislados pueden ser utilizados como herramientas para la propagación y conservación de orquídeas que estén amenazadas al ser estos, de vital importancia en el desarrollo de las orquídeas (Otero *et al.*, 2002; Dearnaley, 2007). Además de que esta relación simbiótica hongo- micorriza mantiene el equilibrio ecológico.



## 7. CONCLUSIONES

El desarrollo de la presente investigación nos permitió obtener las siguientes conclusiones:

- Se logró aislar e identificar *Ceratobasidium sp.* asociada a la raíz de *Trichoceros antenniferum*, recolectada en la zona Remigio Crespo Toral Cantón Gualaceo (Provincia del Azuay) (2.330 m.s.n.m.) y *Sebacina vermifera* asociada a la raíz de *Epidendrum sp.* recolectada en el Cerro Abuga en la parroquia Bayas del Cantón Azogues (Provincia del Cañar) (3.090 m.s.n.m.). Este es el primer reporte de asilamiento en Ecuador en las provincias de Azuay y Cañar.
- En este estudio la aplicación de las técnicas de extracción de ADN, PCR, y análisis de los productos de secuenciación son los adecuados para comprobar la identidad de hongos micorrízicos ya que de los 20 aislados fungales sólo dos pertenecen al género-forma *Rhizoctonia*.
- En el caso de los aislados fungales de los cuales se obtuvo producto de secuenciación, pero no se logró su amplificación pese al cambio de pareja de primers, pasando de ITS1 e ITS4 al ITS1 y TW14 que nos incrementa la posibilidad de amplificación de una amplia variedad de hongos, entonces quizá se deba a las condiciones aplicadas en el termociclador donde se realizó la secuenciación, ya que es necesario estandarizar la técnica dependiendo de las muestras con las que se trabaje. Además se verifica en el gel de agarosa que si se logró la extracción de DNA de dichas muestras.
- La identificación y asilamiento de estas dos especies de hongos micorrízicos puede ser de gran utilidad ya que son de vital importancia en el desarrollo de las orquídeas. Estas especies estarían ayudando en la propagación y conservación de especies de orquídeas nativas además de ser su hallazgo un indicio para seguir explorando, la diversidad de hongos en esta zona del país.

## 8. Recomendaciones

Después de los resultados obtenidos, se recomienda continuar con las investigaciones de hongos micorrízicos empleando las técnicas de biología molecular.

La extracción de ADN es un punto crítico para obtener material genético integro, por lo que se recomienda realizar una cuantificación además de la verificación de su integridad, lo que nos permite obtener productos de PCR y por ende productos de secuenciación de buena calidad, para poder compararlos con bases de datos disponibles en el GenBank, mediante una búsqueda a través de la herramienta bioinformática BLAST.



## UNIVERSIDAD DE CUENCA

Es importante estandarizar las técnicas aplicadas, dependiendo de la muestra con la cual se va a trabajar. Se recomienda probar con otros primers además de los universales ya que existen aquellos que son específicos para ciertas especies de orquídeas.

Es necesario continuar con la identificación de todos los demás aislados fungales aún no secuenciados, y de esta manera fomentar una herramienta para la conservación de dichas especies.

Con los resultados obtenidos podrían realizarse nuevas investigaciones para verificar la interacción hongo- micorríza con las especies de orquídeas que contamos en el laboratorio de la Universidad de Cuenca.



## 9. Bibliografía

- Aguilar, J., & Gonzáles, D. (2011). *Las micorrizas, nuestras aliadas ocultas*. Recuperado el 21 de Marzo de 2017, de La vida en la tierra: [http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf\\_Ferti/Ferti\\_2004\\_17\\_9\\_13.pdf](http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Ferti/Ferti_2004_17_9_13.pdf)
- Aguilera, L., & Olalde, V. (2007). Micorrizas arbusculares. *Redalyc.org*.
- Agrios, G. (2002). Fitopatología. Academic Press Inc. México, DF. pp 838.
- Altschul. (1997). *entro Nacional de Información sobre Biotecnología, Biblioteca Nacional de Medicina, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD 20894, EE.UU.* Recuperado el 6 de Noviembre de 2016, de Gapped BLAST y PSBLAST: una nueva generación de programas de búsqueda de bases de datos de proteínas.: <https://translate.google.com.ec/translate?hl=es&sl=en&u=https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9254694&prev=search>
- Arditti, J. y Ghani A.K. (2000). *Tansley Review No. 110 Numerical and physical* 145: 367-421 properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*.
- Azcón, C., & Barea, J. (1996). *Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved*. Recuperado el 26 de Marzo de 2017, de Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved: <http://www.bashanfoundation.org/barea/bareasoilborne.pdf>
- Banks, D. (2006). Cultivo de orquideas: propagacion y variedades. En *Cultivo de orquideas*. Barcelona: Blume.
- Benzing. (1981). Why is Orchidaceae so large, its seeds so small, and its seedlings mycotrophic? *Selbyana*, 241-242.
- Beltrán, M. (2010). Aislamiento y caracterización de hongos micorrízicos asociados a orquideas terrestres del género *Bletia* (Orchidaceae) en la reserva Natural Barranca del Cupatitzio, Michoacán. Tesis de Maestría en Ciencias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. , Michoacán, México.



- Bruns, T., & White, T. (1991). Fungal Molecular Systematics. *Ecology Revist.*
- Calle, L. (2005). Caracterización morfológica y molecular de hongos fitopatógenos de suelo e identificación de bacterias foliares en el cultivo de cebolla. *Scielo Colombia.*
- Camargo, S., & Montaña, N. M. (2012). Micorrizas: Una gran unión debajo del suelo. *Revista digital universitaria.*
- Cando, M., & Cardenas, V. (2017). *Determinación mediante aislamiento y purificación de hongos potencialmente micorrízicos en las raíces de seis especies de orquídeas en el cantón Gualaceo, provincia del Azuay.* Recuperado el 10 de Abril de 2017, de Universidad de Cuenca: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/26368/1/Tesis.pdf>
- Carling, D., Brainard, K. y Carter., D. (1999). *Characterization of mycorrhizal isolates of Rhizoctonia solani from an orchid, including AG-12, a new group.* Phytopath. 64: 492-496.
- Cronquist, A. (1981). *Botanica basica.* Mexico, D.F.: Continental.
- Cuerda, J. (2005). Botanica: el mundo de las plantas. (Cultural, Ed.) *Atlas de la botanica.*
- Delidow, C., & Lynch, J. (1993). *Polymerase Chain Reaction.* Nueva Jersey: B. A. White.
- Díaz, H. (2013). *Manual de cultivo de orquideas.* Veracruz: Inecol.
- Dodson, C., & Escobar, R. (1998). *Orquideas nativas de Ecuador.* Medellin: Compañía litografica nacional.
- Dressler. (1981). The orchids. En D. RL., *The orchids: natural history and classification* (pág. 322p). Cambridge, MA, USA: Harvard University Press.
- Dearnaley, J., & Martos, F., Selosse M. (2012). Orchid Mycorrhizas: Molecular Ecology Physiology. In fungal associations (pp. 207-230). Springer Berlin Heidelberg.





- Endara, L. (2008). *Orquídeas endémicas de Ecuador y el Sistema Nacional de Areas Protegidas (SNAP)*. Recuperado el 8 de Marzo de 2017, de Florida Museum of Natural History: <https://www.floridamuseum.ufl.edu/ecuadororchids/SNAP.htm>
- Endara, L. (2009). Patrones de Endemismo de la Flora Endémica de Orquídeas Ecuatorianas. *Second Scientific Conference an Andean Orchids.*, 34.
- Endara,L. (2013). *Maywa de Quito*. Recuperado el 14 de Abril de 2017, de Maywa de Quito:  
[http://visit.ecuador.travel/orquideas/index.php?option=com\\_content&view=article&id=113&Itemid=101](http://visit.ecuador.travel/orquideas/index.php?option=com_content&view=article&id=113&Itemid=101)
- Endara, L., & Lost, L. (2011). *Libro Rojo de las plantas endémicas del Ecuador*. Quito: Publicación del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Espinosa, A. (2010). *Evaluación del efecto biocontrolador de Rhizoctonia de orquídeas sobre Rhizoctonia solani Kühn patógeno del suelo en arroz (Oryza sativa L.)* . Recuperado el 26 de Marzo de 2017, de Evaluación del efecto biocontrolador de Rhizoctonia de orquídeas sobre Rhizoctonia solani Kühn patógeno del suelo en arroz (Oryza sativa L.):  
<http://www.bdigital.unal.edu.co/3340/357/9106501.2010.pdf>
- Etayo, M. (1998). Estudio de las ectomicorrizas en una trufera cultivada situada en el Oloriz (Navarra). *Universidad de Navarra*.
- Garcia, L., & Quintana, A. (2009). Calcareous amendments in truffle culture: A soil nutrition hypothesis. *ResearchGate*.
- Gardes , M., & Bruns, T.( 1993). *ITS cebadores con especificidad mejorada para basidiomicetos - aplicación a la identificación de micorrizas y royas*. Obtenido de Departamento de Fitopatología, Universidad de California, Berkeley 94720.:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8180733>
- González, M. (2008). Sistemática y biología González. *Redaly.org*.
- Guaman, V., & Ochoa, G. (2016). *Aislamiento y seleccion de hongos potencialmente micorrizicos en seis especies de orquideas nativas del cerro Abuga en la*



*provincia del Cañar*. Recuperado el 10 de Abril de 2017, de Universidad de Cuenca: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/26627/1/tesis.pdf>

Guzmán, N., & Moreno., B. (2014). "*Efecto de la altitud en la composición y riqueza de hongos Micorrízicos de orquídeas epífitas en bosques montano altos del sur del Ecuador.*"

Honrubia, M. (2009). Las micorrizas una relacion planta-hongo que dura mas de 400 millones de años. *Anales del jardin botanico de Madrid*, 66S1, 134-144.

Hoyos, L., & Rodriguez ,M. (2013). *Aislamiento de micorrizas en seis especies de orquídeas nativas del Ecuador para elaboración de un biofertilizante potencialmente útil en rusticación de orquídeas*. Recuperado el 22 de Abril de 2017, de Universidad Politecnica Salesiana sede Quito: <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6012/1/UPS-QT04342.pdf>

Izco, J. (2004). *Botanica* . Madrid.

Jimenez, M. (2014). Número de especies, endemismo especies amenazadas y su manejo adecuado. *Orquídeas del Ecuador*.

Kristiansen, K. A., Freudenstein J.V., Rasmussen F.N. y Rasmussen, H.N. (2004). *Molecular identification of mycorrhizal fungi in Neuwiedia veratrifolia (Orchidaceae)*. Mol. Phylog. Evol. 33:251 - 258.

Kouvelis, V., Ghikas, D., Typas, M. (2004). The analysis of the complete mitochondrial genome of lecanicilium muscarium(Verticilium lecanii) suggests a minium common gene organization in mtDNAs of Sordariomycetes; phylogenetic implications. *Fungal Genetics and Biology.*, 41:930-940.

Marcatoma, E. (2014). *Comparacion de hongos ectomicorrizicos asociados a especies de bosque altoandino*. Recuperado el 14 de Octubre de 2016, de Comparacion de hongos ectomicorrizicos asociados a especies de bosque altoandino: <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/3594/1/10276.pdf>

Menchaca, R. (2011). *Manual para la propagación de orquídeas*. Veracruz: Conafor.



- Moreira, A. (2009). *Darwin alrededor de las orquídeas*. Recuperado el 30 de Marzo de 2017, de [http://geografia.uc.cl/images/academicos/Andres\\_Moreira/RU104\\_articulo\\_moreira.pdf](http://geografia.uc.cl/images/academicos/Andres_Moreira/RU104_articulo_moreira.pdf)
- Mosquera, A., & Bayman, P. (2010). *Ceratobasidium como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia*. *scielo.org.co*.
- Ochoa, D. (2008). *Caraterizacion molecular de 60 hongos que forman parte del cepario micologico del C.B.C.M. de la Universidad Particular de Loja*. Obtenido de Universidad Particular de Loja: [http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/1844/3/UTPL\\_Ochoa\\_Cueva\\_Dayana\\_Vanessa\\_1008070.pdf](http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/1844/3/UTPL_Ochoa_Cueva_Dayana_Vanessa_1008070.pdf)
- Ordoñez, N., & Otero, J. (2012). *La vainilla y los hongos formadores de micorrizas*. *ResearchGate*.
- Ordoñez, N. F., Díez, M. C., & Otero, J. T. (2015). *La vainilla y los hongos formadores de micorrizas*. *Orquideología*, 29(1), 56.
- Otero, T., & Bayman, P. (2002). *Diversity and host specificity of endophytic Rhizoctonia-like fungi from tropical orchids*. *American Journal of Botany*.
- Otero, J. T., Thrall, P. H., Clements, M., Burdon, J. J. y Miller, J. T. (2007). *Australian Codiversification of orchids (Pterostylidinae) and their associated mycorrhizal fungi*. *Journal of Botany*. 59: 480-497a
- Pereira, O., Kasuya, M., Ackema, J. (2005). *Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil*. *Canadian Journal of Botany*, 83(1), 54-65.
- Peña, C., & Díez, J. (2006). *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba*. Obtenido de *Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico*: <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/17%20Electroforesis%20ACS%20nucleicos%20geles%20agarosa.pdf>



- Pereira , O., Kasuya, M., Araujo, E. (2005). Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. . *Canadian Journal of Botany*, 83(1), 54-65.
- Pereira. (2009). *Diversidade e especificidade micorrízica em orquídeas do gênero Epidendrum*. Obtenido de Universidade Federal de Viçosa: <http://locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/1545/texto%20completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Piercey, M., & Egger, K. (2001). *Molecular and Cellular Biology of Filamentous Fungi*. New York.
- Porras , A., & Bayman, P. (2007). Mycorrhizal fungi of Vanilla: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *NCBI* .
- Rasmussen, H. (2002). Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soi*.
- Rivas, M., & Warner, J. (1998). Presencia de micorrizas en orquídeas de un jardín botánico neotropical. *Revista de Biología Tropical*.
- Rodríguez. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia Uanil. Vol, No. 3*, 326-327.
- Salas, E. (1997). *Micorrizas en la agricultura*. Recuperado el 19 de Octubre de 2016, de Micorrizas en la agricultura: [http://www.mag.go.cr/rev\\_agr/v21n01\\_055.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_agr/v21n01_055.pdf)
- Suárez, J. P., Weiß, M., Abele, A., Garnica, S., Oberwinkler, F., & Kottke, I. (2006). Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycological research*, 110(11), 1257-1270.
- Suárez, J. P., 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 Prog neotropical ress*, 7(2), 75-85.
- Suárez, J. P., & Kottke, I. (2016). Main fungal partners and different levels of specificity of orchid mycorrhizae in the tropical mountain forests of Ecuador.



- Smith, S., & Read, D. (1997). Mycorrhizal Symbiosis. En *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd edn. Academic Press. (pág. 800). San Diego, California: Phytopathology 54: 1093-1095.
- Tamay, D. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, vol.2, 70-78.
- Tejeda, A., & Baca, B. (1995). *Reaccion en cadena de la polimerasa*. Recuperado el 5 de Marzo de 2017, de Universidad Autonoma de Puebla: <http://www.elementos.buap.mx/num23/pdf/16.pdf>
- Llorens, V.(1997). PCR: Una nueva herramienta para el estudio de hongos ectomicorrizicos. *Revista Catalana Micol.*, vol 20, 1-5.
- Velasco, L., & Beltrán, P. (2008). *Orquídeas del Parque Natural sierra de Grazalema*. Grazalema: Consejería de Medio Ambiente.
- Vierstraete, A. (2000). *The Central Dogma of Molecular Biology*. Recuperado el 18 de Febrero de 2017, de Department of Biology University of Ghent: <https://users.ugent.be/~avierstr/pdf/principles.pdf>
- Villalobos, A., & Escobar, M. (2005). *Extraccion de ADN y amplificacion de las secuencias de ITS en Psilocybe ( Agaricale, Fungi)*. Recuperado el 5 de Abril de 2017, de Avances de la investigacion cientifica en Cuba: [http://www.cucba.udg.mx/sites/default/files/publicaciones1/avances/avances\\_2005/Biologia/VillalobosArambulaAlmaRosa/VillalbosArambulaAlmaRosa.pdf](http://www.cucba.udg.mx/sites/default/files/publicaciones1/avances/avances_2005/Biologia/VillalobosArambulaAlmaRosa/VillalbosArambulaAlmaRosa.pdf)
- White, & Bruns. (1990). *Amplification and Direct Sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. Recuperado el 6 de Noviembre de 2016, de PCR Protocols: <https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>
- Wubet, T. (2004). *New Phytologist*. Recuperado el 6 de Noviembre de 2016, de Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Prunus africana, an endangered medicinal tree species in dry Afromontane forests of Ethiopia: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1469-8137.2003.00924.x/full>
- Wubet, T., Weib, M., Kottke, I., Teketay, D., & Oberwinkler, F. (2003). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Prunus africana an endangered







UNIVERSIDAD DE CUENCA

medicinal tree species in dry Afromontane forests of Ethiopia. *New Phytologist*,  
517-519.







## 10. Anexos

### Anexo 1. Análisis general de la siembra en el medio PDA.


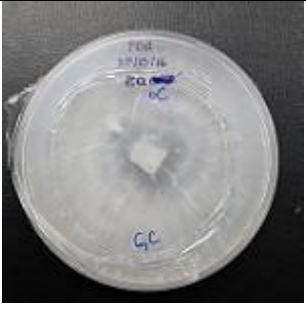

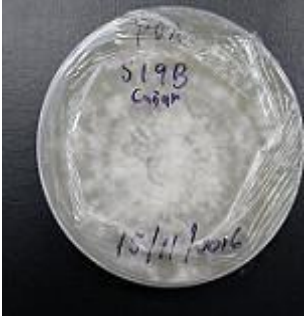
Código	Cepa	Descripción macroscópica	Especie de la orquídea	Crecimiento en días
1M7B		Colonia blanca algodonosa grande.	<i>Trichoceros antenniferum</i> , raíz 7, sección B, Gualaceo.	10
1L7B		Colonia blanca cremosa grande.	<i>Epidendrum secundum</i> ; raíz 7, sección B, Gualaceo.	20
2P7A		Colonia grande blanca cremosa con borde definido.	<i>Pleurotallis gramínea</i> ; raíz 7, sección A, Gualaceo.	20
1P2C		Colonia blanca algodonosa pequeña.	<i>Pleurotallis angustipetala</i> ; raíz 2, sección C, Gualaceo	20





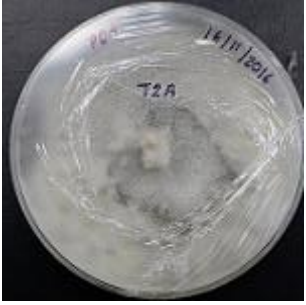
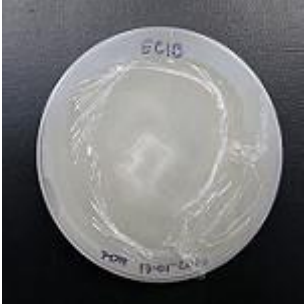
1PG4C		<p>Colonia blanca algodonosa pequeña.</p>	<p><i>Pleurotallis gramínea</i>; raíz 4, sección C, Gualaceo.</p>	20
2E5C		<p>Colonia grande blanca algodonosa con borde definido.</p>	<p><i>Elleanthus oliganthus</i>; raíz 5, sección C, Gualaceo.</p>	20
EC12B		<p>Colonia de color ligeramente amarillento, poco esponjosa.</p>	<p><i>Epidendrum chioneum</i>; raíz 12, sección C, Cañar.</p>	20
E19B		<p>Colonia de color blanco poco algodonoso, crecimiento vertical de adentro hacia afuera, con bordes definidos.</p>	<p><i>Epidendrum sp</i> ; raíz 19, sección B, Cañar</p>	10








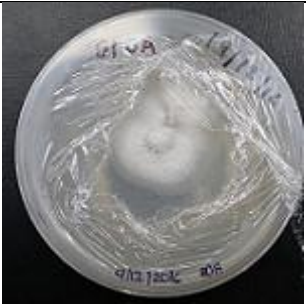
T3B		Colonia grande de color blanco, ligeramente algodonosa en el centro y crecimiento vertical de adentro hacia afuera, con bordes esponjosos.	<i>Trichoceros antenniferum</i> ; raíz 3, sección B, Cañar.	28
Ea6C		Colonia grande de color blanco, ligeramente esponjosa con bordes definidos.	<i>Eleocharis amethystinoides</i> ; raíz G, sección C, Cañar	17
S9C		Colonia grande de color blanco, ligeramente esponjosa.	<i>Stelis sp.</i> ; raíz 9, sección C, Cañar.	30
S19B		Colonia de color blanco algodonoso, aterciopelado de crecimiento vertical de adentro hacia afuera, con bordes algodonosos.	<i>Stelis sp.</i> ; raíz 19, sección B, Cañar.	23



S20B		Colonia grande de color ligeramente blanco, y esponjosa	<i>Stelis sp</i> ; raíz 20, sección B, Cañar.	7
S7C		Colonia grande de color blanco cremoso, aterciopelado de crecimiento vertical de adentro hacia afuera, con bordes color blanco algodónoso.	<i>Stelis sp</i> ; raíz 7, sección C, Cañar.	20
T2A		Colonia grande de color blanco y esponjosa	<i>Trichoceros anteniferum</i> ; raíz 2, sección A, Cañar.	28
EC1B		Colonia grande de color beige de crecimiento vertical de adentro hacia afuera con bordes definido cremoso	<i>Epidendrum chioneum</i> ; raíz 1, sección B, Cañar.	20



UNIVERSIDAD DE CUENCA

EC12C		Colonia de color ligeramente amarillento, poco esponjosa.	<i>Epidendrum chioneum</i> ; raíz 12, sección C, Cañar.	23
EC4C		Colonia grande de color marrón, poco esponjosa	<i>Epidendrum chioneum</i> ; raíz 4, sección C, Cañar.	23
S4B		Colonia pequeña de color blanco, ligeramente esponjosa	<i>Stelis sp.</i> ; raíz 4, sección B, Cañar.	7
S10A		Colonia pequeña de color blanco cremoso, aterciopelado de crecimiento vertical de adentro hacia afuera, con bordes definidos	<i>Stelis sp.</i> ; raíz 10, sección A, Cañar.	7

Elaborado por: Gabriela Crespo y José Sinche



UNIVERSIDAD DE CUENCA

**Anexo 2.** Plant PureLink kit extraction (Invitrogen), utilizado para la extracción de ADN.



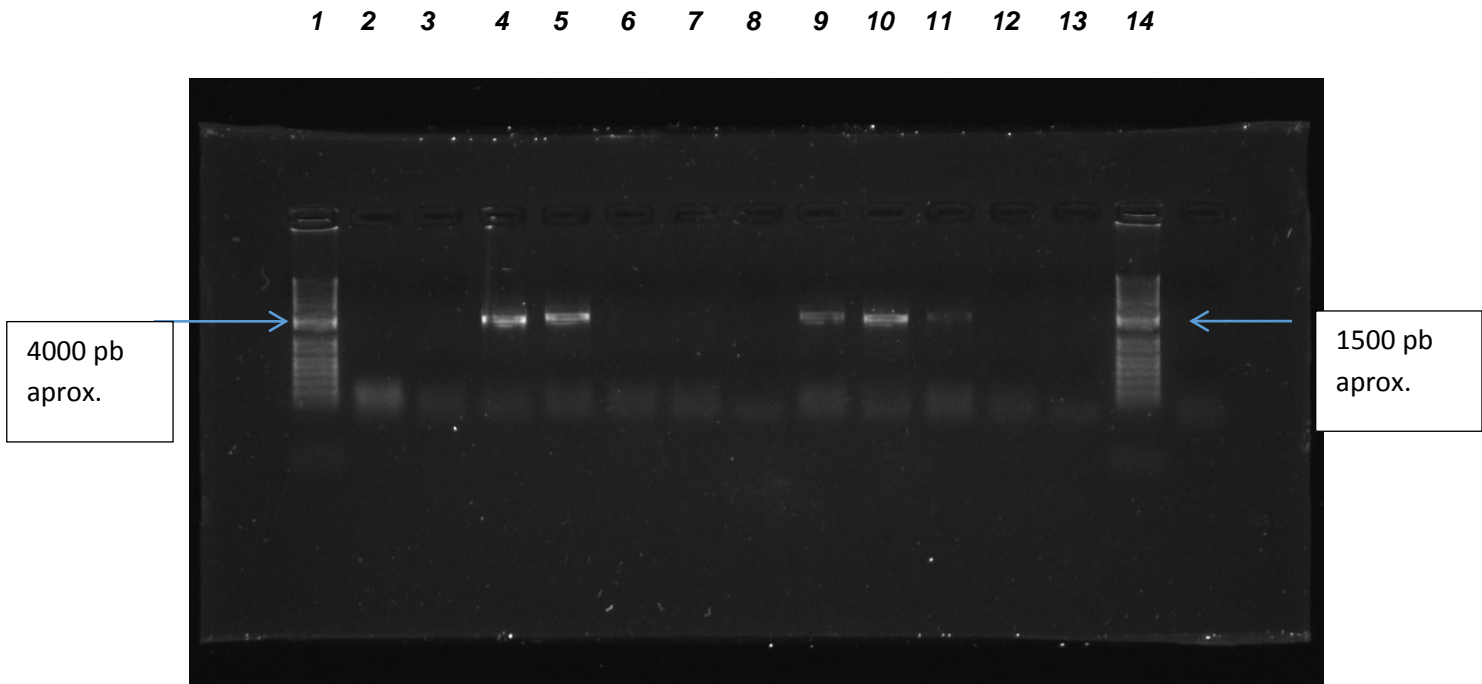
Elaborado por: Gabriela Crespo y José Sinche.

**Anexo 3.** Termociclador utilizado para la PCR



Elaborado por: Gabriela Crespo y José Sinche.

**Anexo 4.** Electroforesis en Gel de Agarosa, producto de la PCR de los aislados fungales de Cañar. Amplificación con una nueva taq polimerasa.



**Figura 10.** Electroforesis en Gel de Agarosa, producto de la PCR de los aislados fungales de Cañar. La designación de los carriles se corresponde con lo que se muestra en el cuadro 11.

Elaborado por: Gabriela Crespo y José Sinche

**Cuadro 11.** Designación de las muestras de ADN de los aislados fungales procedentes de Cañar, por número de carril.

Número de carril		
1	Corresponde al Lader	
	Código del aislado fungal	Orquídea de Origen
2	E19B	<i>Epidendrum</i> ; raíz 19, parte B
3	E19B	<i>Epidendrum</i> ; raíz 19, parte B



UNIVERSIDAD DE CUENCA

4	EC12B	<i>Epidendrum chioneum</i> ; raíz 12, parte B
5	T3B	<i>Trichoceros antenniferum</i> ; raíz 3, parte B
6	S9C	<i>Stelis sp</i> ; raíz 9, parte C
7	S19B	<i>Stelis sp</i> ; raíz 19, parte B
8	S7C	<i>Stelis sp</i> ; raíz 7, parte C
9	EC12C	<i>Epidendrum chioneum</i> ; raíz 12, parte C
10	EC1B	<i>Epidendrum chioneum</i> ; raíz 1, parte B
11	S4B	<i>Stelis sp</i> ; raíz 4, parte B
12	S10A	<i>Stelis sp</i> ; raíz 10, parte A
13	Control negativo.	
14	Control positivo.	
17	Corresponde al Lader.	

Elaborado por: Gabriela Crespo y José Sinche.

**Anexo 5.** Análisis general de la Identificación molecular de las Cepas fúngicas de Gualaceo

<b>Código del aislado fungal</b>	<b>Orquídea de origen</b>	<b>Identificación molecular</b>	<b>% de identidad</b>
1M7B	<i>Trichoceros anteniferum</i> ; raíz 7, sección B. Gualaceo	<i>Ceratobasidium sp.</i>	98% (895/910)



2P7A	<i>Pleurotallis angustipetala</i> ; raíz 7, sección A. Gualaceo	<i>Anthostomella leucospermi</i> .	98% (801/820)
2E5C	<i>Elleanthus aliganthus</i> ; raíz 5, sección C. Gualaceo	<i>Agaricus pinsitus</i> .	99% (609/610)
1L7B	<i>Epidendrum secundum</i> ; raíz 7, sección B. Gualaceo.	<i>Uncultured fungus</i>	94% (757/802)
1P2C	<i>Pleurotallis angustipetala</i> ; raíz 2, sección C. Gualaceo.	Secuencia no disponible.	-
1PG4C	<i>Pleurotallis gramínea</i> ; raíz 4, sección C. Gualaceo	Secuencia no disponible.	-

Elaborado por: Gabriela Crespo y José Sinche

#### Anexo 6. Análisis general de la Identificación molecular de las Cepas fúngicas de Cañar

Código del aislado fungal	Orquídea de origen	Identificación molecular	% de identidad
EC12B	<i>Epidendrum chioneum</i> ; raíz 12, sección B. Cañar	<i>Fusarium globosum</i> .	99% (980/993)
EC12C	<i>Epidendrum chioneum</i> ; raíz 12, sección C. Cañar	<i>Fusarium sp.</i>	99% (878/880)
E19B	<i>Epidendrum sp.</i> ; raíz 19, parte B. Cañar	<i>Sebacina vermifera</i> .	99% (939/948)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

S9C	<i>Stelis sp</i> ; raíz 9, sección C. Cañar	<i>Anthostomella leucospermi.</i>	99% (1000/1010)
S19B	<i>Stelis sp</i> ; raíz 19, sección B. Cañar	<i>Anthostomella leucospermi.</i>	99% (1011/1020)
S7C	<i>Stelis sp</i> ; raíz 7, sección C. Cañar	<i>Anthostomella leucospermi.</i>	99% (1000/1011)
S4B	<i>Stelis sp</i> ; raíz 4, sección B. Cañar	<i>Xylariaceae sp.</i>	97% (839/868)
S10A	<i>Stelis sp</i> ; raíz 10, sección A. Cañar	<i>Xylariaceae sp</i>	97% (857/886)
EC4C	<i>Epidendrum chioneum</i> ; raíz 4, sección C. Cañar	Secuencia disponible	no -
EC1B	<i>Epidendrum chioneum</i> ; raíz 1, sección B. Cañar	Secuencia disponible	no -
T3B	<i>Trichoceros antennifer</i> ; raíz 3, sección B. Cañar	Secuencia disponible	no -
T2A	<i>Trichoceros antennifer</i> ; raíz 2, sección A. Cañar	Secuencia disponible	no -
EaGC	<i>Eleanthus amethystinoides</i> ; raíz G, sección C. Cañar	Secuencia disponible	no -
S20B	<i>Stelis sp</i> ; raíz 20, sección B. Cañar	Secuencia disponible	no -

Elaborado por: Gabriela Crespo y José Sinche





## 11. GLOSARIO

**Anamorfos:** Fase conídica, imperfecta o asexual en los ascomicetos y algunos basidiomicetos, en la que se producen conidios.

**BLAST:** es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o de proteínas.

**Electroforesis:** es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico

**Endémico:** Propio y exclusivo de determinadas localidades o regiones.

**Glomalina:** es una sustancia proteica, insoluble en agua, que actúa como pegamento en su estado nativo y es producida por las hifas de los hongos, la cual se libera en el suelo mediante el proceso de descomposición de las hifas fúngicas

**Humus:** Sustancia que se crea a partir de la descomposición de materias orgánicas presentes en la capa superficial de un suelo

**Labio o Labelo:** Es esta parte de la flor la que más frecuentemente tiene la función de actuar como atractivo o indicador para el polinizador o servir como pista de aterrizaje.

**Ladder:** es un indicador objetivo del tamaño de las bandas de PCR obtenidas, en cada electroforesis **que** se realice

**Micelio:** es la masa de hifas que constituye el cuerpo vegetativo de un hongo.

**PCR:** La reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica que sirve para amplificar un fragmento de ADN

**Primers:** es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN.

**Red de Hartig:** es una **red** de hifas de hongos micorrizos que se extiende dentro de las raíces de las plantas, penetrando entre las células epidérmicas y corticales.

**Región Diana:** es la secuencia de ADN reconocida por una enzima con actividad hidrolasa específica.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

**Simbiosis:** asociación de individuos animales o vegetales de diferentes especies, en la que ambos asociados sacan provecho de la vida en común.

**Saprobio:** esto significa que obtienen sus nutrimentos a partir de materiales orgánicos inertes como restos vegetales y animales.

**Teleomorfo:** estadio reproductivo sexual (morfo), típicamente desarrolla un cuerpo de fructificación.