



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Tulasnella*
spp. A PARTIR DE RAÍCES DE ORQUÍDEAS
TERRESTRES**

**TESIS DE GRADO PREVIO A LA OBTENCIÓN
DEL TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

AUTORA:

Romina Monserrat Acevedo Quizhpe

DIRECTOR:

Paulo Ignacio Herrera Vargas.

LOJA- ECUADOR

2010

CERTIFICACIÓN

Bioquímico

Paulo Herrera Vargas

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA:

Que una vez revisado el trabajo de investigación realizado por la Srta. Romina Monserrat Acevedo Quizhpe, previo a la obtención del título de BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, Octubre 2010

BqF. Paulo Ignacio Herrera

DIRECTOR

AUTORÍA

Los conceptos, ideas y resultados vertidos en el desarrollo del presente trabajo de investigación son de responsabilidad exclusiva de su autora.

Romina Monserrat Acevedo Quizhpe

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico:

A Dios por iluminarme haberme brindado un hogar sólido y lleno de amor que fueron la base para mi formación personal como académica, y además por 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 Elvira, 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.

A mis hermanos, que siempre me brindaron su apoyo incondicional y siempre se sintieron orgullosos de su pequeñita.

A mis sobrinos por brindarle un toque de alegría, y ternura a mi vida con su existencia.

A mi novio Rony, por brindarme su compañía a lo largo de mi carrera universitaria y brindarme mucha felicidad y estabilidad para vivir a plenitud mi formación universitaria.

A mis amigos y compañeros por ser el punto de apoyo, sentimental, y de comprensión, en el transcurso y culminación de mi carrera.

Romina Monserrat Acevedo Quizhpe

AGRADECIMIENTO

Expreso mi gratitud:

A la Universidad Técnica Particular de Loja por permitir vincularme en calidad de estudiante a la Escuela de Bioquímica y Farmacia y así seguir avanzando en mi formación personal y profesional y además brindarme la oportunidad de participar como gestor en el Centro de Biología Celular y Molecular, adquiriendo destrezas y experiencias que serán fortalezas en el campo laboral y social.

A todos los Docentes Universitarios de la Escuela de Bioquímica y Farmacia y Docentes Investigadores del CBCM por impartirnos sus conocimientos en la ciencia y en lo humano, además de aprender de sus experiencias, dándonos puntos de partida para forjar nuestro propio camino en el mundo del saber.

Al Dr. Juan Pablo Suárez Ch. por ser un gran exponente de valores como: responsabilidad, humildad y dedicación, y como muestra de ellos ha logra la formación de un grupo de estudio de micorrizas de similares características y visión de equipo.

Al Bq. Paulo Herrera mi agradecimiento sincero por su valioso tiempo, y asesoramiento en mi trabajo y en todo el proceso de esta investigación.

A la RBSF (Reserva Biológica San Francisco), por facilitar la ejecución de nuestro trabajo investigativo.

A mis amigos del grupo de estudio de micorrizas del CBCM por su invaluable apoyo y ayuda durante el inicio, transcurso y culminación de este trabajo, además por su compañía y enseñanza de conocimientos que han sido la base para el desarrollo de este trabajo investigativo.

Romina Monserrat Acevedo Quizhpe

CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Romina Monserrat Acevedo Quizhpe, declaro conocer y aceptar la disposición del artículo 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigadores, trabajos científicos o técnicos o tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

Romina M. Acevedo Quizhpe
Tesista

Bq. Paulo Herrera Vargas
Director de Tesis

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PAG
CERTIFICACIÓN.....	II
AUTORÍA.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHOS DE TESIS.....	VI
ABSTRACT.....	IX
RESÚMEN.....	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. RECOPIACIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. IMPORTANCIA DE LAS ORQUÍDEAS.....	3
2.2. REINO FUNGI Y SU CLASIFICACIÓN.....	4
2.3. ASOCIACIONES MICORRÍZICAS.....	5
2.3.1. TIPOS DE ASOCIACIÓN.....	5
2.3.1.1. MICORRIZAS EN ORQUÍDEAS.....	7
2.4. AISLAMIENTO DE HONGOS EN CULTIVO.....	10
2.4.1. MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE HONGOS MICORRÍZICOS EN ORQUÍDEAS.....	11
2.4.2. MEDIOS PARA EL AISLAMIENTO DE HONGOS MICORRÍZICOS EN ORQUÍDEAS.....	12
3. OBJETIVOS.....	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
4.1. Sitio de estudio y colección de muestras.....	15
4.2. Verificación de pelotones en células corticales de la raíz.....	17
4.3. Tratamiento de las raíces.....	17
4.4. Siembra de pelotones.....	18
4.5. Purificación de las cepas.....	19
4.6. Agrupamiento de aislados.....	20
4.7. Técnicas moleculares de identificación: Extracción de DNA, PCR.....	21

5. RESULTADOS	22
5.1. Colonización.....	22
5.2. Aislamiento de Cultivos.....	22
5.3. Agrupamiento y conservación de aislados.....	24
5.4. Resultados , PCR.....	25
6. DISCUSIÓN	27
7. BIBLIOGRAFÍA	30
8. ANEXOS	39

ABSTRACT

The symbiosis between specific fungi and the roots of epiphytic and terrestrial orchids constitute a vital point for the establishment and development of orchids in the natural environment. Knowledge of these important mycobionts now has been restricted to the molecular data to find an answer to the correlation between the individuals involved in this exchange of nutrients. The study in orchid micorrhiza in Ecuador has been established by Suárez (2006, 2008) Kottke 2010, without achieving greater success in aislameinto in vitro of these fungi. To establish a method of isolation of mycorrhizal fungi in culture, 25 individuals of orchids terrestrial roots were sampled in the Andean forest at the Reserva Biologica San Francisco. To increase effectiveness and prevent external contaminants only roots without velamen but highly colonized were used in order to isolate in the culture media Potatoe Dextrose Agar (PDA), and Moser B. By PCR with primers combination ITS1/ITS4Tul for Tulasnella was posible determine that 48 isolates belong to this genus.

Is really Imporat to obtain and matinain pure cultures in vitro, for future studies that can assist in the preservation of such valuable species such as orchids.

Key Words: Micorrhiza, Tulasnella, ITS1/ITS4Tul

RESÚMEN

La simbiosis entre hongos específicos y las raíces de las orquídeas epifitas o terrestres se constituyen en un punto vital de establecimiento y desarrollo de las orquídeas en el medio ambiente natural. Los conocimientos sobre estos importantes micobiontes en la actualidad se ha restringido a los datos moleculares para buscar una respuesta a la correlación entre los individuos involucrados en este intercambio de nutrientes. El estudio en micorrizas de orquídeas en el Ecuador ya ha sido establecido (suarez 2006, 2008, Kottke 2010), sin lograr mayor éxito en el aislamiento in vitro de dichos hongos. Con el fin de establecer una metodología de aislamiento de hongos micorrizicos en cultivo, se muestrearon raíces de 25 individuos de orquídeas terrestres en el bosque andino de la Reserva Biologica San Francisco. Para aumentar la efectividad y evitar contaminantes externos se probó aislar desde raíces altamente colonizadas y sin velamen, en los medios de cultivo Potatoe Dextrose Agar (PDA), y medio Moser B. Por medio de PCR con la combinación de primers para Tulasnella ITS1/ITS4Tul, se determinaron que 48 aislados pertenecen a este genero.

Es de importancia obtener y mantener cultivos puros in vitro, para futuros estudios, que puedan colaborar en la conservación de tan valiosas especies como lo son las orquídeas.

Palabras clave: Micorrizas, Tulasnella, ITS1/ITS4Tul

1. INTRODUCCIÓN

Orquidaceae es una de las familias de plantas más rica en especies con aproximadamente 35000 (Cameron *et al.* 2006). Ecuador, es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo, y como ejemplo se han registrado aproximadamente 4000 especies de orquídeas (Dodson 2003).

Las orquídeas tienen la capacidad de producir miles de semillas, pero se enfrentan a una problemática de germinación por ser diminutas y contener escasas reservas de carbohidratos (Shimura & Koda 2005). La limitación de nutrientes en la semilla, lleva a la necesidad de generar un vínculo con hongos específicos que les proporcionen nutrientes y así contribuir a su germinación, el desarrollo del protocormo y el desarrollo temprano de la plántula (Smith & Read 1997).

La simbiosis que se da entre los hongos específicos y las raíces de las plantas se denomina micorriza (Brundrett 2002).

Los estudios de hongos micorrízicos de orquídeas, se ha restringido a datos moleculares obtenidos desde raíces de orquídeas así como cultivos, creándose un grupo superficial denominado Rhizoctonia para ubicar los estados anamórficos, debido a la falta de datos moleculares desde sus teleormos (Warcup 1980; Moore 1987; Taylor *et al.* 2002; Ma. *et al.* 2003; Pereira *et al.* 2003, 2005).

En el Ecuador estudios realizados en la zona Andina de la Reserva Biológica San Francisco, muestran a miembros de *Tulasnellales*, *Sebaciniales* (Suárez *et al.* 2006, 2008) y *Atractielales* (Kottke *et al.* 2010) como potenciales micobiontes en orquídeas, reportándose al género *Tulasnella* como el micobionte más común en orquídeas epífitas y terrestres

Hasta la actualidad, se mantiene la problemática para poder obtener aislados puros de estos hongos simbiotes a partir de raíces de orquídeas, que son necesarios para ampliar nuestros estudios en pruebas de inoculación *in Vitro*, dando relevancia al establecimiento de posibles estrategias de

conservación de orquídeas (Zettler 1997; Otero *et al.* 2002; Dixon *et al.* 2003); análisis enzimáticos, y estudio de la taxonomía mediante la inducción de los estados sexuales o fructificaciones de estos hongos en cultivo (Warcup 1980).

2. RECOPIACIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. IMPORTANCIA DE LAS ORQUÍDEAS

Las orquídeas ocupan un lugar muy importante en la cadena evolutiva de las plantas superiores, debido a que están entre las más avanzadas y especializadas (Linares 1993). Tienen tres hábitos principales de crecimiento: Habitan el suelo (terrestres), sobre otras plantas (epífitas), y en la superficie de las rocas (litófitas) (Smith & Read 1997).

Estas plantas pueden ser encontradas desde los trópicos hasta las regiones árticas, como por ejemplo orquídeas epífitas que son comúnmente encontradas en zonas tropicales, o las terrestres en zonas templadas y hasta algunas formas subterráneas (Smith & Read 1997). Teniendo una gran distribución y por ello son consideradas como indicadores de la estabilidad de los ecosistemas (Rivera 2002)

Por otro lado, estas plantas tienen una gran importancia económica; la *vainilla* obtenida de la *Vainilla planifolia* es utilizada para dar sabor de los alimentos y bebidas, los tejidos de *Gastrodia* spp. son utilizadas en la medicina natural (Griesbach 2002), y en general las orquídeas se constituyen en un gran mercado económico en el campo de la horticultura existiendo una fuerte presión por parte de los colectores al sacarlas de su sitio dado el incremento en la demanda (Larrea 2002).

En la actualidad existe una fuerte preocupación por la pérdida de hábitats, lo cual requiere mayor conocimiento y comprensión de las relaciones bióticas entre estos seres vivos para apoyar los esfuerzos de conservación. Según Hamilton (2005), aproximadamente el 90 % de los bosques andinos ya se han destruido, y se ha perdido gran parte de la diversidad de orquídeas, provocando como consecuencia un funcionamiento no saludable del ecosistema, siendo necesario empezar con actividades de conservación de cada especie amenazada.

2.2. REINO FUNGI Y SU CLASIFICACIÓN

El reino fungi constituye un grupo diverso de organismos unicelulares o pluricelulares que se alimentan mediante la absorción directa de nutrientes (organismos heterotróficos). Los alimentos se disuelven mediante enzimas que secretan los hongos; después se absorben a través de la fina pared de la célula y se distribuyen por difusión simple en el protoplasma. La nutrición heterotrófica puede ser establecida por una vida saprotrófica, parasítica o simbiótica en un huésped determinado (Gams *et al.* 1998).

Durante las últimas décadas se ha venido aplicando técnicas moleculares en micología, pero es en la década de 1990 con la amplificación por PCR de genes de regiones de RNA ribosomal, (18S rRNA, ITS, 5.8S rRNA, 28S rRNA) que se ha llegado hasta la utilización de bases de datos de múltiples locus, concluyendo en conjunto en la más grande clasificación filogenética de hongos, manejando un lineamiento jerárquico modificado por el **Código Internacional de Nomenclatura Botánica**, (Hibbett *et al.* 2007).

Una clasificación basada en las relaciones evolutivas se conoce como una clasificación filogenética, y taxón (sing. taxón), idealmente comprende a todos los organismos pertenecientes a linajes monofiléticos (Vilgalys & Hibbett 1993), incluyendo sus formas tanto sexual como asexual. Aceptándose así un Reino, un Subreino, siete Phylum, diez Subphylum, 35 Clases, 12 Subclases y 129 órdenes (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación del Reino Fungi. (Hibett *et al.* 2007).

Reino	Fungi
Subreino	Dycaria
Phylum	Chytridiomycota
	Neocallimastigomycota
	Blastocladiomycota
	Microsporidia
	Glomeromycota
	Ascomycota
	Basidiomycota

2.3. ASOCIACIONES MICORRÍZICAS

El término micorriza describe una forma común de simbiosis entre raíces de plantas y hongos (Harley & Smith 1983). Los hongos que participan como socios en esta relación hongo planta, son del filum: Basidiomycota, Ascomycota y Glomeromycota (Brundrett 1991; Harley & Smith 1983). En la literatura micorrízica, al término simbiosis se lo describe como una favorable relación mutualista interdependiente del lugar en el que la planta huésped recibe nutrientes minerales, mientras el hongo obtiene componentes de carbono derivados de la fotosíntesis (Harley & Smith 1983).

2.3.1. TIPOS DE ASOCIACIÓN

Al menos se han reconocido siete tipos diferentes de asociaciones micorrízicas, involucrando diferentes grupos de hongos y plantas huésped y distintos modelos morfológicos (Fig. 1), (Brundrett *et al.* 1996).

Las asociaciones más comunes son:

- *Micorrizas vesículo-arbusculares* (VAM) – en esta asociación hongos del filum Glomeromycota producen

arbúsculos, hifas, y vesículas dentro de las células de la corteza radical (Brundrett *et al.* 1996).

- *Ectomicorrizas* (ECM) – son Basidiomicetes y Ascomicetes que forman un manto alrededor de raíces y una red de Hartig entre las células radicales (Brundrett *et al.* 1996).
- *Micorrizas de orquídeas* – principalmente hongos de la clase Basidiomicetes producen ovolos de hifas dentro de raíces de plantas orquídeas (Brundrett *et al.* 1996).
- *Micorrizas ericoides* – involucra ovolos de hifas en el exterior de las células de los angostos pelos radicales de plantas del orden ericales (Brundrett *et al.* 1996).
- *Asociaciones Ectendo-, arbutoides y monotropoides* – son similares a asociaciones ectomicorrízicas, pero tienen características anatómicas especializadas (Brundrett *et al.* 1996).

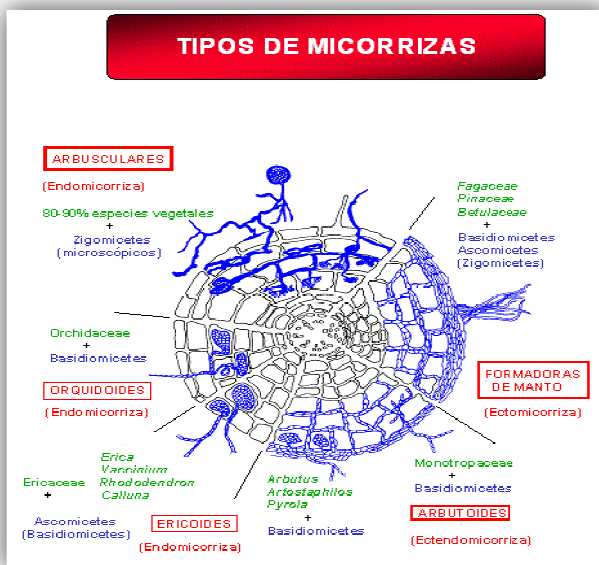


Fig. 1 Tipos de micorrizas modificado de José Miguel Barea, 1998.

2.3.1.1. MICORRIZAS DE ORQUÍDEAS

Según estudios realizados de forma preliminar se ha sugerido que el desarrollo de las relaciones micorrízicas marcó una pauta importante en la evolución de la familia Orchidaceae (Benzing 1981; Rasmussen 1995).

En este contexto se sabe que la mayoría de las especies de orquídeas de zonas templadas están durante todo su ciclo vital infectadas con hongos micorrízicos, al contrario los estudios hechos con orquídeas tropicales han mostrado grados variables de asociación, demostrando que la infección de micorrizas en zonas tropicales es fundamental para la germinación, pudiendo o no estar presente en las siguientes etapas de desarrollo (Rasmussen 1995).

Las micorrizas de orquídeas se caracterizan por la formación de ovillos o pelotones de hifas intracelulares de hongos en la corteza de la raíz de plantas maduras (Dearnaley 2007; Masuhara & Katsuya 1991). Los pelotones son digeridos por la planta, permitiendo la transferencia de nutrientes desde los hongos a las células radicales de las orquídeas (Alexander & Hadley 1985; Rasmussen 1995). La infección inicial fúngica de la raíz en algunas especies es a través de los pelos epidérmicos (Burgeff 1936), aunque en otros casos, los pelos de la raíz no están involucrados (Burgess *et al.* 1994).

Cameron en estudios realizados el 2006 reporta que la asociación hongo-orquídea es mutualista, ya que sus resultados experimentales demostraron una transferencia recíproca de C entre hongo y orquídea. Además se conoce que los hongos son grandes proveedores de nutrientes minerales como el C y N, obtenidos a partir de compuestos como aminoácidos y sustancias como la celulosa, que son producidos y encontrados de forma natural (Sharma 2003; Cameron 2006); y le permiten a la planta obtener recursos como el agua para evitar la desecación (Yoder *et al.* 2000; Cameron *et al.* 2006).

En orquídeas mixotróficas (heterotróficas) existe una dependencia de los hongos micorrízicos a lo largo de su vida. En orquídeas autotróficas esta necesidad va disminuyendo por el desarrollo de funciones fotosintéticas, por lo que la planta disminuye la dependencia hacia las micorrizas. Sin embargo algunas orquídeas fotosintéticas poseen raíces rústicas, por lo que conservan a los hongos micorrízicos, para la suministración de nutrientes minerales, especialmente el fósforo (Cameron *et al.* 2007). En bosques tropicales éstos hongos establecidos sobre la corteza de árboles son importantes para mantenimiento y crecimiento de orquídeas epifitas (Suárez *et al.* 2006).

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

HONGOS QUE FORMAN MICORRIZAS CON ORQUÍDEAS

En bosques tropicales, subtropicales y neotropicales se ha reportado la interacción con hongos pertenecientes al subfilum Basidiomycotina, con los **órdenes**: Tulasnellales, Sebaciniales Ceratobasidiales y Atracteliales como los hongos micorrízicos más comunes en orquídeas. (Kottke & Suárez 2009; Yukawa *et al.* 2009; Kottke *et al.* 2010)

- **FILUM BASIDIOMYCOTA**

El phylum Basidiomycota incluye cerca de 30.000 especies de hongos incluidos royas, carbonos y, levaduras (James *et al.* 2006).

Los hongos que comprenden el filum *Basidiomycota* comúnmente son conocidos como basidiomicetes. Los basidiomicetes se caracterizan primariamente por el hecho de que ellos producen sus esporas sexuales, basidiosporas terminales, sobre la superficie de una estructura especializada y microscópica llamada basidio (Alexopoulos *et al.* 1996), además presentan sus hifas con septas, usualmente micelio dicariótico, a

menudo provistos de fístulas, y propagación sexual con basidios entre 2 y 8 basidiosporas.

ORDEN TULASNELLALES

Los Tulasnellales se han reconocido como saprófitos y parásitos, simbióticos en micorrizas con orquídeas. Muchas colecciones de estas especies han sido hechas desde madera u hojas en descomposición, como también de basidiocarpos senescentes de otros hongos (Bourdot & Galzin 1928; Roberts 1999). Sin embargo, varias especies han sido aisladas desde las raíces de orquídeas terrestres (Warcup & Talbot 1967).

Diversas observaciones en diferentes trabajos han sugerido que algunas especies de Tulasnellales **no** son primariamente organismos descomponedores de madera pero pueden ser micoparasíticos, parásitos sobre otros organismos, asociados micorrízicos, o limpiadores de los bioproductos de especies degradadoras de madera (Wells & Bandoni 2001).

Se conocen seis especies de *Tulasnella* que forman micorrizas en orquídeas: *T. allantospora* Wakefield y Pearson, *T. asimétrica* Warcup y Talbot, *T. calospora* (Boud.) Juel, *T. cruciata* Warcup y Talbot, *T. irregularis* Warcup y Talbot, *T. violea* (Chalet) Bourdot y Galzin (Currah *et al.* 1997).

CARACTERÍSTICAS MORFOLOGICAS DE TULASNELLALES

Entre las características principales de Tulasnellales tenemos: **basidioma**, extendido aracnoideo sin himenium definido, de ceroso a subgelatinoso y hialino (claro) o frecuentemente gris violáceo, muy a menudo invisible microscópicamente; las **hifas** son bi o multinucleadas, claras monomíticas con o sin conexiones por **fístulas** (clamps), esporas: lizas y de variadas formas (Roberts 1999; Warcup & Talbot 1967, 1971, 1980).

Algunas *Tulasnella spp.* se las ha localizado en hepáticas, así se demuestra la importancia de estos micobiontes en los diversos ecosistemas (Kottke *et al.* 2007). También

forman ectomicorrizas y participan en asociaciones tripartitas (Bidartondo *et al.* 2004). En cultivo han sido reportadas como formas Rhizoctónicas (Warcup & Talbot 1966, 1971; Roberts 1999; Sharma 2003).

FORMA-RHIZOCTONIA

Los hongos forma-Rhizoctonia, son hongos imperfectos (Warcup & Talbot 1967) saprofitos, parásitos de plantas y hongos endomicorrícicos de orquídeas, dentro del phylum Basidiomycota, clase Basidiomycetes. (Roberts 1999).

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

La subdivisión de Rhizoctonia, se ha basado en número de núcleos por segmento de hifa y la ultra-estructura de la septa de la hifa, con lo que se ha asignado previamente para los estados anamórficos de sus géneros telomórficos (**Ceratorhiza** para *Ceratobasidium*; **Moniliopsis** para *Thanateaphorus* y **Epulorhiza** para *Tulasnella* y **Opadorhiza** para *Sebacina*) (Sharon *et al.* 2008).

2.4. AISLAMIENTO DE HONGOS EN CULTIVO

La metodología de cultivos puros permite a un investigador detectar, aislar, identificar y cuantificar tipos de hongos desde una amplia serie de ambientes y para definir los requerimientos nutricionales, químicos y ambientales para su crecimiento y metabolismo. Los estudios con cultivos puros no solo mejoran el entendimiento de algún ecosistema natural dentro de huéspedes infectados o en el ambiente, sino también ayudan en la determinación de la arquitectura molecular y el escrutinio (screening) para una nueva actividad/componente (Jong & Birmingham 2001).

Los hongos micorrízicos de orquídeas han sido estudiados mediante el aislamiento y establecimiento de cultivos puros desde tejidos radicales colonizados (Warcup 1981; Currah *et al.* 1997). Para lograrlo se han probado una variedad de métodos de aislamiento, pero todos con el fin de obtener una cepa pura de un hongo micorrízico.

2.4.1.MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE HONGOS MICORRÍZICOS EN ORQUÍDEAS

Existen diversos métodos de aislamiento de hongos micorrízicos en raíces de orquídeas (Zhu *et al.* 2008) son los descritos a continuación.

a) Método de Currah et al. (1987)

En este método segmentos de la superficie de la raíz son esterilizados durante un minuto en una solución de cloro de uso domestico diluida al 20% por, y enjuagadas dos veces en agua destilada estéril, y finalmente se retira el velamen con un bisturí estéril. Grupos de células se extraen de la corteza interior, luego de macerar el corte en una gota de agua estéril se siembran en cajas con medio fundido Melin-Norkran modificado. Las placas se dejan solidificar y se incuban en la oscuridad a 18 °C hasta que las hifas de las células corticales crecen en las placas con medio, luego las hifas son transferidas a Potato Dextrosa Agar (PDA), se repite este paso hasta obtener cultivos puro.

b) Método de Warcup y Talbot (1967)

Las raíces de la orquídea con micelio Rhizoctonio externo se seleccionan y se lavan a fondo con agua del grifo y se cortan en segmentos. Los segmentos son macerados aparte en agua estéril, y con la ayuda de agujas estériles se liberan los pelotones en las placas de aislamiento. Estos se mezclan en refrigeración con el agar fundido con 50 µg/ml de estreptomycin y 20µg/ml de tetraciclina y se vierte en cajas de Petri para obtener los hongos que crecen en pelotones.

2.4.2.MEDIOS PARA EL AISLAMIENTO DE HONGOS MICORRÍZICOS EN ORQUÍDEAS

Muchos medios selectivos son especialmente útiles para aislar hongos desde una mezcla de varias especies. Estos permiten el crecimiento de los hongos deseados mientras suprimen a otros microorganismos (Jong & Birmingham 2001). Los medios selectivos son generalmente más complejos que los usados para cultivo después del aislamiento. En muchos casos, los componentes incluyen una sola fuente de carbón o nitrógeno permitiendo solo el crecimiento de unos pocos tipos de microorganismos.

Las sustancias esenciales de crecimiento necesarias para hongos incluyen azúcares simples, como son glucosa y sucrosa, sales minerales, agua, y aire (Jong & Birmingham 2001). Muchos hongos son capaces de crecer y producir esporas sobre medios sencillos como en el agar-agua; otros requieren factores específicos de crecimiento, como son vitaminas (tiamina, biotina, inositol, piridoxina, ácido nicotínico, y ácido pantoténico), aminoácidos, ácidos grasos, metales traza (Jong & Birmingham 2001).

Los medios de cultivo pueden ser sólidos o líquidos. Los medios sólidos incluyen sustancias naturales o soluciones de nutrientes solidificados por la adición de agar o gelatina. Medios con agar se usan comúnmente en experimentos preliminares; aislamiento, identificación, y mantenimiento de cultivos; y en estudios de esporulación. Los medios líquidos son preferidos por los trabajadores bioquímicos, particularmente en estudios sobre subproductos metabólicos, deficiencias metabólicas, y ensayos microbiológicos (Jong & Birmingham 2001).

Algunos medios de cultivo se han utilizado para estudios en los que se necesita obtener aislamientos de hongos. Por ejemplo en trabajos de caracterización de hongos se usó el medio MMNC para el aislamiento de hongos micorrízicos desde raíces de orquídeas continuando con PDA (Liparini *et al.*2005). Las colonias obtenidas en estos medios se transfirieron a otro medio como corn meal agar CMA,

coconut milk agar, malt extract agar (MEA), o oatmeal agar (Zelmer & Currah 1996).

Los hongos micorrízicos necesitan de un medio de cultivo especial que corresponda a su nicho ecológico. De acuerdo a la ecología de los *Tulasnellales* se ha podido estimar sus requerimientos nutricionales, y se ha considerado ampliamente que la principal fuente de carbón para todas las especies de *Tulasnella* es la materia orgánica del suelo (Smith & Read 1997; Roberts 1999) ya que estos producen sus estructuras reproductivas sobre la madera en descomposición (Bidartondo 2003); en este contexto el grupo de sistemática y micología de la universidad de Tübingen ha desarrollado el medio Moser b cuyos componentes emulan las condiciones para un crecimiento específico de Tulasnellales y Sebaciniales.

Para el herbario micológico de la UTPL, es de especial importancia establecer un método de aislamiento de hongos micorrízicos de orquídeas, el presente trabajo tiene como fin incrementar el banco de hongos micorrízicos que puedan en un futuro ser utilizados para ensayos en estudios ecológicos.

3. OBJETIVOS

General:

Aislar *Tulasnella* spp. en cultivos puros a partir de diferentes especies de orquídeas terrestres.

Específicos:

- Implementar un método adecuado de aislamiento de hongos micorrízicos a partir de pelotones.
- Identificar mediante el uso de técnicas moleculares si los aislados pertenecen al orden Tulasnellales.
- Mantener e incrementar el número de hongos aislados para el herbario micológico de la Universidad Técnica Particular de Loja.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. *Sitio de estudio y colección de muestras*

El sitio de estudio está ubicado en un bosque montano tropical lluvioso dentro de la Reserva Biológica San Francisco (RBSF), ubicada en mitad de la vía entre las provincias de Loja y Zamora Chinchipe (3°58' S, 79°04' W), el mismo que fué utilizado en el proyecto "Mycorrhizal fungi for growth and rehabilitation of orchids of a tropical mountain rain forest in southern Ecuador", que forma parte del programa alemán financiado por la DFG (FOR-816). En el mencionado proyecto fueron establecidos cuatro sitios de muestreo: dos bosques primarios (S1 y S4), un bosque secundario (S3) y un derrumbe antropogénico (S2), (Kottke *et al.* 2010) (Fig. 2). En cada sitio se establecieron parcelas para el muestreo de orquídeas epífitas (1m en ramas de árboles) y de orquídeas terrestres (1m²), las que incluyeron al menos cuatro o cinco individuos de orquídeas.

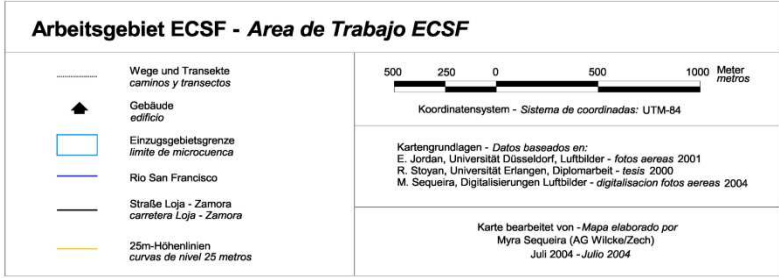
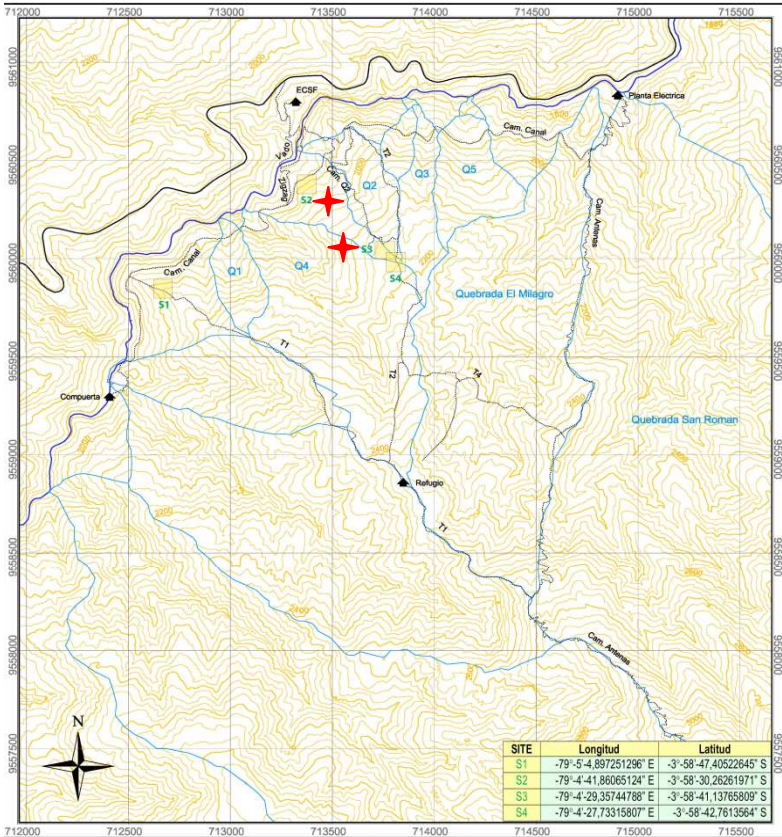


Fig. 2 Mapa del Área de Trabajo en la Estación Científica San Francisco.

Para este trabajo, se colectaron 4 segmentos de raíz de al menos 4 especies de orquídeas terrestres por cada parcela, con un total de 25 muestras entre el sitio 2 y sitio 3. Se seleccionaron aquellas que estén en contacto directo con el suelo, y además se tuvo en cuenta que sean raíces jóvenes con un color amarillento u opaco, característico de la colonización (Zhu *et al.* 2008). Los segmentos de raíz fueron trasladados al laboratorio en papel aluminio para el proceso de esterilización y siembra a realizarse el mismo día del muestreo para evitar la pérdida de viabilidad de los hongos simbiotes.

4.2. Verificación de pelotones en células corticales de la raíz

Antes de iniciar con el aislamiento de pelotones, fue necesario comprobar si las raíces recolectadas se encontraban colonizadas. Para ello se examinaron al microscopio, finos cortes transversales de la raíz provenientes de varias secciones de las muestras colectadas. Estos cortes se tiñeron con una gota de solución de azul de metilo 0.05% (C. I. 42780, Merck), dejando reposar por unos 3 minutos. Las secciones fueron examinadas al microscopio con una magnificación de 40x, 100x (Leitz WETZLAR SM – Lux).

4.3. Tratamiento de las raíces

Luego de comprobar su colonización, las raíces seleccionadas fueron sometidas a un proceso de lavado superficial con agua y jabón para retirar los restos de suelo, y así evitar algún tipo de contaminación ajeno a las células corticales de la raíz.

En condiciones estériles los segmentos de raíz fueron sumergidos en etanol 70% durante 30 seg., seguido por inmersión en una solución de cloro 20% (Hipoclorito de sodio 5.25 %) y unas gotas de jabón líquido (Dish Liquid concentrado) por 10 min. y finalmente lavadas por agitación en agua destilada estéril por aproximadamente 3 min.

Con ayuda de un bisturí, micropinzas y un estereomicroscopio (ZEISS Stemi DV4) se retiró las partes proximal y distal del segmento de raíz (aproximadamente 2 cm por cada lado) y luego se procedió a quitar el velamen del segmento (medio) utilizado para la siembra, dejando el tejido cortical limpio.

4.4. Siembra de pelotones

4.4.1. Preparación de los pelotones en cultivo líquido

Se realizó 16 finos cortes transversales por individuo de diferentes segmentos de raíz con la ayuda de una bisturí, y se incubó cada uno de ellos en tubos de ensayo de 10ml (8 tubos con 2ml de agua potable autoclavada y 8 tubos con 2 ml de medio de cultivo Moser b líquido) por un periodo de 24 horas en agitación constante a 200rpm.

4.4.2. Siembra de pelotones en cultivo sólido

Los cortes incubados fueron examinados por microscopía para detectar el crecimiento de hifas, si presentaban crecimiento, fueron transferidos a cajas petri con medio PDA y con medio sólido Moser b (recomendado para *Tulasnella* y *Sebacina* siguiendo el protocolo establecido por el Departamento de Botánica Sistemática y Micologica de la Universidad de **Tübingen – Alemania**, Anexo 1).

Para el siguiente paso con los 8 cortes incubados, tanto en agua como en medio Moser b líquido, se procedió como sigue:

- Se ecogieron 4 cultivos que presentaron crecimiento.
- De éstos, 2 cultivos fueron transferidos a Medio sólido Moser b y 2 a PDA.

Los cultivos se incubaron a una temperatura de 24°C. El procedimiento se grafica en la figura 3.

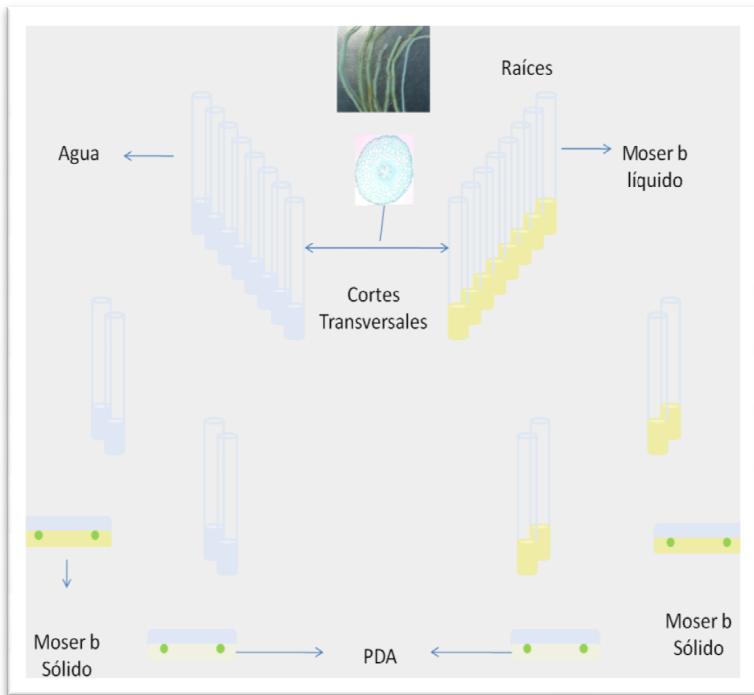


Fig.3 Esquema de la siembra de pelotones

4.5. Purificación de las cepas

La observación tanto al estereomicroscopio como al microscopio (100x) permitió observar las hifas directamente en la caja de cultivo (Fig.4) Cuando éstos alcanzaron un tamaño aproximado de 1 cm, se traspasaron a un nuevo medio de cultivo con la ayuda de un asa de aluminio estéril, (Fig. 5) para así obtener un solo tipo de hongo por caja de cultivo, es decir un cultivo puro. Hay que tener presente que en cada medio de cultivo sembrado pueden crecer varios tipos de hongos diferenciados primariamente por sus características macroscópicas (color, forma de micelio, forma y cinética de crecimiento entre otras), por lo cual se fue separando uno de otro en los medios de cultivo correspondientes. La conservación de

cultivos jóvenes libres de contaminación se los hizo mediante repiques en nuevos medios de cultivo (Fig. 6) y por refrigeración a 4°C.

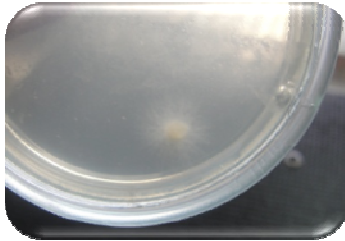


Fig. 4 Crecimiento de las hifas

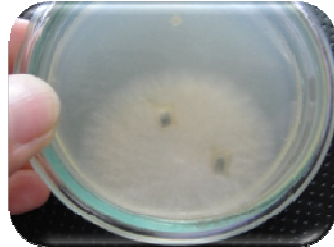


Fig. 5 Cultivo repicado

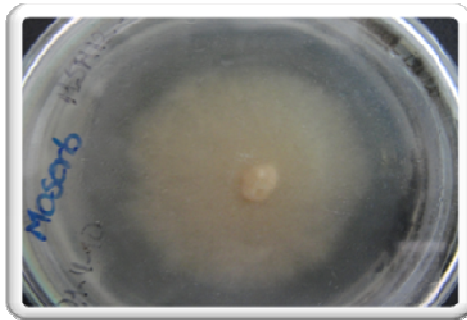


Fig. 6 Cultivo puro aislado

4.6. Agrupamiento de aislado

En el presente trabajo los aislados similares fueron agrupados de acuerdo a sus características macroscópicas. Las similitudes y diferencias de crecimiento entre aislados en su medio correspondiente se observaron en los siguientes caracteres: el grado de crecimiento, color (blanca, crema y castaña), forma, tamaño, textura (grumoso, algodonoso o liso), abundancia de micelio (aéreo abundante o escaso), (Eustáquio 2005) y cambios de color en el sustrato causado por el hongo (Harvais 1967).

4.7. Técnicas moleculares de identificación: Extracción de DNA, PCR.

Se extrajo el DNA de aquellos cultivos que basados en las características macroscópicas fueron sospechosos de ser *Tulasnella*. Para ello, una pequeña porción de micelio fúngico fue extraído desde los cultivo aislados y colocado en microtubos 1.5 ml. El DNA fue extraído usando el kit DNeasy Plant Mini Kit extracción (Qiagen).

Para la detección de *Tulasnella* spp. mediante PCR se utilizó la combinación de primers: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; White *et al.* 1990) y ITS4Tul (5'-CCG CCAGATTCACACATTGA-3'; Taylor & Bruns 1997), combinación específica para este género (Bidartondo *et al.* 2003) para amplificar las regiones nrDNA ITS1, 5.8S rDNA y ITS2.

Las condiciones de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) fueron: desnaturalización inicial a 98 °C por 3 min; 35 ciclos, cada ciclo consiste de un paso de desnaturalización a 94 °C por 30s; anillamiento a 60°C por 45 s y extensión a 72 °C por 1 min; y una extensión final a 72 °C por 7 min para finalizar la PCR (Suárez *et al.* 2006). El volumen de reacción de la PCR fue de 20µl: 10µl de Phusion High-Fidelity PCR Mastermix (Finnzymes, Espoo, Finland), 6.4 µl de Agua estéril, para ambos primers 0.4 µl (25 pmol/µl), 0.8µl de Bovine Serum Albumin 10% (BSA-SIGMA), y 2µl de DNA.

Para verificar que los cultivos aislados pertenecen al género *Tulanella*, los productos de PCR se verificaron por medio de electroforesis, con 2µL de producto de PCR + 2 µL de azul de bromofenol – 6x loading solution, en geles de Agarosa 0.7% (128 V, 300 mA, 20 min), teñido en Gel Red Nucleic Stain 3x in wáter y se analizó la presencia/ausencia de bandas.

5. RESULTADOS

5.1. *Colonización*

Todas las raíces colectadas en contacto directo con el suelo estaban colonizadas. Los hongos se observaron en el interior de las células corticales formando ovillos con hifas jóvenes, (Fíg. 7a) pero también se observaron una serie de estructuras grumosas que denotan pelotones colapsados.(Fig. 7b)

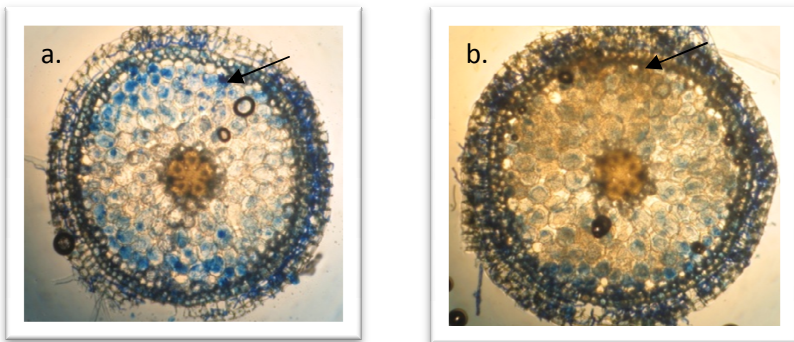


Fig. 7. Pelotones micorrízicos colonizando las células corticales. **a.** pelotones jóvenes, **b.** pelotones colapsados

5.2. *Aislamiento en Cultivos*

Luego de la siembra de los cortes en medio líquido Moser b y Agua, se lograron aislar 100 cajas petri con 2 cortes transversales cada una, obteniendo los porcentajes de crecimiento y contaminación en relación a cada uno de los medios utilizados (Tabla 2).

Tabla 2. Número y porcentajes de crecimiento y contaminación de los cortes transversales aislados en cajas con medio PDA y Moser b.

	Medio de cultivo		Total
	PDA	Moser B	
Nº Sembrados	100	100	200
Nº aislados	19	29	48
Nº contaminados	46	50	96
Nº sin crecimiento	36	20	56
		Total	200

El número inicial de cajas en cada medio de aislamiento fué de 50, cada una con dos cortes

Del total de cortes aislados el 24% presentaron crecimiento el mismo que fue lento (entre 8, 15 y 30 días); la mayor parte de los hongos comenzaron a crecer a partir de la primera y segunda semana, mientras que pocos comenzaron su crecimiento luego de este periodo, hasta aproximadamente 30 días después de su aislamiento en cajas petri independientemente del medio de cultivos en el que fueron aislados. (Tabla 3).

Tabla 3. Tiempo de crecimiento de los aislados desde que el corte transversal fue colocado en el medio Moser b y PDA

Medio	Observación del diámetro del micelio.	PDA		MOSER B	
		Nro. de aislados	% de aislados	Nro. de aislados	% de aislados
8 Días	0,5cm	5	26,32	10	34,49
15 Días	0,5cm	7	36,84	15	51,72
30 Días	0,5cm	7	36,84	4	13,79
Total		19	100	29	100

El medio Moser b fué el que permitió el mayor crecimiento de los hongos endófitos en cultivo en menor tiempo (8 y 15 días); la mayoría de los hongos que crecieron en este medio fueron de crecimiento medio (2cm), con aspecto algodonoso y con coloraciones blanquecinas a rosáceas, amarillentas y castañas. Por otro lado Potato Dextrosa Agar (PDA Difco) se observaron aislados de color blanco pardo, con un micelio aéreo, y bien adherido al substrato, pero su crecimiento fué mas lento (15 y 30 días).

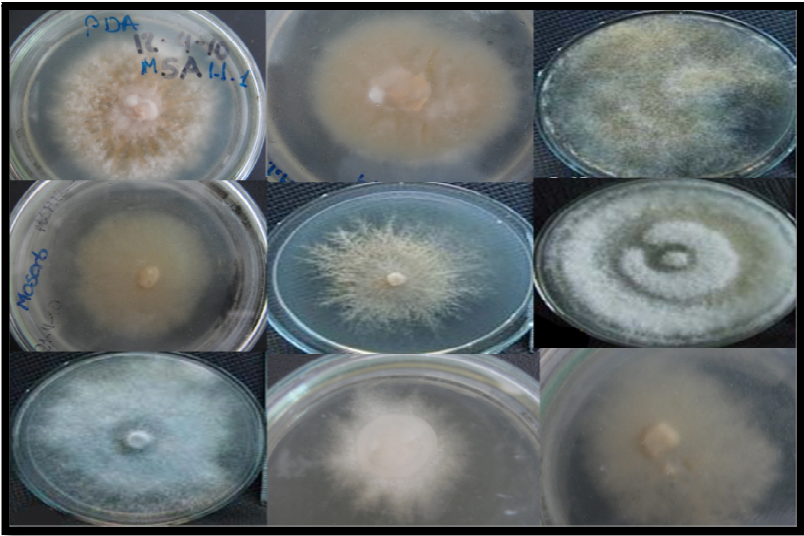
5.3. Agrupamiento y conservación de aislados

Siguiendo el procedimiento de separación de aislados de acuerdo a las características macroscópicas, se pudieron distinguir 6 grupos diferentes de endófitos (Tabla 4),(Fig.8). Facilitando la exclusión de hongos contaminantes como especies de *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* entre otros.

Tabla 4. Clasificación de los aislados de acuerdo a sus caracteres macroscópicos.

Grupos	N° Aislados	Variables				% respecto al total
		Color	Tamaño	Aspecto	Tiempo de Crecimiento desde su siembra	
1	12	Crema	1-2 cm	Plano	8-15 días	25
2	14	Amarillo claro-rosado	2-3 cm	Plano	15-30 días	29,17
3	5	Amarillo-café oscuro	3-4 cm	Algodonoso	8 días	10,42
4	4	Blanco	4-5 cm	Algodonoso	8-15 días	8,33
5	9	Blanco	1-2 cm	Aterciopelado	15 días	18.7
6	4	Rosado	2-3 cm	Algodonoso y con granulosidades	15 días	8,33
	48					100

Fig. 8 Fotografías de hongos aislados tentativos para *Tulasnella*



5.4. Resultados , PCR.

48 de los cultivos que presentaron crecimiento fueron sospechosos de ser *Tulasnella*. Se extrajo el DNA de estos cultivos puros, y fueron amplificados con un primer general y un específico para el género *Tulasnella*, obteniéndose igual número de productos, es decir 48 productos tentativos para *Tulasnella* spp. (Fig. 8)

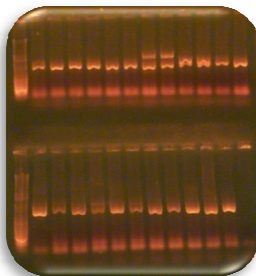


Fig. 8 Electroforesis en gel de agarosa.

El número de aislados que se obtuvieron pertenecen a 18 orquídeas de las 25 estudiadas, que en muchos de los casos aún no han sido identificadas en el sitio de estudio. (Tabla 5)

Tabla 5. Muestras de orquídeas que reportaron *Tulasnella* spp.

Cantidad de aislados	Género Aislado	Código huésped	Especie Huésped	Sitio de colección
2	Tulasnella	2TA-1	No identificada	2
3	Tulasnella	2TA-2	No identificada	2
1	Tulasnella	2TA-3	Maxillaria sp.	2
2	Tulasnella	2TA-4	No identificada	2
2	Tulasnella	2TA-5	No identificada	2
1	Tulasnella	2TE-1	Prosthechea sp.	2
4	Tulasnella	2TE-2	Maxillaria sp.	2
6	Tulasnella	2TE-3	No identificada	2
5	Tulasnella	2TE-4	No identificada	2
2	Tulasnella	3TF-1	No identificada	3
2	Tulasnella	3TF-2	No identificada	3
3	Tulasnella	3TF-3	No identificada	3
2	Tulasnella	2TG-3	Prosthechea sp.	2
3	Tulasnella	3TG-5	Maxillaria sp.	3
2	Tulasnella	2TH-1	Prosthechea sp.	2
4	Tulasnella	2TH-2	No identificada	2
2	Tulasnella	2TH-3	Sobralia sp.	2
2	Tulasnella	2TH-4	No identificada	2

6. DISCUSIÓN

Los cultivos in vitro de *Tulasnella* no han sido exitosos con muchas metodologías, Suárez (2006) logró tres aislados de *Tulasnella* spp. En nuestro trabajo se selecciono muy bien las raíces colonizadas, donde se observó detalles como ovillos fúngicos en varias etapas de digestión y recambio por una nueva infección (Benzing 1981; Esnault *et al.* 1994; Suárez *et al.* 2008). La colonización de estos hongos al ser mucho más en las células corticales externas que en las células internas sugiere que la infección luego de pasar el velamen se dirige de célula a célula (Suárez *et al.* 2008).

Benzing (1981) menciona que la colonización de los hongos micorrizicos de las orquideas se mantiene en mayor porcentaje entre las partes más jóvenes y más viejas de la raíz. Para evitar contaminantes aplicamos el método utilizado por Suárez 2006, que se basa en remoción del velamen y esterilización de la parte externa, sumado a esta metodología el número de cortes a aislar y las raíces en varias etapas de desarrollo, sin olvidar el chequeo previo de colonización, y en lugar de sembrar pelotones aislados de la célula cortical, se sembró el corte transversal completo, asegurando de esta forma la presencia del ovillo fúngico.

Una de las dificultades más grandes en aislar hongos micorrizicos es la exigencia del medio de cultivo, debido a los requerimientos nutricionales y ambientales especiales de éstos hongos (Stretton 1964). Así lo demuestran los esfuerzos por aislar este tipo de hongos Suárez (2006) con tres aislados de *Tulasnella* spp y Herrera (2007) sin ningún aislado.

La preparación de los de cortes con mayor cantidad de pelotones se convirtió en un punto importante para hacer exitoso el aislamiento de hongos endófitos a partir de raíces especialmente *Tulasnella* spp., ya que en el método descrito por Zhu *et al.* (2008) nos dice que al ser incubados los cortes a una temperatura de 18 °C se inhibe el crecimiento de bacterias, promoviendo el crecimiento del hongo.

El éxito de nuestra técnica también se la debemos a la utilización de los medios sólidos Papa Dextrosa Agar (PDA Difco) y Moser b que mostraron en trabajos anteriores como el de Díaz (2009) un mayor diámetro de micelio para los cultivos. El crecimiento en medio Moser b fue mucho más rápido con relación al Papa Dextrosa Agar (PDA Difco), pero en los dos se obtuvieron aislados de características similares a las reportadas por Warcup & Talbot (1967, 1971, 1981) para este tipo de hongos micorrízicos por ejemplo, a los cultivos que se les realizó extracción tuvieron entre sus características un color rosáceo o blanquecino cremoso, y en otros tenían un color rosa más intenso, crecimiento lento, micelio poco abundante e hifas ramificadas.

Las características microscópicas y macroscópicas de los cultivos *in vitro* no siempre son las más precisas, y no permiten determinar grupos establecidos concretos ya que muchos hongos en cultivo *in vitro* generan similares tipos de hifas como moniloides, coloración etc, y además estas características pueden variar y modificarse por el número de sub cultivos, la edad del aislado, el medio de cultivo, nutrientes disponible, etc, (Rangel 2006) por lo que es requerida la herramienta molecular para comprobar nuestras observaciones.

Los aislados tentativos de *Tulasnella* spp. se los confirmó mediante PCR con la aplicación de la combinación de primers ITS1/ITS4Tul, eficaz para este género (Cruz *et al.* 2010), obteniéndose el 24% de los aislados puros como *Tulasnella* spp., constituyéndose así el uso de nuestra técnica conjuntamente con la combinación de primers en una técnica prometedora para aislar hongos potencialmente micorrízicos desde raíces de orquídeas por su alta eficacia.

El ADN desde cultivo puro da menos problemas para ser amplificado, pero de igual forma se debe mantener un cuidado al seleccionar el micelio evitando grandes cantidades de agar que se convierte en inhibidor de PCR, pero para evitar cualquier inconveniente también adicionamos al mix de PCR Serum Bovine Albumine (BSA) que es capaz de capturar una variedad de

sustancias y por consiguiente prevenir el ligamiento e inactivación de la polimerasa (Kreader 1996).

La combinación de una técnica de aislamiento apropiada conjuntamente con medios de crecimiento que proporcionan los nutrientes necesarios para el desarrollo de hongos micorrízicos, además del trabajo molecular y las características macroscópicas permitieron la determinación de Tulasnellales en el tejido cortical de las micorrizas individuales confirmando la interacción mutualista indicativa de las micorrizas de Orquídea (Peterson & Massicotte 2004)

Es importante mencionar que con los resultados obtenidos en esta investigación se pretende realizar la secuenciación de los aislados positivos para una identificación completa, y puedan ser usados para futuras investigaciones que puedan incluir pruebas de inoculación *in vitro* de plántulas de orquídeas para mejorar su sobrevivencia durante la aclimatación y estudios de filogenia utilizando otros genes a más de los nucleares de RNA ribosomal. También, será posible estudiar las características morfológicas macro y microscópicas de los diferentes tipos de hongos aislados, en estudios fisiológicos y en la inducción de estados sexuales.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Alexander C. & Hadley G. 1985. Carbon movement between host and mycorrhizal endophyte during the development of the orchid *Goodyera repens*. *New Phytologist* 101: 657–665.
2. Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. & Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. John Wiley & Sons, New York, USA. Benzing D, 1982. Mycorrhizal Infections of Epiphytic Orchids in Southern Florida. *American Orchid Society Bulletin* 51(6):618-622.
3. Benzing, D. (1981) Why is Orchidaceae so large, its seeds so small, and its seedlings mycotrophic? *Selbyana* 5: 241–242.
4. Bidartondo M, Bruns T, Weiß M, Sérgio C, Read D, 2003. Specialized cheating of the ectomycorrhizal symbiosis by an epiparasitic liverwort. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 835-842.
5. Bidartondo MI, Burghardt B, Gebauer G, Bruns TD, Read DJ. 2004. Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proceedings of the Royal Society London Series B* 271: 1799–1806.
6. Bourdot, H. & Galzin A. (1928). Hymenomycetes de France. Heterobasidiés. Homobasidiés. Gymnocarpes. *Biblioth. Mycol.* 23 (reprint, 1969).
7. Brundrett C. M. 2002; Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants, *NEW PHYTOLOGIST.*, 154: 275–304
8. Brundrett MC, Abbott LK1991, Roots of jarrah forest plants. I. Mycorrhizal associations of shrubs and herbaceous plants. *Australian Journal of Botany* 39, 445–457. doi: 10.1071/BT9910445

9. Brundrett, M. C., Ashwath, N. & Jasper, D. A. (1996b) Mycorrhizas in the Kakadu region of tropical Australia. II. Propagules of mycorrhizal fungi in disturbed habitats. *Plant and Soil* 184: 173–184.
10. Burgeff, H. (1936). *Samenkeimung der Orchideen*. Jena: G. Fischer.
11. Burgess, T., Dell, B. & Malajczuk, N. 1994. Variations in mycorrhizal development and growth stimulation by 20 *Pisolithus* Diversity and classification of mycorrhizal associations 489 isolates inoculated on to *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. *New Phytologist* 127, 731–739.
12. Cameron D, Leake J, Read D, 2006. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant–fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytologist* 171: 405–416.
13. Cameron DD, Leake JR, Read DJ., 2007, Mycorrhizal Acquisition of Inorganic Phosphorus by the Green leaved Terrestrial Orchid *Goodyera repens*. *OXFORD JOURNALS*. 99: 831–834,
14. Cruz D, & Suárez J. P. & Kottke I. 2010 Defining species in *Tulasnella* by correlating morphology and nrDNA ITS-5.8S sequence data of basidiomata from a tropical Andean forest *Mycol Progress* DOI 10.1007/s11557-010-0692-3
15. Currah R, zelmer C, Hambleton S, Richardson K, 1997. Fungi from orchid mycorrhizas. In: *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*, VII. Edited by Joseph Arditti y Alec M. Pridgeon. Kluwer Academic Publishers. pp:117-170.
16. Dearnaley, J.D.W. (2007). Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza* 17: 475-486

17. Díaz G, Flores R, & Honrubia M., 2009 Descripción de cultivos miceliares de Boletales neotropicales y europeos *Boletus* grupo *edulis*, *Boletellus* y *Suillus* y formación de primordios de *B. edulis* en cultivo puro. pp. 1-4
18. Dixon K. 2003. Raising terrestrial orchids from seed, p. 47–100. *In*: W. K. Harris (ed.), *Modern orchid growing for pleasure and profit*. Orchid Club of S. Australia, Inc. Adelaide, S. Australia.
19. Dodson CH, 2003 *Native Ecuadorian Orchids, Volume 4: Oncidium-Restrepopsisa*.
20. Esnault A, Masuhara G, McGee P, 1994. Involvement of exodermal passage cells in mycorrhizal infection of some orchids. *Mycol. Res.* 98(6): 672-676.
21. Eustáquio R, Liparini O, Megumi M, Silva M, Pimentel M, 2005. Fungos micorrízicos associados a orquídeas em campos rupestres na região do Quadrilátero Ferrífero, MG, Brasil. *Acta bot. bras.* 19(3): 417-424.
22. Gams W, Hoekstra E, Aptrot A, 1998. *CBS Course of Mycology. Fourth edition.* Centraalbureau voor Schimmelcultures, Netherlands.
23. Griesbach RJ (2002) Development of *Phalaenopsis* orchids for the mass-market. *In*: Janick J, Whipkey A (eds) *Trends in new crops and new uses*. ASHS, Alexandria, USA
24. Hamilton K. (2005). *Testing genuine savings. Policy, research working paper WPS3577.* Washington, DC, World Bank.
25. Harley JL, Harley EL (1987) A check-list of mycorrhiza in themBritish flora. *New Phytol* 105:1–102
26. Harley, J.L. and Smith, S.E., 1983, *Mycorrhizal Symbiosis* (Academic Press, London).

27. Harvais G, Hadley G, 1967. The relation between host and endophyte in orchid mycorrhiza. *New Phytol.* 66:205-215
28. Herrera P. 2007 "Aislamiento de *Tulasnella* spp. (Basidiomycota) a partir de raíces de cuatro especies de orquídeas epifitas" Tesis de grado previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico, Universidad Técnica Particular de Loja – Ecuador.
29. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, *et al.* 2007A higher-level phylogenetic classification of the *Fungi*, *Mycological Research* 2007, doi: 10.1016/j.mycres.2007.03.004
30. James Y, Kauff F, Schoch CL *et al* (2006) Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443:18–822
31. Jong S, Birmingham J, (2001). Cultivation and Preservation of Fungi in Culture. In: *The Mycota VII Part B, Systematics and Evolution.* Mclaughlin/Mclaughlin/lemke (eds.) Springer-Verlag BerlinHeidelberg. pp:193-202.
32. Kottke I, *et al.* 2007, Guilds of mycorrhizalfungi and their relation to trees, ericads, orchids and liverworts in a neotropical mountain rain forest., *ELSEVIER*, 1-10
33. Kottke I, Suárez J. P, Herrera P, Cruz D, Bauer R, Haug I, & Garnica S, 2010 Atractiellomycetes belonging to the 'rust' lineage (Pucciniomycotina) form mycorrhizae with terrestrial and epiphytic neotropical orchids, *Proc. R. Soc. B* (2010) 277, 1289–1298
34. Kottke I. & Suárez, J. P. 2009 Mutualistic, root-inhabiting fungi of orchids—identification and functional types. In *Proc. Second Scientific Conf. on Andean Orchids* (eds A. M. Pridgeon & J. P. Suárez), pp. 84–99. Loja, Ecuador:

Universidad Técnica Particular de Loja.(ISBN 978-9942-00-502

35. Kreader CA, 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1102–1106.
36. Larrea P, 2002. Estudio de Prefactibilidad para la exportación de Orquídeas In Vitro a Florida, Estados Unidos. Tesis Ing. Agr. Tegucigalpa, Honduras, Zamorano 140 p.
37. Linares J.L. 1993. Propagación *in vitro* de la orquídeas *Rhyncholelia digbyana* (Lind.) Schytr. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamerica. 88p.
38. Liparini O., Kasuya M., Borges A., & Fernandes de Araújo E. 2005 Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil, *Can. J. Bot.* 83(1): 54–65 (2005) | doi:10.1139/b04-151 | © 2005 NRC Canada
39. Ma M., Tan K. T., Wong M. S., 2003, Identification and Molecular Phylogeny of Epulorhiza isolates from tropical orchids”. *MYCOLOGY RESEARCH* 107 (9): 1041-1049
40. Masuhara G, Katsuya K, 1991. *In situ* and *in vitro* specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames. Var. *Amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). *New Phytol.* 127:711-718.
41. Moore, R. T. 1987. The genera of *Rhizoctonia*-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen. nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Moniliopsis*, and *Rhizoctonia*. *Mycotaxon*, 29:91–99.
42. Otero J, Ackerman J, Bayman P, 2002. Diversity and host specificity of endophytic Rhizoctonia-Like fungi from tropical orchids. *Journal of Botany* 89(11): 1852-1858.

43. Pereira OL, Kasuya MCM, Borges AC, Fernández de Araujo E, 2005. Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. *Canadian Journal of Botany* 83: 54–65.
44. Pereira OL, Rollemberg CL, Borges AC, Matsuoka K, Kasuya MCM, 2003. *Epulorhiza epiphytica* sp. nov. Isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. *Mycoscience* 44: 153–155
45. Peterson RL, Massicotte HB, Melville LH (2004) *Mycorrhizas: anatomy and cell biology*. NRC Research Press, Ottawa
46. Rangel M, 2006. Germinación simbiótica y reintroducción de Orquídeas Terrestres en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, México, D.F. Universidad Autónoma de México.
47. Rasmussen, H. N. (1995) *Terrestrial Orchids from Seed to Mycotrophic Plant*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
48. Rivera R, 2002. Guía ilustrada de 55 especies de Orquídeas encontradas en la Reserva Biológica de Yuscarán, Honduras, Trabajo de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero en Desarrollo Socioeconómico y Ambiente en el Grado Académico de Licenciatura, Zamorano Honduras
49. Roberts P, 1999. Great Britain. Rhizoctonia-forming fungi, A taxonomic guide. Edit. Whitstable Litho Printers Ltd., Whitstable, Kent. (1-5pp).
50. Sharma J, Zetizer W. L, and Sambeek V.J.W, 2003 A Survey of Mycobionts of Federally Threatened *Platanthera praeclara* (Orchidaceae)., *SYMBIOSIS* 34: 145-155

51. Sharon M, Kuninaga S, Hyacumachi M, Naito S, Sneh B (2008) Classification of Rhizoctonia spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. *Mycoscience* 49:93–114
52. Shimura H, Koda Y, 2005 Enhanced symbiotic seed germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* following inoculation after cold treatment. *Physiol Plant* 123:281–287
53. Smith SE, Read DJ, 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*, 2nd edn. Academic Press., San Diego, California. Stretton H, McKenzie A, Kenneth F, Flentje N, 1964. Formation of the Basidial Stage of Some Isolates of Rhizoctonia. *Phytopathology* 54: 1093-1095.
54. Stretton HM, McKenzie AR, Baker KF, Flentje NT. 1964. Formation of the basidial stage of some
55. Suárez J. P. 2006. Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest., *ELSEVIER* 1257-1270.
56. Suárez J. P. *et al.* 2008, Members of Sebacinales subgroup B form mycorrhizae with epiphytic orchids in a neotropical mountain rain forest; *MYCOL PROGRESS*
57. Taylor DL, Bruns TD (1997) Independent, specialized invasion of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 944510–4515
58. Taylor, D. L., Bruns, T. D., Leake, J. R. & Read, D. J. 2002 Mycorrhizal specificity and function in mycoheterotrophic plants. In *Mycorrhizal ecology. Ecological Studies* 157 (eds M. G. A. van der Heijden & I. Sanders), pp. 375–413. Berlin, Germany: Springer Verlag.
59. Vilgalys R, & Hibbet, D. S., 1993. Phylogenetic relationships of *Lentinus* (Basidiomycotina) inferred from

- molecular and morphological characters. *Syst.Bot.* 18:409–433.
60. Warcup J. H & Talbot P. H. B. 1980. Perfect states of rhizoctonias associated with orchids. III *NEW PHYTHOLOGIST* 86: 267-272
 61. Warcup J. H & Talbot P. H. B. 1971. Perfect states of rhizoctonias associated with orchids. II. *NEW PHYTHOLOGIST* 76: 35-40.
 62. Warcup J. H, & Talbot P. H. B, 1967. Perfect States of Rhizoctonias Associated with Orchids, 631-641.
 63. Warcup JH (1981) The mycorrhizal relationships of Australian orchids. *New Phytologist* 87, 371–381.
 64. Wells K, Bandoni R. 2001. Heterobasidiomycetes. In: *The Mycota VII Part B Systematics and Evolution*. McLaughlin/McLaughlin/Lemke (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg 4p:85-120
 65. Yoder JA, Zettler LW, Stewart SL (2000) Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. *Plant Sci*156:145–150
 66. Yukawa, T., Ogura-Tsujita, Y., Shefferson, R. P. & Yokoyama, J. 2009 Mycorrhizal diversity in *Apostasia* (Orchidaceae) indicates the origin and evolution of orchid mycorrhiza. *Am. J. Bot.* 96, 1997–2009. (doi:10.3732/ajb.0900101)
 67. Zelmer C, Cuthbertson, Currah R, 1995. Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. *Mycoscience* 37: 439-448.
 68. Zettler, L. W. 1997. Orchid-fungal symbiosis and its value in conservation. *Mcllvainea*, 13:40–45.

69. Zhu, G.S., Yu, Z.N., Gui, Y. and Liu, Z.Y. 2008. A novel technique for isolating orchid mycorrhizal fungi. *Fungal Diversity* 33: 123-137.

8. ANEXOS

A1.Preparación del medio Moser b recomendado para *Tulasnella* y *Sebacina*, según la Botánica Sistemática y Micología de la Universidad de Tübingen - Alemania.

Reactivos	1000ml
KH₂PO₄	0,35g
K₂HPO₄	0,15g
NH₄NO₃	1,00g
NaNO₃	0,30g
MgSO₄x7H₂O	0,50g
CaCl₂x2H₂O	0,10g
Glucose	10,00g
Maltose	10,00g
Saccharose	10,00g
Malt extract	10,00g
Universal Peptone	1,00g
Thiamin	0,5ml (stock solution in the fridge: 10mg in 100ml)
Biotin	0,02ml (stock solution in the fridge: 10mg in 100ml)
Inosit	100mg 0,1g
ZnSO₄x7H₂O	1ml (stock solution in the fridge: 100mg in 100ml)
FelIIICl₃x6H₂O	10ml (stock solution in the fridge: 100mg in 100ml)
MnSO₄xH₂O	5ml (stock solution in the fridge: 100mg in 100ml)
Agar	15g

