



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Caracterización molecular de micorrizas de
orquídeas del género *Teagueia* spp.**

Trabajo de fin de titulación

AUTOR: Torres Quintero, Rony Vladimir

DIRECTOR: Suárez Chacón, Juan Pablo, Dr.

LOJA- ECUADOR

2012

CERTIFICACIÓN DE APROBACIÓN

Doctor

Juan Pablo Suárez Chacón

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA:

Que una vez revisado el trabajo de investigación realizado por el Sr. Rony Vladimir Torres Quintero, previo a la obtención del título de BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, Septiembre 2012

Dr. Juan Pablo Suárez Chacón
DIRECTOR DE TESIS

AUTORÍA

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

Rony Vladimir Torres Quintero

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico:

A Dios por iluminar mi vida.

A la memoria de mi hermano Lenin Rodrigo Torres Quintero que en la gloria de Dios se encuentra.

A mis queridas tías la Lic. Julia Torres y la Dra. Carmen Torres por ser quienes con sus brazos abiertos y llenos de amor apoyo incondicional desde el primer día me han brindado.

A la Mg. Melania González por su gentil apoyo en el transcurso de mi carrera estudiantil.

A mi padre, a mi madre y hermanos menores, deseando los inspire a seguir con entusiasmo y esfuerzo por alcanzar los mejores triunfos en su vida.

Rony Vladimir Torres Quintero

AGRADECIMIENTO

Expreso mi gratitud:

De manera especial al Dr. Juan Pablo Suárez Chacón por brindarme su apoyo incondicional en el desarrollo del presente trabajo.

A los Bioquímicos Paulo Herrera, Darío Cruz por su gentil colaboración en el proceso de asesoramiento para la culminación exitosa de esta investigación.

A la Bq F. Romina Acevedo por su total ayuda en el desarrollo del presente trabajo.

A todo el equipo de trabajo del área de Micorrizas del Centro de Biología Celular y Molecular por acogerme como uno de sus integrantes durante todo este período.

A todas las personas que han sido partícipes en mí acontecer académico desde el primer día hasta hacer posible mi meta propuesta.

Rony Vladimir Torres Quintero

CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Rony Vladimir Torres Quintero, 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”.

Rony Vladimir Torres Quintero
Tesista

Dr. Juan Pablo Suárez Chacón
Director de Tesis

CONTENIDO	Pag
CARÁTULA.....	I
CERTIFICACIÓN.....	II
AUTORÍA.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHOS DE TESIS.....	VI
RESUMEN.....	VIII
ARTICULO.....	IX
1. Propósitos del Proyecto	1
2. Introducción.....	2
3. Materiales y métodos.....	5
3.1. Sitio de Estudio	5
3.2. Muestreo.....	5
3.3. Determinación del porcentaje de Colonización.....	6
3.4. Extracción de DNA, PCR, Cloning, Purificación y Secuenciación de DNA.....	7
3.5. Análisis Filogenético	8
4. Resultados	10
4.1. Porcentaje de Colonización.....	10
4.2. Análisis Filogenético.....	11
5. Discusión.....	18
5.1. Verificación del Estado Micorrízico.....	18
5.2. Análisis Filogenético.....	18
6. Conclusiones.....	20
7. Recomendaciones.....	21
8. Bibliografía.....	22
9. Anexos.....	25

RESUMEN

Los estudios en micorrizas reflejan una potencial ayuda para la gran familia de orquidáceas y su conservación. Esta simbiosis hongo-planta permite brindar a la orquídea los nutrientes principales para germinar y desarrollarse; claramente los estudios en estos hongos nos pueden revelar datos de gran interés para promover, mejorar su desarrollo y conservación en un medio natural.

Se recolectaron 37 muestras de raíces de orquídeas terrestres pertenecientes al género *Teagueia* en la cuenca alta del río Pastaza. Mediante microscopía se verificó y se calculó porcentajes de colonización de las muestras, además se usaron pruebas moleculares como PCR, Cloning molecular, BLAST y procesos de análisis filogenéticos para la identificación de especies.

Se lograron identificar micorrizas pertenecientes a los órdenes Tulasnellales y Atractiellales, haciendo de esta investigación un primer reporte a nivel molecular de los hongos simbioses de este género de Orquídeas.

Esta investigación se convierte en el segundo reporte de que los hongos pertenecientes al orden Atractiellales, son un grupo importante dentro de las clasificaciones de hongos con capacidad micorrízica, hasta hace poco solo se lo clasificaba como parásitos y saprofitos.

ARTICULO

Molecular characterization of mycorrhizal fungi associated with some species of genus *Teagueia* (Orchidaceae).

R. Vladimir Torres, Universidad Técnica Particular de Loja, Centro de Biología Celular y Molecular

Corresponding author; E-mail ronyvladimir@gmail.com

SUMMARY

Studies on mycorrhiza reflect a potential aid to the great family Orchidaceae and their conservation. This fungus-plant symbiosis allows provide the orchid key nutrients to germinate and grow, clearly studies in these fungi can reveal data of great interest to promote, and improve their development and conservation. 37 samples of roots were collected from terrestrial orchids of the genus *Teagueia* in the upper basin of the Pastaza River. Percentage of colonization was verified and calculated through microscopy of the strained roots, Molecular tests as PCR (with universal and specific primers), molecular cloning and BLAST were used to identify the micorrhizal fungi to genus level. *Tulasnellales* and *Atractielalles* genus were identified as mycorrhizal fungi associated with orchids of genus *Teagueia*. This research is the first molecular report of this symbiotic fungus.

INTRODUCTION

Mycorrhizae are a symbiotic association between one or more fungi associated with plant roots in which there is an exchange of nutrients and minerals (Cameron 2006), this exchange takes place from the soil to the plant promoting growth of protocorm nonphotosynthetic (Smith & Read 1997). In Ecuador one quarter of all vascular plant species belongs to the family Orchidaceae with around of 4000 identified species (Dodson 2003). Fungi belonging to the subphylum Basidiomycotina, with orders *Tulasnellales*, *Sebacinales*, *Ceratobasidiales* and *Atractielalles* have been reported as the most common orchid mycorrhizal fungi (Suárez *et al.* 2006, Kottke *et al.* 2010).

Until year 2000, only six species were reported for the genus *Teagueia* (Orchidaceae), all with restricted distributions to geographic hollow between Patate-Pelileo and Puyo (Jost 2004).

Recently twenty new species of *Teagueia* were described by Lou Jost in the northern region of Ecuador, Tungurahua province, near city of Baños in the upper basin of Pastaza river (Jost 2004) (Fig. 1a). The twenty species share characteristics not found in those already described, known in other parts of the world. This means that new species of this region *Teagueia* have probably evolved from a common ancestor

in the same region. Orchids of the *Teagueia* genus are characterized by terrestrial and live in the heights, being predominant from 2800 to 3300 m a.s.l (Jost 2004).

Under natural conditions orchid seeds are transported by wind or water long distances from their plants and deposited on the surface of trees or the ground where they can germinate (Brundrett 2002). Orchids can produce thousands of tiny seeds lacking carbohydrate reserves. Orchid seeds need a specific fungus to

germinate in nature (Shimura & Koda 2005).

The identification of micorrhizal fungi is important to improve conservation strategies of orchids in the wild (Dixon *et al.* 2003; Otero *et al.* 2002; Zetter *et al.* 1997). Studies on mycorrhizal fungi of orchids have been restricted to molecular data obtained from roots of orchids as well cultures (Ma *et al.* 2003, Moore 1987, Pereira *et al.* 2003, 2005, Warcup 1980). Only through molecular phylogeny studies can be fully understand quickly.

Previously the phylogenetic analyses were limited to descriptive and speculative studies of evolutionary relations, at present recent advances in this

methodology allows us to understand and exploit the statistical dependencies between sequences that share common ancestry in broad areas of research (Whelan *et al.* 2001).

5.8S and 28S are regions of nrDNA used mostly in phylogenetic analysis, being considered universal conserved regions as shown in publications such as Suarez *et al.* (2006), Shefferson *et al.* (2007), Taylor *et al.* (2008), Kottke (2010).

The objective of this research is to characterize the molecular micorrhizal fungi associated with orchids of the *Teagueia* genus, based on the ITS1, ITS2, 5.8S and partial 28S of nrDNA.

MATERIALS AND METHODS

1. Study site

The study site is located near to Baños city, Tungurahua Province (Ecuador) (Fig. 1a). The samples were collected in two sites in the region of Viscaya, 10km west of Mayordomo, at an altitude between 3100 to 3300 m a.s.l. (Fig. 1b).

The percentage individual and total of colonization are calculated as follows:
Was counted as 100% all cortical cells

Located within the diameter of the root section, after was counted the total cortical cells colonized, and the percentage of colonization was calculated with a single simple rule of three.

The percentage of total colonization was obtained from the average of all single colonization rates.

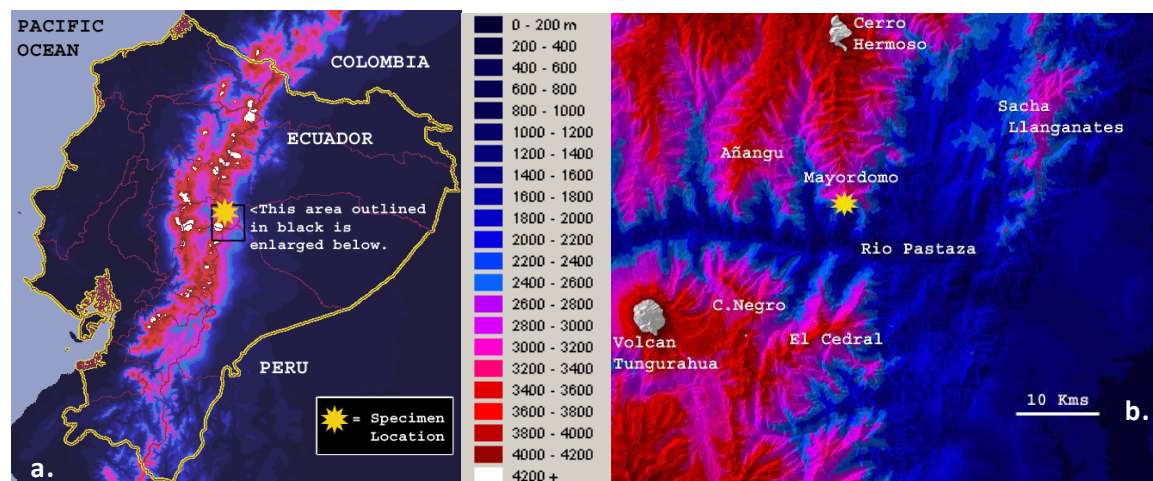


Fig. 1. a). Distribution in Ecuador *Teagueia* spp. (Lou Jost 2004) (<http://www.loujost.com>). **b)** Specimen location zone amplified. (Lou Jost 2004) (<http://www.loujost.com>)

2. DNA extraction, PCR, cloning, DNA purification and sequencing

Colonized root segments were macerated in liquid nitrogen for DNA extraction. We extract the DNA using the kit DNA DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen), according the manufacturer's instructions.

The PCR (Polymerase Chain reaction) was carried out with a universal primer pair combination for eukaryotes ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', White *et al.* 1990) and TW14 (5'GCTATCCTGAGGGAACTTC-

3'Cullings1994), to amplify the ITS1-5.8S-ITS2 and 28S partial region nrDNA. We used the Taq Phusion High-Fidelity PCR Mastermix (Finnzymes, Espoo, Finland). PCR amplification was verified in an electrophoresis using agarose gel 0.7%.

(128 V, 300 mA, 20 min), stained in an ethidium bromide solution at 0.5 g ml⁻¹ for 25 min.

The positive PCR products were cloned using the Zero Blunt TOPO PCR Kit DNA inserts we select by chance 12 colonies to amplify with the primers M13F and M13R modified (Krüger *et al.* 2009). PCR products were checked by agarose gels as described previously. Eight positive

(Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. To check the colonies were taken and purified using the SNAP Kit according to manufacturer's recommendations and sequenced in Macrogen (Seoul Korea), in one direction with primer M13F.

3. Phylogenetic analysis

We use BLAST to find published sequences with high similarity to our sequences on the nrITS-5.8S and 28S subunit LSU region in the NCBI nucleotide database (GenBank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). We divided of data set according two the preliminary identification made by BLAST.

For phylogenetic calculations sequences were aligned with available sequences in the NCBI using the method of multiple analysis (Lee 2001).

For phylogenetic calculations, the genetic regions 5.8S and 28S were aligned separately. All alignments were made using the "GINS-i" implemented in MAFFT v5.667 (Kato *et al.* 2002), without any manual correction of alignment.

The phylogenetic trees were performed using three different analysis for 5.8S and 28S subunit LSU: **i)** a Neighbour-joining (NJ) optimized in PAUP (Swofford

2002) using the modified BIONJ of algorithm NJ (Gascuel 1997); **ii)** a Bayesian analysis based on Markov chains, Monte Carlo (MCMC) was executed in MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001), including two runs each one with four Markov chains, with an increase of four million generations using the onset of random trees; and finally, trees were sampled every 100 generations, resulting in a total of 40000 trees, of which the last 30000 were used to calculate a consensus tree using majority rule with 50% of support. Each set of data were analyzed using the DNA substitution model DNA GTR + I + G (Swofford *et al.* 1996). **iii)** A maximum likelihood (ML) implemented in RAxML version 7.0.4 (Stamatakis 2006) was used with 1000 bootstrap replicates (Felsenstein 1985), using the GTRMIX algorithm to perform a tree inference and finding a good topology.

RESULTS

1. Percentage of root colonization

The average percentage of root colonization in *Teagueia* species was more than 50%, for all analyzed samples (Table 1)

Table 1. Percentage of colonization of the 10 *Teagueia* species

Species	Number of individuals sampled	Average percentage of root colonization
<i>T. cherisei</i>	4	68.1

<i>T. sancheziae</i>	5	55.1
<i>T. gracilis yellow</i>	6	62.2
<i>T. gracilis dark</i>	2	75.0
<i>T. hemispherica</i>	3	69.1
<i>T. cherisei red</i>	2	95.0
<i>T. shepardii</i>	2	50.0
<i>T. grossmanii</i>	1	66.7
<i>T. jostii</i>	2	62.5
<i>T. gnu</i>	1	63.6
<i>Indeterminate species</i>	9	64.50

2. Phylogenetic analysis

DNA was extracted from 37 samples of which 24 had PCR bands using ITS1/TW14 primers, of the 24 samples were taken 3 randomly to do cloning, this number was limited because that research is first in mycorrhizal of genus *Teagueia*. The species selected were: *Teagueia cherisei* (8449), *Teagueia gracilis dark* (8458) *Teagueia hemispherica* (8460). As results by cloning were obtained 12 clones by

sample from which we selected 8 for species, obtaining 24 sequences.

After preliminary comparison using BLAST (GenBank nucleotide database), 16 sequences had high similarity of species within *Tulasnella*, 5 related to the order Atractiellales, 2 to genus *Hyphoderma* and one close to an indeterminate basidiomycete (Table 2).

Table 2. The closest sequences in ITS-5.8S region nrDNA and LSU 28S mycorrhizal fungi present in *Teagueia* obtained by searching the GenBank using Blast tool.

Code	Related organism (Blast)	Access code (GenBank)	Order	BLAST Similarity
8449 cl 05	Uncultured <i>Tulasnella</i>	DQ178044	Tulasnellales	451/461 (97%)
8458 cl 03	Uncultured <i>Tulasnella</i>	DQ178044	Tulasnellales	461/471 (97%)
8449 cl 06	Uncultured <i>Tulasnella</i>	DQ178064	Tulasnellales	450/456 (98%)
8460 cl 07	Uncultured <i>Tulasnella</i>	DQ178064	Tulasnellales	453/459 (98%)
8458 cl 04	Uncultured Tulasnellales	DQ368696	Tulasnellales	703/737 (95%)
8460 cl 09	Uncultured Tulasnellales	DQ368696	Tulasnellales	703/737 (95%)
8449 cl 01	<i>Tulasnella asymmetrica</i>	DQ388047	Tulasnellales	732/761 (96%)
8460 cl 06	<i>Tulasnella asymmetrica</i>	DQ388047	Tulasnellales	754/784 (96%)
8458 cl 07	<i>Tulasnella asymmetrica</i>	DQ388047	Tulasnellales	754/784 (96%)
8460 cl 04	<i>Tulasnella asymmetrica</i>	DQ388047	Tulasnellales	754/784 (96%)
8449 cl 07	Uncultured <i>Tulasnella</i>	DQ178114	Tulasnellales	594/595 (99%)
8449 cl 04	Uncultured <i>Tulasnella</i>	DQ178114	Tulasnellales	590/596 (98%)
8460 cl 12	Uncultured <i>Tulasnella</i>	DQ178072	Tulasnellales	612/628 (97%)
8449 cl 03	<i>Tulasnella asymmetrica</i>	DQ388048	Tulasnellales	656/745 (88%)
8458 cl 09	<i>Tulasnella asymmetrica</i>	DQ388048	Tulasnellales	655/744 (88%)
8460 cl 11	Uncultured <i>Tulasnella</i>	GQ907066	Tulasnellales	529/617 (85%)
8460 cl 02	Uncultured Atractiellales	GU079596	Atractiellales	610/610 (100%)
8458 cl 08	Uncultured Atractiellales	GU079596	Atractiellales	630/630 (100%)

8460 cl 05	Uncultured Atractiellales	GU079596	Atractiellales	629/630 (99%)
8458 cl 01	Uncultured Atractiellales	GU079597	Atractiellales	630/630 (100%)
8449 cl 08	Uncultured Atractiellales	GU079597	Atractiellales	736/736 (100%)
8449 cl 02	<i>Hyphoderma cremeoalbum</i>	DQ677492	Poliporales	479/532 (90%)
8458 cl 02	Uncultured basidiomycete	FM997947	Basidiomycete ind.	562/658 (85%)
8458 cl 05	<i>Hyphoderma cremeoalbum</i>	DQ677492	Poliporales	486/539 (90%)

According to the similarity of sequences shown in Table 2, were calculate four phylogenetic trees, two with of *Tulasnella* sequences and two with the sequences of the Atractiellales.

To facilitate the location of the *Tulasnella* sequences from *Teagueia* spp. were identified groups A, B, C, D in the Figure 2 and A, B, C by Figure 3.

The analysis of 5.8S nrDNA (Fig. 2) allows to observe a relationship between mycorrhizal fungi that are colonizing the orchid genus *Teagueia* and some fungi that are colonizing the genus orchid *Pleurothallis* and *Stelis* in a montane forest. For Figure 2. The sequence A corresponds to a mycorrhizal fungus from *Teagueia cherisei* (8449 cl-04) related with sequences *Stelis hallii* (DQ178114) (DQ178113) and the sequence B from *Teagueia cherisei* (8449 cl-07).

The sequence C from *Teagueia hemispherica* (8460 cl-12) shares the same clade with a sequence from *Stelis concinna* DQ178075 and *Stelis superbiens*

(DQ178074). The clade D belong to sequences from *Teagueia* spp. related with a *Tulasnella asymmetrica* sequence (DQ388047).

In the phylogenetic tree obtained for the partial region of 28S nrDNA (Fig. 3), the clade A corresponds to sequences from *Teagueia* spp., related to *Tulasnella calospora* (DQ388041). The clade B corresponds to sequences from *Teagueia* spp related with sequences of mycorrhiza- from *Pleurothallis lilijae* (DQ178068), (DQ178067) and a clade with sequences from *Stelis hallii* (DQ178066) and *Stelis superbiens* (DQ178064). The clade C corresponds to sequences from *Teagueia* spp. related to a clade containing mycorrhizae sequences from *Tulasnella assymetrica* (AY15240) (DQ388047).

To Atractiellales analysis of the ITS1-5.8S-ITS2 nrDNA (Fig. 4) and for the partial region of nucLSU (Fig. 5) we obtained sequences grouped in a clade with sequences obtained from roots of orchids in a montane tropical rainforest in southern Ecuador (Kottke *et al.* 2010).

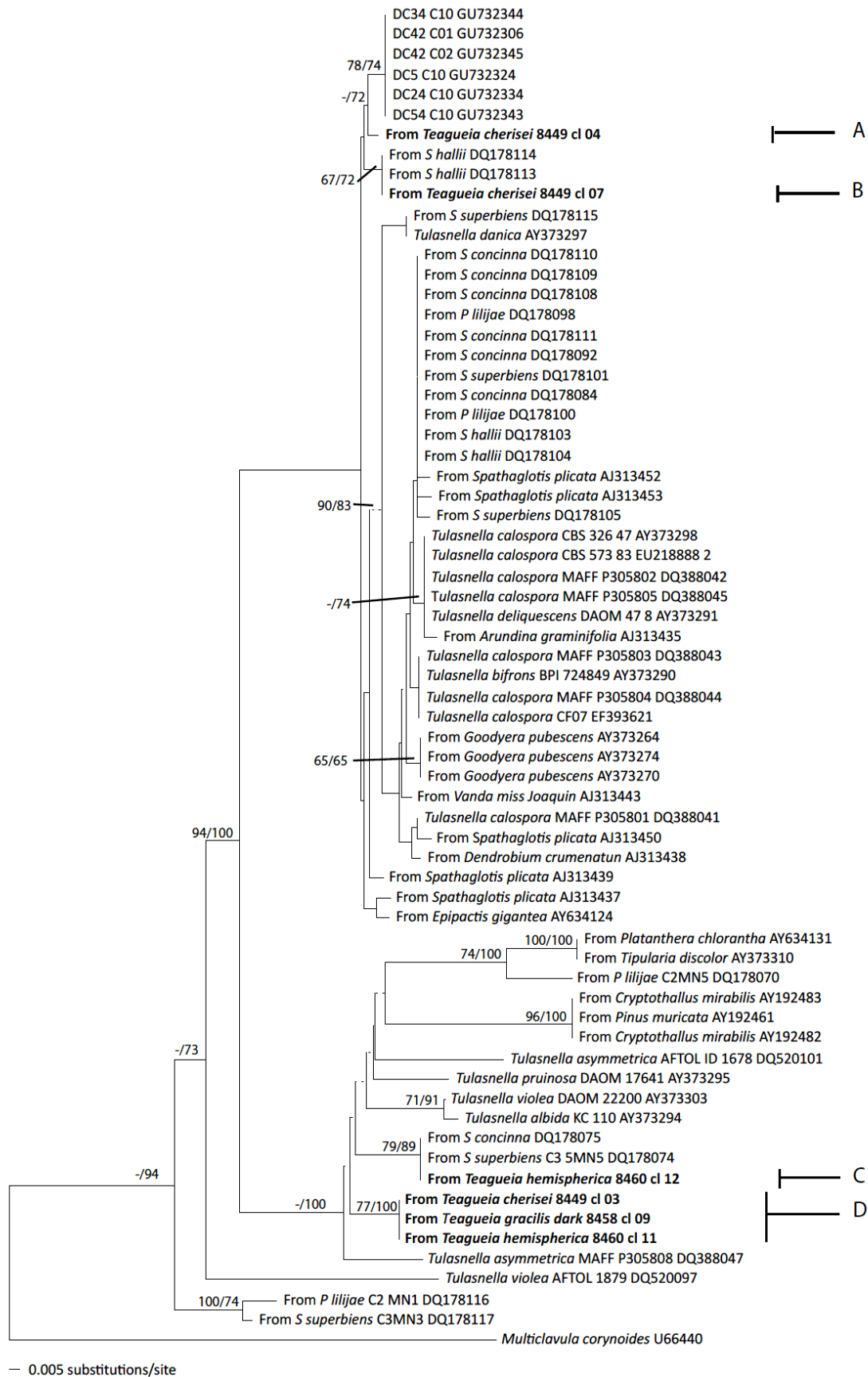


Figure 2. Phylogenetic hypothesis of *Tulasnella* spp. from orchids *Teagueia* spp. inferred from analysis of nrDNA ITS-5.8S region. Tree was calculated by Mrbayes and RaxML methods. The numbers on the nodes denote values greater than 50% since RaxML / Mrbayes.

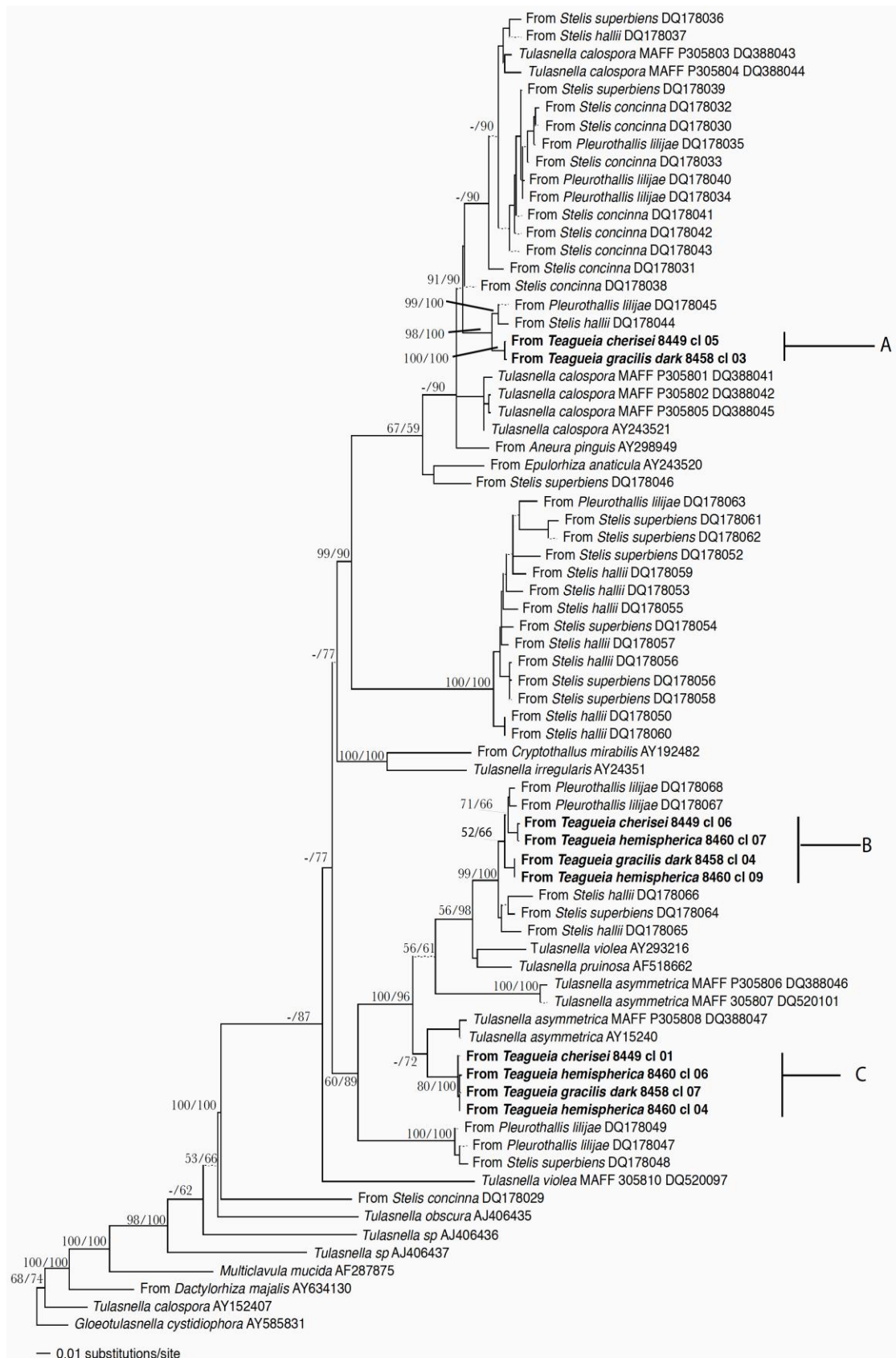


Figure 3. Phylogenetic hypothesis of *Tulasnella* spp. from orchids *Teagueia* spp. inferred from analysis of nrDNA 28S subunit LSU. Tree was calculated by MrBayes and RaxML methods. The numbers on the nodes denote values greater than 50% since RaxML / MrBayes.

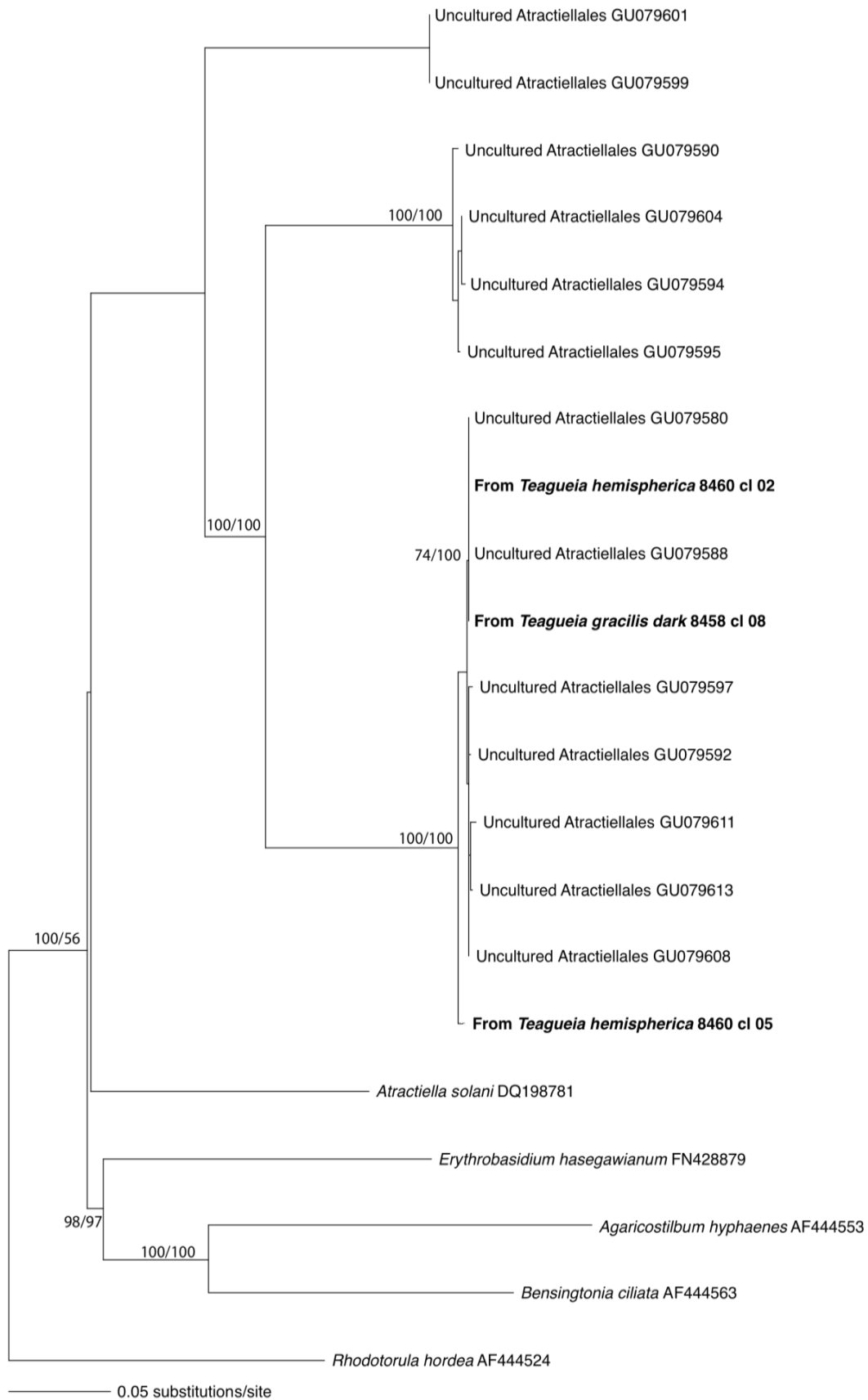


Figure 4. Phylogenetic hypothesis of Atractiellales from orchids *Teagueia* spp. inferred from analysis of the nrDNA. ITS-5.8S Tree was calculated by MrBayes and RaxML methods. The numbers on the nodes denote values greater than 50% since RaxML / MrBayes

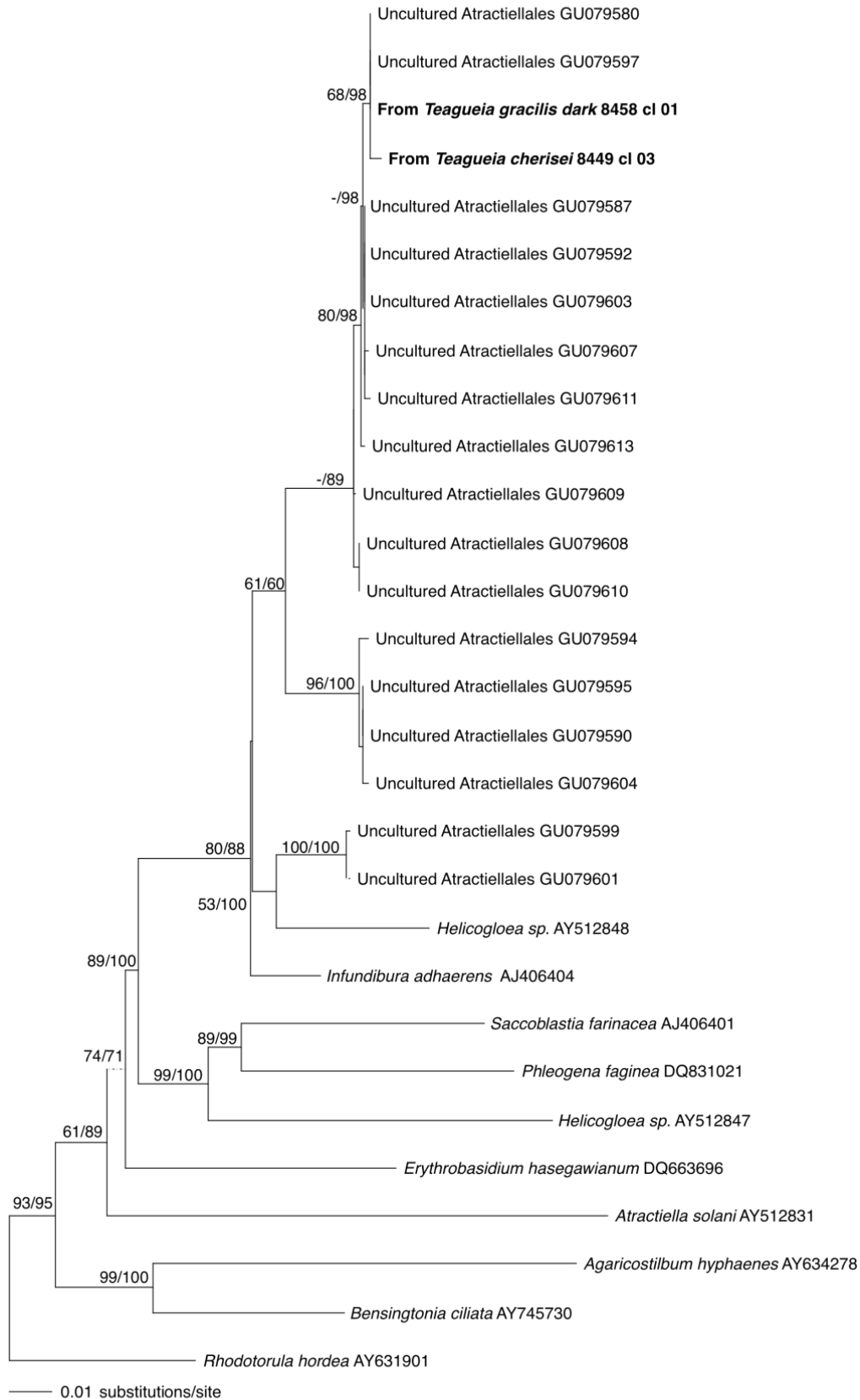


Figure 5. Atractiellales phylogenetic hypothesis from orchids *Teagueia* spp. inferred from the analysis Mrbayes RaxML and a partial region of 28 S nucLSU. The numbers on the nodes denote values greater than 50% since RaxML / Mrbayes.

DISCUSSION

We found in average a percentage of root colonization in *Teagueia* species more than 50% for all analyzed samples. This high colonization percentage suggests a dependence of this orchid species on mycorrhizal fungi. Orchids depend on fungi for seed germination, but mature plants must retain the fungi in their roots to ensure germination of the seedlings (Cameron 2006)

In the analysis 5.8S to *Tulasnella* spp. three of our sequences belong to *Teagueia cherisei*, one for *Teagueia gracilis dark* and two for *Teagueia hemispherica*. These were grouped into three clades (Fig. 2). The sequence obtained from *Teagueia cherisei* (8449 cl-04) form the clade A, very close to sequences obtained previously from fructifications of *Tulasnella* reported by Cruz *et al.* (2010). The *Tulasnella* sequence from *Teagueia cherisei* (8449 cl-07) form the clade B supported by a bootstrap value of 67/72% (RaxML / MrBayes), together with sequences from *Stelis hallii* reported by Suarez *et al.* (2006). *Tulasnella* sequence from *T. hemispherica* (8460 cl-12), is located in the clade C together *Tulasnella* sequences obtained from *Stelis concinna* and *Stelis superbiens* highly supported by a value of 79/89%. In addition, it formed a clade D of *Tulasnella* from 3 species of *Teagueia* (*T. cherisei*, *T. gracilis* and *T. hemispherica dark*) with a bootstrap support of 77/100%. We can observe a relationship between the sequences of *Tulasnella* spp. obtained from *Teagueia* spp. with those of *Stelis* spp. of Suarez *et al.* (2006), obtained from an Andean forest of southern Ecuador and sequences obtained from fruiting bodies of *Tulasnella* reported by Cruz *et al.* (2010) collected in the same forest.

For the 28S region (Fig. 3), we obtained 10 sequences, which are located in three different groups (A, B and C). In group A were located two sequences: the *Tulasnella* sequence from *Teagueia cherisei* (8449 cl-05) and *Teagueia gracilis dark* (8458 cl-03) supported by a value of 100/100% next to a clade of *Tulasnella* obtained from *Pleurothallis lilijae* and *Stelis hallii* supported with a value of 99/100%. Groups B and C grouped only *Tulasnella* sequences from *Teagueia* (*T. cherisei*, *T. hemispherica* and *T. gracilis dark*). The group B is supported by a value of 52/66% and C with a value of 80/100% (RaxML / MrBayes). For the analysis of

these sequences in the same way as for the analysis of 5.8S were used sequences previously reported by Suarez *et al.* (2006). In the phylogenetic trees for *Tulasnella* spp (Fig. 2 and Fig. 3) the sequences from *Teagueia* spp. are grouped forming clades specifically of symbiotic fungi belonging to this genus of orchids. This would mean that our sequences are new genotypes or at least have not been published previously in GenBank.

For the other sequences obtained from *Teagueia* spp. molecular analysis confirmed its phylogenetic position within Atractiellomycetes of Pucciniomycotina along with previously published sequences by Kottke *et al.* (2010) (Fig. 4. and Fig. 5). Significantly Pucciniomycotina was reported as a group composed only of saprophytic and parasitic fungi (Bauer *et al.* 2006). The lack of information in Atractiellomycetes is possibly due to the small number of studies that used transmission electron microscopy (TEM) and the limited number of studies of orchid mycobionts identified molecularly (Kottke *et al.* 2010).

As a result of our molecular characterization despite the low number of samples analyzed, we can conclude that the most frequent mycobionts in the studied species of the genus *Teagueia* belongs to the Tulasnellales, particularly to *Tulasnella*. These results are similar to those reported by Suarez *et al.* (2006) and Kottke *et al.* (2010) in an Andean rainforest of Ecuador. In addition, in this study we report also Atractiellales as mycorrhizal fungi in orchids. However the most important contribution of this work is the first molecular study reporting the identity of symbiotic fungi associated to some species of the *Teagueia* genus.

Acknowledgments

Special thanks to Dr. Juan Pablo Suarez Director of this project, to BqF. Paulo Herrera, BqF. Dario Cruz, BqF Oscar Vivanco and all the Mycorrhizal Team UTPL.

BIBLIOGRAPHY

- Bauer R, Begerow D, Sampaio J, Weiß M. & Oberwinkler F, (2006). The simple-septate basidiomycetes: a synopsis. *Mycol. Progr.* 5, 41–66. (doi:10.1007/s11557-006-0502-0)
- Brundrett C. M., (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants, *New Phytologist*, 154: 275–304
- 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.
- Cruz, D. & Suárez JP. & 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.
- Cullings KW, (1994). Molecular phylogeny of the Monotropoideae (Ericaceae) with a note on the placement of the Pyroloideae. *J Evol Biol* 7: 501–516
- 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.
- Dodson CH, (2003). *Native Ecuadorian Orchids*, Volume 4: *Oncidium-Restrepis*.
- Felsenstein J, (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evol* 39: 783–791
- Gascuel O, (1997). BIONJ: An improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol Biol Evol* 14:685–695.
- Huelsenbeck JP, Ronquist FR, (2001). MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754–755.
- Jost L, (2004). Explosive Local Radiation of the Genus *Teagueia* (Orchidaceae) in the Upper Pastaza Watershed of Ecuador, *Lyona a journal of ecology and application*, 7(1): 41–47.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T, (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transformation. *Nucleic Acids Res* 30: 3059–3066.
- Kottke I, Suárez J, 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.
- Krüger M, Stockinger H, Krüger C. & Schüßler A, (2009). DNA-based species level detection of *Glomeromycota*: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 183, 212–223.
- Lee MSY, (2001). Unalignable sequences and molecular evolution. *Trends Ecol Evol* 16:681–685.
- Ma M, Tan TK, Wong SM, (2003). Identification and molecular phylogeny of *Epulorhiza* isolates from tropical orchids. *Mycological Research* 107: 1041–1049.
- Moore R. T, (1987). The genera of *Rhizoctonia*-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen. nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Moniliopsis*, and *Rhizoctonia*. *Mycotaxon*, 29:91.
- 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.
- 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.
- Pereira OL, Kasuya MCM, Borges AC, Fernandes de Araujo E, (2005). Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. *Canadian Journal of Botany* 83: 54–65.
- Shefferson RP, Taylor DL, Weiß M, Garnica S, McCormick MK, Adams S, Gray HM, McFarland JW, Kull T, Tali K et al, (2007). The evolutionary history of mycorrhizal specificity among lady’s slipper orchids. *Evolution* 61: 1380–1390.
- Shimura H, Koda Y, (2005). Enhanced symbiotic seed germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebutense* following inoculation after cold treatment. *Physiol Plant* 123:281–287.
- 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.
- Stamatakis A, (2006). RAxML-VI-HPC: Maximum Likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 21: 2688–2690.
- Suárez J, Weiß M, Abele A, Sigisfredo Garnica S, Oberwinkler F, Kottke I, (2006). Diverse *tulasnelloid* fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycological Research* 110: 1257–1270.
- Swofford DL, Olsen GJ, Waddell PJ, Hillis DM, (1996). *Phylogenetic Inference*. In: *Molecular Systematics*, Hillis DM, Moritz C, Mable BK, (eds), pp. 407–514. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Swofford DL, (2002). PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), v. 4.0b10. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Taylor DL, McCormick MK, (2008) Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytologist* 177:1020– 1033.
- Warcup JH, Talbot PHB, (1980). Perfect states of *Rhizoctonias* associated with orchids III. *New Phytologist* 86:267–272.
- Whelan S, Lio P, & Goldman N, (2001). Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past *TRENDS in Genetics* Vol.17 No.5.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW, (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand H, Sninsky JS, White TJ (eds), *PCR-Protocols and applications: A Laboratory Manual*. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.

1. Propósitos del Proyecto

General

Caracterizar molecularmente los hongos micorrízicos presentes en orquídeas del género *Teagueia*.

Específicos

- Determinar y cuantificar los porcentajes de colonización micorrízica en orquídeas del género *Teagueia* spp.
- Especificar los géneros de hongos micorrízicos presentes en *Teagueia* spp.

2. INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae es considerada una de las familias más grandes de plantas vasculares con más de 25,000 especies distribuidas por todo el planeta (Dressler 2005). En el Ecuador, una de cada cuatro especies de plantas pertenece a esta familia, lográndose identificar alrededor de 4187 especies y se estima que sobrepasan las 5000. Esto representa cerca del 60% de las especies reconocidas en América del Sur y 40% de las especies del continente Americano (Hirtz 2004). Hasta ahora han sido reconocidos 214 géneros de orquídeas (Dodson 2003).

Hasta el año 2000 se conocía al género *Teagueia* (Orchidaceae) por tener solo seis especies reportadas, todas con distribuciones restringidas (Luer 2000). En los años 2003 y 2004 se incrementó los registros con veinte especies nuevas de *Teagueia* (Fig. 1) por el Botánico Lou Jost en la región norte de Ecuador, Tungurahua, cerca de Baños en la cuenca alta del río Pastaza (Jost 2004).



Figura. 1 Trece nuevas especie
de *Teagueia* (Jost 2004)

Las orquídeas del género *Teagueia* se caracterizan por ser terrestres, crecen en alturas desde 2800 hasta 3300 m s.n.m. (Jost 2004). Jost (2004) en sus estudios muestra que probablemente las especies encontradas en tres cerros de Tungurahua provengan de un ancestro común.

La abundancia de orquídeas no garantiza su supervivencia por diversos factores que le impiden su establecimiento en la naturaleza (Bayman *et al.* 2003). Las orquídeas

pueden producir miles de semillas, pero al ser diminutas y contener escasas reservas de carbohidratos la gran mayoría no germina (Shimura & Koda 2005). Además las orquídeas están siendo gravemente amenazadas por la destrucción de su hábitat y el tráfico de especies debido su alto valor comercial (Endara 2007).

En condiciones naturales las semillas de las orquídeas son transportadas por el aire, el agua a grandes distancias desde sus plantas y depositadas en la superficie de los árboles o el suelo donde podrán germinar y establecerse en el medio natural con la ayuda de un hongo micorrízico (Brundrett 2002).

Las micorrizas, son un fenómeno simbiótico general que se produce al asociarse uno o varios hongos con las raíces de las plantas en la cual hay un intercambio de nutrientes y minerales (Cameron 2006).

El beneficio más importante para una orquídea es el suministro de carbohidratos por parte del hongo promoviendo el crecimiento no fotosintético del protocormo (Smith & Read 1997). Todas las orquídeas necesitan de hongos micorrízicos para la germinación y establecimiento de sus semillas en el medio natural (Smith & Read 1997). Una vez ya desarrollada la plántula y sus raíces, las hifas de los hongos micorrízicos siguen creciendo dentro de las células corticales de la raíz sin romper la membrana, formando estructuras en forma globosa llamados pelotones (Richardson *et al.* 1993).

La identificación de los hongos que están micorrizando las plantas es importante para en futuro mejorar las estrategias de conservación de las orquídeas en su medio natural (Dixon *et al.* 2003; Otero *et al.* 2002; Zetter *et al.* 1997). 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.* 2006, Kottke *et al.* 2010).

Anteriormente, los análisis filogenéticos se limitaban a los estudios descriptivos y especulativos de las relaciones revolucionarias, en la actualidad los avances en esta metodología nos permiten comprender y explotar las dependencias estadísticas entre las secuencias que comparten un ancestro común en amplias áreas de investigación (Whelan *et al.* 2001).

Los estudios de hongos micorrízicos de orquídeas han sido restringidos a datos moleculares obtenidos desde raíces de orquídeas así como de cultivos (Ma. *et al.* 2003;

Moore 1987; Pereira *et al.* 2003, 2005; Warcup 1980). ITS-5.8S y 28S son las regiones de nrDNA más usadas en análisis filogenéticos, por considerarse regiones que aportan suficiente información para distinguir especies como se muestra en publicaciones de Suárez *et al.* (2006), Shefferson *et al.* (2007), Taylor *et al.* (2008), Kottke *et al.* (2010).

El objetivo de esta investigación es caracterizar molecularmente los hongos micorrízicos asociados a orquídeas del género *Teagueia*, basados en la región ITS1, ITS2, 5.8S y 28S parcial de nrDNA tomando como referencia la investigación de Suárez *et al.* (2006).

El estudio forma parte de un primer análisis de las comunidades de hongos relacionadas a las especies de orquídeas del género *Teagueia*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Sitio de estudio

El sitio de estudio está ubicado en el cantón Baños, provincia del Tungurahua (Ecuador) (Fig. 2a). Las muestras fueron colectadas en dos sitios en la región de Viscaya, a 10 km al oeste de Mayordomo, por el otro lado del Río Verde, vía a la laguna de Viscaya y vía a la laguna de Valencia en la cuenca alta del río Pastaza, todas a una altura entre 3100 m a 3300 m s.n.m. (Fig. 2b).

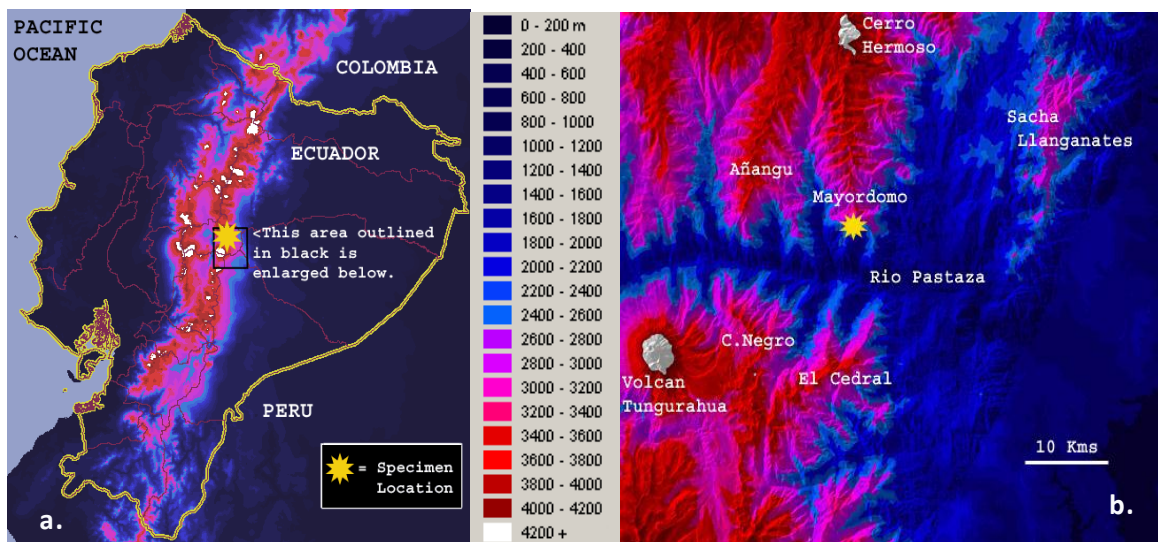


Figura. 2 a). Distribución de *Teagueia* spp en Ecuador. (Lou Jost 2004) (<http://www.loujost.com>). b) Zona de localización del espécimen ampliificada (Lou Jost 2004) (<http://www.loujost.com>)

3.2. Muestreo

Las orquídeas seleccionadas para el muestreo fueron identificadas por el Botánico Lou Jost. Se muestrearon un total de 37 individuos de orquídeas pertenecientes a 10 especies del género *Teagueia*: *Teagueia cherisei*, *T. sancheziae*, *T. gracilis yellow*, *T. gracilis dark*, *T. hemispherica*, *T. cherisei red*, *T. shepardii*, *T. grossmanii*, *T. jostii* y *T. gnu*.

La colección de las muestras se hizo durante el 12 y 13 de enero del 2007. Por cada orquídea, se colectaron tres raíces que estuvieron en contacto directo con

el sustrato y en estado saludable. Aproximadamente 0.5 cm de los extremos de cada segmento de raíz fueron cortados y la parte media fue lavada y dividida en dos partes para ser conservados en silica gel y etanol 50% respectivamente.

3.3. Determinación del porcentaje de Colonización

Se eliminó el velamen de las raíces conservadas en etanol, y se hizo cortes transversales muy finos, los mismos que se tiñeron durante tres minutos con azul de metileno 0.05% (C. I. 42780, Merck). Los excesos de tinción fueron eliminados lavando con agua destilada. Los cortes fueron montados en placas portaobjeto y se examinaron usando un microscopio óptico (Leitz WETZLAR SM – Lux) a 400x, 1000x. (Fig. 3)

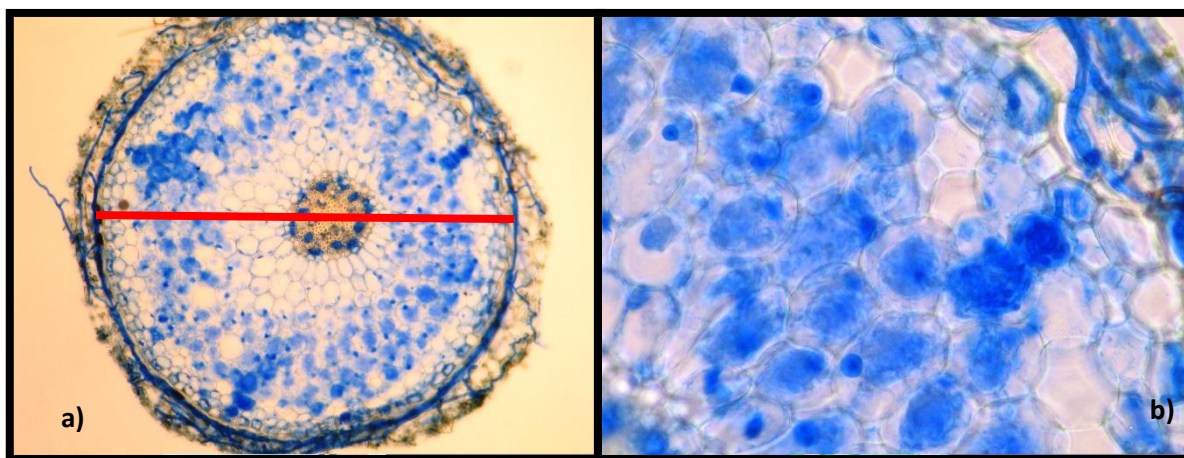


Figura 3. a) Corte transversal de la raíz teñida, vista al microscopio. **b)** Zoom de la células colonizadas

El cálculo del porcentaje de colonización de cada muestra se detalla a continuación:

1. Gracias a la colonización homogénea en las muestras de *Teagueia* se tomó como 100% a todas las células corticales ubicadas dentro del diámetro de corte de la raíz. (Fig. 3)
2. Tomamos como porcentaje de colonización al número de células colonizadas con respecto al total de células corticales dentro del diámetro.

3. Se calculó el porcentaje de colonización individual con una regla de tres, utilizando el número de células corticales como el 100%, y el número de células corticales colonizadas.

3.4. Extracción de DNA, PCR, Cloning, Purificación y Secuenciación de DNA

Para la extracción de DNA, se maceró con nitrógeno líquido los segmentos de raíz colonizados. Se utilizó el kit de extracción de DNA DNeasy Plant Mini Kit extracción (Qiagen) (Anexo 1) según las instrucciones del fabricante.

La PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) (Anexo 2) fue llevada a cabo con la combinación de primers universales para eucariotas ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', White *et al.* 1990) y TW14 (5'-GCTATCCTGAGGGAACTTC-3'; Cullings 1994), para amplificar la región ITS1- 5.8S -ITS2 y 28S parcial de nrDNA. Se usó la taq Phusion High-Fidelity PCR Mastermix (Finnzymes, Espoo, Finland). El éxito de amplificación de la PCR se comprobó en una electroforesis usando geles de Agarosa 0.7% (128 V, 300 mA, 20 min), teñido en una solución de bromuro de etidio 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ durante 25 min (Fig. 4).

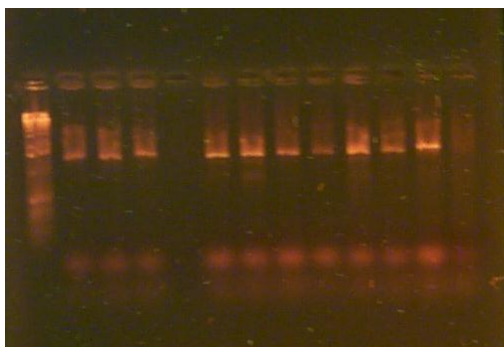


Figura 4. Electroforesis en Gel de Agarosa.

Los productos de PCR positivos fueron clonados usando el Kit Zero Blunt TOPO PCR (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para chequear los insertos de DNA se tomó 12 colonias para amplificarlas con los primers M13F y M13R modificados (Krüger *et al.* 2009). Los productos de la PCR fueron comprobados mediante geles de agarosa como los descritos previamente. Se tomaron 8 colonias positivas y se las purificó usando el Kit

SNAP (Anexo 3) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los purificados de ADN fueron secuenciados en MacroGen (Seúl Corea), en una sola dirección con el primer M13F.

3.5. Análisis filogenético

La edición de las secuencias se realizó con el programa Sequencher 4.6 (Gene Codes, Ann Arbor, MI). Se realizó una comparación previa de las secuencias usando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Las secuencias fueron alineadas junto con secuencias disponibles en el NCBI (GenBank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) siguiendo el método de análisis múltiple (Lee 2001). Los grupos de alineamiento se definieron según la región amplificada luego del clonaje. Se obtuvieron secuencias para la región ITS1-5.8S-ITS2 y para la región 28S. Todos los alineamientos fueron realizados usando la opción "GINS-i" implementada en MAFFT v5.667 (Kato et al. 2002), sin realizar ninguna corrección manual del alineamiento.

La región ITS1-5.8S-ITS2 nrDNA se utilizó para calcular un primer árbol filogenético de un espectro más amplio. En base a este resultado, seleccionamos un subconjunto de las secuencias estrechamente relacionadas de toda la región 5.8S nrDNA como lo realizado en trabajos previos por Suárez et al. (2006) y Taylor & McCormick (2008).

Los árboles filogenéticos fueron realizados siguiendo tres diferentes análisis. i) Un Neighbour-joining (NJ) optimizado en PAUP (Swofford 2002), usando la modificación BIONJ del algoritmo NJ (Gascuel 1997). ii) Un análisis Bayesiano basado en cadenas de Markov, Monte Carlo (MCMC) fue ejecutado en MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001), incluyendo dos corridas cada una con cuatro cadenas de Markov, con un incremento de cuatro millones de generaciones usando el inicio de árboles al azar. Los árboles fueron muestreados cada 100 generaciones, resultando en un total de 40000 árboles, de los cuales los últimos 30000 fueron usados para calcular un árbol consenso usando *majority rule* con el 50% de soporte. Cada conjunto de datos fueron analizados usando el modelo de sustitución de DNA GTR+I+G (Swofford et al.

1996). iii) Un máximo likelihood (ML) implementado en RAxML versión 7.0.4 (Stamatakis 2006) fue usado con 1000 replicaciones *bootstrap* (Felsenstein 1978-1985), utilizando el algoritmo GTRMIX para realizar un árbol de inferencia y la búsqueda de una buena topología.

4. RESULTADOS

4.1. Porcentaje de colonización

Las hifas de los hongos en su mayoría fueron observadas en el interior de las células corticales formando ovillos. Conjuntamente en algunos casos se observó estructuras grumosas con la tinción totalmente difuminada denotando la presencia de pelotones colapsados.

El promedio de los porcentajes de colonización por especies de *Teagueia* nos muestra un valor arriba del 50 %, tanto individual como general, (Tabla 1)

Tabla 1. Porcentaje de colonización de las raíces de las 10 especies de *Teagueia* consideradas en este estudio.

Especie	Número de individuos muestreados	Porcentaje promedio de colonización de las raíces
<i>T. cherisei</i>	4	68.1
<i>T. sancheziae</i>	5	55.1
<i>T. gracilis yellow</i>	6	62.2
<i>T. gracilis dark</i>	2	75.0
<i>T. hemispherica</i>	3	69.1
<i>T. cherisei red</i>	2	95.0
<i>T. shepardii</i>	2	50.0
<i>T. grossmanii</i>	1	66.7
<i>T. jostii</i>	2	62.5
<i>T. gnu</i>	1	63.6
Especies Indeterminadas	9	64.50

4.2. Análisis Filogenético

Se extrajo el DNA de 37 muestras, de las cuales obtuvimos 24 productos de PCR; de las 24 muestras, tomamos las 3 mejores, a las 3 se les realizó clonación molecular.

Las especies seleccionadas fueron: *Teagueia cherisei* (8449), *Teagueia gracilis dark* (8458) *Teagueia hemispherica* (8460). Como resultado de la clonación molecular se secuenciaron ocho clones por especie.

Luego de la comparación preliminar usando BLAST (GenBank nucleotide database), 16 secuencias tuvieron una alta similitud con especies pertenecientes al orden Tulasnellales, 5 relacionadas al orden Atractiellales, 2 al género *Hyphoderma* y 1 similar a un basidiomicete indeterminado (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencias con mayor similitud en la región ITS-5.8S nrDNA, 28S LSU de hongos micorrízicos presentes en *Teagueia* obtenidas de la búsqueda en el GenBank utilizado Blast .

Código	Organismo relacionado (Blast)	Código de acceso (GenBank)	Orden	Similitud
8449 cl 05	Uncultured <i>Tulasnella</i>	DQ178044	Tulasnellales	451/461 (97%)
8458 cl 03	Uncultured <i>Tulasnella</i>	DQ178044	Tulasnellales	461/471 (97%)
8449 cl 06	Uncultured <i>Tulasnella</i>	DQ178064	Tulasnellales	450/456 (98%)
8460 cl 07	Uncultured <i>Tulasnella</i>	DQ178064	Tulasnellales	453/459 (98%)
8458 cl 04	Uncultured Tulasnellales	DQ368696.1	Tulasnellales	703/737 (95%)
8460 cl 09	Uncultured Tulasnellales	DQ368696.1	Tulasnellales	703/737 (95%)
8449 cl 01	<i>Tulasnella asymmetrica</i>	DQ388047.1	Tulasnellales	732/761 (96%)
8460 cl 06	<i>Tulasnella asymmetrica</i>	DQ388047.1	Tulasnellales	754/784 (96%)
8458 cl 07	<i>Tulasnella asymmetrica</i>	DQ388047.1	Tulasnellales	754/784 (96%)
8460 cl 04	<i>Tulasnella asymmetrica</i>	DQ388047.1	Tulasnellales	754/784 (96%)
8449 cl 07	Uncultured <i>Tulasnella</i>	DQ178114.1	Tulasnellales	594/595 (99%)
8449 cl 04	Uncultured <i>Tulasnella</i>	DQ178114.1	Tulasnellales	590/596 (98%)
8460 cl 12	Uncultured <i>Tulasnella</i>	DQ178072.1	Tulasnellales	612/628 (97%)
8449 cl 03	<i>Tulasnella asymmetrica</i>	DQ388048.1	Tulasnellales	656/745 (88%)
8458 cl 09	<i>Tulasnella asymmetrica</i>	DQ388048.1	Tulasnellales	655/744 (88%)
8460 cl 11	Uncultured <i>Tulasnella</i>	GQ907066.1	Tulasnellales	529/617 (85%)
8460 cl 02	Uncultured Atractiellales	GU079596.1	Atractiellales	610/610 (100%)
8458 cl 08	Uncultured Atractiellales	GU079596.1	Atractiellales	630/630 (100%)
8460 cl 05	Uncultured Atractiellales	GU079596.1	Atractiellales	629/630 (99%)
8458 cl 01	Uncultured Atractiellales	GU079597.1	Atractiellales	630/630 (100%)
8449 cl 08	Uncultured Atractiellales	GU079597.1	Atractiellales	736/736 (100%)
8449 cl 02	<i>Hyphoderma cremeoalbum</i>	DQ677492.1	Poliporales	479/532 (90%)
8458 cl 02	Uncultured basidiomycete	FM997947.1	Basidiomycete ind.	562/658 (85%)
8458 cl 05	<i>Hyphoderma cremeoalbum</i>	DQ677492.1	Poliporales	486/539 (90%)

De acuerdo con la similitud de secuencias mostradas en la Tabla 2, se elaboraron 4 árboles filogenéticos, 2 con las secuencias de *Tulasnella* y 2 con las secuencias de los Atractiellales.

Para facilitar la ubicación de las secuencias de *Tulasnella* desde *Teagueia* spp se señalaron los grupos A, B, C, D para la figura 5 y A, B, C para la figura 6.

El análisis de 5.8S nrDNA (Fig. 5) permite observar una relación entre los hongos micorrízicos que están colonizando las orquídeas del género *Teagueia* y algunos hongos que están colonizando las orquídeas de los géneros *Stelis* y *Pleurothallis* de un bosque montano.

Para la figura 5 la secuencia A corresponde a un hongo micorrízico desde *Teagueia cherisei* (8449 cl04) relacionada con secuencias de *Stelis hallii* (DQ178114) (DQ178113) y la secuencia B desde *Teagueia cherisei* (8449 cl7).

La secuencia C desde *Teagueia hemispherica* (8460 cl12) comparte el mismo clado con una secuencia desde *Stelis concinna* DQ178075 y *Stelis superbiens* (DQ178074). El clado D corresponde a secuencias desde *Teagueia* spp relacionadas con una secuencia de *Tulasnella asymmetrica* (DQ388047).

En el árbol filogenético obtenido para la región parcial de 28S nrDNA (Fig.6) el clado A corresponde a secuencias desde *Teagueia* spp, relacionadas a *Tulasnella calospora* (DQ388041). El clado B corresponde a secuencias desde *Teagueia* spp relacionadas a secuencias de micorrizas desde *Pleurothallis lilijae* (DQ178068), (DQ178067); además de un clado con secuencias desde *Stelis hallii* (DQ178066) y *Stelis superbiens* (DQ178064). El clado C corresponde a secuencias desde *Teagueia* spp relacionadas con un clado que contiene secuencias de micorrizas desde *Tulasnella asymmetrica* (AY15240), (DQ388047).

Para Atractiellales el análisis de la región ITS1-5.8S-ITS2 nrDNA (Fig. 7) y para la región parcial de nuLSU (Fig.8) obtuvimos secuencias que se agrupan en un clado con secuencias obtenidas desde raíces de orquídeas en un bosque tropical montano lluvioso en el sur de Ecuador (Kottke et al. 2010).

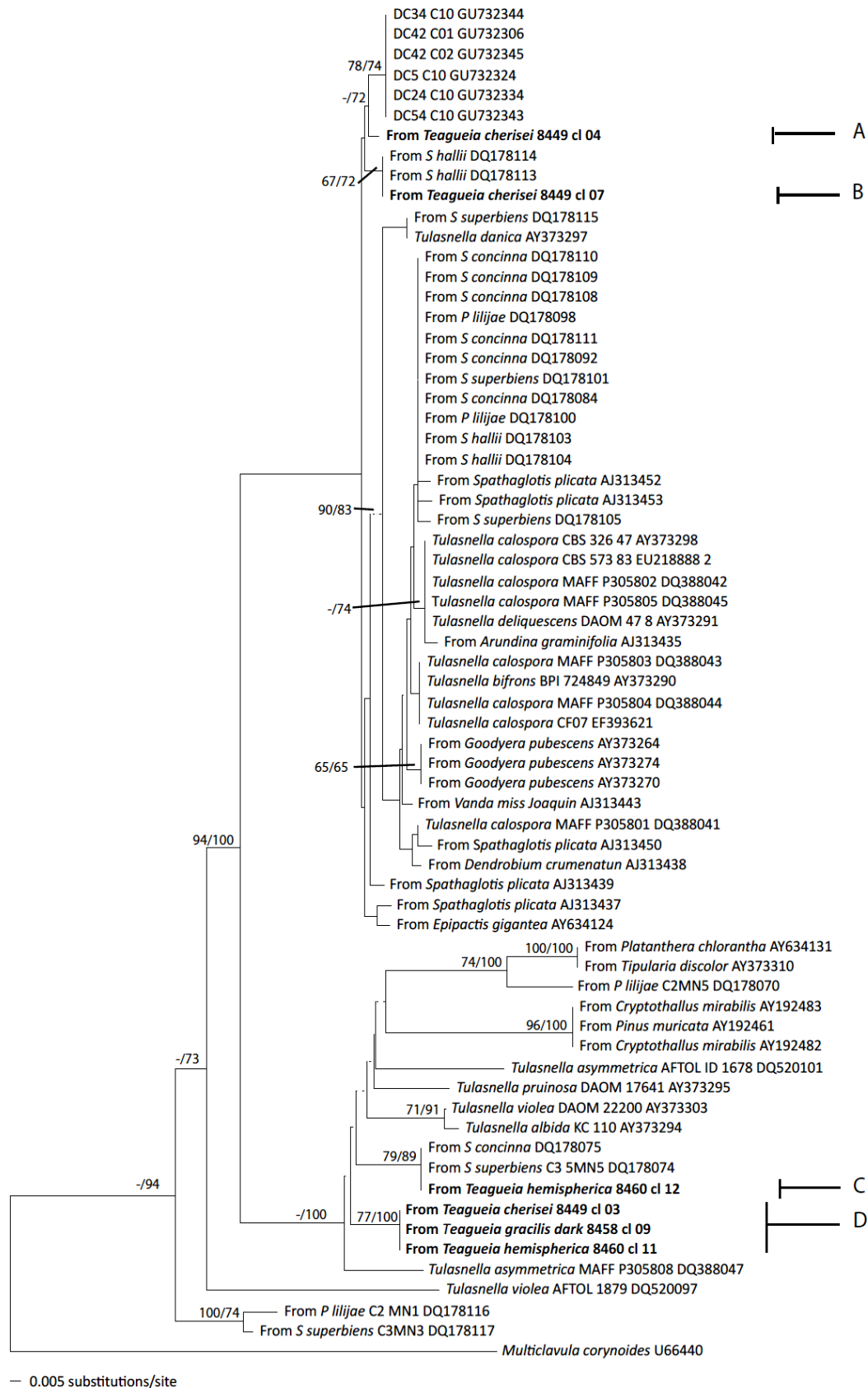


Figura 5. Hipótesis filogenética de *Tulasnella* spp. desde orquídeas *Teagueia* spp. inferidas desde los análisis RaxML y Mbayes de nrDNA de las región 5.8S. Los números sobre los nodos designan los valores mayores al 50% desde RaxML/ Mbayes.

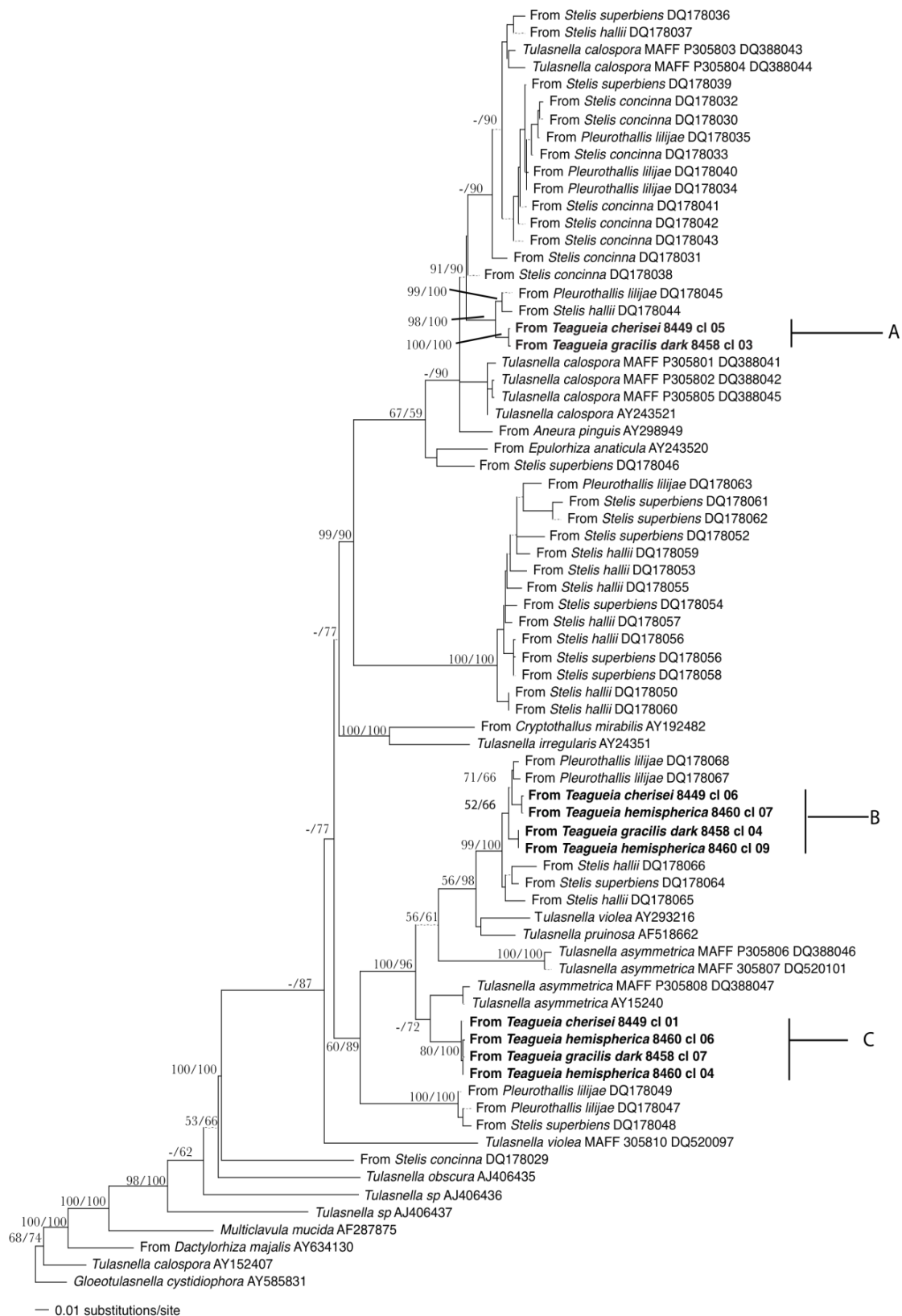


Figura. 6 Hipótesis filogenética de *Tulasnella* spp. desde orquídeas *Teagueia* spp. inferidas desde los análisis RaxML y Mbayes de nrDNA de la subunidad parcial 28S nrDNA. Los números sobre los nodos designan los valores mayores al 50% desde RaxML/MCMC.

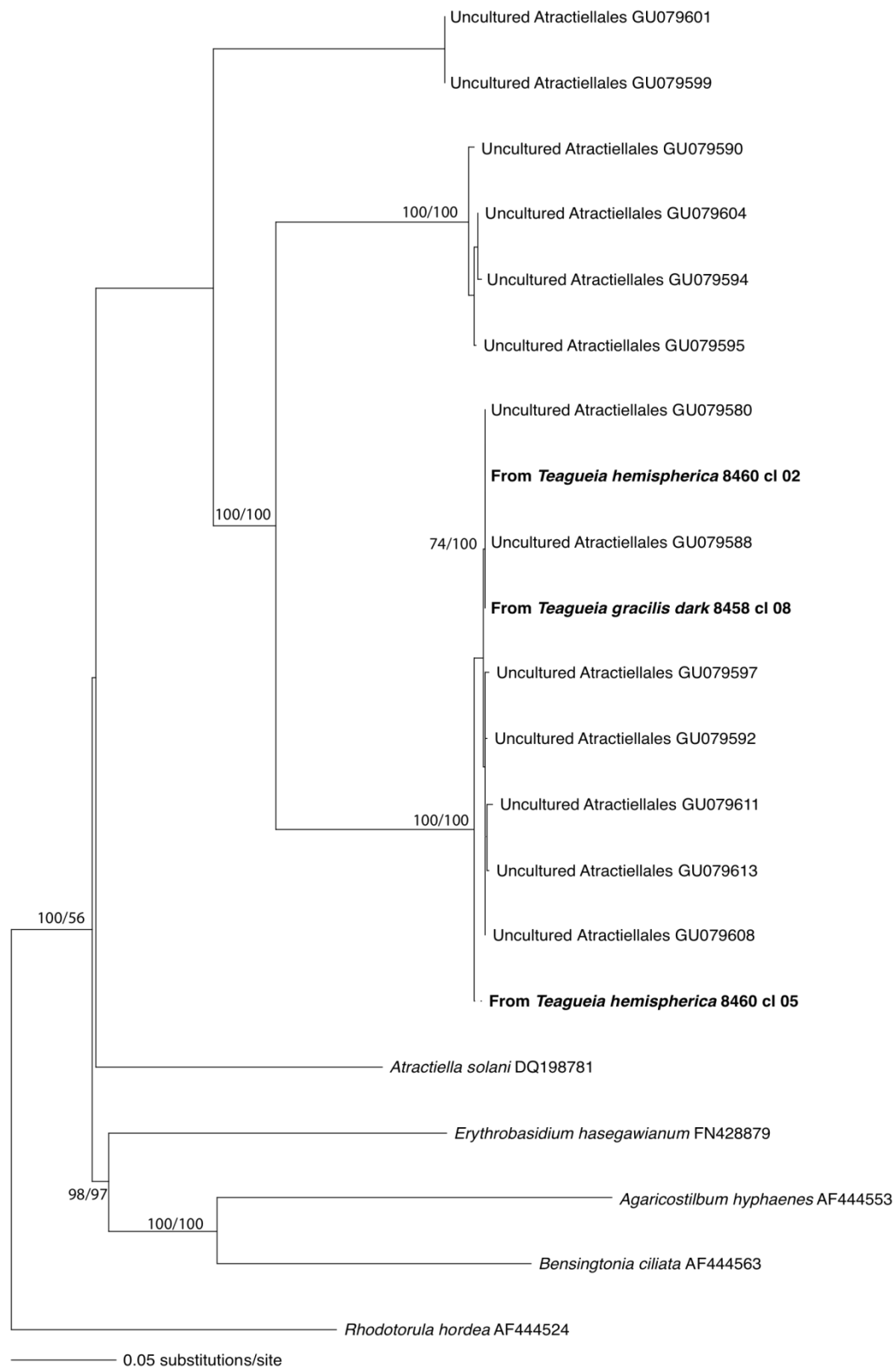


Figura 7. Hipótesis filogenética de *Atractiellales* desde orquídeas *Teaguea* spp. inferidas desde los análisis RaxML y Mbayes de la región ITS1-5.8S-ITS2 nrDNA. Los números sobre los nodos designan los valores mayores al 50% desde RaxML/ Mbayes

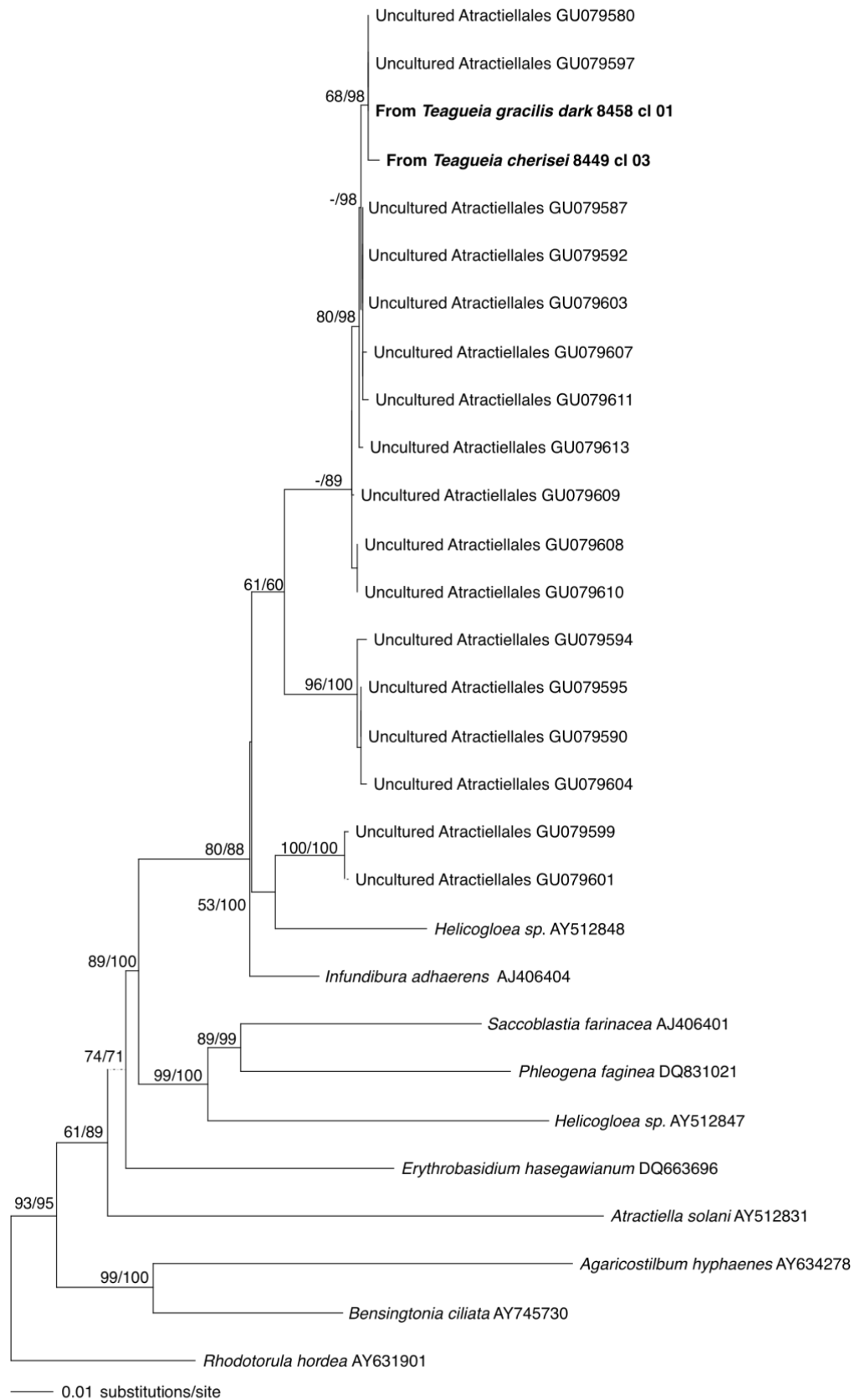


Figura 8. Hipótesis filogenética de *Atractiellales* desde orquídeas *Teaguea* spp. inferidas desde los análisis RaxML y Mbayes de una región parcial de 28S nrDNA. Los números sobre los nodos designan los valores mayores al 50% desde RaxML/ Mbayes.

5. DISCUSIÓN

5.1. Verificación del estado micorrízico

Obtuvimos un valor superior al 50 % en el total de las muestras analizadas (Tabla 1). Cabe resaltar que en muchas de las muestras los pelotones observados estuvieron colapsados.

La importancia de los hongos micorrízicos en orquídeas y el rol que estos desempeñan ha sido demostrada en un gran número de publicaciones. (Cameron *et al.* 2006; Rasmussen 2002; Suárez *et al.* 2006) Estos estudios nos brindan información útil para establecer nuevas estrategias para la conservación de orquídeas en su medio natural (Dixon *et al.* 2003).

La identificación de pelotones en las células corticales de las raíces es vista como la mejor forma de comprobar la presencia de micorrizas de orquídeas (Kottke *et al.* 2010).

5.2. Análisis filogenético

De la búsqueda en BLAST encontramos un alto porcentaje de similitud con los *Tulasnellales* previamente reportadas por Suárez *et al.* (2006) y del orden *Atractiellales* recientemente publicadas por Kottke *et al.* (2010).

En el análisis 5.8S para *Tulasnella* spp, tres de nuestras secuencias pertenecen a *Teagueia cherisei*, una a *Teagueia gracilis dark* y dos a *Teagueia hemispherica*. Estas se agruparon en tres clados (Fig 5). La secuencia obtenida desde *Teagueia cherisei* 8449 cl 04 forma el clado A, muy cercana a secuencias obtenidas desde fructificaciones de *Tulasnella* previamente reportadas por Cruz *et al.* (2010). Esta secuencia se encuentra con un bajo soporte en comparación al resto de secuencias de esta región. La secuencia de *Tulasnella* desde *Teagueia cherisei* 8449 cl 07 forma el clado B soportada por un valor de bootstrap de 67/72 % (RaxML/ Mbayes), junto a secuencias desde *Stelis hallii* reportadas por Suárez *et al.* (2006). La secuencia de *Tulasnella* desde *T. hemispherica* 8460 cl 12 (C), se ubica en un clado junto a secuencias de *Tulasnella* obtenidas de *Stelis concinna* y *Stelis superbiens*, altamente soportada por un valor de 79/89%. Además, se formó un clado (D) de

Tulasnella desde 3 especies de *Teagueia* (*T. cherisei*, *T. gracilis dark* y *T. hemispherica*) con un soporte de bootstrap de 77/100 %. Podemos observar una relación entre las secuencias de *Tulasnella* spp. obtenidas desde *Teagueia* spp. con las de *Stelis* spp. de Suárez *et al.* (2006), obtenidas de un bosque andino del sur de Ecuador y secuencias obtenidas desde fructificaciones de *Tullasnella* reportadas por Cruz *et al.* (2010) colectadas en el mismo bosque.

Para la región 28S (Fig 6), obtuvimos 10 secuencias, las cuales se ubican en 3 diferentes grupos (A, B y C). En el grupo A se ubicaron 2 secuencias: la secuencia de *Tulasnella* desde *Teagueia cherisei* 8449 cl 05 y *Teagueia gracilis dark* 8458 cl 03 soportadas por un valor de 100/100 % junto a un clado hermano de *Tulasnella* obtenidas desde *Pleurothallis lilijae* y *Stelis hallii* soportado con un valor de 99/100 %. Los grupos B y C agrupan únicamente a secuencias de *Tulasnella* desde *Teagueia* (*T. cherisei*, *T. hemispherica* y *T. gracilis dark*). El grupo B está soportado por un valor de 52/66 % y C por un valor de 80/100 % (RaxML/ Mbayes).

Para el resto de secuencias obtenidas desde *Teagueia* spp, el análisis molecular confirmó su ubicación filogenética dentro de Atractiellomycetes de Pucciniomycotina junto con secuencias previamente publicadas por Kottke *et al.* (2010) (Fig 7 y Fig 8). Cabe resaltar que Pucciniomycotina hasta hace poco solamente era reportado como un grupo compuesto únicamente por hongos parásitos y saprofíticos (Bauer *et al.* 2006). La falta de información en Atractiellomycetes se debe posiblemente a la poca cantidad de estudios en los que utilizaron microscopía electrónica de transmisión (TEM) y al número limitado de estudios de micobiontes de orquídeas identificados molecularmente (Kottke *et al.* 2010).

En los árboles filogenéticos para *Tulasnella* spp (Fig 5 y Fig 6) las secuencias desde *Teagueia* spp se agrupan formando clados específicamente de hongos simbioses pertenecientes a este género de orquídeas. Esto significaría que nuestras secuencias son genotipos nuevos o al menos no han sido publicadas en el GenBank.

6. CONCLUSIONES

En nuestro estudio claramente observamos como promedio, un alto porcentaje de colonización, esto nos permite concluir que nuestras muestras de *Teagueia* spp están altamente colonizadas por hongos micorrízicos.

Los análisis filogenéticos ubicaron a los hongos micorrízicos de este estudio dentro de los órdenes Tulasnellales y Atractiellales, siendo *Tulasnella* el grupo de hongo simbiote más frecuente en estas orquídeas del género *Teagueia*. Estos resultados son similares a los reportados por Suárez *et al.* (2006) y Kottke *et al.* (2010) en un bosque tropical andino del Ecuador.

Esta investigación se constituye como el primer estudio molecular realizado en hongos simbiotes pertenecientes al género *Teagueia*, y el segundo reporte de que los hongos Atractiellales son un grupo importante de hongos formadores de micorrizas en orquídeas. Los resultados obtenidos nos brindan una amplia visión de la información que podemos obtener en cuanto al estudio de micorrizas en orquídeas de los bosques tropicales del Ecuador y de los bosques montanos andinos.

Como resultado de nuestra caracterización molecular a pesar de la baja cantidad de muestras analizadas, podemos decir que las orquídeas *Teagueia* presentan un porcentaje importante de colonización con hongos micorrízicos pertenecientes al género *Tulasnella* y a hongos simbiotes pertenecientes al orden Atractiellales. En investigaciones futuras sin duda las *Teagueia* spp pueden proporcionar datos de gran importancia en el campo de las micorrizas y su evolución.

7. RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con las investigaciones en micorrizas de orquídeas del género *Teagueia*, por ser un género que aporta información nueva para la ciencia en cuanto a la relación simbiótica hongo - planta.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Bauer R, Begerow D, Sampaio JP, Weiß M, & Oberwinkler F, (2006). The simple-septate basidiomycetes: a synopsis. *Mycol. Progr.* 5, 41–66. (doi:10.1007/s11557-006-0502-0)
- Bayman P, Tupac O, and Ackerman J, (2003). *The Curious Relationships Between Orchids and Fungi*, ACT 2601, Australia.
- Brundrett C. M. (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*. 154: 275–304.
- 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.
- 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.
- Cullings KW, (1994.) Molecular phylogeny of the Monotropoideae (Ericaceae) with a note on the placement of the Pyroloideae. *J Evol Biol* 7: 501-516.
- 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.
- Dodson CH, (2003). *Native Ecuadorian Orchids*, Volume 4: *Oncidium-Restrepids*.
- Dressler RL, (2005). How many orchid species? *Selbyana* 26(1): 155–158.
- Endara L, León S, (2007). Patrones de Endemismo de la Flora Endémica de Orquídeas Ecuatorianas. Second Scientific Conference on Andean Orchids. pp. 34.
- Felsenstein J, (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791.
- Gascuel O, (1997). BIONJ: An improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol Biol Evol* 14:685–695.
- Hirtz A, (2004). Donde están las orquídeas *Tierra Incógnita*, vol. 32, Ed. 31 Ecuador.
- Huelsenbeck JP, Ronquist FR, (2001). MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754–755.
- Jost L, (2004). Explosive Local Radiation of the Genus *Teagueia* (Orchidaceae) in the Upper Pastaza Watershed of Ecuador, *lyona a journal of ecology and application*, Volume 7(1), Pages [41-47].

- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T, (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transformation. *Nucleic Acids Res* 30: 3059-3066.
- Kottke I, Suárez J, 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.
- Krüger M, Stockinger H. Krüger, C. & Schüßler, A, (2009). DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 183, 212–223.
- Lee MSY, (2001). Unalignable sequences and molecular evolution. *Trends Ecol Evol* 16:681–685.
- Luer, C. A, (2000). *Icones Pleurothallidarum XX: Systematics of Jostia, Andinia, Barbosella, Barbodria, and Pleurothallis Subgenus Antilla, Subgenus Effusia, Subgenus Restrepioidea*. Monographs in Systematic Botany From The Missouri Botanical Garden 79. Missouri Botanical Garden, St. Louis.
- Ma M, Tan TK, Wong SM, (2003). Identification and molecular phylogeny of *Epulorhiza* isolates from tropical orchids. *Mycological Research* 107: 1041–1049.
- Moore, R. T, (1987). The genera of *Rhizoctonia*-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen. nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Moniliopsis*, and *Rhizoctonia*. *Mycotaxon*, 29:91–99.
- 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.
- 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.
- Pereira OL, Kasuya MCM, Borges AC, Fernandes de Araújo E, (2005). Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. *Canadian Journal of Botany* 83: 54–65.
- Rasmussen HN, (2002). Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil* 244: 149–163.
- Richardson K, Currah R, Hambleton S, (1993). Basidiomycetous endophytes from the roots of neotropical epiphytic orchidaceae. *Lindleyana* 8(3): 127-137.

- Shefferson RP, Taylor DL, Weiß M, Garnica S, McCormick MK, Adams S, Gray HM, McFarland JW, Kull T, Tali K et al, (2007). The evolutionary history of mycorrhizal specificity among lady's slipper orchids. *Evolution* 61: 1380–1390.
- Shimura H, Koda Y, (2005). Enhanced symbiotic seed germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebutense* following inoculation after cold treatment. *Physiol Plant* 123:281–287.
- 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.
- Suárez J, Weiß M, Abele A, Sigisfredo Garnica S, Oberwinkler F, Kottke I, (2006). Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycological Research* 110: 1257-1270.
- Stamatakis, A, (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihoodbased phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688–2690. (doi:10. 1093/bioinformatics/btl446)
- Swofford DL, Olsen GJ, Waddell PJ, Hillis DM, (1996). *Phylogenetic Inference*. In: *Molecular Systematics*, Hillis DM, Moritz C, Mable BK, (eds), pp. 407-514. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Swofford, D. L, (2002). PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), v. 4.0b10. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Taylor DL, McCormick MK, (2008). Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytologist* 177:1020– 1033.
- Warcup JH, Talbot PHB, (1980). Perfect states of *Rhizoctonias* associated with orchids III. *New Phytol* 86:267–272.
- Whelan S, Lio P, & Goldman N, (2001). Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past *TRENDS in Genetics* Vol.17 No.5.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW, (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand H, Sninsky JS, White TJ (eds), *PCR-Protocols and applications: A Laboratory Manual*. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.
- Zetter, L. W, (1997). Orchid-fungal symbiosis and its value in conservation. *McIlvainea*, 13:40–45.

9. ANEXOS

Anexo 1

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA: DNeasy® Plant Mini Kit, Qiagen:

Previo: Mantener el bloque calentador a 65°C, calentar el buffer AE a 65°C.

1. Rompa el tejido vegetal utilizando nitrógeno líquido hasta convertirlo en un fino polvo usando micropestles.
2. Añada 400 µl de buffer AP1 y 4 µl de RNAasa solución stock (100 mg/µl) a un máximo de 100 µg tejido peso húmedo a 20 µg peso seco y mézclelo por vortex vigoroso.
3. Incube la mezcla por 10 min a 65 °C. Mezcle 2-3 veces durante la incubación invirtiendo el tubo.
4. Añada 130 µl de buffer AP2 para lisar, mezcle e incube en hielo por 5 minutos. Opcional: centrifugue el lisado por 5 min a máxima velocidad.
5. Vierta el lisado en una columna lila colocada en un tubo de colección de 2 mL y centrifugue por 2min a máxima velocidad.
6. Transfiera la fracción sobrenadante del paso 5 a un nuevo tubo (no incluido) sin alterar el pelet de células.
7. Añada 1.5 volúmenes de buffer AP3/E a producto del paso 5 y mezcle por pipeteo.
8. Aplique 650 µl de la mezcla del paso 7, incluido cualquier precipitado que se pueda haber formado, a una columna blanca colocada en un tubo de colección de 2 mL. Centrifugue por 1 min a 6000 g (8000 rpm) y descartar el sobrenadante.
9. Repita el paso 8 con el resto de la muestra. Descarte el sobrenadante y el tubo de colección.
10. Coloque la columna blanca en un nuevo tubo de colección y añada 500 µl de buffer AW a la columna y centrifugue por 1 min a 6000 g (8000 rpm). Elimine el sobrenadante y reuse el tubo de colección en el paso 11.

11. Añada 500 µl de buffer AW a la columna blanca y centrifugue por 2 min a máxima velocidad para secar la membrana.

12. Transfiera la columna a un nuevo tubo de micro-centrífuga de 1.5 o 2 mL (no incluido) y pipetee 50 µl de buffer AE precalentado a 65°C directamente en la membrana. Incube por 5 min a temperatura ambiente y centrifugue por 1 min a

6000 *g* (8000 rpm). Para incrementar la concentración final del DNA se puede reducir la cantidad de buffer AE.

13. Repita el paso anterior. Deseche la columna y guarde el DNA en el congelador a 20°C.

Anexo 2

PROTOCOLO DE PCR- PROMEGA
PCR-N.

FECHA:
NOMBRE:

N/COD	Descripción	Dil.	N/COD	Descripción	Dil.
A1			B1		
A2			B2		
A3			B3		
A4			B4		
A5			B5		
A6			B6		
A7			B7		
A8			B8		

N/COD	Descripción	Dil.
C1		
C2		
C3		
C4		
C5		
C6		
C7		
C8		

	x 1	x	x 24	Con. final
Buffer (10X sin MgCl2)	5 uL		120 uL	1 x
dd H2O	32.6 uL		782.4 uL	
MgCl2 (25 mM)	3 uL		72 uL	1.5 mM
dNTPs (5 mM)	2 uL		48 uL	0.2 mM
Primer (25 pmol/uL)	1 uL		24 uL	0.5 pmol/uL
Primer (25 pmol/uL)	1 uL		24 uL	
Taq polimerasa (5U/uL)	0.2 uL		4.8 uL	
BSA 1%	0.2 uL			
= 5 uL de DNA matriz por reacción				=Total

Programa Termociclador

Desnaturalización inicial	94 °C	3:00 min
N. ciclos touch down		
Desnaturalización	94 °C	0:00 min
Anillamiento		0:45 min
Extensión	72 °C	1:00 min
N. ciclos constantes		
Desnaturalización	94 °C	0:30 min
Anillamiento		0:45 min
Extensión	72 °C	1:00 min
Extensión final	72 °C	7:00 min

JPS 10 Dic 2004

Electroforesis es gel de agarosa al 0,7%.
3 uL de (3uL Prod PCR + 1 azul) 1.5 uL de marcador peso molecular.
Corrida de 20 minutos a 128V y 50 mA para cubetas pequeñas de electroforesis.
Luego se deja en la solución de bromuro de etidio (0,5 ug/mL) por 20 min y luego 15 de lavado en agua destilada.

Anexo 3.

S.N.A.P. PROTOCOLO PARA PURIFICACION (CLONING)

Protocolo

- 1.** Centrifugar 1-3 ml de over night (2 min x 13200 rpm) (Cultivo líquido para obtener el pelet de células. En 150ul de resuspensión buffer por vortex o simple pipeteo.
- 2.** Resuspender el pelet de células en 150ul de resuspensión buffer por vortex o simple pipeteo.
- 3.** Adicionar 150ul de buffer lisis y mezclar suavemente por inversión del tubo 5-6 veces. Incubar por 3 min. A temperatura ambiente.
- 4.** Adicionar 150ul de precipitación de sal (fría) e invertir de 6-8 veces para asegurar la mezcla de todos los componentes.
- 5.** Centrifugar (micro centrífuga) a temperatura ambiente a 14000xg por 5 min.
- 6.** Pipetear el sobrenadante dentro de un tubo estéril de micro centrífuga descartar el pelet gelatinoso.
- 7.** Adicionar 600ul de buffer binding y mezcla por inversión de 5-6 veces.
- 8.** Pipetear o colocar toda la solución sobre S.N.A.P. miniprep columna/colección, descartar de la columna el flujo restante.
- 9.** Adicionar 500 ul de Wash Buffer.
- 10.** Centrifugar el S.N.A.P miniprep columna/colección a temperatura ambiente a máxima velocidad por 1 min.
- 11.** Adicionar 900 ul de 1x Final Wash y centrifugar (Final Wash preparado al inicio). 30 segundos a 3000 rpm.
- 12.** Centrifugar el S.N.A.P.. miniprep columna/colección a temperatura ambiente a máxima velocidad por 1 min.
- 13.** Transferir la columna a un tubo de micro centrífuga y adicionar 60 ul de Buffer TE. Incubar 3 min. A temperatura ambiente.
- 14.** Centrifugar el S.N.A.P miniprep Columna/ Colección a máxima velocidad por 30 seg. Descartar la columna.