



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

AREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIÓLOGO

Caracterización molecular de hongos micorrízicos aislados a partir de cuatro especies de orquídeas epífitas, en dos pisos altitudinales de bosque montano.

Trabajo de fin de Titulación.

Autor: Cueva Agila Anabel de los Ángeles

Directora: Cevallos Solórzano Stefania, Blga.

LOJA – ECUADOR

2014

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Stefanía Cevallos Solórzano

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

De mi consideración:

Que el presente trabajo de fin de titulación, denominado: “Caracterización molecular de hongos micorrízicos aislados a partir de cuatro especies de orquídeas epífitas, en dos pisos altitudinales de bosque montano”, realizado por el profesional en formación Anabel de los Ángeles Cueva Agila; cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la Graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en el aspecto de forma como de contenido, por lo cual me permito autorizar su presentación para los fines pertinentes.

Loja, de Agosto del 2014

Stefanía Cevallos Solórzano

CI: 1104859556

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Anabel de los Ángeles Cueva Agila declaro ser el autor del presente trabajo de fin de titulación, denominado: “Caracterización molecular de hongos micorrízicos aislados a partir de cuatro especies de orquídeas epífitas, en dos pisos altitudinales de bosque montano” de la titulación de Biólogo, siendo Stefania Cevallos Solórzano directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 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 investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

Anabel de los Ángeles Cueva Agila

CI: 1725562266

DEDICATORIA

A Cristo, por darme tantas oportunidades de aprender la misma lección aunque aun siga fallando.

A las felices memorias de mamá y papá, por mantener encendidas las luces de mi alma.

A mis hermanos Alfonso, Sandra, Fernando y Vanesa, por el ejemplo de fortaleza y constancia, y por haberme dado unos sobrinos tan maravillosos.

A mi ñaña Yadi, por darme tanto amor, por ser la mejor mamá espiritual y por siempre pedir más.

A Diego, por darme su mano incondicionalmente, por poner sonrisas en los días duros, por haber aparecido en mi vida y por haberse quedado.

A mi familia, por ser inmensa y cálida.

A mis amigos por tener los oídos y brazos siempre dispuestos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Técnica Particular de Loja por contribuir en mi formación personal y profesional.

A los docentes de Biología por la paciencia, entrega y guía educativa. Especialmente a los Biólogos Lorena y Carlos por el ejemplo y ayuda oportunos.

A todos los Docentes Investigadores del grupo de micorrizas, por compartir sus experiencias y conocimientos. En especial a la doctora Elizabeth, por haber compartido conmigo su experiencia y mostrarme una luz en la ejecución del trabajo.

A Stefania Cevallos por su apoyo en el desarrollo de este proyecto.

A Alberto Mendoza, Stefania Cevallos y Diego Ochoa por la ayuda en el trabajo de campo. Por haber sido pacientes y aventureros.

A mis compañeros del laboratorio de Ciencias Naturales Natalia, Oscar, Byron, Nubia, Mayra y Nicole, por su incondicionalidad.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN.....	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
INDICE DE CONTENIDOS	VI
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	VII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO	5
1.1 Reino Fungi	6
1.1.1 Asociaciones Micorrízicas	6
1.1.2 Micorrizas de Orquídeas	8
1.1.3 Hongos endófitos de orquídeas	10
1.2 Las Orquídeas en Ecuador.....	10
1.2.1 Importancia de las orquídeas.....	11
1.2.2 Distribución y Amenazas.....	11
1.2.3 Géneros <i>Cyrtorchilum</i> y <i>Epidendrum</i>	11
1.3 Bosque Montano y su diversidad.....	13
OBJETIVOS	15
<i>General</i>	15
<i>Específicos</i>	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
<i>Área de estudio y colección de muestras</i>	17
<i>Análisis microscópico</i>	17
<i>Aislamiento de hongos</i>	18
<i>Análisis Molecular</i>	19

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1 Muestreo	21
4.2 Colonización micorrízica	21
4.3 Aislamiento de hongos	22
4.4 Identificación molecular	23
CONCLUSIONES	25
RECOMENDACIONES	27
BIBLIOGRAFIA.....	28
ANEXOS.....	37
<i>Anexo 1. Tabla de registro de hongos aislados en el Banco de microorganismos UTPL ..</i>	<i>38</i>

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1.- Colección de muestras de raíz de <i>C. flexuosum</i>	17
Figura 2.- Preparación y tinción de muestras para análisis microscópico.....	18
Figura 3. Cortes transversales de raíz de orquídea.	21
Figura 4. Hongos aislados según el método empleado.....	22
Figura 5. Fotografías de algunos de los hongos aislados.....	29
Tabla 1. Individuos de la población muestreados en cada sitio.....	21
Tabla 2. BLAST de las secuencias.....	24

RESUMEN

Las plantas en su mayoría establecen asociaciones simbióticas con hongos, relación que facilita el intercambio de nutrientes y favorece la relación con el medio. En las orquídeas esta asociación desempeña un papel clave para la germinación de semillas y establecimiento de plántulas. Este estudio se enfocó en la caracterización molecular de la comunidad de hongos micorrizicos aislados a partir de cuatro especies de orquídeas (*Cyrtochilum myanthum*, *Cyrtochilum flexuosum*, *Epidendrum hemiscleria* y *Epidendrum dalessandroi*) de dos poblaciones en un bosque montano del sur del Ecuador. Se colectó raíces de 10 individuos de cada especie para obtener aislados fúngicos en medios de cultivo. Se obtuvo ADN de los cultivos puros y se amplificó la región rADN ITS1-5.8S-ITS2 usando la combinación de primers ITS1 y TW14. Se logró la identificación molecular de 16 de los 35 hongos aislados. La identidad molecular de los aislados fue en su mayoría de miembros de la clase de los Agaricomycetes (Basidiomycota), con aislados identificados como *Tulasnella*. Además de varios grupos de Ascomycetes como Helotiales, Hypocreales y *Fusarium* sp., registrados en su mayoría como endófitos.

Palabras clave: Micorriza, endófitos, orquídea, bosque montano.

ABSTRACT

Most plant species form symbiotic associations with fungi called mycorrhizae that facilitates the exchange of nutrients and enhances the relationship with the environment, particularly with soil. In orchids this partnership plays a key role in seed germination and seedling setting. This study focused on molecularly characterization of the fungal community isolated from four species of orchids (*Cyrtochilum myanthum*, *Cyrtochilum flexuosum*, *Epidendrum hemiscleria* and *Epidendrum dalessandroi*) in two populations of montane forest in southern Ecuador. Roots of 10 individuals of each species were collected to attempt fungal isolate in culture media. DNA was obtained from pure cultures to amplify the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA region using the primer combination ITS1-TW14. Sixteen of the 35 fungal isolates were identified by molecular methods. The molecular identity of the isolates was mostly members of Agaricomycetes (Basidiomycota), with isolates identified as *Tulasnella*. In addition, several groups of Ascomycetes as Helotiales, Hypocreales and *Fusarium* sp., recorded mostly as endophytes.

Key words: Micorrhizae, endophytes, orchid, montane forest.

INTRODUCCIÓN

La asociación simbiótica que se da entre hongos específicos y las raíces de las orquídeas se denomina micorriza de orquídea, asociación que ha sido constantemente considerada como una asociación micorrízica atípica, donde el hongo obtiene poco beneficio de la orquídea hospedera (Smith & Read, 2008). Sin embargo publicaciones recientes demuestran que se trata de una relación mutualista (Perotto et al. 2014). Las hifas de los hongos crecen dentro de células corticales, formando elaboradas estructuras enroscadas conocidas como pelotones (Dearnaley, 2007).

Las semillas de las orquídeas son diminutas y contienen pocas reservas energéticas, siendo esencial la colonización por un hongo compatible para la germinación de semillas, y establecimiento de las plántulas en los estadios tempranos de desarrollo (Smith & Read, 2008; Kottle *et al.*, 2010). Por lo que se requiere ampliar el conocimiento de estas asociaciones micorrízicas para comprender mejor su biología. (Dearnaley *et al.*, 2012). Orchidaceae representa la familia más numerosa entre las monocotiledóneas, con 27135 especies aceptadas en el mundo (The Plantlist, 2010). En Ecuador, es la familia de plantas vasculares más grande, con cerca de 4000 especies, de estas el 40% son endémicas (Jørgensen & León-Janez, 1999). La mayor diversidad está distribuida en la región de montaña, con el 64% de las especies (Cueva & González, 2009). El multifacético impulso de investigación, en torno a esta familia, es justificado, pues se ha acumulado conocimiento básico de lo que representa aproximadamente el 10% de la diversidad del reino vegetal (Dearnaley *et al.*, 2012). Sin embargo, aún es muy poco lo que se conoce acerca de estas plantas durante su crecimiento y desarrollo (Cameron *et al.*, 2006).

Los estudios sobre hongos micorrízicos en bosques nublados se han orientado a la caracterización morfológica y caracterización molecular (Suárez *et al.*, 2006, 2008; Kottke *et al.*, 2010; Nilson *et al.*, 2008), siendo las bases sobre las que se estudia en la región. Los avances en métodos moleculares para la taxonomía fúngica, incluyen principalmente aislamiento y secuenciación de regiones de ADN ribosomal (Seifert, 2009). La identificación molecular de los micobiontes asociados a varias especies de orquídeas ha dado una perspectiva general sobre la situación ecológica de las especies de hongos, conocimiento necesario para procedimientos de restauración o protección de poblaciones existentes (Dearnaley *et al.*, 2012). Sin embargo, los endófitos fúngicos son frecuentemente seleccionados durante el aislamiento *in vitro* o amplificación por PCR, razón por la cual la

disección de pelotones de hongos individuales a partir de tejidos antes de aislamientos *in vitro* (Zhu *et al.*, 2008) o amplificaciones de PCR (Rasmussen, 1995; Kristiansen *et al.*, 2001) son muy recomendables. Además, el aislamiento de pelotones minimiza la contaminación por hongos no micorrízicos y bacterias (Zhu *et al.*, 2008).

Se sabe muy poco acerca del papel que desarrollan las comunidades de hongos micorrízicos sobre el tamaño de la población, la distribución y la genética de las poblaciones de orquídeas (McCormick *et al.*, 2004). Sin embargo, se puede prever la importancia de éstos en la permanencia de poblaciones de orquídeas. Para ampliar los estudios de esta asociación micorrízica, es de gran importancia obtener y mantener cultivos puros *in vitro*, que puedan ser utilizados en proyectos de investigación y/o de conservación (Acevedo, 2010).

El objetivo principal de este estudio es identificar molecularmente los hongos micorrízicos obtenidos a partir de raíces de cuatro especies de orquídeas epífitas. Para esto se evaluó la colonización en las raíces y se aisló los pelotones individuales para proceder al cultivo. Posteriormente, utilizando herramientas moleculares, se secuenció la región de rADN ITS1-5.8S-ITS2 y se identificó los aislados.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Reino Fungi

El reino Fungi constituye un grupo diverso de organismos unicelulares y 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).

1.1.1 Asociaciones micorrízicas

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 (Smith & Read, 2008). Son asociaciones que comprenden diversas categorías morfológicas, funcionales y evolutivas (Smith & Read, 2008). Algunos tipos de micorrizas son similares y comparten linajes de plantas, mientras otros tienen características anatómicas muy distintas e historias evolutivas separadas (Brundrett, 2002). Los hongos que participan como socios en esta relación hongo-planta, son del filum: Basidiomycota, Ascomycota y Glomeromycota (Brundrett 1991; Harley & Smith 1983).

El término mutualismo implica beneficios mutuos en las asociaciones entre dos o más organismos vivos diferentes (Boucher, 1985; Lewis, 1985). Las asociaciones mutualistas incluyen un amplia gama de asociaciones directas e indirectas, o simbióticas y no simbióticas, muchas de las cuales funcionan mediante transferencia de nutrientes (Boucher *et al.*, 1982; Paracer & Ahmadjian, 2000). Todas las asociaciones micorrízicas son simbióticas, pero no todas son mutualistas (Brundrett, 2004).

El término micorriza fue acuñado por Frank (1885), quien estaba bastante seguro de que estas asociaciones simbióticas planta-hongo eran requeridas para la nutrición de ambos socios. Las micorrizas han sido definidas como las asociaciones entre las hifas de hongos y los órganos de plantas superiores en cuestión con la absorción de sustancias desde el suelo (Harley & Smith, 1983). Actualmente se considera que difieren de otras asociaciones planta-hongo principalmente porque son asociaciones íntimas con una interfaz especializada donde el intercambio de material se produce entre células vivas (Nehls *et al.*, 2001; Pfeffer *et al.*, 2001).

A. Tipos de Asociaciones micorrízicas

Brundrett (2004) reconoce como principales tipos de asociaciones micorrízicas a las descritas a continuación:

- **Micorrizas vesículo-arbusculares (VAM)**

Los arbusculos son normalmente utilizados para definir las asociaciones de VAM. Ellos pueden ser cuantificados por procedimientos microscópicos estándar y su abundancia está generalmente correlacionada con el grado de colonización en raíces jóvenes por hongos VAM (McGonigle *et al.*, 1990; Toth *et al.*, 1990). En esta asociación hongos del filum Glomeromycota producen arbusculos, hifas, y vesículas dentro de las células de la corteza radical (Brundrett *et al.*, 1996).

- **Ectomicorrizas (ECM)**

Se caracteriza por presentar la red de Hartig, que consiste en laberínticas hifas entre las células de raíces, se utiliza para designar asociaciones ECM (Frank, 1885; Harley & Smith, 1983). Esta red es la zona principal de la transferencia de nutrientes en estas asociaciones (Burgess *et al.*, 1994; Dell *et al.*, 1994). Los hongos que forman el manto alrededor de raíces y la red de Hartig entre las células radicales pueden ser Basidiomicetes y Ascomicetes (Brundrett *et al.*, 1996).

- **Micorrizas de orquídeas**

Principalmente hongos del filum Basidiomicetes son los que producen ovillos de hifas dentro de raíces de plantas orquídeas (Brundrett *et al.*, 1996). Aún se requiere investigación para confirmar si existen diferencias sustanciales en la estructura y función de micorrizas entre las raíces y los tallos de orquídeas terrestres, o entre orquídeas clorofílicas y sin clorofila.

- **Micorrizas ericoides**

A pesar de la evidencia filogenética sobre la evolución de las micorrizas ericoides a partir de plantas con ECM (Cullings, 1996; Brundrett, 2002), existe una amplia evidencia de que son lo suficientemente distintas para justificar su clasificación separada de otros tipos de micorrizas. No se han reconocido categorías morfológicas dentro de éstas pero pueden existir. Involucra ovillos de hifas en el exterior de las células de los angostos pelos radicales de plantas del orden Ericales (Brundrett *et al.*, 1996).

1.1.2 Micorrizas de Orquídeas

Las micorrizas de orquídeas han sido frecuentemente consideradas como una asociación micorrízica atípica, donde el hongo obtiene “poco” beneficio de la orquídea hospedera (Dearneley, 2007; Smith & Read, 2008).

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

Todas las orquídeas producen semillas diminutas y pobres en endospermo por lo que son dependientes de colonización fúngica para la germinación y crecimiento hasta el estado clorofílico llamado protocormo (Rasmussen, 1995; Smith & Read, 2008). Los hongos ambientales colonizan a la orquídea a través de los tejidos del suspensor del embrión o por los pelos epidérmicos y entran en las células corticales (Dearneley *et al.*, 2012). Las hifas colonizadoras de los hongos no infringen la membrana celular cortical pero se ramifican en el espacio entre la pared celular y la membrana, formando elaboradas estructuras en espiral conocidas como pelotones (Dearneley *et al.*, 2012).

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).

Los hongos asociados a orquídeas no pueden ser más precisamente identificados de forma simple a partir de hongos cultivados o directamente desde protocormos de orquídeas, raíces, tubérculos y rizomas (Bougoure *et al.*, 2005; Suárez *et al.*, 2006; Martos *et al.*, 2009; Swarts *et al.*, 2010). Los hongos pertenecientes al filum Basidiomycota, con los órdenes Cantharellales, Sebaciales, Ceratobasidiales y Atractielalles han sido reportados como los hongos micorrízicos más comunes de las orquídeas autótrofas (Otero *et al.*, 2002, 2007; Suárez *et al.* 2006; Kottke *et al.*, 2008; Suárez *et al.*, 2008; Kottke *et al.* 2010; Graham & Dearneley, 2012). En cambio, las llamadas orquídeas mycoheterotróficas (MH) se asocian con un grupo diverso de hongos Ascomycota o Basidiomycota (Bidartondo *et al.*, 2004; Girlanda *et al.*, 2006; Martos *et al.*, 2009).

Las orquídeas mycoheterotróficas (MH) se asocian con un grupo diverso de hongos Ascomycota o Basidiomycota (Bidartondo *et al.*, 2004; Girlanda *et al.*, 2006; Martos *et al.*, 2009). Sin embargo, las orquídeas autótrofas generalmente se asocian con una gama limitada de Basidiomycota, principalmente Agaricomycotina incluyendo miembros de Tulasnellaceae (Suárez *et al.*, 2006; Kottke *et al.*, 2008), Sebacinales (Kottke *et al.*, 2008; Suárez *et al.*, 2008), y Ceratobasidiaceae (Otero *et al.*, 2002, 2007; Graham & Dearnaley, 2012).

Aunque las especies epífitas representan el mayor número de orquídeas de todo el mundo (Jones, 2006) son sorprendentemente menos estudiadas en cuanto a sus asociaciones micorrízicas. Los hongos micorrízicos escasamente colonizan las raíces de las orquídeas epífitas en comparación con orquídeas terrestres (Boddington & Dearnaley, 2008; Smith & Read 2008; Graham & Dearnaley 2012; Martos *et al.*, 2012), pero la identificación molecular de los micobiontes presentes los revela como las típicas “rhizoctonias” de orquídeas verdes. Esto ha incluido los miembros de Ceratobasidiaceae (Otero *et al.*, 2002, 2004, 2005, 2007; Pereira *et al.*, 2005; Gowland *et al.*, 2007; Graham & Dearnaley, 2012), de Tulasnellaceae (Pereira *et al.*, 2003; Suárez *et al.*, 2006; Kottke *et al.*, 2008; Martos *et al.*, 2012) y Sebacinales (Suárez *et al.*, 2008; Martos *et al.*, 2012).

Las asociaciones micorrízicas en orquídeas requieren un delicado equilibrio entre la agresión del hongo y las defensas de la planta, así, sólo ciertas asociaciones huésped-hongo son exitosas (Burgeff, 1959; Hadley, 1982). Los metabolitos fungiestáticos producidos por la planta se cree que son importantes para el control de hongos compatibles (Burgeff, 1959; Xu *et al.*, 1998). La evolución de muchos linajes de orquídeas con plena asociaciones de explotación proporciona una prueba más de una capacidad altamente desarrollada para el control del hongo (Brundrett, 2002). Estudios recientes han demostrado la naturaleza de la asociación micorrízica con orquídeas autótrofas, sugiriendo que la asociación puede ser mutualista (Cameron *et al.*, 2006, 2008; Perotto *et al.* 2014).

Las micorrizas tienen tres vías de interacción: planta, hongo y suelo (Brundrett, 1991), por lo que debemos esperar que el medio ambiente y los factores edáficos afecten a su estructura y función. En consecuencia, la información sobre los suelos y hábitats donde se producen las micorrizas, puede ser tan valiosa como la información acerca de la identidad taxonómica del hongo (Brundrett, 2004). El grado de especificidad de micorrizas puede tener importantes consecuencias sobre la distribución y conservación de las orquídeas (Riofrío *et al.*, 2013).

El establecimiento y la supervivencia de las orquídeas epífitas dependen de factores tales como las condiciones ambientales de los bosques que lo sustentan y, quizás lo más importante, de la presencia de hongos apropiados (Riofrío *et al.*, 2013). Dado que las orquídeas requieren la presencia de hongos asociados adecuados para la germinación y establecimiento de plántulas, se requiere una comprensión más completa de la biología de las micorrizas para aplicarlo en esfuerzos de conservación de orquídeas (Batty *et al.*, 2002; Dearneley *et al.*, 2012), especialmente cuando las especies requieren hongos específicos (McCormick *et al.*, 2004).

1.1.3 Hongos endófitos de orquídeas

La definición más apropiada de endofitismo es, asociación asintomática de otros organismos vivos que crecen dentro de los tejidos de la planta viva (Wilson, 1995). Muchos hongos pueden colonizar rápidamente la corteza de las raíces vivas sin causar enfermedades, incluyendo hongos patógenos o necrotróficos con fases latentes, así como hongos beneficiosos que ofrecen protección contra los patógenos, pero no es fácil de clasificar de modo preciso las funciones de estos hongos (Sivasithamparam, 1998).

Las asociaciones endófitas difieren de las micorrizas principalmente por la ausencia de una interfaz localizada de hifas especializadas (presente en la mayoría de las micorrizas), la ausencia de un desarrollo sincronizado planta-hongo, y la falta de beneficios de la planta de la transferencia de nutrientes (Brundrett, 2004).

Sin embargo, las plantas pueden beneficiarse indirectamente de los endófitos por un aumento de la resistencia a herbívoros, patógenos o estrés, o por otros mecanismos desconocidos (Saikkonen *et al.*, 1998).

1.2 Las Orquídeas en Ecuador

Refiriéndonos a la biodiversidad de plantas en Ecuador, se han identificado 18176 especies de plantas con semillas, representando al 5% de todas las especies registradas en el mundo. De éstas, el 30% son endémicas del Ecuador, aproximadamente la mitad de todas las especies de plantas en el país crecen entre 900-3000 m s.n.m. Sin embargo, esto representa solo el 10% del área total del país (Cueva & González, 2009).

Orchidaceae representa la familia más numerosa de plantas entre las monocotiledóneas, con 27135 especies aceptadas en el mundo (The Plant list, 2010). Como la familia más grande de plantas con flor, con 27135 especies aceptadas (The Plant list, 2010) se ha acumulado conocimiento biológico básico de lo que representa aproximadamente el 10% de la diversidad botánica. Además, es la familia de plantas vasculares más grande del Ecuador,

con cerca de 4000 especies, de las cuales el 40% son endémicas (Jørgensen & León-Janez, 1999).

1.2.1 Importancia de las orquídeas

Algunas especies de orquídea, como la aromática *Vanilla* spp. o algunas especies ornamentales, tienen importante valor económico (Dearneley *et al.*, 2012). En Ecuador, la mayoría de las especies de orquídeas tienen un significativo valor económico debido al comercio internacional (Simpson, 2006).

La apreciación de la belleza de la orquídea tiene una historia muy larga tanto en la cultura occidental, como en la oriental. Mucho de esto se atribuye tanto a la forma diversa, a la estructura de las orquídeas y el gran número de especies en la familia (Cueva & González, 2009). El cultivo de orquídeas ha recorrido un largo camino, con los años se ha convertido en un negocio altamente comercial. Hoy en día, el cultivo de orquídeas es algo más que una industria: es un negocio internacional (Griesbach, 2002).

En América del Sur, la producción de orquídeas a gran escala está limitada a un corto número de productores, debido a la ausencia de información genética y protocolos de cultivo *in vitro* para las especies nativas y endémicas. En Ecuador, las orquídeas se solicitan principalmente para fines decorativos, especialmente durante la temporada de Navidad y, en mayor medida, por los coleccionistas extranjeros que pagan precios exorbitantes por las orquídeas raras (Cueva & González, 2009). Sin embargo, en el sur del Ecuador sólo hay un productor comercial que utiliza la micropropagación (Cuoco & Cronan, 2009).

1.2.2 Distribución y Amenazas

Es importante tener en cuenta que la distribución de la orquídea se limitan no sólo por la presencia de hongos compatibles, sino también por su abundancia (Diez, 2007; McCormick *et al.*, 2012) y por otros factores, como la polinización (Pauw & Bond, 2011), dispersión de semillas (Jacquemyn *et al.*, 2009; Winkler *et al.*, 2009), o condiciones ambientales (Těšitelová *et al.*, 2012).

El hábitat de muchas especies epífitas que viven a la sombra de denso dosel forestal se caracteriza por una baja irradiación y es posible que las especies se reconozcan pronto como mixotróficas con una dependencia exterior del carbono que reciben (Dearneley *et al.*, 2012). La dependencia en las orquídeas epífitas a hongos micorrízicos durante todo el ciclo

de vida no es sorprendente ya que los micobiontes, con su aumento de la superficie de absorción, pueden mejorar el acceso a agua y minerales (Zotz & Schmidt, 2006).

Desafortunadamente, la mayoría de las especies de orquídeas epifitas se encuentran en peligro debido a la alta tasa de deforestación y la pérdida de hábitat consecuente (Dodson, 2004). Esto es grave si se considera que la distribución de muchas orquídeas es conocida solo por una colección pobre, que en la mayoría de los casos corresponde a una localidad fuera del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (Valencia *et al.*, 2000). Según la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), el 74% de las especies de orquídeas son vulnerables y el 11% están en peligro o en peligro crítico (Valencia, 2000).

En el sur de Ecuador las dos principales amenazas a la supervivencia de orquídeas son antrópicas (Cueva & González, 2009). La primera amenaza es la deforestación, pues muchas especies de orquídeas en su medio natural requieren grandes extensiones de bosque intacto para ser reproductivamente exitosas (Dodson & Escobar, 1994). El hábitat de las orquídeas ha sido destruido por la presión de una población creciente y la expansión de la red de carreteras, y agravado por el mínimo control de la deforestación, incluso en zonas protegidas (Cueva & González, 2009; Cuoco & Cronan, 2009). La segunda amenaza es la recolección de orquídeas del hábitat natural, debido al aumento de la accesibilidad a las áreas, es casi imposible determinar el volumen de las orquídeas que se extraen de los bosques en el sur de Ecuador cada año (Dodson, 2004).

1.2.3 Géneros *Cyrthochilum* y *Epidendrum*

Estos dos géneros están reportados en el Ecuador y se caracterizan por ser mayormente epífitas (Dodson, 2002). *Epidendrum* se encuentra dentro la Subtribu Laeliinae, una de las tres subtribus más abundantes en el Ecuador (Dodson, 2001).

A. *Cyrthochilum*

Las especies de este género son epífitas o raramente terrestres. Crecen sobre terraplanes escarpados en bosques de tierras bajas húmedas a elevaciones 40-1500 metros sobre el nivel del mar (Dodson, 2005).

- ***Cyrthochilum flexuosum* (Kunth, 1816)**

Planta epífita, de aproximadamente 50 cm. Pseudobulbos bifoliados, ligeramente comprimidos, lisos, separados, cubiertos por 2–4 vainas foliáceas caducifolias a cada lado. Hojas estrechamente oblongas-lanceoladas. Inflorescencia en panícula, alargada. Flores color amarillo intenso con manchas amarillo oscuras, y las marcas de color marrón claro, sépalos y pétalos libres (Mendoza, 2013).

- ***Cyrtorchilum myanthum* (Kraenzl, 1917)**

Distinguido por su labio ovado y fuertemente recurvado, 2 callos cónicos, oblongos, basalmente unidos y rígidamente erectos, con inflorescencia densamente ramificada, ramas laterales, y flores amarillas con segmentos teñidos de color marrón oscuro (Dodson, 2005).

B. Epidendrum

De la Subtribu Laeliinae el género *Epidendrum* constituye el segundo género más grande de las orquídeas del Ecuador con una cantidad de 452 especies de 1200 especies en total (Dodson, 2002). Con 110 especies, distribuidas en casi todos los hábitats, pero el mayor número se producen como epífitas en bosque nublado húmedo en las laderas de los Andes (Dodson, 2005). Caracterizado, entre otras, por plantas con tallos como caña o pseudobulbos, no superpuestos, hojas planas, inflorescencia terminal, flores sin una articulación entre el ovario y el pedúnculo, labio unido a la columna, a su ápice y con callos carentes o sólidos (Dodson, 2005).

- ***Epidendrum hemiscleria* (Rchb.f., 1862)**

Esta especie es un miembro del grupo Hemiscleria. Se distingue por tallos yacentes, sin vainas, y agrandados en la base de la inflorescencia; pedúnculo alargado, colgante, y de color rojo brillante; y las flores de color naranja carnosas con una columna corta que rodea la base del labio (Dodson, 2005).

- ***Epidendrum dalessandroi* (Hágsater & Dodson, 2001)**

Epidendrum dalessandroi pertenece al grupo Albertii, subgrupo Albertii y es reconocido por las plantas con largas inflorescencias apicales y laterales, el tallo como caña, el largo pedúnculo de la inflorescencia cubierto parcialmente por brácteas conduplicadas y redondeadas, y las flores grandes con un labio convexo, cordiforme y emarginado, sépalo dorsal, y la columna prolongada (Dodson, 2005).

1.3 Bosque Montano y su diversidad

El bosque montano tropical de los Andes es uno de los ecosistemas más ricos del mundo en lo que se refiere al número de especies (Barthlott *et al.*, 1996). Es así que Myers *et al.* (2000) menciona a los Andes orientales como uno de los «puntos calientes» de biodiversidad. La mayor diversidad de plantas en Ecuador se encuentra en la región de montaña, con el 64% de las especies (Cueva & Golzález, 2009).

Aun así, los bosques montanos tropicales, como tales, han sido sólo recientemente investigados en mayor profundidad (Churchill *et al.*, 1995). Es así como los bosques

montañosos relictos de los Andes del sur de Ecuador y del norte de Perú han sido recientemente reconocidos como uno de los más importantes centros de diversidad florística del mundo (Barthlott *et al.*, 1999; Young & Reynel, 1997), y como *hot spots* en relación con su prioridad de conservación (Myers *et al.*, 2000). De hecho esta zona constituye uno de los pocos lugares del planeta donde aún es posible descubrir plantas vasculares nuevas para la ciencia (Weigend, 2002).

Este ecosistema expresa condiciones peculiares propias de áreas de mayor elevación tales como temperatura más baja, mayor humedad e incremento de la evaporación debido a la exposición a los vientos (Morales, 1999). Es importante por varias razones; entre ellas, el papel que juegan en el balance hidrológico a escala regional, la diversidad biológica que alberga, la abundancia y diversidad de epífitas, más alta que en ningún otro tipo de bosque (Ewel, 1980).

OBJETIVOS

General

- Identificar molecularmente aislados de hongos micobiontes obtenidos a partir de raíces de cuatro especies de orquídeas epífitas.

Específicos

- Obtener cultivos puros de hongos micorrízicos de orquídeas mediante dos diferentes métodos de aislamiento.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y colección de muestras

Los sitios de estudio corresponden a dos localidades de bosque montano (Baquero *et al.*, 2004), ubicados en las zonas aledañas a la vía Loja-Zamora Chinchipe, denominados como “El tiro” y “Curva Misteriosa”.

En cada sitio se colectó aproximadamente 10 individuos por cada una de las cuatro especies de orquídeas: *Cyrtochilum myanthum*, *Cyrtochilum flexuosum*, *Epidendrum hemiscleria* y *Epidendrum dalessandroi*, esto dependió de la condición de las poblaciones existentes. Por cada espécimen se extrajo un total de tres raíces. Para la colección se tomó en cuenta que sean raíces jóvenes con color amarillento u opaco, característico de la colonización (Zhu *et al.*, 2008) y además que estén en contacto con el hospedero (Figura 1).



Figura 1. Colección de muestras de raíz de *C. flexuosum*.

Las raíces colectadas en el campo fueron transportadas al laboratorio en bolsas de aluminio para evitar su desecación.

Análisis microscópico

Por cada individuo muestreado se preparó al menos tres cortes transversales que fueron teñidos con Azul de metileno 0,05%. Se analizó microscópicamente cada corte para confirmar la colonización por hongos en las células corticales de la raíz (Figura 2).



Figura 2. Cortes transversales de la raíz de *C. flexuosum* teñidos con azul de metileno al 5%.

Aislamiento de hongos

Para el análisis microscópico se tomo en cuenta tres raíces por individuo muestreado, Este proceso permitió seleccionar raíces con presencia de colonización en células corticales. Durante la fase de aislamiento de los hongos micorrízicos se emplearon dos métodos distintos. A continuación se describen ambos procesos:

- a. Raíces que presentaron colonización en células corticales fueron desinfectadas externamente usando agua con jabón, etanol 70% por treinta segundos, cloro 20% durante tres minutos y tres enjuagues con agua estéril. Seguidamente el velamen se eliminó y de la sección resultante se tomaron cortes transversales que fueron incubados en agua estéril durante 24 horas a 27 °C. El corte fue transferido a cajas Petri con medio de cultivo Moser b, la incubación se dio a 28°C. Finalmente los aislados fúngicos se mantuvieron en Potato Dextrosa Agar (PDA) (Suárez *et al.*, 2006; Herrera *et al.*, 2010).
- b. Raíces que presentaron colonización en las células corticales fueron seleccionadas y desinfectadas con una combinación de 2.5 ml etanol, 2.5 ml cloro y 4.5 ml agua estéril, durante 1 minuto. Posteriormente, se realizó cortes transversales de la raíz. La extracción de pelotones se efectuó con ayuda del microscopio, pipetas pasteur, pinzas y bisturís (Bernard, 1909). Seguidamente se los colocó en cajas Petri, donde fue necesario añadir medio de cultivo Fungi Isolation Medium (FIM). Finalmente, se realizaron subcultivos en medio PDA hasta obtener aislados fúngicos puros, necesarios para el posterior análisis.

Análisis Molecular

De los hongos aislados a partir de raíces de orquídeas epífitas, se extrajo el ADN usando Plant Mini Kit (Invitrogen). La PCR se enfocó en la región ITS1-5.8S-ITS2 y una parte de 28S de rDNA utilizando la combinación de primers ITS1 (5 '-TCC GTA GGT GAA CCT GCG-3') (White *et al.*, 1990) y TW14 (5 '-GCT ATC AGG CTG GAA ACT TC-3') (Cullings, 1994), con la polimerasa Taq Phusion (Finnzymes) Master Mix en un volumen final de 20 uL. Las condiciones de PCR constaron de una desnaturalización inicial a 98°C por 30 segundos; seguido 35 ciclos con desnaturalización a 98°C por 10 segundos, temperatura de anillamiento de 60°C por 20 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos; por último una extensión final a 72°C por 10 min. Los productos de PCR se verificaron por medio de electroforesis (128 V, 300 mA, 20 min) en geles de agarosa al 1%. A los productos de PCR que tenían el tamaño de banda esperado (aproximadamente 800 bp.) para los primers utilizados se procedió a purificarlos con el kit Wizard SVClean (PROMEGA) y por último se secuenció la región ITS.

La edición de las secuencias se realizó con el programa Codon Code Aligner V 4.2.4, para posteriormente compararlas en la herramienta BLAST (Altschul *et al.*, 1997) de la base de datos de nucleótidos del NCBI (GenBank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Muestreo

Se obtuvieron raíces de 124 individuos de las especies *Cyrtochilum myanthum*, *Cyrtochilum flexuosum*, *Epidendrum hemiscleria* y *Epidendrum dalessandroi* como se muestra en la Tabla 1; siendo el Tiro la zona con mayor número de colecciones. De las cuatro especies, las poblaciones del Tiro presentaron 99 individuos, contrario a la Curva misteriosa, donde las poblaciones observadas fueron pequeñas, con 25 representantes.

	El tiro	Curva misteriosa
<i>Cyrtochilum flexuosum</i>	26	10
<i>Cyrtochilum myanthum</i>	24	10
<i>Epidendrum hemiscleria</i>	27	3
<i>Epidendrum dalessandroi</i>	22	2

Tabla 1. Individuos de la población muestreados en cada sitio.

4.2 Colonización micorrízica

El análisis microscópico de las raíces de orquídea colectadas, reveló que 115 de 124 individuos estaban colonizados por hongos. La visualización de pelotones en las células corticales de las raíces es vista como la mejor forma de comprobar la presencia de hongos micorrízicos en orquídeas (Kottke *et al.*, 2010). Es importante mencionar que se observó pelotones colapsados y saludables en el mismo tejido (Figura 3a), lo que, según Riofrío *et al.* (2013) se debe a la colonización subsecuente en las raíces. Por otro lado, la ausencia de colonización, (Figura 3b), puede ser causada por el estadio de desarrollo en que se encuentra cada orquídea (Jacquemyn *et al.*, 2011) o por la época en que se la colecta (Dearnaley *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha reportado que el mantenimiento de asociaciones micorrízicas en etapas adultas puede ser ventajoso en condiciones ambientales adversas ya que las orquídeas son capaces de obtener carbono a través de sus simbiontes (Hudson, 1992; Dearnaley *et al.*, 2012), lo que justifica la presencia de pelotones en el 92% de los individuos.

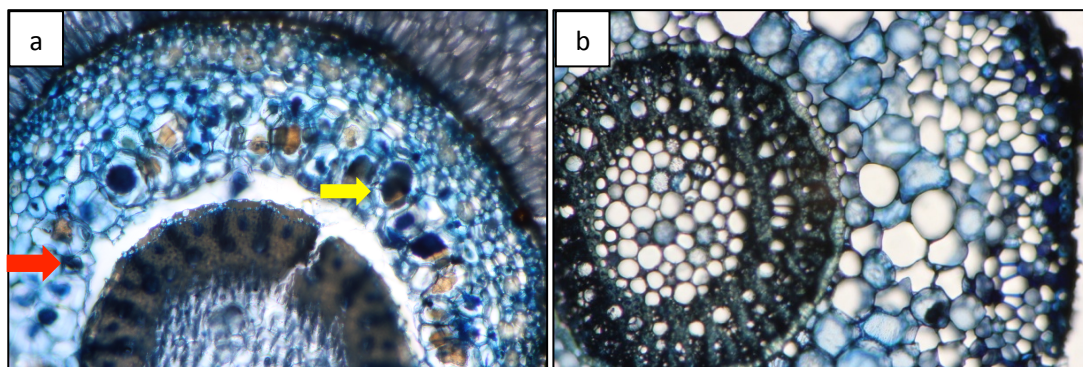


Figura 3. Cortes transversales de raíz . a) Células corticales colonizadas por hongos micorrízicos: pelotones sanos (flecha amarilla) y pelotones colapsados (flecha roja). b) Células sin colonización.

4.3 Aislamiento de hongos

Los métodos de aislamiento de pelotones dieron como resultado 40 aislados fúngicos. El método en el que se emplea la siembra de los cilindros corticales, mostró baja eficacia (6 aislados fúngicos) para las especies utilizadas en este estudio (Figura 5), sin embargo, ha sido reportado como un método eficaz para otras especies (Suárez *et al.*, 2006; Acevedo, 2010; Herrera *et al.*, 2010). Contrario a esto, el segundo método de siembra de pelotones (Bernard, 1909) mostró mejor efectividad (34 aislados fúngicos) con estas especies de orquídea (Figura 4), el desarrollo de hifas se evidenció siempre dentro de los cinco días subsecuentes al aislamiento. Es posible que los hongos asociados a estas especies de orquídeas, necesitan otras condiciones de aislamiento para lograr su desarrollo *in vitro*. Siendo este un método, por mucho tiempo, ampliamente recomendado para el aislamiento de hongos micorrízicos (Warcup & Talbot 1967), presenta algunos inconvenientes en el proceso, principalmente por contaminación bacteriana y la necesidad de contar con pelotones que no presenten ningún tipo de deterioro (Zhu *et al.*, 2008), cuestión que resulta problemática ya que es un factor dependiente de la percepción de cada investigador.

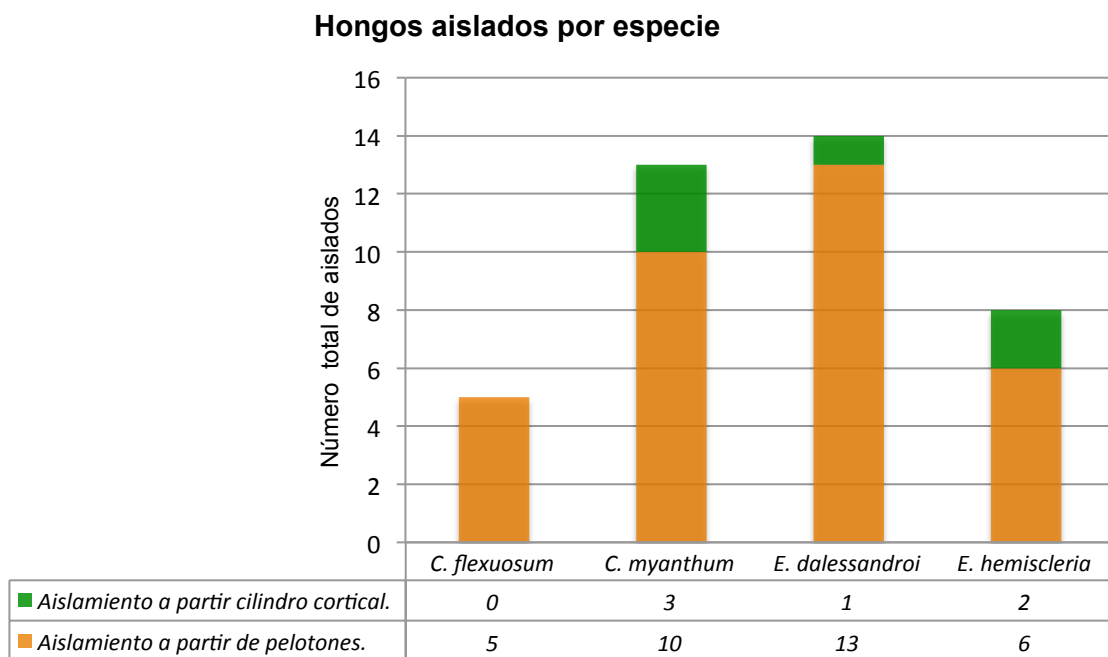


Figura 4. Número total de hongos aislados por cada especie colectada, según los dos métodos empleados.

Estos 40 aislados fúngicos (Figura 5) son una contribución al banco de microorganismos de la Universidad Técnica Particular de Loja (Anexo 1) y representan una base sobre la cual es posible la ejecución de futuros estudios enfocados a la ampliación del conocimiento. Ejemplos claros de futuras investigaciones engloban análisis de las interacciones que estos individuos presentan dentro de los ecosistemas, cuyos resultados apoyarán la

implementación de medidas efectivas de conservación de bosque montano en el sur del Ecuador (Riofrío *et al.*, 2013).

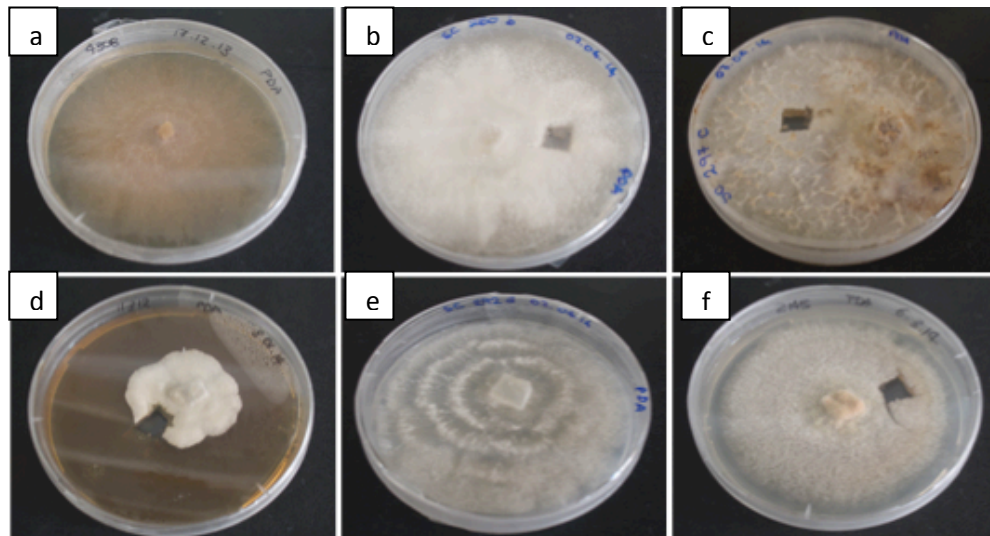


Figura 5. Fotografías de algunos de los hongos aislados. a) *Tulasnella violea*. b) *Hypocreales* sp. c) *Peniophora phithya*. d) *Helotiales* sp. e) *Poliporales* sp. f) *Helotiales* sp.

4. 4 Identificación molecular

La combinación de primers ITS1-TW14 que amplifica las regiones ITS1-5.8S-ITS2 y 28S parcial, fue elegida porque no excluye grupos de hongos que pueden formar micorrizas con orquídeas (Suárez *et al.*, 2008). De esta manera la posibilidad de identificar el aislado aumenta. Riofrío *et al.* (2013) utiliza los mismos cebadores en muestras de ADN total de raíces de orquídeas, obteniendo buenos resultados para el 86% de sus muestras.

ITS1-5.8S-ITS2 son las regiones de nrADN más usadas en análisis filogenéticos, por considerarse regiones que aportan suficiente información para distinguir géneros y especies, llegando a ser considerada como la región para el “barcode” oficial de los hongos (Schoch *et al.* 2012).

Los 40 productos de PCR correspondientes a los aislados puros se verificaron por medio de electroforesis, donde 35 productos mostraron el tamaño de banda esperado de acuerdo a la combinación de primers utilizada. Una vez obtenidas las secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2 se procedió con el análisis y en algunos casos fue necesario editarlas con el software Codon Code Aligner, lo que resultó en 16 secuencias de buena calidad que reflejaron completamente la región de interés. Las 19 secuencias restantes no fueron empleadas para el BLAST porque no eran de buena calidad. De los individuos que no se obtuvieron buenas secuencias, a pesar que se verificaron por electroforesis, será necesario hacer en lo posterior una re amplificación a partir de su ADN total.

El análisis de las secuencias en el BLAST se realizó escogiendo como válidas las especies que presentaron mayor porcentaje de similitud y cobertura. Los resultados del análisis en

BLAST se muestran en la Tabla 2.

Código del colector	Especie con mayor similitud en BLAST	% de Identidad	% de cobertura	Accesión	Orquídea de la cual se aisló
AC-011	Helotiales sp.	99%	100%	HQ207036.1	<i>E. hemiscleria</i>
AC-010	<i>Tulasnella violea</i>	99%	99%	KC152430.1	<i>E. hemiscleria</i>
AC-026	Hypocreales sp.	100%	100%	HQ207019.1	<i>E. hemiscleria</i>
AC-006	Hypocreales sp.	100%	100%	HQ207053.1	<i>E. hemiscleria</i>
AC-007	<i>Fusarium solani</i>	99%	100%	KF918580.1	<i>E. dalessandroi</i>
AC-014	<i>Ceriporia lacerata</i>	99%	100%	KF152169.1	<i>E. dalessandroi</i>
AC-029	Ascomicota sp	97%	77%	JF773599.1	<i>E. dalessandroi</i>
AC-004	Helotiales sp.	99%	100%	HQ207039.1	<i>E. dalessandroi</i>
AC-008	<i>Trametes versicolor</i>	99%	100%	KF800596.1	<i>E. dalessandroi</i>
AC-005	<i>Fusarium solani</i>	99%	100%	KF918580.1	<i>E. dalessandroi</i>
AC-001	Polyporales sp.	96%	100%	JQ312197.1	<i>E. dalessandroi</i>
AC-012	Llyonectria sp.	100%	100%	JX231165.1	<i>C. myanthum</i>
AC-002	<i>Peniophora pithya</i>	99%	85%	KC771449.1	<i>C. myanthum</i>
AC-022	Trametes sp.	98%	100%	KF578082.1	<i>C. flexuosum</i>
AC-009	Bjerkandera sp.	98%	98%	KF578081.1	<i>C. flexuosum</i>

Tabla 2.BLAST de las secuencias

Dentro de la clase Agaricomycetes, el orden Cantharellales, se encuentra el género *Tulasnella* que ha sido ampliamente reportado como un hongo micorrízico de orquídea (Dearneley *et al.*, 2012; Herrera *at al.*, 2010; Jacquemyn *et al.*, 2010; Suárez *et al.*, 2006) y específicamente *Tulasnella violea* ha sido previamente encontrada formando asociaciones micorrízicas en orquídeas epífitas de bosque montano (Cruz *et al.*, 2010). Por otro lado, el orden Russulales con *Peniophora pithya* y el orden Poliporales con *Polyporus tricoloma*,

Tremates sp., *Bjerkandera* sp. y *Polyporales* sp., no se han registrado como endófitos o micorrizas de orquídea. Sin embargo, en el orden de *Russulales* se encuentran géneros como *Gymnomyces* (Dearneley & Le Brocque, 2006) y *Russula* (Taylor *et al.*, 2004) registrados por Dearneley *et al.* (2012) como formadores de micorrizas de orquídeas; y un caso especial en el orden Poliporales es *Ceriporia lancerata* que recientemente se ha reportado como un endófito de *Cleistocalyx operculatus* (Wang *et al.*, 2013) lo que sugiere que estos órdenes pueden poseer un mayor número de especies potencialmente endófitas. El 31% de los aislados obtenidos pertenecen a los órdenes Hypocreales y Helotiales, miembros de los Ascomicetes, que han sido reportados como endófitos de orquídea (Herrera *et al.*, 2010; Ávila-Díaz *et al.* 2013).

Furarium solaní representa el 12% de las identidades moleculares obtenidas. Este microorganismo ha sido reportado como patógeno (Beayon *et al.*, 1996; Girlanda *et al.*, 2006) y como endófito promotor del crecimiento de plántulas de orquídeas (Ovando *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2007). Debido a que esta especie se ha encontrado como endófito de plantas, no podemos descartar la posibilidad de una relación simbiótica hongo-orquídea, de manera puntual con las especies *C. myanthum*, *C. flexuosum*, *E. hemiscleria* y *E. dalessandro*. Similar asociación se propone para algunas cepas de *Fusarium* que se encontraron colonizando *Pecteilis susannae* reportado recientemente por Chutima *et al.* (2011).

La obtención de cultivos puros *in vitro*, a partir de pelotones es ampliamente recomendado para evitar aislar endófitos (Dearneley *et al.*, 2012). Sin embargo este estudio muestra una gama de hongos endófitos con pocos reportes de simbiosis. Es necesario considerar que las raíces colectadas estaban en estrecho contacto con la corteza de los árboles, dónde, algunos ascomicetes asociados al velamen pudieron aislarse en los diferentes procesos, como resultado de una incompleta eliminación de este tejido. No obstante, anteriormente se ha sugerido que este tipo de hongos que no tiene claramente una asociación micorrízica pueden indirectamente mejorar el acceso de nutrientes de las orquídeas por la descomposición del sustrato fuera de las raíces (Herrera *et al.*, 2010), cumpliendo de igual manera roles important es para la estabilidad del ecosistema.

La identidad de muchos hongos asociados a raíces de orquídeas, aún se está describiendo, por lo que se hace necesario intensificar los estudios, por su potencial para la conservación.

CONCLUSIONES

El estado de los pelotones puede resultar un determinante a la hora de procurar el aislamiento de hongos en cultivos puros. En el caso particular de las orquídeas epifitas *Cyrtorchilum myanthum*, *Cyrtorchilum flexuosum*, *Epidendrum hemiscleria* y *Epidendrum dalessandroi* la extracción de pelotones de las células corticales resultó ser el método más efectivo.

Los aislados obtenidos no nos permiten inferir con claridad toda la diversidad de hongos asociados a las cuatro especies de orquídeas para los dos niveles altitudinales, ya que muchos hongos no fueron susceptibles de aislamiento con los métodos empleados en este estudio.

Sigue siendo prioridad para investigaciones presentes y futuras, el levantamiento de información complementaria que permita la inferencia de relaciones orquídea-hongo con los diferentes fila Basidiomycota y Ascomycota, en las que se tome en cuenta la identidad del tanto de la planta como del hongo. Pautas necesarias para entender la forma en que se integran las especies. Apoyándonos en estos estudios estar en capacidad para realizar un adecuado manejo de las especies.

RECOMENDACIONES

- Es importante tener conocimiento de la estructura de las poblaciones de orquídeas previo a la colecta para evitar las diferencias en el número de individuos por especies colectadas.
- El número de muestras a colectar por salida de campo, debe manejarse en función de la capacidad de aislamiento que se tenga en el laboratorio, para evitar pérdida de material.
- Es importante conocer la identidad de las plantas a muestrear, porque resulta un limitante el no encontrarlas en flor en el transcurso del muestreo.
- Es recomendable mantener el mismo kit de extracción de ADN para obtener concentraciones de ADN homogéneas.
- Cambiar el medio de cultivo en que se desarrollan los hongos, afecta el crecimiento y el tiempo de desarrollo de los individuos. Se recomienda estandarizar para el tipo de hongo que se está trabajando.

BIBLIOGRAFIA

- Acevedo R. 2010. 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. UTPL. 50 pp.
- Ávila-Díaz I., Garibay-Orijel R., Magaña-Lemus R. & Oyama K. 2013. Molecular evidence reveals fungi associated within the epiphytic orchid *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. *Botanical Sciences*. 91:
- Baquero F., Sierra R., Ordóñez L., Tipán M., Espinosa L., Rivera M. & Soria P. 2004. La vegetación de los Andes del Ecuador. *EcoCiencia*. ESLA. EcoPar. División Geográfica – IGM.
- Barthlott W., Lauer W. & Placke A. 1996. Global distribution of species diversity in vascular plants: towards a map of phyto diversity. *Erdkunde* 50: 317- 327.
- Barthlott W., Biedinger N., Braun G., Feig F., Kier G. & Mutke J. 1999. Terminological and methodological aspects of the mapping and analysis of global biodiversity. *Acta Botánica Fennica* 162: 103-110.
- Batty A. L., Dixon K. W., Brundrett M. C., & Sivasithamparam K. 2002. Orchid conservation and mycorrhizal associations. *Microorganisms in plant conservation and biodiversity*. 195–226.
- Bayman P., Gonzalez E. J., Fumero J. J., Tremblay R. L. 2002. Are fungi necessary? How fungicides affect growth and survival of the orchid *Lepanthes rupestris* in the field. *Journal of Ecology*. 90:1002–1008.
- Bernard N. 1909. L'évolution dans la symbiose. Les orchidées et leur champignons commensaux. *Annales des Sciences Naturelles; Botanique*. Paris 9: 1-196.
- Bidartondo M. I., Burghardt B., Gebauer G., Bruns T. D., & Read D. J. 2004. Changing partners in the dark: Isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proceedings of the Royal Society of London, B, Biological Sciences*. 271: 1799–1806.
- Boddington M., Dearnaley J. D. W. 2008. Morphological and molecular identification of fungal endophytes from roots of *Dendrobium speciosum*. *Proc R Soc Queensland*. 114: 13–17.

- Boucher D. H., James S. & Keeler K. H. 1982. The ecology of mutualism. *Annual Review of Ecology and Systematics*.13: 315–347.
- Boucher D. H. 1985. The idea of mutualism, past and future. In *The Biology of Mutualism*. D. H. Boucher ed. Croom Helm, London.
- Bougoure J. J., Bougoure D. S., Cairney J. W. G., Dearnaley J. D. W. 2005. ITS-RFLP and sequence analysis of endophytes from *Acianthus*, *Caladenia* and *Pterostylis* (Orchidaceae) in southeastern Queensland. *Mycol Res*. 109:452–460.
- Brundrett M. C. 1991. Mycorrhizas in natural ecosystems. *Advances in Ecological Research*. 21: 171–313.
- Brundrett M., Bougher N., Dell B., Grove T. & Malajczuk N. 1996. *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture*. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.
- Brundrett M. C. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*.154: 275–304.
- Brundrett M. C. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Revisions*. Cambridge Philosophical Society. 79 pp.
- Burgeff H. 1959. Mycorrhiza of orchids. In *The Orchids a Scientific Study*. The Roland Press Company, New York.361–395.
- Burgess T., Dell B. & Malajczuk N. 1994. Variations in mycorrhizal development and growth stimulation by 20 *Pisolithus* isolates inoculated on to *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. *New Phytologist*.127: 731–739.
- 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.
- Cameron D., Johnson I., Leake J. R., Read D. J. 2007. Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *Annals of Botanic*. 99: 831–834.
- Cameron D., Johnson I., Leake J. R., Read D. J. 2008. Giving and receiving: measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. *New Phytologist*.180: 176–184.

- Chutima R., Dell B., Vessabutr S., Bussaban B. & Lumyong S. 2011. Endophytic fungi from *Pectilis susannae* (L) Rafin (Orchidaceae), a threatened terrestrial orchid in Thailand. *Mycorrhiza*. 21: 221-229.
- Cruz D., Suárez J. P., Kottke I., Piepenbring M., Oberwinker F. 2010. Defining species in *Tulasnella* by correlation morphology and nrDNA ITS-5.8S sequence data of basidiomata from a tropical Andean forest. *Mycological Progress*. 10: 229–238
- Cueva A. & González Y. 2009. In vitro germination and somatic embryogenesis induction in *Cyrtochilum loxense*, an endemic, vulnerable orchid from Ecuador. In: Pridgeon A M. Suarez JP (eds) Proceedings of the Second Scientific Conference on Andean Orchids. Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador. 56-62.
- Cullings K. 1994. Molecular phylogeny of the Monotropoideae (Ericaceae) with a note on the placement of the Pyroloideae. *Journal of Evolutionary Biology*. 7: 501–516.
- Cullings K. W. 1996. Single phylogenetic origin of ericoid mycorrhizae within the Ericaceae. *Canadian Journal of Botany*. 74: 1896–1909.
- Cuoco L. B. & Cronan J. B. 2009. Orchidaceae: Using a Globalized Commodity to Promote Conservation and Sustainable Economic Development in Southern Ecuador. *Journal of Sustainable Forestry*, 28: 799 —824.
- Dearnaley J. D. W. & Le Brocq A. F. 2006. Molecular identification of the primary root fungal endophytes of *Dipodium hamiltonianum* (Yellow hyacinth orchid). *Journal of Botany*. 54: 487–491
- Dearneley J. 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza*. 17: 475-486.
- Dearnaley J., Martos F. & Selosse M. 2012. Orchid Mycorrhizas: Molecular Ecology, Physiology, Evolution and Conservation Aspects. *Fungal Associations*. 2nd Edition. The Mycota IX B. Hock Ed. 207-230.
- Dell B., Malajczuk N., Bougher N. L. & Thompson G. 1994. Development and function of *Pisolithus* and *Scleroderma* ectomycorrhizas formed in vivo with *Allocasuarina*, *Casuarina* and *Eucalyptus*. *Mycorrhiza*. 5: 129–138.
- Diez J. M. 2007. Hierarchical patterns of symbiotic orchid germination linked to adult proximity and environmental gradients. *Journal of Ecology*. 95: 159–170.
- Dodson C, 2001. Native Ecuadorian Orchids. Vol I. pp. 20.

- Dodson C, 2002. Native Ecuadorian Orchids. Vol III. pp. 435
- Dodson, C. H. 2004. Native Ecuadorian orchids. Volume V.
- Dodson C, 2005. Native Ecuadorian Orchids. Vol IV. pp. 665.
- Dodson C. H. & Escobar R. R. 1994. Native Ecuadorian orchids. Volume I. Aa - Dracula. Medellin: Editorial Colina.
- Ewel J. 1980. Tropical succession manifold routes to maturity. *Biotropica*. 12: 1-95.
- Frank B. 1885. Über die auf Wurze lymbiose beruhende Ernährung ggewisser Bäume durchunterir dische Pilze. *Berichteder Deutschen Botanischen Gessellschaft*. 3: 128–145.
- Gams W., Hoekstra E., Aptrot A. 1998. *CBS Course of Mycology*. Fourth edition. Central bureau voor Schimmel cultures, Netherlands.
- Girlanda M., Selosse M. A., Cafasso D., Brilli F., Delfine S., Fabbian R., Ghignone S., Pinelli P., Segreto R., Loreto F., Cozzolino S., Perotto S. 2006. Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum* *bortivum* mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. *Molecular Ecology*. 15: 491–504.
- Graham R. R., & Dearnaley J. D. W. 2012. The rare Australian epiphytic orchid *Sarcochilus weinthalii* associates with a single species of *Ceratobasidium*. *Fungal Diversity*. 54: 31–37.
- Griesbach R. J. 2002. Development of Phalaenopsis orchids for the mass market. Trends in new crops and new uses. ASHS, Alexandria, USA.
- Hadley G. 1982. Orchid mycorrhiza. In *Orchid Biology Reviews and Perspectives II*. 85–118. Cornell University Press. Ithaca.
- Harley J. L. & Smith S. E. 1983. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London.
- Herrera P., Suárez J. P., Kottke I. 2010. Orchids keep the ascomycetes outside: a highly diverse group of ascomycetes colonizing the velamen of epiphytic orchids from a tropical mountain rainforest in Southern Ecuador. *Mycology*. 1: 261-268.
- Hudson H. J. 1992. Fungi as mutualistic symbionts in endomycorrhizas. *Fungal biology*. 214-241. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Jacquemyn H., T. Wiegand, Vandepitte K., BRYS I., Roldán Ruiz R., & Honnay O. 2009. Multigeneration analysis of spatial structure in the terrestrial, food deceptive orchid *Orchis mascula*. *Journal of Ecology*. 97: 206–216.
- Jacquemyn H., Bryans R., Cammue B., Honnay O. & Lievens B. 2011. Mycorrhizal associations and reproductive isolation in three closely related Orchid species. *Annals of Botany*. 107: 347-356.
- Jorgensen P. & León-Yáñez S. 1999. Catálogo de plantas vasculares del Ecuador. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- Kottke I., Haug I., Setaro S., Suárez J. P., Weiss M., Preussing M., Nebel M., & Oberwinkler F. 2008. Guilds of mycorrhizal fungi and their relation to trees, ericads, orchids and liverworts in a neotropical mountain rain forest. *Basic and Applied Ecology*. 9: 13–23.
- Kottke I., Suárez J. P., Herrera P., Cruz D., Bauer R., Haug I. & Garnica S. 2010. Atractiellomycetes belonging to the “rust” lineage (*Puccinio mycotina*) form mycorrhizae with terrestrial and epiphytic neotropical orchids. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*. 277: 1289–1298.
- Lewis D. H. 1985. Symbiosis and mutualism: crisp concepts and soggy semantics. In *The Biology of Mutualism*. D. H. Boucher ed. Croom Helm, London.
- Martos F., Dulormne M., Pailler T., Bonfante P., Faccio A., Fournel J., Dubois M. P., & Selosse M. A. 2009. Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids. *New Phytologist*. 184: 668–681.
- Martos F., Munoz F., Pailler T., Kottke I., Gonneau C., & Selosse M. A. 2012. The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. *Molecular Ecology*. 21: 5098–5109.
- McCormick M. K., Whigham D. F. & O’Neill J. 2004. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *Journal New Phytologist*. 163: 425–438.
- McCormick M. K., Lee Taylor D., Juhaszova K., Burnett R. K., Whigham D. F., & O’Neill J. P. 2012. Limitations on orchid recruitment: Not a simple picture. *Molecular Ecology*. 21: 1511–1523.

- McGonigle T. P., Miller M. H., Evans D. G., Fairchild G. L. & Swan J. A. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 115: 495–501.
- Mendoza A. 2013. Catálogo de la diversidad de especies de orquídeas en la zona de amortiguamiento de Parque Nacional Podocarpus al Sur de Ecuador. Trabajo de fin de titulación. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Myers N., Mittermeier R. A., Mittermaier C. G., Da Fonseca G. A. B. & Kent J. 2000. Biodiversity hot spots for conservation priorities. *Nature*. 403/25: 853-858.
- Morales F. 1999. Geografía física del territorio en reclamación Guayana Esequiba. Fondo Editorial de Humanidades y Educación. Caracas. Venezuela.
- Nehls U., Mikolajewski S., Magel E. & Hampp R. 2001. Carbohydrate metabolism in ectomycorrhizas: gene expression, monosaccharide transport and metabolic control. *New Phytologist*. 150: 533–541.
- Nilson H., Kristiansson E., Ryberg M., Hallenberg N. & Larsson K. 2008. Intraspecific ITS Variability in the Kingdom Fungi as Expressed in the International Sequence Databases and its implications for Molecular Species Identification. *Evolutionary Bioinformatics*. 4: 193-201.
- Otero J. T., Ackerman J. D., & Bayman P. 2002. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia* - like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*. 89: 1852–1858.
- Otero J. T., Ackerman J. D., & Bayman P. 2004. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology*. 13: 2393–2404.
- Otero J. T., Bayman P., & Ackerman J. D. 2005. Variation in mycorrhizal performance in the epiphytic orchid *Tolumnia variegata* *in vitro*: The potential for natural selection. *Evolutionary Ecology*. 19: 29–43.
- Otero, J. T., S. Aragón, AND J. D. Ackerman. 2007. Site variation in spatial aggregation and phorophyte preference in *Psychilimonensis* (Orchidaceae). *Biotropica*. 39: 227–231.
- Paracer S. & Ahmadjian V. 2000. Symbiosis an Introduction to Biological Interactions. Oxford University Press, Oxford.
- Pauw A., & Bond W. J. 2011. Mutualism matter: Pollination rate limits the distribution of oil secreting orchids. *Oikos*. 120: 1531–1538.

- Pereira O. L., Rollemberg C. L., Borges A. C., Matsuoka K., & Kasuya M. C. M. 2003. *Epulorhiza epiphytic* sp. nov. Isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. *Mycoscience*. 44: 153–155.
- Perotto S., Rodda M. A., Silo F., Ercole E., Rodda M. & Girlanda M. 2014. Gene expression in mycorrhizal orchid protocorms suggests a friendly plant-fungus relationship. *Planta*. 239: 1337-1349.
- Pfeffer P. E., Bago B. & Shachar-Hill Y. 2001. Exploring mycorrhizal function with NMR spectroscopy. *New Phytologist*. 150: 543–553.
- Rasmussen H. N. 1995. Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant. Cambridge University Press, Cambridge.
- Riofrío M. L., Cruz D., Torres E., De La Cruz M., Iriando J. M. & Suárez J. P. 2013. Mycorrhizal preferences and fine spatial structure of the epiphytic orchid *Epidendrum rhopalostele*. *American Journal of Botany*. 12: 1-10.
- Saikkonen K., Faeth S. H., Helander M. & Sullivan T. J. 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions with plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 29: 319–343.
- Schoch C. L., Seifert K. A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J. L., Levesque C. A., Chen W. & Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *PNAS*. Early edition.
- Seifert K. 2009. Barcoding Fungi. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources*. 9: 83-89.
- Shefferson R. P., Taylor D. L., Weiss M., Garnica S., McCormick M. K., Adams S., Gray H. M., *et al.* 2007. The evolutionary history of mycorrhizal specificity among lady's slipper orchids. *Evolution*. 61: 1380–1390.
- Simpson, M. G. 2006. Plant systematics. Academic Press, Amsterdam.
- Sivasithamparam K. 1998. Rootcortex the final frontier for biocontrol of root-rot with fungal antagonists: a case study on asterile red fungus. *Annual Review of Phytopathology*. 36, 439– 452.
- Smith S. & Read D. 2008. Mycorrhizal symbiosis. Third Edition. Elsevier.

- Suárez J. P., Weiß M., Abele A., Garnica S., Oberwinkler F. & Kottke I. 2006. Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. Elsevier. 1257-1270.
- Suárez J. P., Weiß M., Abele A., Oberwinkler F. & Kottke I. 2008. Members of Sebaciales subgroup B form mycorrhizae with epiphytic orchids in a neotropical mountain rain forest. Mycological Progress. 7:75-85.
- Swarts N. D., Sinclair E. A., Francis A., & Dixon K. W. 2010. Ecological specialization in mycorrhizal symbiosis leads to rarity in an endangered orchid. Molecular Ecology. 19: 3226–3242.
- Taylor D. L., Bruns T. D. & Hodges S. A. 2004. Evidence for mycorrhizal races in a cheating orchid. Proceedings of the Royal Society of London. Biological Sciences. 271: 35–143
- Těšitelová T., Těšitel J., Jersáková J., Říhová G., & Selosse M. A. 2012. Symbiotic germination capability of four *Epipactis* (Orchidaceae) is broader than expected from adult ecology. American Journal of Botany. 99: 1020–1032.
- The Plant List. 2010. The plant list. [En línea] <http://www.theplantlist.org>
- Toth R., Doane C., Bennett E. & Alexander T. 1990. Correlation between host-fungal surface areas and percent colonization in VA mycorrhizae. Mycologia. 82: 519–522.
- Valencia R., Pitman N., León-Yáñez & Jorgensen P. M. 2000. Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Ecuador. Herbario Q.C.H, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- Wang J., Ling-yun Y. & Yan-hua L. 2013. Ceriporia lacerate DMC1106, a new endophytic fungus: Isolation, identification, and optimal medium for 2', 4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone production. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 18: 669-678.
- Warcup J. H. & Talbot P. H. B. 1967 Perfect States of Rhizoctonias Associated with Orchids, 631-641.
- Weigend M. 2002. Observations on the Biogeography of the Amotape-Huancabamba Zone in Northern Peru. The Botanical Review. 68: 38-54.

- White T. J., Bruns T. D., Lee S. & Taylor J. 1990 Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic, San Diego. 315–322
- Wilson, D. (1995). Endophyte – the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 73, 274–276.
- Winkler M., Hülber K., & Hietz P. 2009. Population dynamics of epiphytic orchids in a metapopulation context. *Annals of Botany*. 104: 995–1004.
- Xu Q., Liu Y., Wang X., Gu H. & Chen Z. 1998. Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Gastrodia elata*. *Plant Physiology & Biochemistry*. 36: 899–905.
- Young K. R. & Reynel C. 1997. Huancabamba Region, Peru and Ecuador. *Centres of Plant Diversity: A Guide and Strategy for their Conservation*. 3: 465-469.
- Zhu G. S., Yu Z. N., Gui Y. & Liu Z. Y. 2008. A novel technique for isolating orchid mycorrhizal fungi. *Fungal Diversity*. 33: 123-137.
- Zotz G., Schmidt G. 2006. Population decline in the epiphytic orchid *Aspasia principissa*. *Biology of Conservation*. 129:82–90.

ANEXOS

Anexo 1. Tabla de registro de hongos aislados en el Banco de microorganismos UTP

Código Banco Microorganismos	Código colector	Fecha de colección	Especie de orquídea	Hábito	Zona de muestreo
BMUTPL_002	1123	01.10.13	<i>C. myanthum</i>	Arbol vivo	El tiro-Zona 2
BMUTPL_006	2145	27.10.13	<i>E. dalessandroi</i>	Materia orgánica	El tiro-Zona2
BMUTPL_003	2226	08.11.13	<i>C. myanthum</i>	Arbol vivo	El tiro-Zona2
BMUTPL_004	11312	01.10.13	<i>E. hemiscleria</i>	Arbol vivo	El tiro-Zona2
BMUTPL_005	24380	08.11.13	<i>E. hemiscleria</i>	Materia orgánica	El tiro-Zona1
BMUTPL_031	SC134a	25.03.14	<i>C. myanthum</i>	Arbol vivo	El tiro-Zona1
BMUTPL_032	SC134b	25.03.14	<i>C. myanthum</i>	Arbol vivo	El tiro-Zona1
BMUTPL_028	SC139	25.03.14	<i>C. myanthum</i>	Arbol vivo	El tiro-Zona1
BMUTPL_029	SC139b	25.03.14	<i>C. myanthum</i>	Arbol vivo	El tiro-Zona1
BMUTPL_030	SC139x	25.03.14	<i>C. myanthum</i>	Arbol vivo	El tiro-Zona1
BMUTPL_001	SC218	01.10.14	<i>C. myanthum</i>	Arbol vivo	El tiro-Zona1
BMUTPL_036	SC243	05.12.13	<i>C. flexuosum</i>	Materia orgánica	El tiro-Zona2
BMUTPL_037	SC277	26.02.14	<i>E. hemiscleria</i>	Arbol vivo	El tiro-Zona1
BMUTPL_038	SC278	26.02.14	<i>C. flexuosum</i>	Arbol vivo	El tiro-Zona1
BMUTPL_014	SC280	20.03.14	<i>E. hemiscleria</i>	Arbol vivo	El tiro-Zona1
BMUTPL_015	SC280a	20.03.14	<i>E. hemiscleria</i>	Arbol vivo	El tiro-Zona1
BMUTPL_039	SC280b	20.03.14	<i>E. hemiscleria</i>	Arbol vivo	El tiro-Zona1
BMUTPL_016	SC280c	20.03.14	<i>E. hemiscleria</i>	Arbol vivo	El tiro-Zona1
BMUTPL_017	SC280x	20.03.14	<i>E. hemiscleria</i>	Arbol vivo	El tiro-Zona1
BMUTPL_007	SC287	25.03.14	<i>C. flexuosum</i>	Arbol vivo	El tiro-Zona 2
BMUTPL_027	SC287a	25.03.14	<i>C. flexuosum</i>	Arbol vivo	El tiro-Zona 4
BMUTPL_026	SC287b	25.03.14	<i>C. flexuosum</i>	Arbol vivo	El tiro-Zona 3
BMUTPL_008	SC289a	25.03.14	<i>E. dalessandroi</i>	Materia orgánica	El tiro-Zona 2
BMUTPL_035	SC289b	25.03.14	<i>E. dalessandroi</i>	Materia orgánica	El tiro-Zona 2
BMUTPL_025	SC290a	25.03.14	<i>E. dalessandroi</i>	Materia orgánica	El tiro-Zona 2
BMUTPL_009	SC290e	25.03.14	<i>E. dalessandroi</i>	Materia orgánica	El tiro-Zona 2
BMUTPL_022	SC290w	25.03.14	<i>E. dalessandroi</i>	Materia orgánica	El tiro-Zona 2
BMUTPL_023	SC290x	25.03.14	<i>E. dalessandroi</i>	Materia orgánica	El tiro-Zona 2
BMUTPL_024	SC290y	25.03.14	<i>E. dalessandroi</i>	Materia orgánica	El tiro-Zona 2
BMUTPL_040	SC292	25.03.14	<i>E. dalessandroi</i>	Materia orgánica	El tiro-Zona 2
BMUTPL_013	SC292a	25.03.14	<i>E. dalessandroi</i>	Materia orgánica	El tiro-Zona 2
BMUTPL_011	SC292e	25.03.14	<i>E. dalessandroi</i>	Materia orgánica	El tiro-Zona 2

BMUTPL_012	SC292f	25.03.14	<i>E. dalessandroi</i>	Materia orgánica	El tiro-Zona 2
BMUTPL_033	SC293a	25.03.14	<i>E. dalessandroi</i>	Materia orgánica	El tiro-Zona2
BMUTPL_034	SC293b	25.03.14	<i>E. dalessandroi</i>	Materia orgánica	El tiro-Zona 2
BMUTPL_018	SC297	25.03.14	<i>C. myanthum</i>	Arbol vivo	El tiro-Zona 2
BMUTPL_010	SC297a	25.03.14	<i>C. myanthum</i>	Arbol vivo	El tiro-Zona 2
BMUTPL_020	SC297b	25.03.14	<i>C. myanthum</i>	Arbol vivo	El tiro-Zona 2
BMUTPL_019	SC297c	25.03.14	<i>C. myanthum</i>	Arbol vivo	El tiro-Zona 2
BMUTPL_021	SC297d	25.03.14	<i>C. myanthum</i>	Arbol vivo	El tiro-Zona 2