



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA**

TÍTULO DE INGENIERO EN GESTIÓN AMBIENTAL

**Evaluación de velocidad de crecimiento y esporulación de cuatro cepas de hongos micorrízicos de orquídeas en dos medios de cultivo**

TRABAJO DE TITULACIÓN

**AUTORA:** Ludeña González Arianna Cristina

**DIRECTOR:** Cruz Sarmiento Darío Javier, Ph.D.

LOJA – ECUADOR

2017



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>*

*Septiembre, 2017*

## APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Loja, Abril de 2017

Ph.D. Darío Javier Cruz Sarmiento

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mí consideración:

El presente trabajo de titulación: "Evaluación de velocidad de crecimiento y esporulación de cuatro cepas de hongos micorrízicos de orquídeas en dos medios de cultivo" realizado por Arianna Cristina Ludeña González ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Atentamente

f) .....

Ph.D. Darío Javier Cruz Sarmiento.

C.I: 1104012016

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Arianna Cristina Ludeña González, declaro ser autora del presente trabajo de titulación: “Evaluación de velocidad de crecimiento y esporulación de cuatro cepas puras de hongos micorrízicos en tres medios de cultivo”, de la Titulación de Gestión Ambiental, siendo Darío Javier Cruz Sarmiento director (a) del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 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”.

Expreso tener pleno conocimiento de la obligación que tienen las IES, de conformidad con el Artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor. Así mismo autorizo a la SENESCYT a tener una copia del referido trabajo de titulación, con el propósito de generar un repositorio que democratice la información, respetando las políticas de propiedad intelectual vigentes.

Firmado: .....

Autora: Ludeña González Arianna Cristina

C.I.: 1105679847

## DEDICATORIA

*“Cada persona en su existencia puede tener dos actitudes: construir o plantar. Los constructores un día terminan aquello que estaban haciendo y entonces les invade el tedio. Los que plantan a veces sufren con las tempestades y las estaciones, pero el jardín jamás para de crecer”*

*(Paulo Coelho)*

El presente trabajo lo dedico con todo el amor y cariño a mis padres Wilber e Isabel quienes han sido una guía constante a lo largo de mi vida, con su amor, trabajo, paciencia y sacrificio, en todos estos años ya que con su ayuda he podido llegar hasta aquí y convertirme en una persona de bien, perseverante, que cumple con sus ideales. Es un privilegio ser su hija gracias a su ejemplo de superación y humildad, son los mejores padres que Dios me dio, los amo mucho y espero compartir juntos nuevas metas.

A mi hijo José Miguel que es mi vida, mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día y así seguir luchando cada vez más por darle un mejor futuro.

A mi esposo Juan por caminar siempre a mi lado aun en los momentos difíciles, por las alegrías, la paciencia, comprensión, cariño y amor que me da cada día para seguir adelante, por entenderme y estar conmigo para superar los desafíos que se nos presenten, porque simplemente es mi amor, lo que siempre espere y lo amo demasiado.

A mi hermana Jeannette quien ha estado junto a mí brindándome su apoyo incondicional, compartiendo conmigo los buenos y malos momentos, me siento muy feliz de que sea mi hermana y aunque el tiempo pase espero que sigamos juntas alcanzando nuevas metas y compartiendo cada momento con nuestra familia, te amo mucho ñaña.

Arianna Cristina Ludeña González

## **AGRADECIMIENTO**

Le agradezco a Dios por haberme dado la vida y una familia que me ha brindado amor, apoyo y motivación día a día para alcanzar mis metas, además de bendecirme durante todo mi etapa universitaria y por darme la fortaleza necesaria para poder culminar mis estudios Universitarios.

A la Universidad Técnica Particular de Loja por permitirme formar parte de la Escuela de Gestión Ambiental en calidad de estudiante y contribuir en mi formación personal y profesional adquiriendo destrezas y experiencias que serán importantes en el campo laboral y social.

Al Ph.D. Darío Cruz por brindarme la oportunidad de ser parte del equipo del fungario, por compartir conmigo sus conocimientos, experiencias, y saberme guiar con paciencia a lo largo de este estudio, siendo más que un tutor un amigo que me enseñó a ser dedicada y responsable con el trabajo.

A los Docentes de la carrera de Gestión Ambiental por compartir conmigo sus experiencias y conocimientos a lo largo de mi carrera ya que fueron parte importante en mi formación académica.

Al grupo del fungario, en especial a Óscar por ayudarme y acompañarme durante el proyecto, a Karlita y Andrés por compartir conmigo sus alegrías, tristezas y apoyarme durante todo este tiempo, gracias por su amistad siempre serán para mí más que solo amigos.

Arianna Cristina Ludeña González

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA .....	I
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA .....	IV
AGRADECIMIENTO .....	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	VI
ÍNDICE DE TABLAS, GRÁFICAS Y FIGURAS .....	VIII
RESÚMEN.....	- 1 -
ABSTRACT .....	- 2 -
INTRODUCCIÓN.....	- 3 -
OBJETIVOS .....	- 4 -
CÁPITULO I.....	- 5 -
MARCO TEÓRICO .....	- 5 -
1.1. El reino de los Hongos.....	- 6 -
1.2. Asociaciones micorrízicas y sus tipos .....	- 8 -
1.3. Micorrizas de Orquídeas .....	- 9 -
1.4. Medios de cultivos para hongos micorrízicos .....	- 10 -
CÁPITULO II.....	- 11 -
MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 11 -
2.1. Cepas de <i>Tulasnella</i> spp. ....	- 12 -
2.2. Evaluación del crecimiento .....	- 12 -
2.2.1. Selección de sustratos.....	- 12 -
2.3. Diseño experimental .....	- 12 -
2.4. Siembra y toma de datos del crecimiento micelial .....	- 13 -
2.5. Análisis estadístico para evaluar la velocidad-de crecimiento .....	- 13 -
2.6. Esporulación .....	- 14 -
CÁPITULO III.....	- 15 -
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	- 15 -
3.1. Morfología del crecimiento micelial según el tipo de sustrato.....	- 21 -
3.2. Evaluación del crecimiento micelial .....	- 22 -
3.3. Evaluación de esporulación.....	- 31 -
CONCLUSIONES .....	- 35 -
RECOMENDACIONES .....	- 36 -
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	- 37 -
ANEXOS.....	- 42 -
Anexo 1. Formulación para la preparación de los medios Bacto™ Agar y MEA (Extracto de Agar Malta). .....	- 43 -
Anexo 2. Datos del análisis estadístico Shapiro-Wilk y prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para las cepas de <i>Tulasnella</i> spp. 63.....	- 43 -
Anexo 3. Datos del análisis estadístico Shapiro-Wilk y prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para las cepas de <i>Tulasnella</i> spp. 36.....	- 44 -
Anexo 4. Datos del análisis estadístico Shapiro-Wilk y prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para las cepas de <i>Tulasnella</i> spp. 243.....	- 45 -
Anexo 5. Datos del análisis estadístico Shapiro-Wilk y prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para las cepas de <i>Tulasnella</i> spp. 35.....	- 46 -

Anexo 6. Datos del análisis estadístico ANOVA y prueba TukeyHSD para las cepas de *Tulasnella* spp. 63  
..... - 47 -  
Anexo 7. Datos del análisis estadístico ANOVA y prueba TukeyHSD para las cepas de *Tulasnella* spp. 36  
..... - 48 -  
Anexo 8. Datos del análisis estadístico ANOVA y prueba TukeyHSD para las cepas de *Tulasnella* spp.  
243 ..... - 49 -  
Anexo 9. Datos del análisis estadístico ANOVA y prueba TukeyHSD para las cepas de *Tulasnella* spp. 35  
..... - 50 -

## ÍNDICE DE TABLAS, GRÁFICAS Y FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clasificación filogenética del reino de los hongos basado en la región LSU, SSU y 5.8S de ARNr mitocondrial. Tomado de Hibbett et al., (2007).....	- 6 -
<b>Tabla 1.</b> Descripción general de las diferentes y más comunes asociaciones micorrízicas. ....	- 8 -
<b>Figura 2.</b> Tipos de micorrizas modificado de José Miguel Barea, 1998. ....	- 9 -
<b>Figura 3.</b> Diseño experimental para los diferentes tratamientos empleados en el presente estudio.-	13 -
-	-
<b>Figura 4.</b> A-AF) Observación fotográfica del comportamiento de crecimiento micelial para las cuatro cepas de <i>Tulasnella</i> spp. ....	- 22 -
<b>Figura 5.</b> Curva de crecimiento del diámetro de cobertura micelial para la cepa 63 <i>Tulasnella</i> sp..	- 23 -
<b>Figura 6.</b> Gráfica de cajas (boxplot) para evaluar el diámetro micelial de las réplicas en los diferentes tratamientos de la cepa 63 de <i>Tulasnella</i> sp. medidos al día 11. ....	- 24 -
<b>Figura 7.</b> Curva de crecimiento del diámetro de cobertura micelial para la cepa 36 <i>Tulasnella</i> sp..	- 25 -
<b>Figura 8.</b> Gráfica de cajas (boxplot) para evaluar el diámetro micelial de las réplicas en los diferentes tratamientos para la cepa 36 <i>Tulasnella</i> sp. medidos al día 18.....	- 26 -
<b>Figura 9.</b> Curva de crecimiento del diámetro de cobertura micelial para la cepa 243 <i>Tulasnella</i> sp.-	27 -
<b>Figura 10.</b> Gráfica de cajas (boxplot) para evaluar el diámetro micelial de las réplicas en los diferentes tratamientos para la cepa 243 <i>Tulasnella</i> sp. medidos al día 21. ....	- 28 -
<b>Figura 11.</b> Curva de crecimiento del diámetro de cobertura micelial para la cepa 35 <i>Tulasnella</i> sp.-	29 -
<b>Figura 12.</b> Gráfica de cajas (boxplot) para evaluar el diámetro micelial de las réplicas en los diferentes tratamientos para la cepa 35 <i>Tulasnella</i> sp. medidos al día 21. ....	- 30 -
<b>Figura 13.</b> A-AF; Fotografías microscópicas de diferentes estructuras de desarrollo para las cuatro cepas de <i>Tulasnella</i> spp. ....	- 32 -
<b>Figura 14.</b> A-F; Fotografías microscópicas de la cepa <i>Tulasnella</i> sp. 36 .....	- 33 -
<b>Figura 15.</b> A-AF; Fotografías microscópicas de la cepa <i>Tulasnella</i> sp. 243 .....	- 33 -
<b>Figura 16.</b> A-AF; Fotografías microscópicas de la cepa <i>Tulasnella</i> sp. 243 .....	- 34 -
<b>ANEXOS</b> .....	- 42 -
<b>Figura 1.</b> Curva de normalidad del diámetro de cobertura micelial para la cepa 63 <i>Tulasnella</i> sp. de los diferentes tratamientos (madera de <i>Alnus acuminata</i> , alpiste, trigo) más Bacto o MEA y sus respectivos controles positivos.....	- 44 -
<b>Figura 2.</b> Curva de normalidad del diámetro de cobertura micelial para la cepa 36 <i>Tulasnella</i> sp. de los diferentes tratamientos (madera de <i>Alnus acuminata</i> , alpiste, trigo) más Bacto o MEA y sus respectivos controles positivos.....	- 45 -
<b>Figura 3.</b> Curva de normalidad del diámetro de cobertura micelial para la cepa 243 <i>Tulasnella</i> sp. de los diferentes tratamientos (madera de <i>Alnus acuminata</i> , alpiste, trigo) más Bacto o MEA y sus respectivos controles positivos.....	- 46 -
<b>Figura 4.</b> Curva de normalidad del diámetro de cobertura micelial para la cepa 35 <i>Tulasnella</i> sp. de los diferentes tratamientos (madera de <i>Alnus acuminata</i> , alpiste, trigo) más Bacto o MEA y sus respectivos controles positivos.....	- 47 -

## RESÚMEN

El género *Tulasnella* un importante micobionte de orquídeas, presenta dificultades de aislamientos y bajas tasas de crecimiento in vitro. Escasos estudios han logrado su aislamiento y esporulación desde estados sexuales. Acorde a esta problemática, estudios taxonómicos y ecológicos presentan constantes limitantes. Nuestro estudio busca evaluar diferentes fuentes de celulosa, que permitan aumentar el crecimiento de diferentes cepas de *Tulasnella* spp. aisladas desde orquídeas epífitas. Las cepas se replicaron en seis tratamientos madera de *Alnus*, trigo y alpiste en medio (Bacto/MEA) con sus respectivos controles (Bacto/MEA). Estadísticamente los datos del diámetro micelial de las cepas se analizaron con ANOVA y prueba Tukey. La esporulación sexual o asexual se evaluó microscópicamente luego de someter las cepas a estrés de temperaturas (4°; 22° y 27°C) durante cuatro meses. El ANOVA con (p-value  $\leq$  0,001) y la prueba Tukey establecieron que los tratamientos (madera/Bacto; trigo Bacto/MEA; alpiste/MEA) influyen positivamente en el crecimiento de las cepas de *Tulasnella* spp. Además los tratamientos (madera Bacto/MEA y Trigo/Bacto) favorecieron la formación de esporas asexuales en dos de las cepas evaluadas HUTPL(CF) 243 y 36 de *Tulasnella* spp.

**PALABRAS CLAVES:** celulosa; cultivo in vitro; esporas; *Tulasnella*.

## ABSTRACT

The genus *Tulasnella*, an important mycobionte of orchids, presents difficulties of isolations and low rates of growth in vitro. Few studies have achieved their isolation and sporulation from sexual states. According to this problem, taxonomic and ecological studies have constant limitations. Our study aims to evaluate different sources of cellulose, which allow to increase the growth of different strains of *Tulasnella* spp. Isolated from epiphytic orchids. The strains were replicated in six treatments of Alnus, wheat and canary seed in medium (Bacto / MEA) with their respective controls (Bacto / MEA). Statistically the data of the mycelial diameter of the strains were analyzed with ANOVA and Tukey's test. Sexual or asexual sporulation was evaluated microscopically after subjecting the strains to temperature stress (4 °, 22 ° and 27 ° C) for four months. The ANOVA with (p-value  $\leq 0.001$ ) and the Tukey test established that the treatments (wood / Bacto, wheat Bacto / MEA, canary seed / MEA) positively influence the growth of *Tulasnella* spp. In addition, the treatments (wood Bacto / MEA and wheat / Bacto) favored the formation of asexual spores in two of the evaluated strains HUTPL (CF) 243 and 36 of *Tulasnella* spp.

**Keywords:** cellulose; in vitro culture; spores; *Tulasnella*.

## INTRODUCCIÓN

Ecuador es uno de los países más biodiversos del mundo (Busmann, 2005), se han registrado aproximadamente 16.000 plantas vasculares, de las cuales se destaca a las orquídeas con unas 3.630 especies dentro de 219 géneros (Endara, 2006; Jørgensen et al., 2006). Dentro del grupo de las orquídeas se enfatiza la capacidad de producir miles de semillas, además presenta la problemática de la viabilidad de germinación, por ser diminutas y contener escasas reservas de carbohidratos (Shimura & Koda, 2005). La limitación determinada de nutrientes en la semilla, lleva a la necesidad de generar un vínculo con hongos específicos dentro de grupos Basidiomycota que les proporcionen nutrientes y de esta manera contribuyan a su germinación, desarrollo del protocormo y establecimiento de la plántula (Smith & Read, 1997). La simbiosis entre determinados hongos y las raíces de la mayoría de plantas se denomina micorriza la cual colabora en el intercambio mutuo de nutrientes y minerales como el fósforo (P) y nitrógeno (N) (Brundrett, 2002). Dentro de los hongos reportados como formadores de micorrizas en orquídeas tropicales están los órdenes Cantharellales, Sebaciniales y Atractiellales, todos Basidiomycetes (Otero et al., 2004; Suarez et al., 2006; Kottke et al., 2010). Estos hongos, no obstante se reportan difíciles de aislar en cultivos puros probablemente por sus requerimientos específicos de nutrientes especialmente fuentes de celulosa, o su interacción con otros hongos (Warcup & Talbot, 1967, 1971, 1980). Pocos estudios han logrado tener éxito en el aislamiento de estos microorganismos y su generación de estados sexuales, donde también se reporta la baja tasa de crecimiento y la reducción de viabilidad en continuas replicas (Warcup & Talbot, 1967, 1971, 1980). Esta problemática ha sido una limitante en estudios taxonómicos, ecológicos (Herrera et al., 2010; Dario Cruz et al., 2011; Kohler et al., 2015) e industriales (Smith, 2002). Con estos antecedentes en el contexto del presente estudio se analizara diferentes sustratos como fuente de celulosa que permitan aumentar la tasa de crecimiento de diferentes cepas de *Tulasnella* spp. aislados desde orquídeas epifitas. La formulación de un buen sustrato para *Tulasnella* spp. puede permitir a futuro el cultivo de estos hongos y poder generar grandes cantidades de biomasa fúngica potencialmente útil en la producción de inóculos como biofertilizantes de orquídeas o en la generación de estados sexuales para investigaciones taxonómicas.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

- ❖ Analizar diferentes sustratos como fuente de celulosa que permitan aumentar la tasa de crecimiento de diferentes cepas de *Tulasnella* spp.

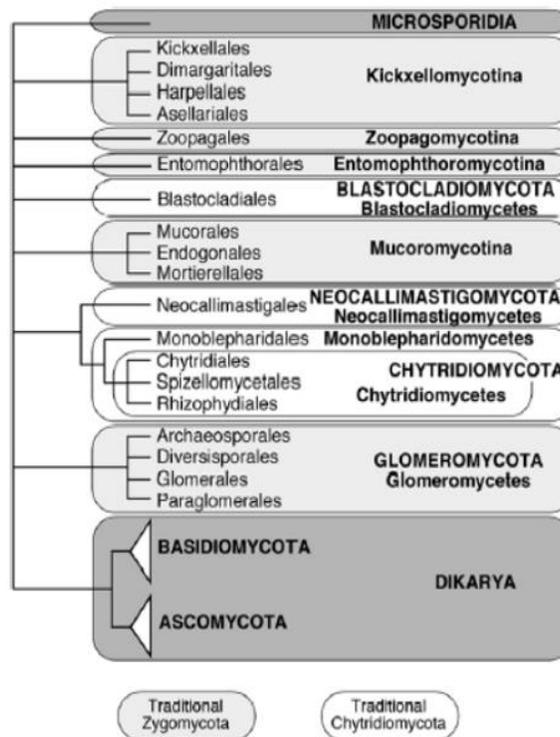
### Objetivos Específicos

- ❖ Evaluar la tasa de crecimiento de cuatro cepas de *Tulasnella* spp. (OTUs) en seis sustratos ricos en celulosa,
- ❖ Inducir la esporulación por medio de estrés por variaciones de temperatura en las cuatro cepas de *Tulasnella* spp. en diferentes sustratos.

**CÁPITULO I**  
**MARCO TEÓRICO**

## 1.1. El reino de los hongos

Los hongos son un grupo diverso de organismos unicelulares o pluricelulares, que se alimentan mediante la absorción directa de nutrientes, ya que son organismos heterotróficos esta nutrición puede ser obtenida por vía saprotrófica, parasítica o simbiótica desde un huésped determinado (Gams et al., 1998). Actualmente en base a criterios taxonómicos, patogénicos, epidemiológicos o en la actualidad datos moleculares, se ha podido obtener una nueva clasificación del reino de los hongos (Haro & Melic, 1998). Así actualmente tenemos ,el subreino Dikarya que presenta siete Filos, 10 Subfilos, 35 Clases, 12 Subclases, 103 órdenes, 484 familias, 4.979 géneros (Hibbett et al., 2007) y unas 80.000 especies descritas de acuerdo con el diccionario de hongos (Kirk et al., 2008). Dentro del subreino Dikarya se encuentran clasificados los Filos Ascomycota y Basidiomycota (Hibbett et al., 2007) como se describe en la Figura 1.



**Figura 1.** Clasificación filogenética del reino de los hongos basado en la región LSU, SSU y 5.8S de ARNr mitocondrial. Tomado de Hibbett et al., (2007).

El filo Basidiomycota conocido comúnmente como basidiomicetes comprende alrededor de 30.000 especies de hongos entre los que se encuentran royas, carbonos y levaduras (James et al., 2006), se caracterizan por producir esporas sexuales, sobre la superficie de una estructura especializada y microscópica llamada basidio (Alexopoulos et al., 1996). Además presentan hifas con septas, usualmente micelio dicariótico, y en algunos casos provistos de fíbulas, con propagación sexual de basidios entre dos y ocho basidiosporas (Alexopoulos et al., 1996). Los basidiomicetes cumplen diferentes roles importantes en la naturaleza donde algunas son capaces de formar ectomicorrizas y otros son capaces de descomponer o degradar la lignina. Otros basidiomicetes contienen especies que son comestibles y otros son investigados para su aplicación en la medicina (Agrios, 2005).

Dentro del filo Basidiomycota tenemos al orden Cantharellales el cual comprende a la familia Tulasnellaceae, con miembros del género *Tulasnella* (estado teleomorfo) con muchas especies que se han clasificado dentro del género *Epulorhiza* (estado anamorfo), el cual es parte de una clasificación artificial denominada Forma-Rhizoctonia para ubicar múltiples taxas con estados generativos asexuales o anamórficos de hongos parásitos o algunos micobiontes de orquídeas (González et al., 2006). Algunas especies dentro del grupo Forma-Rhizoctonia tienen correspondencia con sus formas teleomórficas denominadas así: *Ceratorhiza* para *Ceratobasidium*; *Rhizoctonia* o *Moniliopsis* para *Thanateaphorus*, *Epulorhiza* para *Tulasnella* y *Opadorhiza* para *Sebacina* (Sharon et al., 2008). De tal manera que se ha reconocido a miembros de *Tulasnella* como saprófitos, parásitos o micobiontes de orquídeas y hepáticas (Bourdot & Galzin, 1925; Roberts, 1999). Además presentan características como basidioma sin himenium definido, de coloración hialina que suele ser imperceptible visualmente e incluso microscópicamente, sus hifas pueden ser uni, bi o multinucleadas, claras monomíticas con o sin conexiones por clamps, con esporas de diferentes formas (Warcup & Talbot, 1966, 1967, 1971, 1980; Roberts, 1999; Sharma et al., 2003; Cruz et al., 2016).

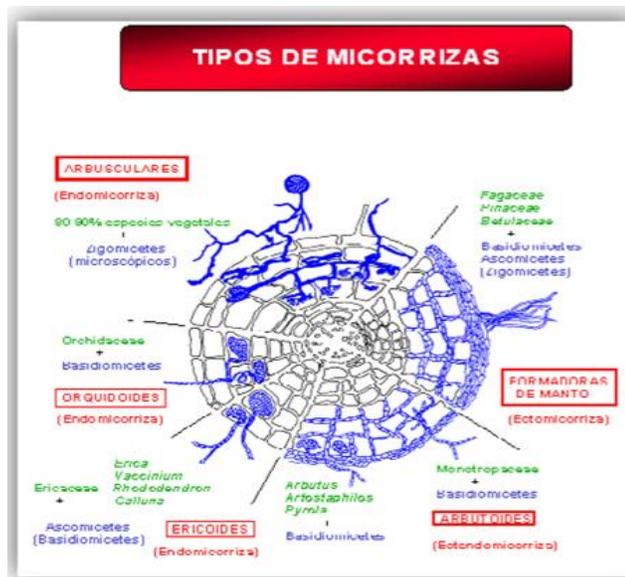
## 1.2. Asociaciones micorrízicas y sus tipos

La forma más común de simbiosis entre raíces de plantas y hongos son las micorrizas Harley & Smith (1983), en el cual la planta huésped recibe nutrientes y minerales, mientras que el hongo obtiene componentes de carbono derivados de la fotosíntesis, siendo ambos de mutuo beneficio (Harley & Smith, 1983). Los hongos que forman parte de esta relación hongo-planta pueden pertenecer a los filos Basidiomycota, Ascomycota y Glomeromycota (Brundrett, 1991; Harley & Smith, 1983). De tal manera que se han reconocido siete tipos diferentes de asociaciones micorrízicas, incluyendo grupos de hongos y plantas huésped formando distintas morfologías como se puede observar en la Tabla 1 y Figura 2 (Brundrett et al., 1996).

**Tabla 1.** Descripción general de las diferentes y más comunes asociaciones micorrízicas.

<b>Micorrizas con manto fúngico:</b> forman un manto de varias capas de hifas alrededor de la raíz.		
<b>Ectomicorriza</b> Hongos endófitos: Basidiomicetos y Ascomicetos que forman un manto alrededor de raíces y una red de Hartig entre las células radicales (Brundrett et al., 1996).	<b>Arbutoide y Monotroipoide</b> Hongos endófitos: ascomicetos y basidiomicetos, similares a asociaciones ectomicorrízicas, pero tienen características anatómicas especializadas (Brundrett et al., 1996).	
<b>Micorrizas sin manto fúngico:</b> desarrollan sus estructuras dentro de las células del cortex de la raíz (intracelular) o bien entre célula y célula (intercelular).		
<b>Arbuscular</b> Hongos del filo Glomeromycota que producen arbuscúlos, hifas, y vesículas dentro de las células de la corteza radical (Brundrett et al., 1996).	<b>Ericoide</b> Hongos endófitos: ascomicetos y basidiomicetos, involucra ovillos de hifas en el exterior de las células de los angostos pelos radicales de plantas del orden Ericales (Brundrett et al., 1996).	<b>Orquideoide</b> Hongos de la clase Basidiomicetos producen ovillos de hifas dentro de raíces de plantas orquidáceas (Brundrett et al., 1996).

**Fuente:** Brundrett et al., 1996



**Figura 2.** Tipos de micorrizas modificado de José Miguel Barea, 1998.

### 1.3. Micorrizas de Orquídeas

Las micorrizas de orquídeas presentan características principales como la formación de ovillos o pelotones de hifas intracelulares de hongos, en la corteza de la raíz de plantas maduras (Masuhara & Katsuya, 1994; Dearnaley, 2007). La absorción de los pelotones por parte de la planta permite la transferencia de nutrientes desde los hongos a las células radicales de las orquídeas (Alexander & Hadley, 1985; Rasmussen, 1995). Estas asociaciones también permiten a la planta obtener recursos como agua para evitar la desecación (Yoder et al., 2000; Cameron et al., 2006) y a su vez ayudar a la germinación de las semillas de orquídeas (Rasmussen, 1995). En esta asociación el requerimiento nutricional del hongo implica básicamente oxígeno, vitaminas, hidratos de carbono, azúcares, nitrógeno, fósforo, azufre, agua y otros elementos, además de mayores cantidades de carbono por ser una fuente directa de energía necesaria para el metabolismo; y la formación de las diferentes partes y estructuras celulares (Kendrick, 1985, Arias & Piñeros, 2008). Los hongos basidiomicetos degradan la lignina a dióxido de carbono en presencia de otra fuente de carbono como celulosa, celobiosa o glucosa como fuente de energía (Arias & Piñeros, 2008)

Diversos estudios han visto la necesidad de evaluar distintos tipos de sustratos que contengan celulosa, lignina y hemicelulosa debido al alto porcentaje de nutrientes y carbono que aportan al desarrollo y crecimiento de los hongos (Atlas & Bartha, 2001; Bidartondo et al., 2003), utilizando materia orgánica de manera eficiente como el trigo, avena, desperdicios de café, yuca, cáscaras o cortezas de árboles, virutas de madera entre otros compuestos orgánicos etc. (Miles & Chang, 1997; Oei, 2003; Stamets, 2003).

#### **1.4. Medios de cultivos para hongos micorrízicos**

Los medios de cultivo que se han empleado en estudios previos son sólidos o líquidos que contienen suficientes nutrientes como (vitaminas, carbonos, nitrógeno, oligoelementos, etc.) con un pH ligeramente ácido que permita asegurar el desarrollo y reproducción de los hongos e inhiba al mismo tiempo el desarrollo de otros microorganismos. (Littman, 1947; Jong & Birmingham, 2001).

Entre los medios más usados para el desarrollo de hongos micorrízicos tenemos medio de agar agua., agar dextrosa de papa (PDA), agar extracto de malta (MEA), Sabouraud, agar miel peptona (Gaitán et al., 2006), que sirven para el aislamiento y desarrollo de los hongos dependiendo de su origen y requerimiento de nutrientes (Jong & Birmingham, 2001)

**CÁPITULO II**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

## **2.1. Cepas de *Tulasnella* spp.**

Cuatro cepas de *Tulasnella* spp. (HUTPL(CF)63; HUTPL(CF)36; HUTPL(CF)243; HUTPL(CF)35) aisladas desde orquídeas epifitas de la Reserva Biológica San Francisco (RBSF) correspondientes a cuatro OTUs moleculares, se evaluaron para probar medios de cultivo con varias fuentes de celulosa que ayuden a incrementar la tasa de crecimiento y esporulación de los mismos.

## **2.2. Evaluación del crecimiento**

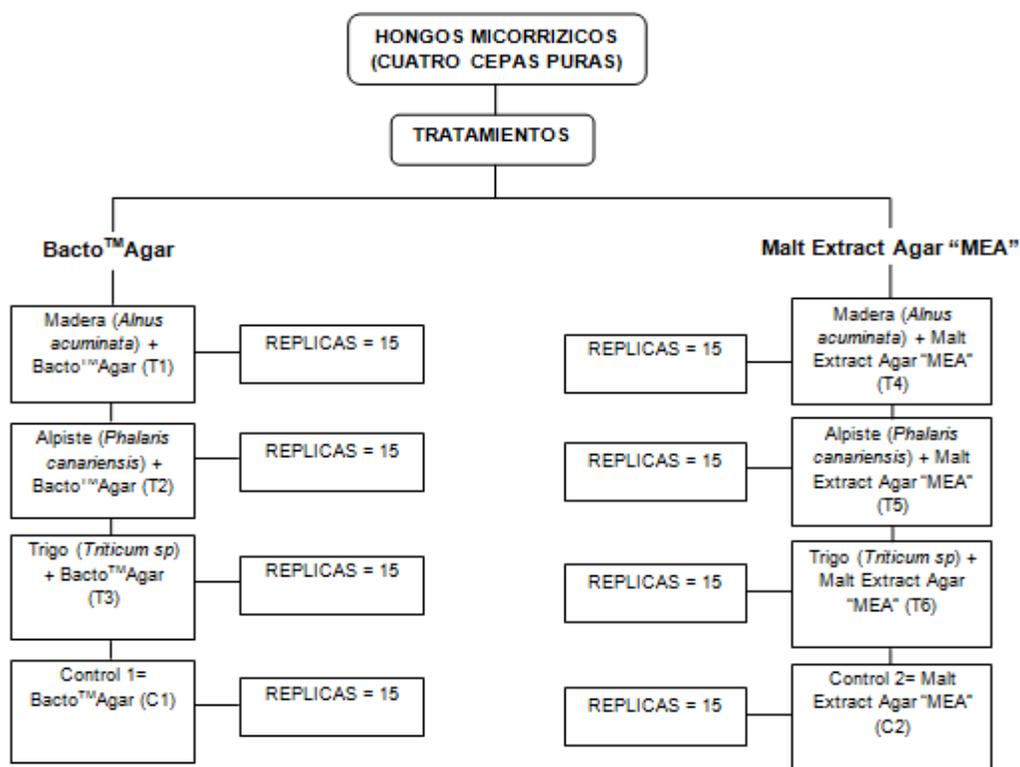
### **2.2.1. Selección de sustratos.**

En el presente estudio se utilizaron tres sustratos, madera de aliso (*Alnus acuminata*), semillas de alpiste (*Phalaris canariensis*) y semillas de trigo (*Triticum* sp.), mezclados con dos medios sólidos agar (Bacto™ Agar y MEA (Extracto de Agar Malta)) (Figura 4). Los diferentes sustratos fueron seleccionados acorde a su porcentaje de celulosa, lignina u otros nutrientes según fuentes bibliográficas como se describe a continuación:

La madera *A. acuminata* contiene 3.52 % de lignina y 7.47 % de celulosa (Petisco & Aldana, 2005). Las semillas de alpiste *P. canariensis* con proporción de 55,8 g/100 g de almidón, un 23,7% g/100 g de proteína, 7.9 % de grasa cruda, 7,3 g/100 g de fibra total, 1,8 g/100 g de azúcar soluble y 2,3 g/100 g total de cenizas en el grano entero (Abdel-Aal et al., 2011), y el trigo *Triticum* sp. el cual sus hidratos de carbono totales constituyen del 77 al 87% de la materia seca total y son los componentes más importantes, de los cuales alrededor de el 64 % es almidón y el resto, carbohidratos solubles e insolubles que forman la fibra dietética (Kent, 1994), no obstante la envoltura del grano está compuesta principalmente por celulosa y hemicelulosa (Serna, 2013).

## **2.3. Diseño experimental**

Para evaluar la tasa de crecimiento y generar esporulación se prepararon sustratos (madera de *Alnus*, trigo y alpiste) y sus respectivos controles positivos. Los distintos tratamientos (sustratos) se combinaron con medios sólidos (Bacto™ Agar) y Extracto de Agar Malta (MEA) (Figura 4). Los sustratos fueron molidos y luego mezclados 60 g del sustrato + 15 g L<sup>-1</sup> de Bacto™ Agar y 33,6 g L<sup>-1</sup> para el MEA. Los medios preparados se dispensaron en cajas Petri plásticas de 90 mm, con un número de 15 réplicas, como se indica en el diseño experimental (Figura 3).



**Figura 3.** Diseño experimental para los diferentes tratamientos empleados en el presente estudio.  
**Fuente:** Autora

#### 2.4. Siembra y toma de datos del crecimiento micelial

Se sembraron las diferentes cepas de *Tulasnella* spp. en cada uno de los tratamientos (sustratos + agar) previamente preparados, luego se mantuvo en incubación a temperatura de 27°C durante 21 días. Posterior a la siembra se realizó la evaluación del crecimiento micelial de las cepas midiendo el diámetro de cada una, diariamente desde después del primer día de siembra hasta los 21 días. El micelio de las cepas que lograron completar las cajas antes de los 21 días fueron medidas como fase estacionaria. Paralelamente al crecimiento se realizó la diferenciación o forma de crecimiento micelial (colores, textura, esclerocios) de las diferentes cepas según el sustrato empleado (ANEXO 1).

#### 2.5. Análisis estadístico para evaluar la velocidad de crecimiento

Para los análisis estadísticos se midió y se registro continuamente el crecimiento micelial en milímetros (mm) para las cuatro cepas de *Tulasnella* spp. según los tratamientos durante los 21 días para generar la curva de crecimiento fúngico. Los datos numéricos obtenidos de los

diferentes tratamientos se analizarón en el programa estadístico R 2.14.2 (R Development Core Team, 2012), en el que se evaluó la normalidad de los datos mediante análisis Shapiro-Wilk y la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis( $p$ -value  $\leq 5$ ) (ANEXO 2, 3, 4 y 5) para el diámetro de crecimiento micelial de cada una de las cepas de *Tulasnella* spp. En función a los resultados obtenidos se procedio a realizar un análisis Anova de una cola, utilizando las variables, diámetro de crecimiento vs tratamiento para saber si existen diferencias significativas. Así mismo mediante la prueba TukeyHSD se evaluó el mejor tratamiento para responder la pregunta ¿Cuál de los tratamientos es el más idóneo en producir una mayor tasa de crecimiento para cada una de las cepas evaluadas?, representados en gráficas de cajas o popularmente conocido como (boxplots) y de esta manera comprobar los supuestos del Anova. Para este análisis se tomaron los datos del crecimiento micelial más elevado de todas las replicas, independiente de los 21 días de medición, o a su vez el dato más elevado de crecimiento logrado a los 21 días para las cuatro cepas de *Tulasnella* spp.

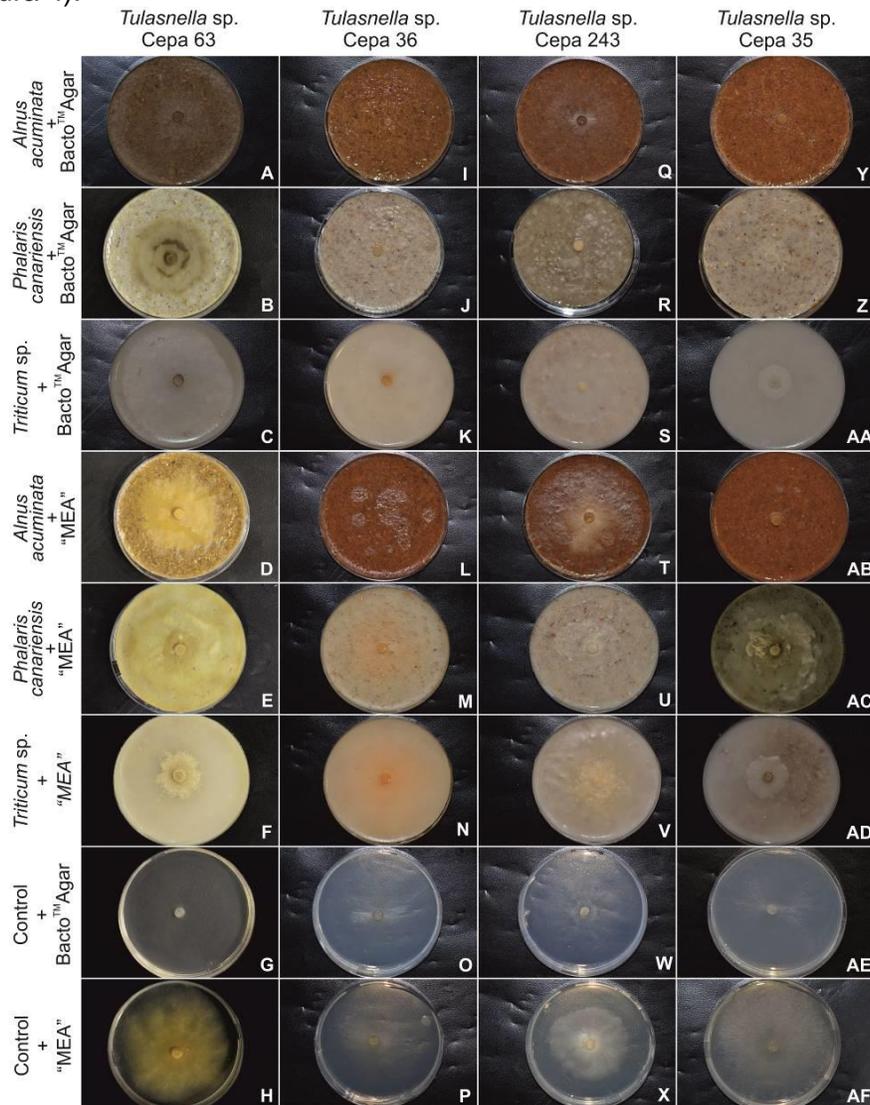
## **2.6. Esporulación**

La inducción de esporulación se realizó al concluir el seguimiento y la medición del diametro de crecimiento micelial. Una vez concluida la toma de datos de crecimiento se efectuaron cambios bruscos, alternando diariamente la de temperatura ( $T^{\circ}$ ) entre ( $4^{\circ}$ ,  $22^{\circ}$  y  $27^{\circ}\text{C}$ ) de mes a mes durante cuatro meses. Esperando que estos cambios de estrés generen en las cepas esporas sexuales (basidiosporas) o asexuales (conidiosporas). La observación positiva o negativa de la generación de esporas, se efectuó mediante la elaboración de placas desde las diferentes cepas y tratamientos, teñidas con Phloxine al 1% y/o Azul de metileno al 0,5%. Las placas se observarón al microscópio de luz a un aumento de 40X y 100X.

**CÁPITULO III**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3.1. Morfología del crecimiento micelial según el tipo de sustrato

El crecimiento micelial de las cuatro cepas de *Tulasnella* spp. (Figura 4. A-AF), se mostraron muy similares y casi imperceptibles a simple vista pero refringentes a la luz artificial. La característica de refringencia por parte de estos hongos en cultivo también suele suceder al encontrarlos fructificando en el medio ambiente natural, como se ha descrito por algunos autores como Roberts (1999) y Cruz et al. (2016). Entre algunos de nuestros cultivos se observó crecimiento micelial de color amarillenta y generación de anillos concéntricos (ver leyenda Figura 4).



**Figura 4.** A-AF) Observación fotográfica del comportamiento de crecimiento micelial para las cuatro cepas de *Tulasnella* spp. (63, 36, 243, 35) en los diferentes sustratos de madera, alpiste, trigo y sus controles Bacto y MEA. A-AF) excepto (D, E, H, B, M, F, M, N, T, V, AC) muestran micelio superficial extendido y traslucido. D, E, H) micelio superficial extendido y carnoso amarillento. B) micelio superficial

extendido fuertemente pegado al sustrato y formando anillos de color café. F) micelio superficial-aéreo central y algodonoso cremoso. M, N) micelio superficial extendido y ligeramente rosado. T) micelio superficial extendido carnosos y cremoso. V) micelio superficial extendido-carnosos central y ligeramente rosado. AC) micelio superficial extendido-aéreo carnosos central y cremoso.

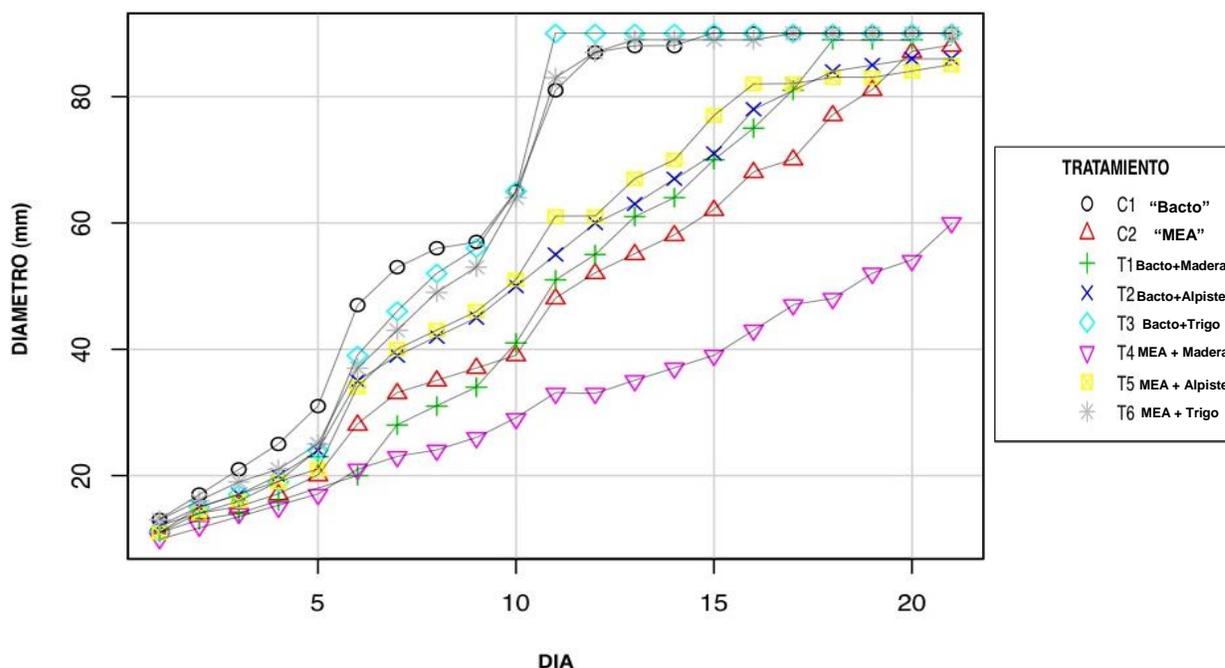
**Fuente:** Autora

Varias cepas reaccionan según el sustrato de forma distinta y forman estructuras miceliales más fuertes o de diferente coloración, por ejemplo, la cepa 63 de *Tulasnella* sp. creciendo sobre alpiste/Bacto muestra un micelio superficial extendido fuertemente pegado al sustrato y formando anillos de color café (figura 4-B), mientras que en alpiste/MEA el micelio es extendido y fuertemente pegado al sustrato, pero sin generación de anillos de color café (Figura 4-E) y así otros ejemplos como se observa en la (Figura 4. A-AF) ver leyenda. Dichos cambios se pueden dar debido a que los hongos dependen del medio o sustrato donde habitan, y reaccionan expresando o no enzimas que les permitan asimilar los nutrientes presentes, por estas razones sus fenotipos en especial el crecimiento puede variar de forma o coloración (Moreno et al., 2015).

### **3.2. Evaluación del crecimiento micelial**

Las curvas de crecimiento nos indican como reaccionan las cuatro cepas de *Tulasnella* spp. frente a los diferentes tratamientos (Figuras. 5, 7, 9 y 11). Dichos datos se visualizan de mejor forma en las gráficas de cajas donde se indica que tratamiento es mejor estadísticamente para cada una de las cepas de *Tulasnella* en los 21 días de seguimiento (Figuras 6, 8, 10 y 12).

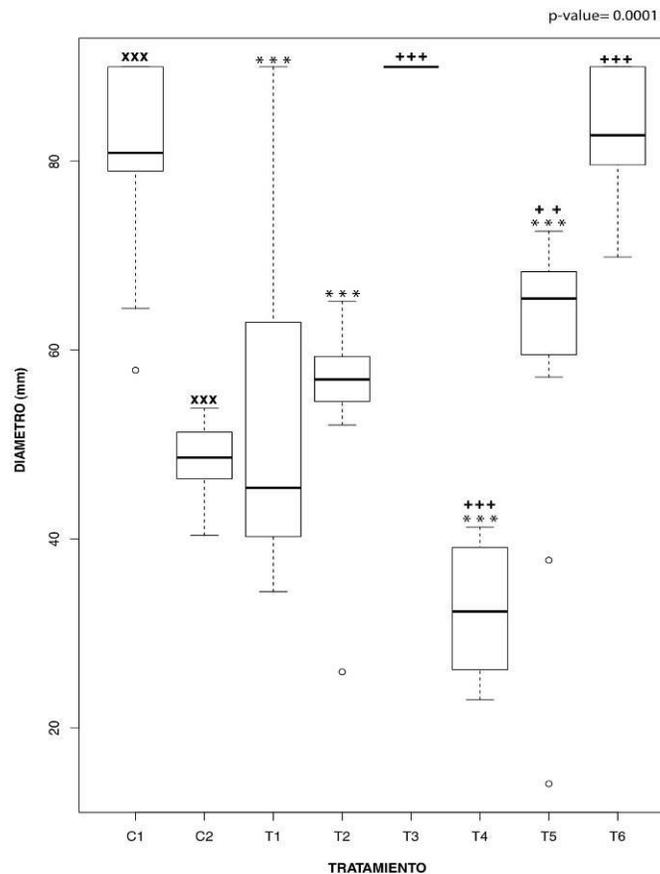
La cepa 63 de *Tulasnella*. sp. acorde a la curva de crecimiento muestra claramente como al día 11 completó en su totalidad la caja de cultivo (90mm), con el tratamiento de trigo/Bacto (Figura 5). No obstante presentó bajo crecimiento micelial en el tratamiento de madera/MEA en el cual alcanzó 60mm de diametro hasta los 21 días de medición.



**Figura 5.** Curva de crecimiento del diámetro de cobertura micelial para la cepa 63 *Tulasnella* sp. con respecto al tiempo en días (21 días) en diferentes tratamientos (madera, alpiste y trigo) más Bacto o MEA y sus respectivos controles positivos.

**Fuente:** Autora

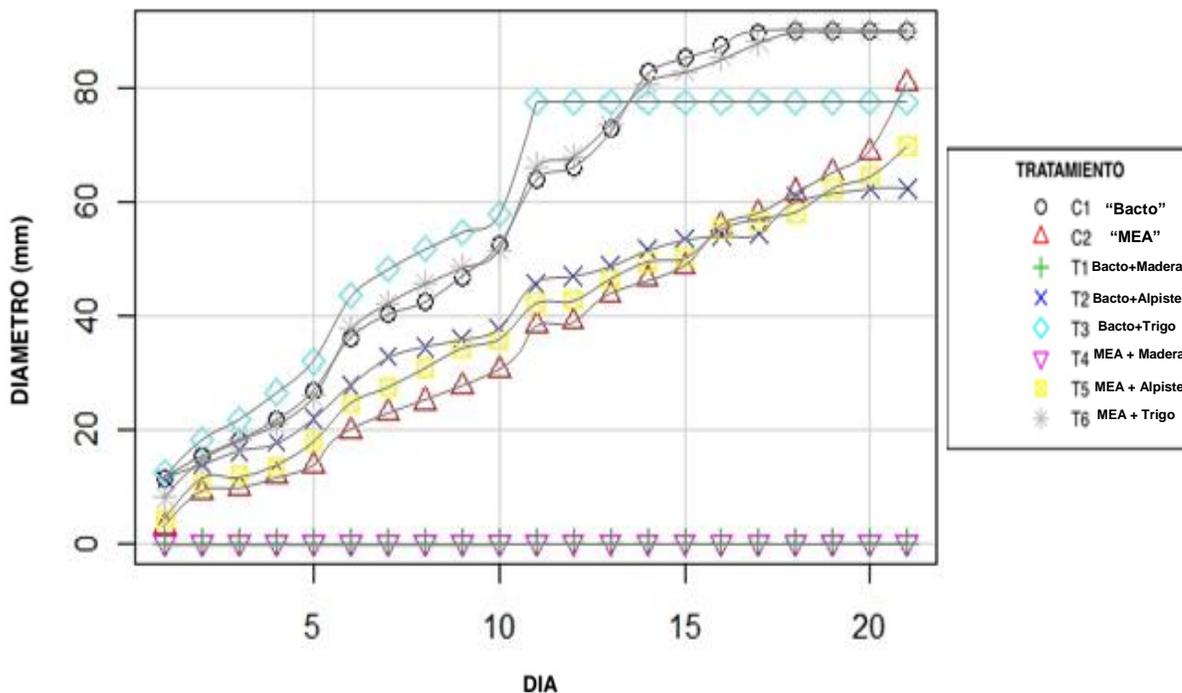
Estadísticamente se pudo comprobar diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los controles vs tratamientos, teniendo como resultado que la cepa 63 de *Tulasnella*. sp. reacciona mejor al T3 (trigo/Bacto) corroborando lo expresado en la curva de crecimiento figura 5 ya que al día 11 completó los 90mm de la caja petri, pudiendo considerar a este tratamiento el mas adecuado para el crecimiento de está cepa (ver leyenda de Figura 6). Por otra parte el tratamiento de madera/MEA mostró bajo crecimiento micelial, considerando estadísticamente a este tratamiento el menos conveniente para el crecimiento de esta cepa (ver leyenda de Figura 6).



**Figura 6.** Gráfica de cajas (boxplot) para evaluar el diámetro micelial de las réplicas en los diferentes tratamientos de la cepa 63 de *Tulasnella* sp. medidos al día 11. Los símbolos que se muestran en la parte superior de cada caja representan la significancia según sus comparaciones (\* significa control 1 vs. tratamientos) (+ significa control 2 vs. tratamientos) y (x significa control 1 vs. control 2). El p-valor de la prueba de ANOVA fue de 0,001, con significancia de (++)  $\leq 0,01$ ; xxx  $\leq 0,001$ ; +++  $\leq 0,001$ ; \*\*\*  $\leq 0,001$ ) obtenidos a través de la prueba de TukeyHSD.

**Fuente:** Autora

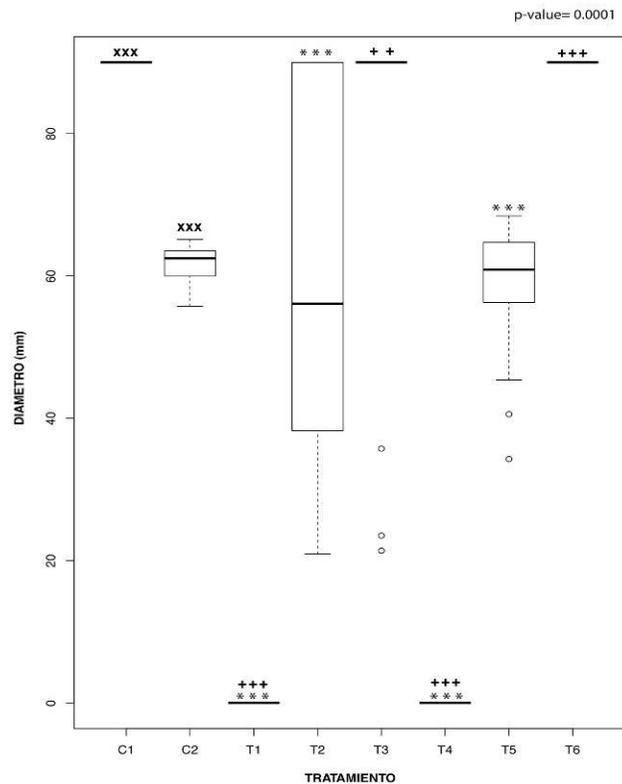
La cepa 36 de *Tulasnella* sp. en la curva de crecimiento muestra claramente como al día 18 completó en su totalidad la caja de cultivo con el tratamiento de trigo/MEA (Figura 7). Por otra parte no presentó crecimiento micelial durante los 21 días de medición en los tratamientos de madera/Bacto y madera/MEA.



**Figura 7.** Curva de crecimiento del diámetro de cobertura micelial para la cepa 36 *Tulasnella* sp. con respecto al tiempo en días (21 días) en diferentes tratamientos (madera, alpiste, trigo) más Bacto o MEA y sus respectivos controles positivos.

**Fuente:** Autora

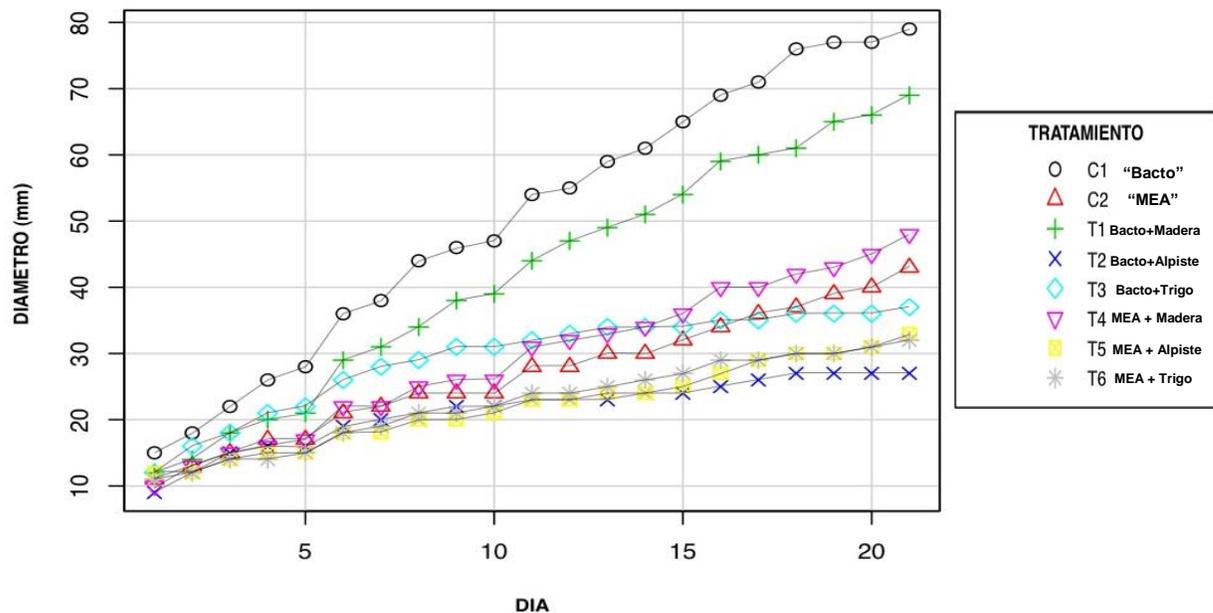
Se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los controles vs tratamientos, teniendo como resultado que la cepa 36 de *Tulasnella* sp. reacciona mejor al T6 (trigo/MEA) corroborando lo expresado en la curva de crecimiento figura 7 ya que al día 18 la cepa 36 completó los 90mm de la caja petri lo cual permitió considerar a este tratamiento el mas adecuado para el crecimiento de está cepa (ver leyenda de Figura 8). De igual manera en la figura 7 los tratamientos de madera/Bacto y MEA debido a que no presentaron crecimiento micelial se los pudo considerar menos favorables para el crecimiento de esta cepa (ver leyenda de Figura 8).



**Figura 8.** Gráfica de cajas (boxplot) para evaluar el diámetro micelial de las réplicas en los diferentes tratamientos para la cepa 36 *Tulasnella* sp. medidos al día 18. Los símbolos que se muestran en la parte superior de cada caja representan la significancia según sus comparaciones (\* significa control 1 vs. tratamientos) (+ significa control 2 vs. tratamientos) y (x significa control 1 vs. control 2). El p-valor de la prueba de ANOVA fue de 0,001, con significancia de (++  $\leq$  0,01; xxx  $\leq$  0,001; +++  $\leq$  0,001; \*\*\*  $\leq$  0,001) obtenidos a través de la prueba de TukeyHSD.

**Fuente:** Autora

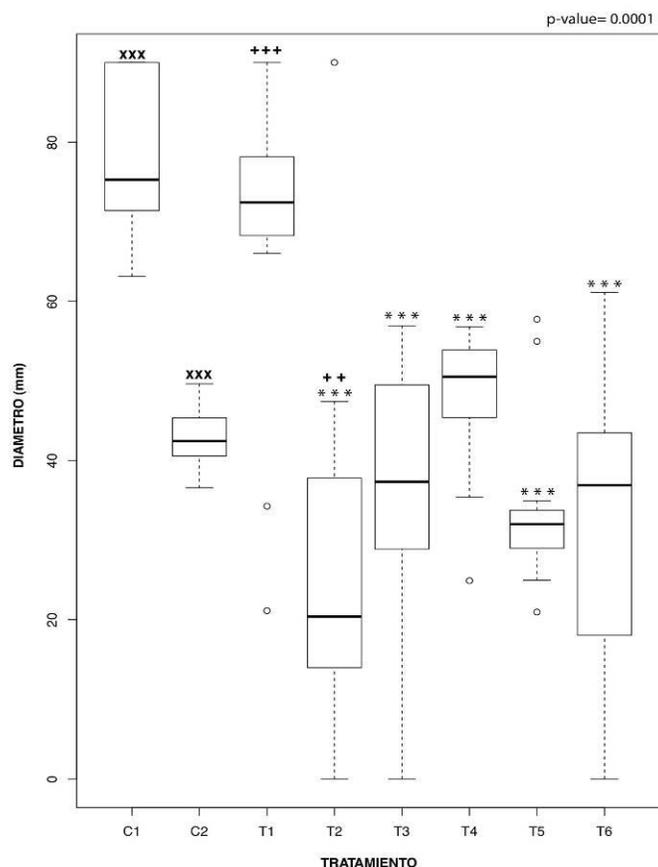
La cepa 243 de *Tulasnella*. sp. en la curva de crecimiento muestra claramente como al día 21 completó parcialmente la caja de cultivo con el tratamiento de madera/Bacto (Figura 9). No obstante presentó bajo crecimiento micelial de 27,14 – 48,23 mm de diámetro en los tratamientos (T2 – T6) Figura 9.



**Figura 9.** Curva de crecimiento del diámetro de cobertura micelial para la cepa 243 *Tulasnella* sp. con respecto al tiempo en días (21 días) en diferentes tratamientos (madera, alpiste, trigo) más Bacto o MEA y sus respectivos controles positivos.

**Fuente:** Autora

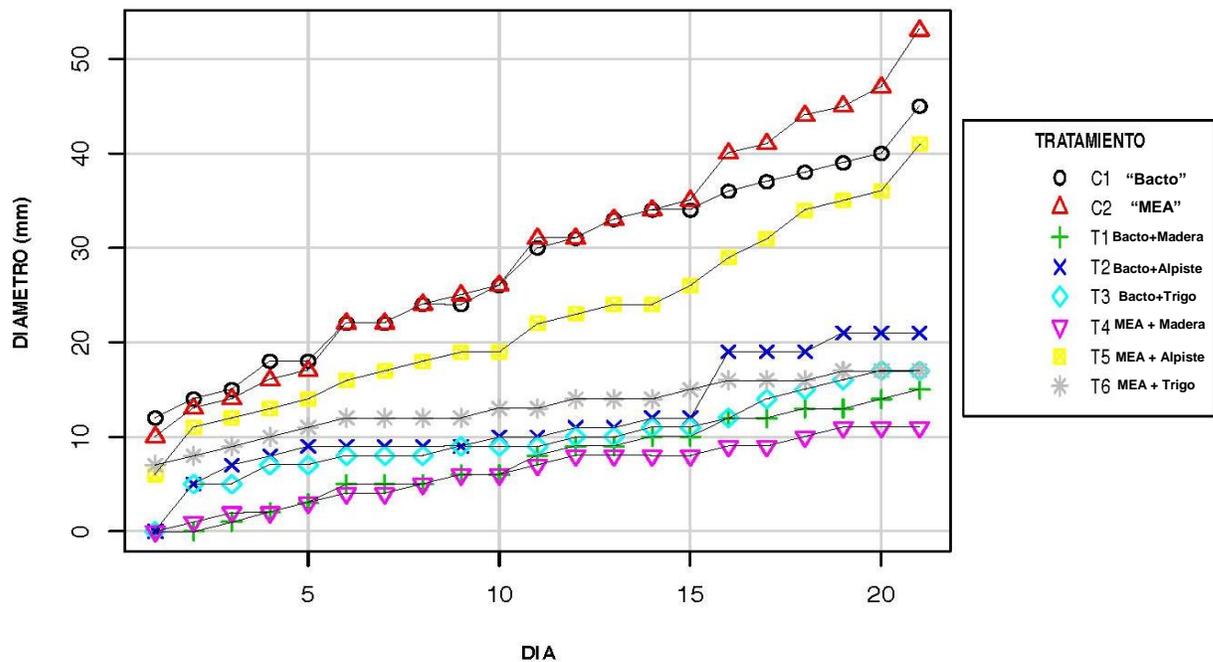
Mediante diferencias estadísticas entre los controles vs tratamientos, se pudo comprobar significativamente ( $p < 0,05$ ) que la cepa 243 de *Tulasnella*. sp. reacciona mejor al T1 (madera/Bacto), corroborando lo expresado en la curva de crecimiento (Figura 9), ya que al día 21 completó 69,25 mm de la caja petri lo que permitió considerar a este tratamiento el mas adecuado para el crecimiento de está cepa (ver leyenda de Figura 10). De igual manera en la figura 9 los tratamientos (T2–T6) presentaron un crecimiento micelial bajo o inferior a los 50mm en los 21 días de medición, por lo que se los pudo considerar menos convenientes para el crecimiento de esta cepa (ver leyenda de Figura 10).



**Figura 10.** Gráfica de cajas (boxplot) para evaluar el diámetro micelial de las réplicas en los diferentes tratamientos para la cepa 243 *Tulasnella* sp. medidos al día 21. Los símbolos que se muestran en la parte superior de cada caja representan la significancia según sus comparaciones (\* significa control 1 vs. tratamientos) (+ significa control 2 vs. tratamientos) y (x significa control 1 vs. control 2). El p-valor de la prueba de ANOVA fue de 0,001, con significancia de ( $++ \leq 0,01$ ;  $xxx \leq 0,001$ ;  $+++ \leq 0,001$ ;  $*** \leq 0,001$ ) obtenidos a través de la prueba de TukeyHSD.

**Fuente:** Autora

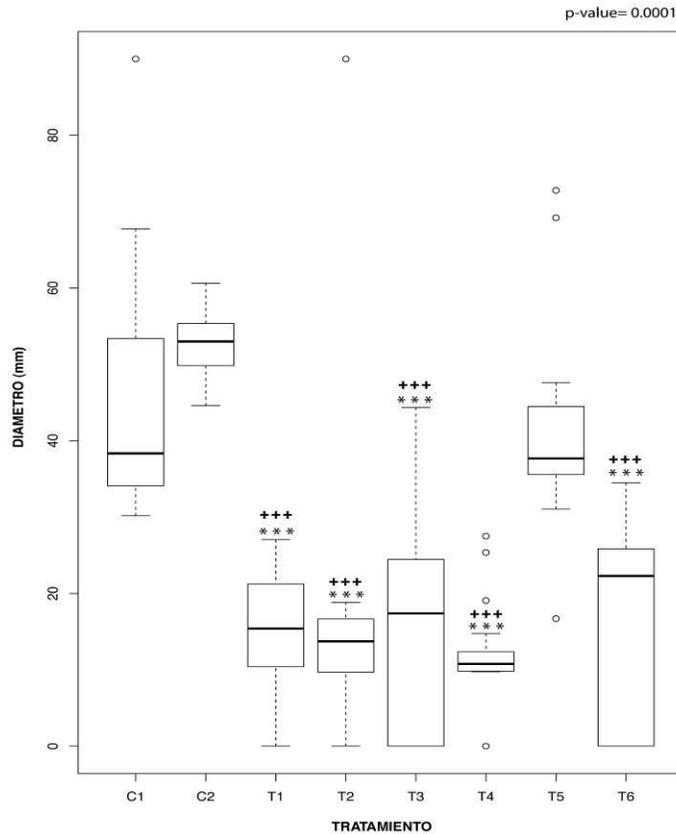
La cepa 35 de *Tulasnella* sp. en la curva de crecimiento muestra claramente como al día 21 completó parcialmente la caja de cultivo con el tratamiento de alpiste/MEA (Figura 11). No obstante presentó un bajo crecimiento micelial entre 11,43 – 20,53 mm de diámetro en los tratamientos T1 – T4 y T6 (Figura 11).



**Figura 11.** Curva de crecimiento del diámetro de cobertura micelial para la cepa 35 *Tulasnella* sp. con respecto al tiempo en días (21 días) en diferentes tratamientos (madera, alpiste, trigo) más Bacto o MEA y sus respectivos controles positivos.

**Fuente:** Autora

Mediante la comparación de controles vs tratamientos se pudo comprobar diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), teniendo como resultado que la cepa 35 de *T. sp.* reacciona mejor al T5 (alpiste/MEA) corroborando lo expresado en la curva de crecimiento figura 11, ya que al día 21 completó 40,96 mm de la caja petri lo que permitió considerar a este tratamiento el mas adecuado para el crecimiento de está cepa (ver leyenda de Figura 12). De igual manera en la figura 11 los tratamientos (T1–T4 y T6) debido a que presentaron un crecimiento micelial bajo o inferior a los 20mm en los 21 días de medición, considerandolos menos convenientes para el crecimiento de esta cepa (ver leyenda de Figura 12).



**Figura 12.** Gráfica de cajas (boxplot) para evaluar el diámetro micelial de las réplicas en los diferentes tratamientos para la cepa 35 *Tulasnella* sp. medidos al día 21. Los símbolos que se muestran en la parte superior de cada caja representan la significancia según sus comparaciones (\* significa control 1 vs. tratamientos) (+ significa control 2 vs. tratamientos) y (x significa control 1 vs. control 2). El p-valor de la prueba de ANOVA fue de 0,001, con significancia de (\*\*\*  $\leq$  0,001; +++  $\leq$  0,001, \*\*\*  $\leq$  0,001) obtenidos a través de la prueba de TukeyHSD.

**Fuente:** Autora

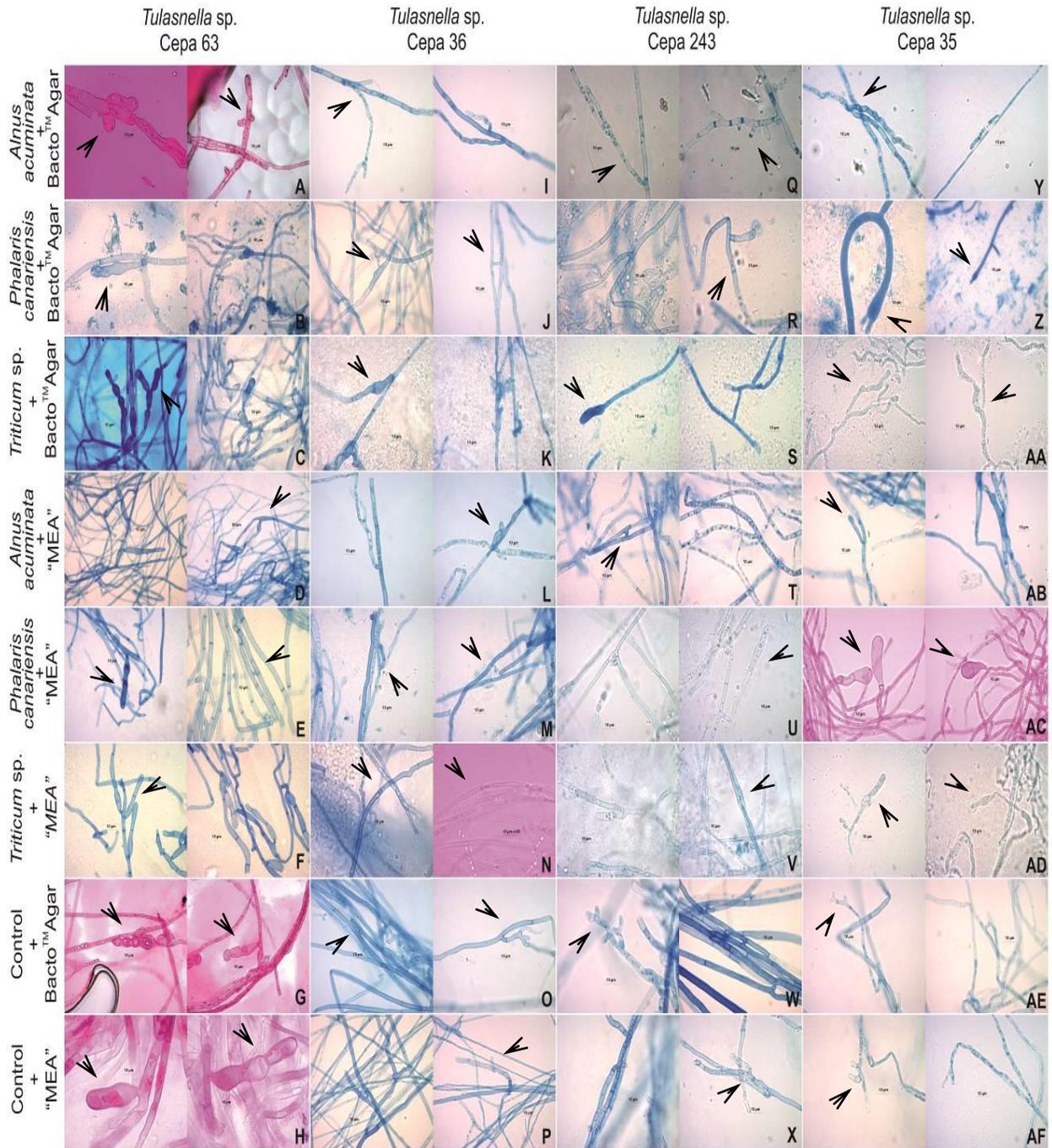
Las curvas de crecimiento según lo observado revelan que los tratamientos (T1; T3; T5 y T6) son los más adecuados para el crecimiento de *Tulasnella* spp. según se demuestra tanto en las curvas de crecimiento micelial (Figuras 5, 7, 9 y 11) como estadísticamente ( $p \leq 0.001$ ) (Figuras 6, 8, 10 y 12). Por otra parte los controles C1 y C2 con crecimientos micelial entre 42 hasta 90mm (figuras 5, 6-10) y con estadísticas de significancia  $\leq 0,001$  son también representativos para el desarrollo de *Tulasnella* spp.

Esta similitud entre los tratamientos y los controles para desarrollo de *Tulasnella*, tanto en crecimiento de diámetro como estadísticamente puede deberse a varios factores, como estrés, búsqueda de nutrientes y la producción de sustancias, que promuevan su crecimiento como se

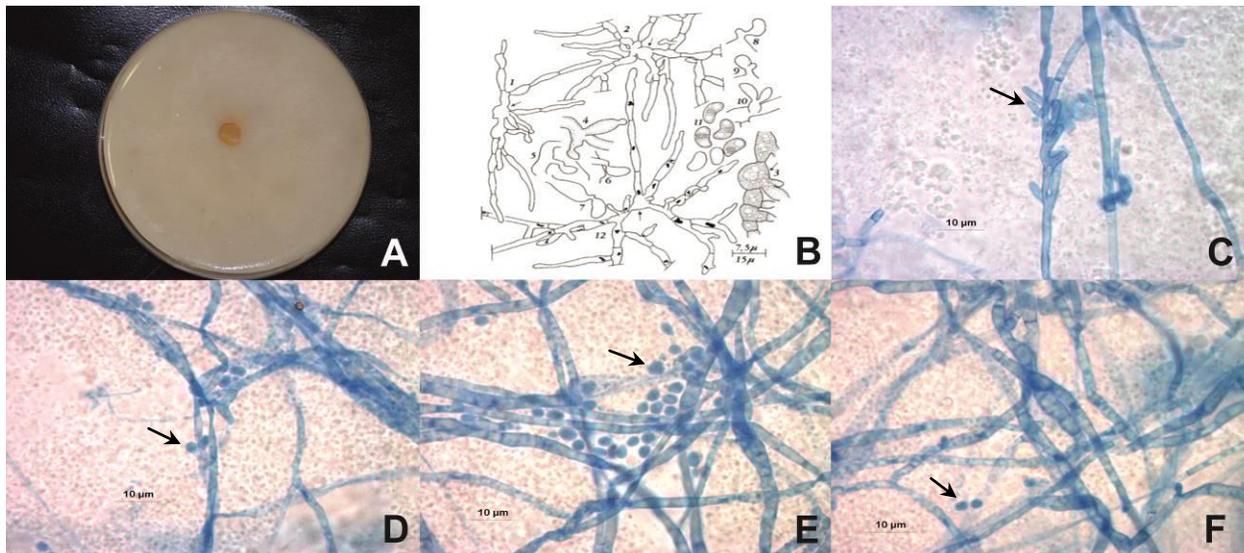
detalla en varios estudios (Karandashov & Bucher, 2005). No obstante, cuando los medios contienen altos porcentajes de celulosa, lignina, hidratos de carbono, pueden determinar la velocidad en tiempo de crecimiento micelial (Figuras 5, 7, 9 y 11) así como la fortaleza morfológica del o los individuos (Figura 4), como ya se ha determinado en estudios que involucran experimentos de hongos u otros microorganismos, al analizar varios sustratos (Callejas et al., 2009). Así mismo el comportamiento de crecimiento y la velocidad de desarrollo de las cepas puede deberse al comportamiento específico de cada especie, debido a que algunas especies de hongos necesitan más nutrientes que otros para poder alcanzar el máximo crecimiento (Rincón, 2014). Por esta razón los hongos utilizan sustratos con mayor proporción de carbono y nutrientes como la lignina y la celulosa como fuente de energía para su crecimiento y formación de biomasa (Hernández & López, 2006). Como se ha demostrado en un estudio realizado por Hernández & López (2006) sobre el crecimiento micelial, los sustratos sí influyen significativamente en el crecimiento de los hongos. Por lo cual en ciertos casos se ha podido establecer que los hongos micorrízicos se desarrollan mejor en medios de cultivo que asemejen a las condiciones naturales en donde habitan (Roberts, 1999; Smith & Read, 1997).

### **3.3. Evaluación de esporulación**

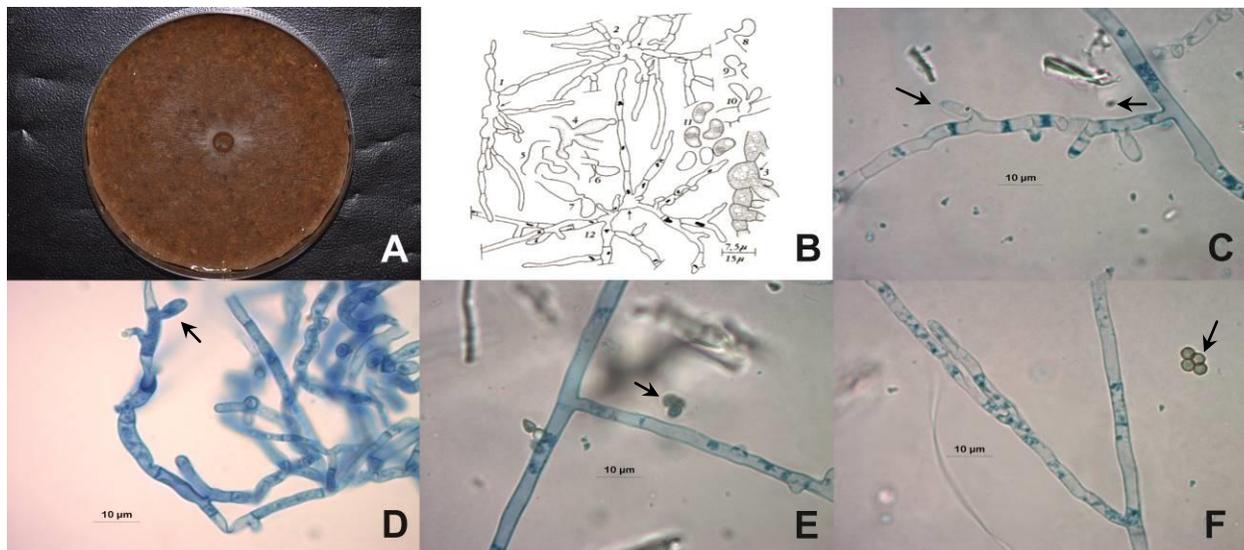
Los diferentes tratamientos permitieron que muchas cepas de *Tulasnella* spp. tengan una elevada velocidad de crecimiento micelial (ver apartado anterior), no obstante la esporulación sexual o asexual no fue evidente a simple vista, por lo que se realizó una observación y verificación por microscopía (Figura 13). De acuerdo al análisis microscópico se comprobó el desarrollo o generación de varias estructuras como hifas alargadas, septadas, con células monilioides (cadenas globosas) y la formación de aparentes basidias inmaduras o en algunos casos hasta generación de esporas asexuales, las cuales son características para *Tulasnella* spp. (Roberts, 1999) (Figura 13, 14, 15 y 16). De tal manera que las estructuras encontradas pueden servir de base para determinar estados sexuales o tipos de esporulación (sexual o asexual), debido a que este proceso es muy difícil o casi imposible de obtener en el género *Tulasnella*, como ya lo demuestran algunos autores (Warcup & Talbot, 1966; Taylor & McCormick, 2008; Cruz et al., 2014).



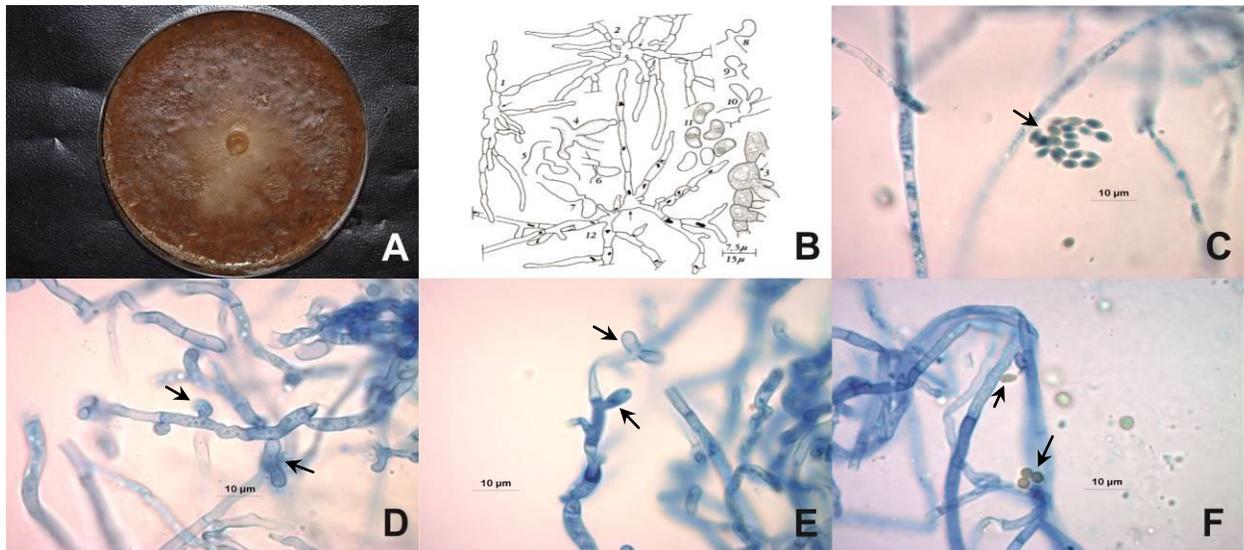
**Figura 13.** A-AF; Fotografías microscópicas de diferentes estructuras de desarrollo para las cuatro cepas de *Tulasnella* spp. en diferentes sustratos de madera, alpiste y trigo con sus respectivos controles positivos (Bacto™ Agar) y MEA (Extracto de Agar Malta). A,C,F) Las flechas negras indican hifas septadas, células monilioides; D,J,K,M-O,R,T-W) Las flechas negras indican hifas monilioides con estructuras alargadas y unión entre diferentes hifas; B,E,G,H,L,P,S,Z,AA,AC,AD) Las flechas negras indican hifas monilioides con aparentes basidias inmaduras; I,N,Q,X,Y,AB,AE,AF) Las flechas negras indican hifas largas, septadas e indicios de células monilioides. Vista microscópica 40x (Estructuras diminutas) -100x (estructuras más grandes). Barras = 10um.  
**Fuente:** Autora



**Figura 14.** A-F; Fotografías microscópicas de la cepa *Tulasnella* sp. 36 según el sustrato aplicado en: A) trigo/Bacto; B) Basidiosporas de germinación con esporóforo inicial de forma asimétrico, esporas casi maduras y maduras asexuales, basidiospоро de germinación con núcleos de tubo germinativo tomado de (Petersen, 1968); C) La flecha negra indica hifas septadas con basidiosporos de germinación y células monilioides uninucleadas con estructuras alargadas en aumento de 100x; D,E,F) Las flechas negras indican hifas con presencia de esporas asexuales (conidiosporas) en aumento de 100x. Barras = 10µm.  
**Fuente:** Autora



**Figura 15.** A-AF; Fotografías microscópicas de la cepa *Tulasnella* sp. 243 según el sustrato aplicado en: A) madera/Bacto; B) Basidiosporas de germinación con esporóforo inicial de forma asimétrico, esporas casi maduras y maduras asexuales, basidiospоро de germinación con núcleos de tubo germinativo tomado de (Petersen, 1968); C,D) Las flechas negras indican hifas septadas con aparentes basidias inmaduras y basidiosporos de germinación en aumento de 100x; C,E,F) Las flechas negras indican hifas con presencia de esporas asexuales (conidiosporas) y células monilioides uninucleadas con estructuras alargadas en aumento de 100x. Barras = 10µm.  
**Fuente:** Autora



**Figura 16.** A-AF; Fotografías microscópicas de la cepa *Tulasnella* sp. 243 según el sustrato aplicado en: A) madera/MEA; B) Basidiosporas de germinación con esporóforo inicial de forma asimétrico, esporas casi maduras y maduras asexuales, basidiosporo de germinación con núcleos de tubo germinativo tomado de (Petersen, 1968); D,E) Las flechas negras indican hifas septadas con aparentes basidias inmaduras y basidiosporos de germinación en aumento de 100x ; C,F) Las flechas negras indican hifas con presencia de esporas asexuales (conidiosporas) y células moniloides con estructuras alargadas en aumento de 100x. Barras = 10µm.

**Fuente:** Autora

Los datos microscópicos nos muestran que las cepas evaluadas, de *Tulasnella* spp., formaron estructuras características para el género, como se indica anteriormente. De tal manera que se pudo observar en la cepa 36 en el tratamiento T3 (Figura 14) y la 243 en los tratamientos T1 y T4 (Figuras 15 y 16) la formación de esporas asexuales (conidiosporas). La germinación de esporas se puede dar bajo ciertas circunstancias microambientales, que después de un crecimiento variable de las hifas, pueden generar esporas asexuales de diversos tipos (Petersen, 1968). Por lo que es necesario cumplir con requerimientos nutricionales específicos, para generar esporas, como se han detallado para algunas especies de *Tulasnella* aisladas desde orquídeas terrestres (Warcup & Talbot, 1966, 1967, 1971, 1980). Estas dificultades son ampliamente reportadas para diversos hongos y es por ello que muchos de los hongos aislados en medios de cultivo artificial no esporulan dificultando así su correcta identificación (Bayman & Otero, 2006).

## CONCLUSIONES

Los tratamientos T1 (madera/Bacto), T3 (trigo/Bacto), T5 (alpiste/MEA) y T6 (Trigo/MEA) ricos en celulosa y también contenido de lignina, son los medios más adecuados para el crecimiento micelial de las cuatro cepas de *Tulasnella* spp. con una significancia de  $p \leq 0,001$ .

Los tratamientos T1 (madera/Bacto), T3 (trigo/Bacto) y T4 (madera/Bacto) sumado al cambio de temperatura (estrés térmico) permitieron que dos cepas (36 y 243 *Tulasnella* spp). formaran esporas asexuales (conidioesporas).

## RECOMENDACIONES

Se debería evaluar las cepas de *Tulasnella* por un mayor período de tiempo para determinar si generan estructuras asexuales o sexuales que permitan una determinación morfológica de las especies.

Es de importancia que a futuro se promueva una nueva tesis que de seguimiento al estudio con el fin de evaluar nuevas mezclas de celulosa artificial o natural con otros compuestos y así lograr determinar un medio que sea aplicable en aislamientos y crecimiento rápido de *Tulasnella* spp., las cuales son importantes micobiontes de orquídeas.

La búsqueda de un medio adecuado para *Tulasnella* spp. permitiría mejorar el aislamiento de nuevas cepas que pueden ser bioprospectados con diversos fines como por ejemplo en bioproductos que mejoren la producción y conservación de orquídeas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Aal, E.-S., Hucl, P., Shea, S., Patterson, C., & Gray, D. (2011). Microstructure and nutrient composition of hairless canary seed and its potential as a blending flour for food use. *Food Chemistry*, 125(2), 410–416.
- Agrios, G. (2005). *Plant pathology* (5th ed.). EE.UU: Elsevier Academic Press.
- Alexander, C., & Hadley, G. (1985). Carbon movement between host and mycorrhizal endophyte during the development of the orchid *Goodyera repens* Br. *New Phytologist*, 101(4), 657–665.
- Alexopoulos, C., Mims, C., & Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology* (4th ed.). New York: Wiley.
- Arias, E., & Piñeros, P. (2008). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogota, D.C.
- Atlas, R., & Bartha, R. (2001). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. (A. Wesley, Ed.) (4th ed.). Pearson Educación.
- Barea, J. M., Andrade, G., Bianciotto, V., Dowling, D., Lohrke, S., Bonfante, P., O’Gara, F., Azcon-Aguilar, C. 1998. Impact on arbuscular mycorrhiza formation of *Pseudomonas* strains used as inoculants for the biocontrol of soil-borne plant fungal pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2304-2307
- Bayman, P., & Otero, J. (2006). *Microbial endophytes of orchid roots*. (B. Schulz, C. Boyle, & T. Sieber, Eds.), *Microbial root endophytes* (Vol. 9). Palmira, Valle del Cauca, Colombia: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Bidartondo, M., Bruns, T., Weiss, M., Sérgio, C., & Read, D. (2003). Specialized cheating of the ectomycorrhizal symbiosis by an epiparasitic liverwort. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 270(1517), 835–42.
- Bourdot, H., & Galzin, A. (1925). Hyménomycètes de France. *Bulletin de La Société Mycologique de France*, 41, 1–764.
- Brundrett, M. (1991). Mycorrhizas in natural ecosystems. *Advances in Ecological Research*, 21(C), 171–313.
- Brundrett, M. (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*, 154(2), 275–304.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., & Malajczuk, N. (1996). Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. *The Journal of Biological Chemistry*, 32(June 1982), 374.
- Bussmann, R. (2005). Bosques andinos del sur de Ecuador, clasificación, regeneración y uso.

*Rev. Peru. Biol.*, 12(2), 203 – 216.

- Callejas, B., Castillo, A., Colinas, M., González, M., Pineda, J., & Valdez, L. (2009). Substrates and arbuscular mycorrhizal fungi in the production of poinsettia. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 15(1), 57–66.
- 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*. University of Sheffield.
- Cruz, D., Suárez, J., Kottke, I., & Piepenbring, M. (2014). Cryptic species revealed by molecular phylogenetic analysis of sequences obtained from basidiomata of *Tulasnella*. *Mycologia*, 106(4), 708–22.
- Cruz, D., Suarez, J., Kottke, I., Piepenbring, M., & Oberwinkler, F. (2011). Defining species in *Tulasnella* by correlating morphology and nrDNA ITS-5.8S sequence data of basidiomata from a tropical Andean forest. *Mycological Progress*, 10(2), 229–238.
- Cruz, D., Suarez, J., & Piepenbring, M. (2016). Morphological revision of tulasnellaceae, with two new species of *tulasnella* and new records of *Tulasnella* spp. For Ecuador. *Nova Hedwigia*, 102(3-4), 279–338.
- Dearnaley, J. D. W. (2007). Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza*, 17(6), 475–486.
- Endara, L. (2006). How Do Red Lists Help Plant Conservation? A Case Study of the Endemic Orchid Flora of Ecuador. *Selbyana*, 26(1/2), 310.
- Gaitán, R., Salmones, D., Pérez, R., & Mata, G. (2006). *Manual práctico del cultivo de setas: aislamiento, siembra y producción* (1 era. ed). Xalapa, Veracruz, México: Instituto de Ecología, A. C.
- Gams, W., O'Donnell, K., Schroers, H.-J., & Christensen, M. (1998). Generic classification of some more hyphomycetes with solitary conidia borne on phialides. *Canadian Journal of Botany*, 76(9), 1570–1583.
- González, V., Portal, M., & Rubio, V. (2006). Review. Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 4(1), 55–79.
- Harley, J., & Smith, S. (1983). *Mycorrhizal Symbiosis*. *Academic Press*, 22(01), 483.
- Haro, J., & Melic, A. (1998). Taxonomía, Sistemática, Filogenia y Clasificaciones. *Comunidad Virtual de Entomología*, 23, 57–58.
- Hernández, R., & López, C. (2006). *Evaluación del crecimiento y producción de Pleurotus Ostreatus sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Herrera, P., Suarez, J., & 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(4), 262–268.
- Hibbett, D., Binder, M., Bischoff, J., Blackwell, M., Cannon, P., Eriksson, O., ... Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), 509–547.
- James, T., Letcher, P., Longcore, J., Mozley-Standridge, S., Porter, D., Powell, M., ... Vilgalys, R. (2006). A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia*, 98(6), 860–71.
- Jong, S.-C., & Birmingham, J. (2001). Cultivation and preservation of fungi in culture. In McLaughlin & Lemke (Eds.), *Systematics and Evolution* (Vol. 7, pp. 193–202). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Jørgensen, P., Ulloa, C., & Maldonado, C. (2006). Riqueza de plantas vasculares. *Botánica Económica de Los Andes Centrales*, 37–50.
- Karandashov, V., & Bucher, M. (2005). Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Elsevier Ltd*, 10(1), 8.
- Kendrick, B. (1985). *The fifth kingdom. The fifth kingdom*. (3ra edición). Mycologue Publications.
- Kent, L. (1994). *Tecnología de los cereales*. (Acibia, Ed.) (4th ed.). España: Elsevier.
- Kirk, P., Cannon, P., Minter, D., & Stalpers, J. (2008). *Dictionary of The Fungi* (10th ed., Vol. 106). Wallingford: CABI.
- Kohler, A., Kuo, A., Nagy, L., Morin, E., Barry, K., Buscot, F., ... Martin, F. (2015). Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nature Genetics*, 47(4), 410–5.
- 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. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 277(December 2009), 1289–1298.
- Littman, M. L. (1947). A Culture Medium for the Primary Isolation of Fungi. *Science (Washington)*, 106(2744), 109–111.
- Masuhara, G., & Katsuya, K. (1994). In situ and in vitro specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames. var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). *New Phytologist*, 127(4), 711–718.
- Miles, P., & Chang, S. (1997). *Mushroom Biology: Concise Basics and Current Developments*. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
- Moreno, G., Manjón, J., & Álvarez-Jiménez, J. (2015). Los hongos y el cambio climático. In *Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* (Vol. 33, pp. 129–135). Madrid: Naturalis

Biodiversity Center.

- Oei, P. (2003). *Mushroom cultivation : appropriate technology for mushroom growers* (3rd ed.). Backhuys.
- Otero, J., Ackerman, J., & Bayman, P. (2004). Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology*, 13(8), 2393–404.
- Petersen, R. (1968). Hyphal spore germination and asexual spore production in *Gloeotulasnella Pinicola*, 35(2), 145–149.
- Petisco, C., García, A., Vázquez, B., Zabalgogezcoa, I., Mediavilla, S., & García, B. (2005). Determinación de lignina y celulosa en hojas de plantas leñosas mediante NIRS: Comparación de métodos estadísticos. *Producciones Agroganaderas: Gestión Eficiente Y Conservación Del Medio Natural*, 1, 97–104.
- Rasmussen, H. (1995). *Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant*. Cambridge: Cambridge University Press.
- R Development Core Team, 2012. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ISBN 3- 900051-07-0 <http://www.R-project.org/>
- Rincón, C. (2014). *Modelo de evaluación para resolver problemas de filogenia molecular en el género Fusarium, basado en los análisis de microsecuencias de ADN de multilocus conservados*. Universidad Nacional de Colombia.
- Roberts, P. (1999). *Rhizoctonia-forming fungi : a taxonomic guide*. England: Herbarium, Royal Botanic Gardens.
- Serna, O. (2013). *Química almacenamiento e industrialización de los cereales*. (A. Editor, Ed.) (2nd ed.). Pearson.
- Sharma, J., Zettler, L., & Sambeek, J. (2003). A survey of mycobionts of federally threatened *Platanthera praeclara* ( Orchidaceae ). *Symbiosis*, 34, 145–155.
- Sharon, M., Kuninaga, S., Hyakumachi, M., Naito, S., & Sneh, B. (2008). Classification of *Rhizoctonia* spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. *Mycoscience*, 49(2), 93–114.
- Shimura, H., & Koda, Y. (2005). Enhanced symbiotic seed germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* following inoculation after cold treatment. *Physiologia Plantarum*, 123(3), 281–287.
- Smith, S & Read, D. (1997). *Mycorrhizal symbiosis*. (C. A. P. San Diego, Ed.) (2nd ed.). London: Academic.
- Stamets, P. (2003). Potentiation of cell-mediated host defense using fruitbodies and mycelia of medicinal mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 5(2), 14.

- Suarez, J., Weiß, M., Abele, A., Garnica, S., Oberwinkler, F., & Kottke, I. (2006). Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycological Research*, 110(11), 1257–1270.
- Taylor, D., & McCormick, M. (2008). Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytologist*, 177(4), 1020–1033.
- Waller, J, Lenné, J, W. S. (2002). *Plant pathologist's pocketbook* (3rd ed.). New York: CABI.
- Warcup, J., & Talbot, P. (1966). Perfect states of some rhizoctonias. *Transactions of the British Mycological Society*, 49(3), 427–435.
- Warcup, J., & Talbot, P. (1967). Perfect states of rhizoctonias associated with orchids. *New Phytologist*, 66(4), 631–641.
- Warcup, J., & Talbot, P. (1971). Perfect states of rhizoctonias associated with Orchids. II. *New Phytologist*, 70(1), 35–40.
- Warcup, J., & Talbot, P. (1980). Perfect states of some rhizoctonias associated with orchids. III. *New Phytologist*, 86(3), 267–272.
- Yoder, J., Zettler, L., & Stewart, S. (2000). Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. *Plant Science*, 156(2), 145–150.

## **ANEXOS**

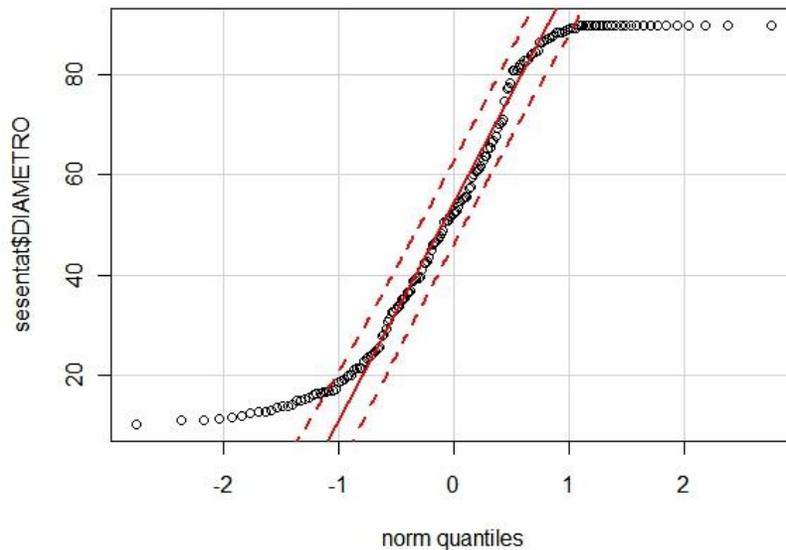
**Anexo 1. Formulación para la preparación de los medios Bacto™ Agar y MEA (Extracto de Agar Malta).**

**Agar para 1000 ml**

Madera	60g
Alpiste	60g
Trigo	60g
(Bacto™ Agar)	15g
MEA (Extracto de Agar Malta)	33,6g

**Anexo 2. Datos del análisis estadístico Shapiro-Wilk y prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para las cepas de *Tulasnella* spp. 63**

<pre>&gt; shapiro.test(sesentat\$DIAMETRO)</pre>							
Shapiro-Wilk normality test							
data: sesentat\$DIAMETRO							
W = 0.8929, p-value = 1.143e-09							
<pre>&gt; tapply(sesentat\$DIAMETRO, sesentat\$TRATAMIENTO, median, na.rm=TRUE)</pre>							
C1	C2	T1	T2	T3	T4	T5	T6
80.84	48.31	50.99	55.38	90.00	32.58	60.97	83.05
<pre>&gt; kruskal.test(DIAMETRO ~ TRATAMIENTO, data=sesentat)</pre>							
Kruskal-Wallis rank sum test							
data: DIAMETRO by TRATAMIENTO							
Kruskal-Wallis chi-squared = 24.5055, df = 7, p-value = 0.0009281							

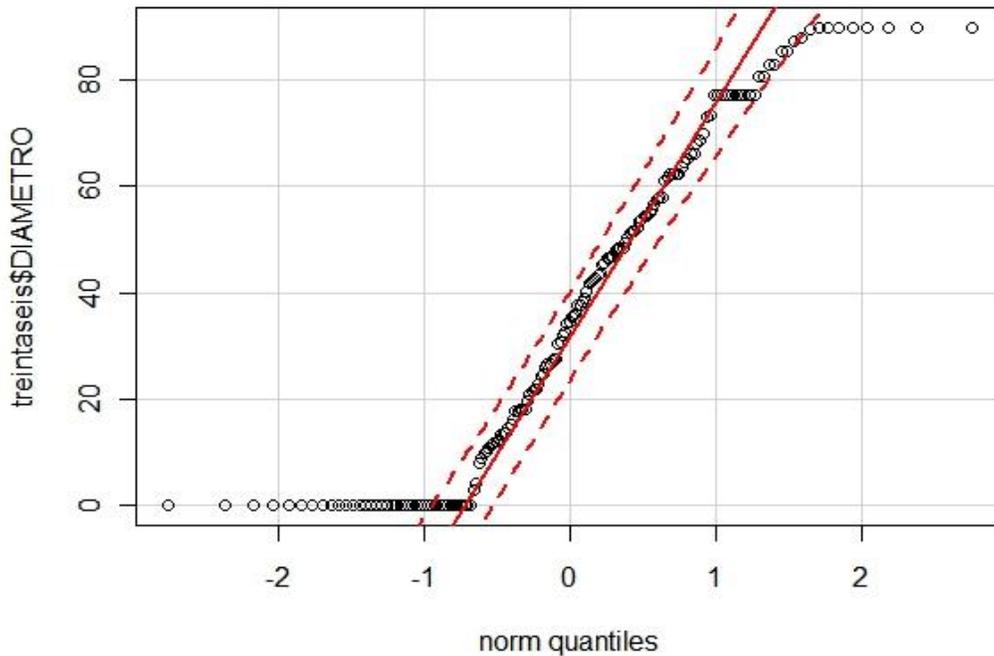


**Figura 1.** Curva de normalidad del diámetro de cobertura micelial para la cepa 63 *Tulasnella* sp. de los diferentes tratamientos (madera de *Alnus acuminata*, alpiste, trigo) más Bacto o MEA y sus respectivos controles positivos.

**Fuente:** Autora

**Anexo 3. Datos del análisis estadístico Shapiro-Wilk y prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para las cepas de *Tulasnella* spp. 36**

<pre>&gt; shapiro.test(treintaseis\$DIAMETRO)</pre>			
Shapiro-Wilk normality test			
data: treintaes\$DIAMETRO			
W = 0.9038, p-value = 5.016e-09			
<pre>&gt; tapply(treintaseis\$DIAMETRO, treintaes\$TRATAMIENTO, median, na.rm=TRUE)</pre>			
C1	C2	T1	T2
63.71	38.26	0.00	45.36
T3	T4	T5	T6
77.37	0.00	42.12	66.18
<pre>&gt; kruskal.test(DIAMETRO ~ TRATAMIENTO, data=treintaseis)</pre>			
Kruskal-Wallis rank sum test			
data: DIAMETRO by TRATAMIENTO			
Kruskal-Wallis chi-squared = 105.3081, df = 7, p-value < 2.2e-16			

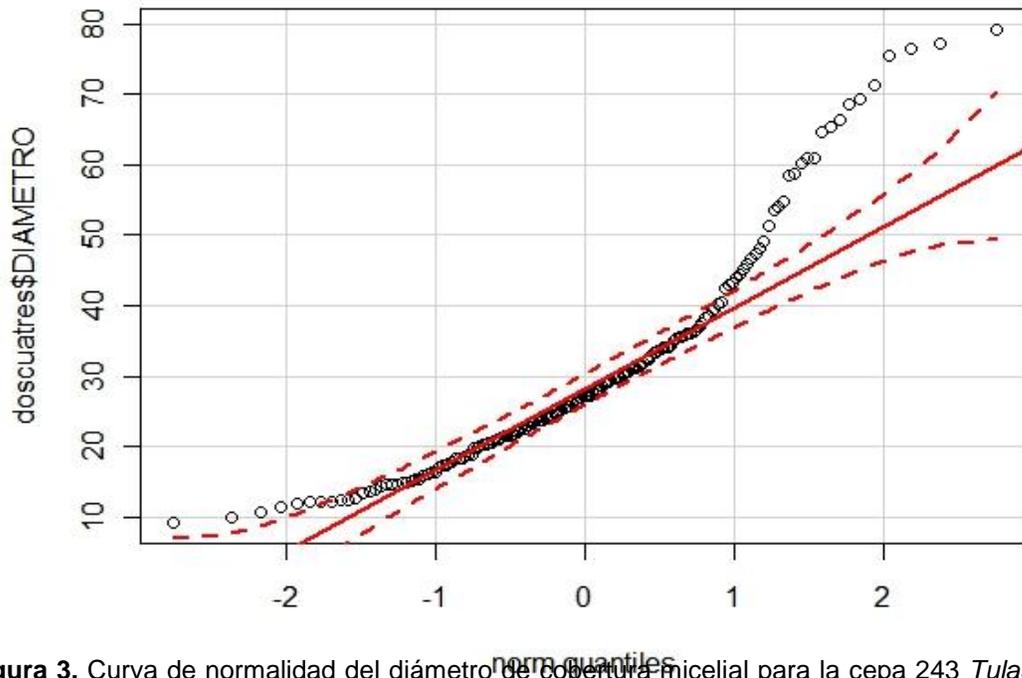


**Figura 2.** Curva de normalidad del diámetro de cobertura micelial para la cepa 36 *Tulasnella* sp. de los diferentes tratamientos (madera de *Alnus acuminata*, alpiste, trigo) más Bacto o MEA y sus respectivos controles positivos.

Fuente: Autora

**Anexo 4. Datos del análisis estadístico Shapiro-Wilk y prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para las cepas de *Tulasnella* spp. 243**

<pre>&gt; shapiro.test(doscuatres\$DIAMETRO)</pre>							
Shapiro-Wilk normality test							
data: doscuatres\$DIAMETRO							
W = 0.8894, p-value = 7.305e-10							
<pre>&gt; tapply(doscuatres\$DIAMETRO, doscuatres\$TRATAMIENTO, median, na.rm=TRUE)</pre>							
C1	C2	T1	T2	T3	T4	T5	T6
53.50	27.82	44.40	22.90	32.39	30.54	22.57	23.74
<pre>&gt; kruskal.test(DIAMETRO ~ TRATAMIENTO, data=doscuatres)</pre>							
Kruskal-Wallis rank sum test							
data: DIAMETRO by TRATAMIENTO							
Kruskal-Wallis chi-squared = 48.9497, df = 7, p-value = 2.321e-08							
- 45 -							

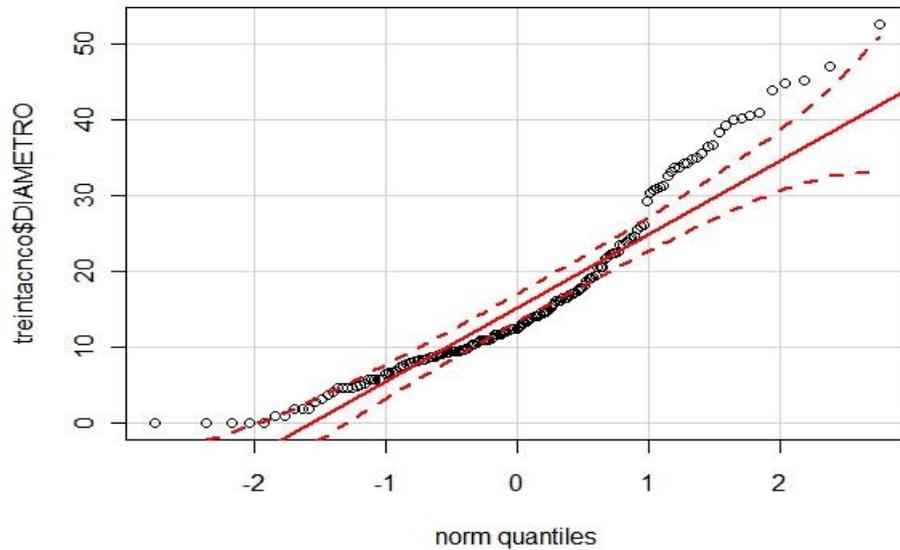


**Figura 3.** Curva de normalidad del diámetro de cobertura micelial para la cepa 243 *Tulasnella* sp. de los diferentes tratamientos (madera de *Alnus acuminata*, alpiste, trigo) más Bacto o MEA y sus respectivos controles positivos.

Fuente: Autora

**Anexo 5. Datos del análisis estadístico Shapiro-Wilk y prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para las cepas de *Tulasnella* spp. 35**

<pre>&gt; shapiro.test(treintacncos\$DIAMETRO)</pre>							
Shapiro-Wilk normality test							
data: treintacncos\$DIAMETRO							
W = 0.9075, p-value = 8.43e-09							
<pre>&gt; tapply(treintacncos\$DIAMETRO, treintacncos\$TRATAMIENTO, median, na.rm=TRUE)</pre>							
C1	C2	T1	T2	T3	T4	T5	T6
30.47	30.82	7.82	10.49	9.22	6.98	21.79	13.42
<pre>&gt; kruskal.test(DIAMETRO ~ TRATAMIENTO, data=treintacncos)</pre>							
Kruskal-Wallis rank sum test							
data: DIAMETRO by TRATAMIENTO							
Kruskal-Wallis chi-squared = 105.52, df = 7, p-value < 2.2e-16							



**Figura 4.** Curva de normalidad del diámetro de cobertura micelial para la cepa 35 *Tulasnella* sp. de los diferentes tratamientos (madera de *Alnus acuminata*, alpiste, trigo) más Bacto o MEA y sus respectivos controles positivos.

Fuente: Autora

**Anexo 6. Datos del análisis estadístico ANOVA y prueba TukeyHSD para las cepas de *Tulasnella* spp. 63**

Parameter,,,,,				
Table Analyzed,"One-way ANOVA data",,,,,				
,,,,,				
One-way analysis of variance,,,,,				
P value,"< 0.0001",,,,,				
P value summary,***,,,,,				
Are means signif. different? (P < 0.05),Yes,,,,				
Number of groups,8,,,,				
F,74.80,,,,				
R square,0.8036,,,,				
,,,,,				
Bartlett's test for equal variances,,,,,				
Bartlett's statistic (corrected),3.400e+038,,,,				
P value,,,,,				
P value summary,ns,,,,				
Do the variances differ signif. (P < 0.05),No,,,,				
,,,,,				
ANOVA Table,SS,df,MS,,				
Treatment (between columns),46777,7,6682,,				
Residual (within columns),11435,128,89.33,,				
Total,58212,135,,				
.....				

****	Tukey's Multiple Comparison Test,"Mean Diff.",q,"Significant? P < 0.05?",Summary,"95% CI of diff"			
	T1 vs T2,-4.389,1.942,No,ns,"-14.25 to 5.472"			
	T1 vs T3,-39.01,16.48,Yes,***,"-49.34 to -28.68"			
	T1 vs T4,18.41,8.145,Yes,***,"8.549 to 28.27"			
	T1 vs T5,-9.986,4.418,Yes,*,"-19.85 to -0.1250"			
	T1 vs T6,-32.06,13.99,Yes,***,"-42.07 to -22.06"			
	T1 vs C1,-29.85,13.02,Yes,***,"-39.86 to -19.85"			
	T1 vs C2,2.682,1.152,No,ns,"-7.474 to 12.84"			
	T2 vs T3,-34.62,14.82,Yes,***,"-44.82 to -24.43"			
	T2 vs T4,22.80,10.23,Yes,***,"13.08 to 32.52"			
	T2 vs T5,-5.597,2.512,No,ns,"-15.32 to 4.122"			
	T2 vs T6,-27.68,12.24,Yes,***,"-37.54 to -17.81"			
	T2 vs C1,-25.47,11.27,Yes,***,"-35.33 to -15.60"			
	T2 vs C2,7.071,3.079,No,ns,"-2.948 to 17.09"			
	T3 vs T4,57.42,24.58,Yes,***,"47.23 to 67.62"			
	T3 vs T5,29.03,12.42,Yes,***,"18.83 to 39.22"			
	T3 vs T6,6.948,2.935,No,ns,"-3.381 to 17.28"			
	T3 vs C1,9.158,3.868,No,ns,"-1.171 to 19.49"			
	T3 vs C2,41.69,17.36,Yes,***,"31.21 to 52.17"			
	T4 vs T5,-28.40,12.75,Yes,***,"-38.12 to -18.68"			
	T4 vs T6,-50.47,22.33,Yes,***,"-60.34 to -40.61"			
	T4 vs C1,-48.26,21.35,Yes,***,"-58.13 to -38.40"			
	T4 vs C2,-15.73,6.849,Yes,***,"-25.75 to -5.709"			
	T5 vs T6,-22.08,9.768,Yes,***,"-31.94 to -12.22"			
	T5 vs C1,-19.87,8.790,Yes,***,"-29.73 to -10.01"			
	T5 vs C2,12.67,5.517,Yes,**,"2.650 to 22.69"			
	T6 vs C1,2.210,0.9641,No,ns,"-7.791 to 12.21"			
	T6 vs C2,34.75,14.93,Yes,***,"24.59 to 44.90"			
	C1 vs C2,32.54,13.98,Yes,***,"22.38 to 42.69"			

**Anexo 7. Datos del análisis estadístico ANOVA y prueba TukeyHSD para las cepas de *Tulasnella* spp. 36**

Parameter,,,,				
Table Analyzed,"One-way ANOVA data",,,,				
****				
One-way analysis of variance,,,,				
P value,"< 0.0001",,,,				
P value summary,***,.,.,.,				
Are means signif. different? (P < 0.05),Yes,,,,				
Number of groups,8,,,,				
F,132.8,,,,				
R square,0.8807,,,,				
****				
Bartlett's test for equal variances,,,,				
Bartlett's statistic (corrected),3.400e+038,,,,				
P value,,,,,				
P value summary,ns,,,,				
Do the variances differ signif. (P < 0.05),No,,,,				
****				
ANOVA Table,SS,df,MS,,				
Treatment (between columns),159262,7,22752,,				
Residual (within columns),21579,126,171.3,,				
Total,180841,133,,				
****				
Tukey's Multiple Comparison Test,"Mean Diff.",q,"Significant? P < 0.05?",Summary,"95% CI of diff"				
T1 vs T2,-61.04,18.87,Yes,***,"-75.15 to -46.92"				
T1 vs T3,-77.37,23.92,Yes,***,"-91.49 to -63.26"				
T1 vs T4,0.0,0.0,No,ns,"-13.46 to 13.46"				
T1 vs T5,-57.99,18.24,Yes,***,"-71.86 to -44.12"				
T1 vs T6,-90.00,28.76,Yes,***,"-103.7 to -76.35"				
T1 vs C1,-90.00,28.76,Yes,***,"-103.7 to -76.35"				
T1 vs C2,-61.67,19.99,Yes,***,"-75.13 to -48.21"				
T2 vs T3,-16.34,4.835,Yes,*,"-31.08 to -1.596"				
T2 vs T4,61.04,18.87,Yes,***,"46.92 to 75.15"				
T2 vs T5,3.047,0.9162,No,ns,"-11.46 to 17.56"				
T2 vs T6,-28.96,8.836,Yes,***,"-43.27 to -14.66"				
T2 vs C1,-28.96,8.836,Yes,***,"-43.27 to -14.66"				
T2 vs C2,-0.6358,0.1965,No,ns,"-14.75 to 13.48"				
T3 vs T4,77.37,23.92,Yes,***,"63.26 to 91.49"				
T3 vs T5,19.39,5.829,Yes,**,"4.876 to 33.89"				
T3 vs T6,-12.63,3.852,No,ns,"-26.93 to 1.675"				
T3 vs C1,-12.63,3.852,No,ns,"-26.93 to 1.675"				
T3 vs C2,15.70,4.854,Yes,*,"1.588 to 29.82"				
T4 vs T5,-57.99,18.24,Yes,***,"-71.86 to -44.12"				
T4 vs T6,-90.00,28.76,Yes,***,"-103.7 to -76.35"				
T4 vs C1,-90.00,28.76,Yes,***,"-103.7 to -76.35"				
T4 vs C2,-61.67,19.99,Yes,***,"-75.13 to -48.21"				
T5 vs T6,-32.01,9.932,Yes,***,"-46.07 to -17.95"				
T5 vs C1,-32.01,9.932,Yes,***,"-46.07 to -17.95"				
T5 vs C2,-3.683,1.158,No,ns,"-17.55 to 10.19"				
T6 vs C1,0.0,0.0,No,ns,"-13.85 to 13.85"				
T6 vs C2,28.33,9.052,Yes,***,"14.67 to 41.98"				
C1 vs C2,28.33,9.052,Yes,***,"14.67 to 41.98"				

**Anexo 8. Datos del análisis estadístico ANOVA y prueba TukeyHSD para las cepas de *Tulasnella* spp. 243**

Parameter,,,,,							
Table Analyzed,"One-way ANOVA data",,,,,							
,,,,,							
One-way analysis of variance,,,,,							
P value,"< 0.0001",,,,,							
P value summary,***,,,,							
Are means signif. different? (P < 0.05),Yes,,,,							
Number of groups,8,,,,							
F,31.83,,,,							
R square,0.6297,,,,							
,,,,,							
Bartlett's test for equal variances,,,,,							
Bartlett's statistic (corrected),49.41,,,,							
P value,"< 0.0001",,,,,							
P value summary,***,,,,							
Do the variances differ signif. (P < 0.05),Yes,,,,							
,,,,,							
ANOVA Table,SS,df,MS,,							
Treatment (between columns),44008,7,6287,,							
Residual (within columns),25876,131,197.5,,							
Total,69884,138,,							
,,,,,							
Tukey's Multiple Comparison Test, "Mean Diff.",q, "Significant? P < 0.05?",Summary, "95% CI of diff"							
T1 vs T2,42.11,12.88,Yes,***, "27.85 to 56.37"							
T1 vs T3,32.72,9.877,Yes,***, "18.27 to 47.17"							
T1 vs T4,21.02,6.155,Yes,***, "6.121 to 35.91"							
T1 vs T5,35.90,10.68,Yes,***, "21.23 to 50.56"							
T1 vs T6,36.89,10.80,Yes,***, "21.99 to 51.79"							
T1 vs C1,-10.07,3.041,No,ns, "-24.53 to 4.378"							
T1 vs C2,26.27,7.815,Yes,***, "11.60 to 40.93"							
T2 vs T3,-9.388,2.872,No,ns, "-23.65 to 4.873"							
T2 vs T4,-21.09,6.254,Yes,***, "-35.80 to -6.379"							
T2 vs T5,-6.212,1.872,No,ns, "-20.69 to 8.262"							
T2 vs T6,-5.218,1.547,No,ns, "-19.93 to 9.494"							
T2 vs C1,-52.18,15.96,Yes,***, "-66.44 to -37.92"							
T2 vs C2,-15.84,4.774,Yes,*, "-30.31 to -1.366"							
T3 vs T4,-11.70,3.427,No,ns, "-26.60 to 3.195"							
T3 vs T5,3.175,0.9448,No,ns, "-11.49 to 17.84"							
T3 vs T6,4.170,1.221,No,ns, "-10.73 to 19.07"							
T3 vs C1,-42.79,12.92,Yes,***, "-57.25 to -28.34"							
T3 vs C2,-6.452,1.920,No,ns, "-21.12 to 8.211"							
T4 vs T5,14.88,4.298,No,ns, "-0.2240 to 29.98"							
T4 vs T6,15.87,4.517,Yes,*, "0.5437 to 31.20"							
T4 vs C1,-31.09,9.105,Yes,***, "-45.99 to -16.19"							
T4 vs C2,5.250,1.517,No,ns, "-9.852 to 20.35"							
T5 vs T6,0.9948,0.2874,No,ns, "-14.11 to 16.10"							
T5 vs C1,-45.97,13.68,Yes,***, "-60.63 to -31.31"							
T5 vs C2,-9.628,2.824,No,ns, "-24.50 to 5.244"							
T6 vs C1,-46.96,13.75,Yes,***, "-61.86 to -32.07"							
T6 vs C2,-10.62,3.069,No,ns, "-25.72 to 4.479"							
C1 vs C2,36.34,10.81,Yes,***, "21.68 to 51.00"							

**Anexo 9. Datos del análisis estadístico ANOVA y prueba TukeyHSD para las cepas de *Tulasnella* spp. 35**

Parameter,,,,,					
Table Analyzed,"One-way ANOVA data",,,,,					
,,,,,					
One-way analysis of variance,,,,,					
P value,"< 0.0001",,,,,					
P value summary,***,,,,					
Are means signif. different? (P < 0.05),Yes,,,,					
Number of groups,8,,,,					
F,21.93,,,,					
R square,0.5358,,,,					
,,,,,					
Bartlett's test for equal variances,,,,,					
Bartlett's statistic (corrected),59.27,,,,					
P value,"< 0.0001",,,,,					
P value summary,***,,,,					
Do the variances differ signif. (P < 0.05),Yes,,,,					
,,,,,					
ANOVA Table,SS,df,MS,,					
Treatment (between columns),30593,7,4370,,					
Residual (within columns),26502,133,199.3,,					
Total,57094,140,,					
,,,,,					
Tukey's Multiple Comparison Test,"Mean Diff.",q,"Significant? P < 0.05?",Summary,"95% CI of diff"					
T1 vs T2,-5.731,1.746,No,ns,"-20.05 to 8.592"					
T1 vs T3,-2.467,0.7514,No,ns,"-16.79 to 11.86"					
T1 vs T4,3.367,1.026,No,ns,"-10.96 to 17.69"					
T1 vs T5,-26.16,8.078,Yes,***,"-40.29 to -12.03"					
T1 vs T6,-2.597,0.7794,No,ns,"-17.13 to 11.94"					
T1 vs C1,-30.02,8.864,Yes,***,"-44.80 to -15.24"					
T1 vs C2,-37.93,11.20,Yes,***,"-52.71 to -23.15"					
T2 vs T3,3.264,0.9810,No,ns,"-11.25 to 17.78"					
T2 vs T4,9.098,2.734,No,ns,"-5.418 to 23.61"					
T2 vs T5,-20.43,6.223,Yes,***,"-34.75 to -6.107"					
T2 vs T6,3.134,0.9283,No,ns,"-11.59 to 17.86"					
T2 vs C1,-24.29,7.082,Yes,***,"-39.25 to -9.327"					
T2 vs C2,-32.20,9.389,Yes,***,"-47.16 to -17.24"					
T3 vs T4,5.834,1.753,No,ns,"-8.681 to 20.35"					
T3 vs T5,-23.69,7.217,Yes,***,"-38.02 to -9.370"					
T3 vs T6,-0.1302,0.03857,No,ns,"-14.86 to 14.60"					
T3 vs C1,-27.55,8.034,Yes,***,"-42.51 to -12.59"					
T3 vs C2,-35.46,10.34,Yes,***,"-50.43 to -20.50"					
T4 vs T5,-29.53,8.994,Yes,***,"-43.85 to -15.20"					
T4 vs T6,-5.964,1.767,No,ns,"-20.69 to 8.763"					
T4 vs C1,-33.39,9.735,Yes,***,"-48.35 to -18.42"					
T4 vs C2,-41.30,12.04,Yes,***,"-56.26 to -26.34"					
T5 vs T6,23.56,7.071,Yes,***,"9.026 to 38.10"					
T5 vs C1,-3.859,1.140,No,ns,"-18.63 to 10.92"					
T5 vs C2,-11.77,3.475,No,ns,"-26.55 to 3.006"					
T6 vs C1,-27.42,7.888,Yes,***,"-42.59 to -12.26"					
T6 vs C2,-35.33,10.16,Yes,***,"-50.50 to -20.17"					
C1 vs C2,-7.911,2.242,No,ns,"-23.31 to 7.485"					