



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ESCUELA DE BIOLOGÍA

“Colección, caracterización morfológica–molecular y experimentos de inoculación *in-vitro* de Basidiomicetes potencialmente micorrízicos de orquídeas en Bosque Montano del Sur del Ecuador”

Tesis de Grado previo la
obtención del título de
Biólogo

AUTORA:

Stefania Cevallos Solórzano

DIRECTOR:

Bq. Darío Javier Cruz Sarmiento

Loja – Ecuador

2012

Bq. Darío Cruz

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA:

Que una vez revisado el proyecto de investigación efectuado por la Srta. Stefania Cevallos Solórzano, se ha establecido que el trabajo previo a la obtención del título de BIÓLOGA, cumple con los requisitos establecidos por la Universidad Técnica Particular de Loja y por la Escuela de Biología y por ello se autoriza la presentación final.

Loja, 22 de marzo de 2012

Bq. Darío Cruz

DIRECTOR DE TESIS

ACTA DE DECLARACIÓN Y CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Stefania Cevallos Solórzano declaro ser autora del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja 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 de tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

Stefania Cevallos
1104859556

Bq. Darío Cruz
Director de tesis

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

“Las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo, son de exclusiva responsabilidad de su autora”.

Stefania Cevallos Solórzano

1104859556

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico:

A mis padres Amada y Vicente, por su apoyo invaluable, que gracias a su ejemplo de fortaleza, humildad y perseverancia, he podido culminar con mi formación académica universitaria.

A mis hermanos Gabriela, Julio, Eliza, Reydi y Andrea quienes han sido un soporte fundamental en mi vida.

A mis sobrinos por recordarme la simplicidad de la vida.

A mis primos y tíos con quienes siempre he podido contar, compartiendo buenos y malos momentos.

A mis amigos por escucharme y tener las palabras adecuadas en los momentos difíciles, aprendiendo juntos el verdadero valor de la amistad y fidelidad.

Stefania Cevallos Solórzano

AGRADECIMIENTO

Expreso mi gratitud:

A la Universidad Técnica Particular de Loja por contribuir en mi formación personal y profesional y además brindarme la oportunidad de participar como gestor en el Centro de Biología Celular y Molecular.

A todos los Docentes Universitarios de la Escuela de Biología y Docentes Investigadores del CBCM por compartir sus conocimientos y su calidad humana, aprendiendo de ellos muchos valores.

Al Dr. Juan Pablo Suárez por brindarme la oportunidad de ser parte del grupo de estudio de micorrizas del CBCM y por haber colaborado en la realización del proyecto.

A mis amigos del CBCM por su sincero apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

Al Bq. Darío Cruz mi especial agradecimiento, por su tiempo, paciencia y apoyo incondicional en todo el transcurso de la realización de tesis.

Stefania Cevallos Solórzano

INDICE DE CONTENIDOS	Pág.
Certificación del director de la tesis	II
Cesión de derechos	III
Autoría	IV
Dedicatoria	V
Agradecimientos	VI
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	X
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	5
Sitio de muestreo y Colecta.....	6
Caracterización morfológica.....	7
Aislamiento de hongos por el método de esporulación.....	8
Ensayos de germinación simbiótica <i>in vitro</i>	9
Colonización de <i>Tulasnella</i> spp. a plántulas de orquídeas.....	12
Caracterización molecular y análisis filogenético.....	13
3. RESULTADOS	16
Caracterización morfológica.....	17
Germinación simbiótica.....	19
Colonización de <i>Tulasnella</i> spp. a plántulas de orquídeas.....	22
Caracterización molecular y análisis filogenético.....	24
5. DISCUSIÓN	29
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

RESUMEN

Los hongos que forman micorrizas en las orquídeas cumplen un papel muy importante durante su ciclo de vida, tanto en la germinación de las semillas como en el desarrollo de sus plántulas. Existe un limitado conocimiento de la diversidad de estos simbiosomas, especialmente en las zonas tropicales. En este estudio se analizó microscópicamente e ilustró las características de basidiomas de hongos resupinados potencialmente micorrizicos de orquídeas, colectados en un bosque tropical lluvioso. Además se inició experimentos de micorrización en semillas y plántulas de cuatro especies de orquídeas junto con ocho hongos *Tulasnella* spp. de diferentes orígenes. Cinco hongos provocaron ensanchamiento en algunas semillas. En plántulas se observó por microscopia la formación de pelotones en células corticales. Molecularmente, de las ocho *Tulasnella* spp., se amplificó y analizó los genes que codifican DNA ribosomal nuclear (nrDNA) ITS-5.8S y 28S, comparandolas frente a secuencias disponibles en el GenBank, nuestras secuencias se ubicaron en cuatro clados, junto o cercanas a secuencias de *Tulasnella*

asymmetrica obtenidas desde *Thelymitra epipactoides*, de Australia. Comprobando así su potencial micorrícico.

Palabras Claves: micorrizas de orquídeas; *Epidendrum parviflorum*, *Epidendrum arachnoglossum*, *Cyrtochilum tricostatum*; *Helcia sanguinolenta*; inoculación in vitro; *Tulasnella*; pelotones; ITS-5.8S; 28S

ABSTRACT

Mycorrhizal fungi in orchids play an important role during its life cycle in both seed germination and seedlings development. There is a limited knowledge of the diversity of these symbionts, especially in the tropics. In the first part of this study it was analyzed and illustrated microscopic features of resupinate fungi basidiomata of the genus *Tulasnella*, *Sebacina*, *Helicogloea*, present in a tropical rainforest characterized by an abundance of orchids, both epiphytic and terrestrial. In the second part of this study, the aim was obtain *in vitro* isolates from basidiomata sampled and begin orchid mycorrhizal experiments. The isolates from basidiomata were unsuccessful; therefore, seven established cultures of *Tulasnella* spp. that were isolated from basidiomata and orchids roots were used together with seeds of orchids *Epidendrum parviflorum*, *Epidendrum arachnoglossum*, *Cyrtochilum tricostatum* and *Helcia sanguinolenta*, from different geographical points. The trial by placing seeds on filter paper in OMA with fungi DC309, DC292, F4306, F124 and FO24462c resulted in embryo widening. The effects of fungal inoculation were also tested in seedlings obtained from asymbiotics controls of orchid above. As a result of this experiment were observed the formation of pelotons in cortical cells of roots in the species *E. parviflorum* and *E. arachnoglossum* inoculated with *Tulasnella* spp. F448 and F4306. Whereas, the strains DC292, FO24462c and FO24380a only grew in the root surface but did not enter into it. Molecularly the genes those encoding nuclear ribosomal DNA (nrDNA) ITS-5.8S and 28S were amplified and analyzed for fungal cultures. Then obtained sequences were compared with sequences available in GenBank. Phylogenetically the sequences of these fungi were placed in several clades,

either nearly or closely to the sequences of *Tulasnella asymmetrica* from *Thelymitra epipactoides* of Australia. So, checking it's potential of mycorrhization and hypothesizing unspecificity in the association *Tulasnella*-orchid, as previously found in field studies. In the future, when cultivating orchids, these observations could be considered in order to develop standard protocols facilitating the work with these isolates.

Key words: orchid mycorrhiza; *Epidendrum parviflorum*, *Epidendrum arachnoglossum*, *Cyrtochilum tricostatum*; *Helcia sanguinolenta*; *in vitro* inoculación; *Tulasnella*; pelotons; ITS-5.8S; 28S

INTRODUCCIÓN

Introducción

Ecuador es uno de los países más biodiversos del mundo (Bussmann 2005) con 16.006 especies de plantas vasculares, destacándose las orquídeas con aproximadamente 3.630 especies (Jorgensen *et al.* 2006). Las orquídeas son plantas muy apreciadas y de alto valor comercial (Boldrini *et al.* 2010), que cumplen roles importantes como elementos estructurales de los ecosistemas. Una de sus funciones es contribuir al balance hídrico (Bussmann *et al.* 2001). Sin embargo una gran cantidad de especies de orquídeas están en peligro de extinción, principalmente por la pérdida de hábitat inducida por el hombre (Dearnaley *et al.* 2007). La familia *Orchidaceae* se caracteriza por generar miles de semillas, denominadas también “polvo de semillas” (Rasmussen 1995), con pocas reservas nutritivas de lípidos y proteínas, insuficientes para el desarrollo del embrión. Siendo esencial la colonización por un hongo compatible, que le proporcione los hidratos de carbono necesarios para la germinación, establecimiento y desarrollo de la planta (Smith & Read 2008). Esta asociación mutualista entre las raíces de las orquídeas y hongos específicos se denomina micorrizas de orquídeas (Cameron *et al.* 2006; Smith & Read 2008).

Introducción

Los hongos hasta ahora reportados como formadores de micorrizas en orquídeas pertenecen a los órdenes “Tulasnellales”-Cantharellales, Sebaciniales, Ceratobasidiales y Atractiellales dentro del filum Basidiomycota (Kottke *et al.* 2010; Otero *et al.* 2004; Suárez *et al.* 2006, 2008). En los bosques tropicales montanos del sur del Ecuador los ordenes Tulasnellales, Sebaciniales y Atractiellales han sido reportados como formadores de esta asociación simbiótica (Suárez *et al.* 2006, 2008; Kottke *et al.* 2010) y frecuentes colonizadores de orquídeas tanto epífitas como terrestres. Muchos de los estudios dirigidos a estimar la diversidad de hongos micorrízicos en orquídeas, se han basado en métodos moleculares, mediante el manejo del ADN obtenido desde las raíces colonizadas (Otero *et al.* 2002, 2004; Suárez *et al.* 2006, 2008; Taylor & McCormick 2007).

La combinación de la taxonomía clásica basada en caracteres morfológicos y la filogenia molecular, es indispensable para tratar de definir especies con una mayor exactitud y correlación, como se ha mostrado para Tulasnellales (Cruz *et al.* 2011). De igual manera es necesario aislar y mantener a los organismos

Introducción

micobiontes *in vitro* para estar en capacidad de realizar, entre otros estudios, ensayos de germinación, para determinar la especificidad entre hongos y orquídeas, con significativas implicaciones para la conservación (Bonnardeaux *et al.* 2007; Roche *et al.* 2010; Swarts *et al.* 2010). Por consiguiente es relevante aportar e incrementar el conocimiento de hongos potencialmente micorrízicos, tanto en orquídeas como en otras plantas vasculares, para avanzar en el entendimiento de estas interrelaciones biológicas.

Los objetivos planteados para la presente investigación fueron dirigidos a: (i) coleccionar basidiomas de hongos resupinados e identificar morfológicamente y molecularmente si pertenecen a hongos basidiomicetes potencialmente micorrízicos de orquídeas, (ii) aislar los hongos en cultivos puros mediante esporulación y (iii) establecer experimentos de germinación simbiótica y de colonización en raíces de plántulas de orquídeas, mediante inoculación *in vitro* de hongos aislados en cultivo. Todo esto con miras a futuras aplicaciones en programas de conservación y reintroducción de orquídeas en su medio natural.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de muestreo y colecta

El muestreo se realizó en la Reserva Biológica San Francisco (RBSF), ubicada en la vertiente oriental de la Cordillera de El Consuelo en el norte de los Andes del sur del Ecuador, provincia de Zamora Chinchipe ($3^{\circ}58'S$, $79^{\circ}04'W$). El sitio es un bosque montano tropical lluvioso, cubre la falda empinada entre 1850 y 2700 m s.n.m. (Suárez *et al.* 2006), caracterizado por la riqueza de plantas vasculares, criptógamas y epífitas (Beck *et al.* 2008). Los basidiomas se colectaron a lo largo de transeptos en una altitud entre 1900 m s.n.m. y 2500 m s.n.m., cubriendo aproximadamente una hectárea de bosque. Los muestreos se realizaron en los meses septiembre, octubre, noviembre de 2010 que es época seca; abril, mayo, agosto 2011, correspondiente a la época lluviosa. Se colectaron basidiomas resupinados definidos por su color (violáceo, grisáceo, rosado o ligeramente rosado), ubicados en ramas caídas o sobre madera en descomposición (Cruz *et al.* 2011). Las muestras se mantuvieron en papel aluminio hasta que se analizaron en el laboratorio, que para la mayoría de las muestras fue el mismo día de la colecta de campo. Los especímenes de interés se secaron y se conservan en el

herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja (HUTPL) con su respectivo código.

Caracterización morfológica

A todos los especímenes colectados se los analizó al microscopio luego de haberles realizado cortes finos con hojas de afeitar y con la ayuda del estereomicroscopio (ZEISS Stemi DV4). A cada preparación en placa se adicionó una gota de phloxine 1% y una gota de KOH 10%, para mejorar su observación al microscopio de contraste de fases (Leitz WETZLAR SM-Lux). Se realizó las observaciones usando magnificaciones de 40x hasta 100x. Los basidiomas con características para los órdenes Tulasnellales, Sebaciniales, Ceratobasidiales y Atractiellales fueron utilizados para realizar más preparaciones donde se buscó tomar 20 medidas del diámetro, largo y ancho de cada estructura como hifas, basidias, esterigmatas, cistidias y 25 medidas para las esporas que se les calculó además el valor Q (cociente: largo/ancho). Los promedios totales de cada estructura se obtuvieron con la fórmula $(\bar{x}) \pm SD$ y los valores extremos se encerraron en paréntesis. Finalmente se desarrollaron manualmente ilustraciones con una escala

milimétrica para mantener un rango estándar, incluyendo todos los detalles observados en el espécimen.

Aislamiento de hongos por el método de esporulación

De los basidiomas seleccionados, tentativamente positivos para los órdenes de interés en esta investigación, luego de la caracterización morfológica, se tomó un segmento fresco de 2 cm x 1 cm aproximadamente. El segmento se pegó en la parte interna de una caja petri (9cm diámetro) con medio Malt Extract Agar (MEA 3.36%, Sigma) más 1% de cloranfenicol, como antibiótico (Florez 1998). La tapa con el segmento adherido se giró a diario hasta marcar cuatro puntos diferentes de caída de esporas sobre el medio de cultivo. Los hongos que crecieron en los diferentes puntos de la misma caja se compararon en busca de similitudes morfológicas y hábito de crecimiento. Los seleccionados fueron replicados en medio Potato Dextrose Agar (PDA 3.9%, Sigma) para favorecer el desarrollo micelial del hongo. La esporulación de Basidiomycota no se observó durante el

periodo de investigación. En su lugar evidencio desarrollo de Ascomycotas.

Ensayos de germinación simbiótica *in vitro*

Para los ensayos de germinación *in vitro* no fue posible usar los hongos aislados por el método de esporulación. Por tal razón, para las pruebas de germinación, se recurrió al uso de ocho cultivos ya establecidos (Tabla1).

Tabla 1. Cultivos empleados en los ensayos de inoculación.

Cultivo	Espécimen	Colector y Determinador	Año de colección	GenBank	sustrato	País de origen
DC309 (HUTPL)	<i>Tulasnella</i> sp.	Leg. y Dt.: Darío Cruz	2010	--	Aislado desde basidioma <i>Tulasnella</i> cf. <i>pinicola</i>	Alemania
DC292 (HUTPL)	<i>Tulasnella</i> sp.	Leg. y Dt.: Darío Cruz	2010	--	Aislado desde basidioma <i>Tulasnella violea</i>	Alemania
FO24462c	<i>Tulasnella</i> sp.	Leg. y Dt: Franz Oberwinkler	1996	--	Aislado desde basidioma <i>Tulasnella</i> sp.	--
FO24380a	<i>Tulasnella</i> sp.	Leg. y Dt: Franz Oberwinkler	1996	--	Aislado desde basidioma <i>Tulasnella</i> sp.	--
F124 (RFB663)	<i>Tulasnella</i> sp.	Leg. Bandoni	--	--	--	--
F448 (NIAES 5809)	<i>Tulasnella asymmetrica</i>	Leg. y Dt: Warcup	1968	DQ388048	Aislados desde <i>Thelymitra epipactoides</i>	Australia
F4306 MAFF 305808	<i>Tulasnella asymmetrica</i>	Leg. y Dt: Warcup	1967	DQ388047	Aislados desde <i>Thelymitra epipactoides</i>	Australia
2TH-2M2	<i>Acremonium</i> sp. anteriormente determinada como <i>Tulasnella</i> sp.	Leg.: Romina Acevedo Dt.: Darío Cruz	2011	--	Orquídea no identificada.	Ecuador

Durante el periodo de muestreo no se encontró plantas con semillas de las especies seleccionadas. Por tal motivo se usó semillas de orquídeas proporcionadas

desde el Banco de Germoplasma de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL); de las especies: *Epidendrum parviflorum*, *E. arachnoglossum*, *Cyrtochilum tricostatum* y *Helcia sanguinolenta*, con código de Banco 70, 44, 54 y 35 respectivamente, colectadas en el vivero municipal del cantón Loja (Datos del determinador no obtenidos). La diferencia entre los porcentajes de germinación en medio MS (Murashige & Skoog 1962) obtenidos luego de colectadas las semillas (datos proporcionados por el Banco de Germoplasma) y los porcentajes de germinación obtenidos en MS (Murashige & Skoog 1962) en este estudio, fueron verificados previo al ensayo.

Los hongos (Tabla 1) se replicaron en Oat Meal Agar (OMA 2.5% avena, 8% agar, Sigma sin hormonas) (Bonnadeaux *et al.* 2007; Roche *et al.* 2010; Swarts *et al.* 2010), contenido en cajas petri (9cm diámetro), las cuales se dividieron por observación en cuatro segmentos, estas secciones contuvieron 50 semillas de cada especie de orquídea (Fig. 2A).

La desinfección de las semillas se hizo colocándolas en sobres pequeños de papel absorbente y sometiénolas a

Materiales y Métodos

inmersión en hipoclorito de sodio 1% por 3 minutos seguido de un enjuague en agua destilada estéril por 1 minuto (Guachizaca 2011).

Para probar el efecto de los hongos en la germinación de semillas se realizaron dos ensayos y tres repeticiones por cada ensayo. En el primer ensayo se sembró directamente las semillas sobre el medio, junto con el hongo en crecimiento (OMA 2.5% avena, 8% agar, Sigma sin hormonas). En el segundo ensayo el sobre que contiene las semillas en la desinfección, se abrió y dejó en contacto con el medio, ubicándolo contiguo al hongo en crecimiento (Fig. 2A).

Los controles asimbióticos fueron semillas de orquídea sembradas en medio MS, sin la presencia de ningún hongo, empleándolos para verificar el porcentaje de germinación. Como control negativo se estableció, las semillas de orquídea sembradas en medio OMA (2.5% avena, 8% agar, Sigma sin hormonas) en ausencia de hongos.

Las cajas de los ensayos y los controles se incubaron a 18°C en oscuridad por cuatro semanas (Roche *et al.*

2010; Swarts *et al.* 2010). A continuación las cajas se trasladaron a un cuarto de fotoperiodo (12h luz/8h sombra) a 22°C. Se realizó revisiones semanales. Y finalmente a las diez semanas las semillas se analizaron y clasificaron de acuerdo al estado de desarrollo alcanzado en cada lote de semillas, de la siguiente manera: S0=no germinó, S1=ensanchamiento del embrión, S2=desarrollo de pelos radicales, S3=desarrollo de proyección de hoja, S4=desarrollo de la primera hoja, S5=desarrollo de la segunda hoja y S6=desarrollo de raíces (Stenberg & Kane 1998).

Colonización de *Tulasnella* spp. a plántulas de orquídeas

Las plántulas que se obtuvieron en los controles asimbióticos, en medio MS (Murashige & Skoog 1962) que alcanzaron el estado seis de germinación, catalogado como desarrollo de raíces (Stenberg & Kane 1998), se trasplantaron individualmente según la especie de orquídea a cajas petri bi-compartimentadas que contenían medio OMA, inoculadas previamente (tres días) con un hongo (2TH-2M2, DC309, DC292,

FO24462c, F124, F448, F4306 y FO24380a). Las cajas se sometieron a fotoperiodo (12h luz/8h sombra) a 24°C por 45 días. Para determinar efectos del hongo en las plántulas se observó en la apariencia externa la presencia de: cambios en la coloración, marchitez, necrosis o invasión del hongo a toda la plántula. También para verificar la colonización del hongo a la raíz se realizaron cortes transversales en la zona superior, media y apical de la raíz, en busca de formación de pelotones u ovillos en las células corticales. Los cortes se tiñeron con azul de metileno 0,05%. Las secciones se examinaron al microscopio (Leitz WETZLAR SM-Lux) con una magnificación de 10x hasta 100x.

Caracterización molecular y análisis filogenético

La extracción de ADN desde basidiomas se efectuó únicamente desde los hongos tentativamente positivos, utilizando de ellos un segmento fresco o seco, sin ningún tratamiento previo. Para los cultivos se tomó una porción micelial evitando llevar demasiado agar. En ambas extracciones se empleó el kit de extracción DNeasy Plant

Materiales y Métodos

Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). En cuanto a la amplificación de productos de ADN se utilizó la metodología aplicada por Cruz *et al.* (2011) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 98°C por 30 s, 30 ciclos, cada ciclo consta de un paso de desnaturalización a 98°C por 10 s, anillamiento de primers a 60°C por 20 s, extensión a 72°C por 30 s y una extensión final a 72°C por 10min. El volumen de reacción de PCR fue de 20 µL: 10 µL de 2x Phusion Mastermix, 6.4µL de agua dd, 0.4 µL de cada primer (25 pmol/µL), 0.8 µL de Bovine Serum Albumin 10% (BSA) y 2 µL de ADN.

Para amplificar nrDNA desde basidiomas se emplearon los primers universales ITS1/TW14 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3/5'-GCT ATC CTG AGG GAA ACT TC-3' White *et al.* 1990; Cullings 1994) en una primera PCR, y luego una segunda PCR anidada con primers específicos para cada orden: Tulasnellales 5.8STul/NL4 (White *et al.*1990; Suárez *et al.* 2006), Sebaciales SebITS/NL4 (White *et al.*1990; M. Berbee 2002). El ADN de cultivos se amplificó directamente utilizando los primers ITS1/TW14.

Materiales y Métodos

Los productos de PCR se verificaron por medio de electroforesis (128 V, 300 mA, 20 min) en geles de agarosa 1%, teñido en Gel Red Nucleic Stain (3x en agua). El primer pocillo contuvo 1,5 μ L de marcador molecular de 1 Kb. A partir del segundo pocillo se cargó 2 μ L de cada producto de PCR combinado con 1.5 μ L de azul de bromofenol-6x loading solution. La observación se hizo en el transiluminador UV.

Para los análisis filogenéticos se incluyeron las secuencias obtenidas en los sets de datos proporcionados por Suárez *et al.* (en preparación), tanto para ITS-5.8S como para 28S. Luego se analizó por el método Neighbor-joining con bootstrap tomando los valores >50, esto se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico PAUP * (Swofford 2002) con la modificación BIONJ del algoritmo NJ (Gascuel 1997).

RESULTADOS

Caracterización morfológica

Del total de 71 basidiomas colectados se logró obtener tres especímenes (SC038; SC040 y SC062) con características para Sebaciniales. Sin embargo, solo se hizo la ilustración del espécimen SC062 (Fig. 1A). En las otras muestras no se logró observar estructuras en estado de madurez adecuada para la descripción morfológica. El espécimen SC062 presentó *Basidioma*: resupinado de aspecto graso brillante a la luz; *Himenio*: irregular como un entramado de fibras; *Hifas*: hialinas, delgadas seguidamente septadas de 2-3(-4) μ m de diámetro; *Basidias*: transversalmente septadas ovaladas y oblongas, ocasionalmente clavadas (8-)9-13 \times 12-17(-20) μ m; *Esterigmas*: alargados cilíndricos, con terminación en punta 2-3(-4) \times (7-)9-14(-15) μ m; *Esporas*: semi-alantoideas, oblongas y elípticas (6-)8-11(-12) \times (10-)12-15(-16) μ m, con un valor Q de 1,7-2.

Para los miembros de Tulasnellales y Atractiellales no se obtuvieron basidiomas durante este periodo de muestreo. Para el conocimiento estructural, morfológico de hongos pertenecientes a estos ordenes únicamente se incluyó e ilustró especímenes ya colectados por Cruz

Resultados

D. (DC245 *Tulasnella* sp. y DC207 *Helicogloea* sp.) en Ecuador y Panamá respectivamente (Fig. 1B y 1C).

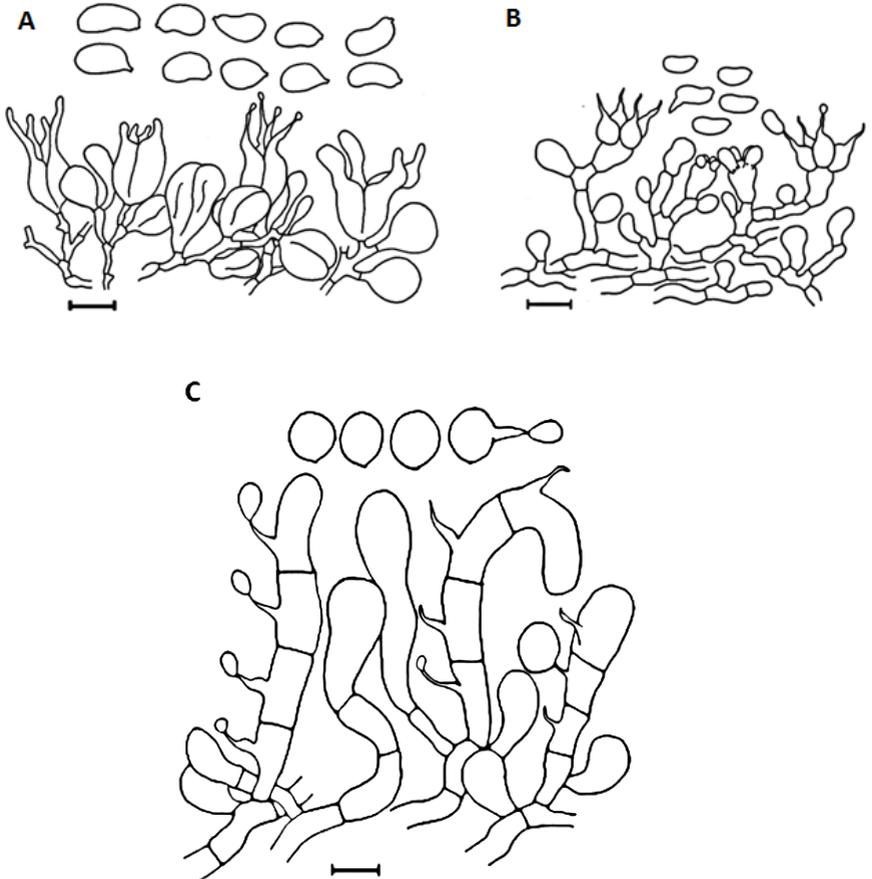


Fig. 1 Basidiomicetes potenciales micorrícicos **(A)** *Sebacina* sp. SC 062 **(B)** *Tulasnella* sp. DC245 **(C)** *Helicogloea* sp. DC207. Barra 10 μm .

Germinación simbiótica

Las pruebas pre-inoculación de la germinación de semillas en medio MS (Murashige & Skoog 1962) mostraron que después de un año de la colección, las semillas almacenadas disminuyeron sus porcentajes de germinación entre un 40 y 78 % (Tabla 2).

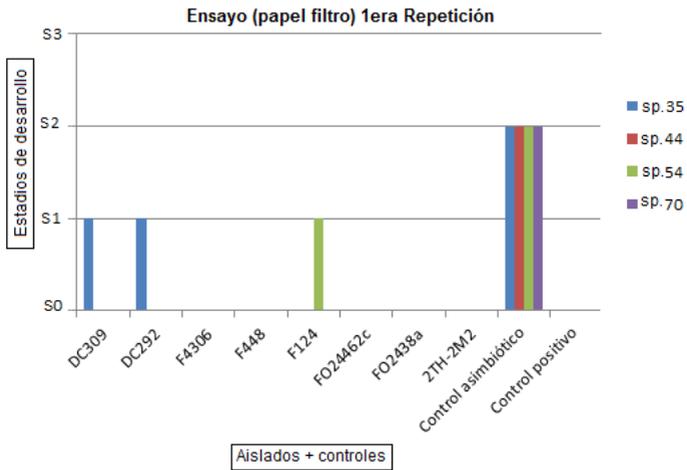
Tabla 2 Germinación obtenida en medio MS.

Orquídeas	% germinación 2010 (recién colectadas)	% germinación 2011 (previo al ensayo)	Diferencia
35	90	25	65
44	90	14	76
54	95	17	78
70	50	10	40

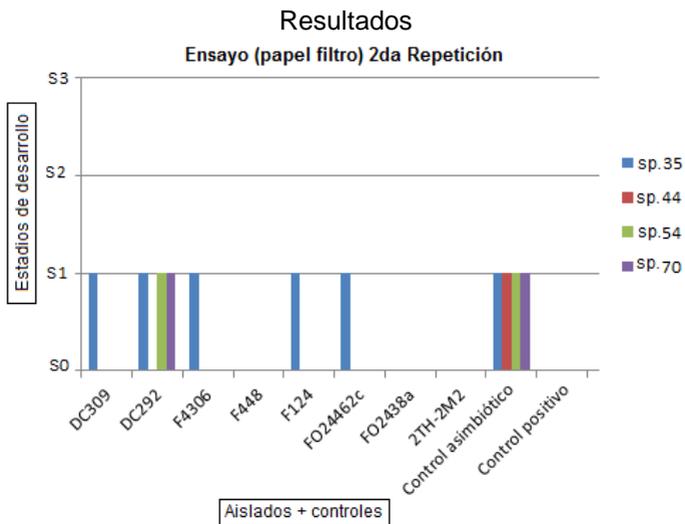
No se obtuvo germinación de ninguna de las especies de orquídeas en medio OMA (OMA 2.5% avena, 8% agar, Sigma sin hormonas). En el primer ensayo, las semillas en contacto directo, agar y hongo, no mostraron ningún indicio de germinación. Para el segundo ensayo, las semillas sobre el papel absorbente, con agar y hongo, presentaron desarrollo hifal alrededor de la testa (Fig. 2B) y se dio ensanchamiento de embriones en las

Resultados

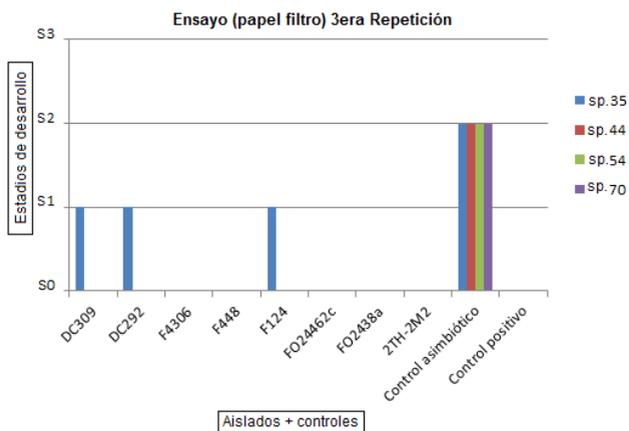
diferentes repeticiones (S1) (Gráfica 1, 2 y 3). Las semillas de la sp. 35 inoculadas con DC292 mostraron S1 en el 20 % de las semillas (Gráfica 3), siendo el porcentaje máximo alcanzado de las cuatro especies de semillas. La germinación fue baja y no se favoreció por el hongo.



Gráfica 1. Estadio de germinación alcanzados por las semillas de orquídeas, a las diez semanas. Primera Repetición.



Gráfica 2. Estadio de germinación alcanzados por las semillas de orquídeas, a las diez semanas. Segunda Repetición.



Gráfica 3. Estadio de germinación alcanzados por las semillas de orquídeas, a las diez semana. Tercera Repetición.

Colonización de *Tulasnella* spp. a plántulas de orquídeas

No se observaron células colonizadas en los cortes transversales del control asimbiótico (Fig. 2C). De los ocho hongos inoculados a las plántulas, los especímenes F4306 y F448 formaron pelotones con las raíces de las orquídeas *E. arachnoglossum* (Fig. 2D-E) y *E. parviflorum* (Fig. 2F-G) respectivamente. Las inoculaciones con las cepas F124, FO24462c, FO2438a, DC309, DC292 y 2TH-2M2 no produjeron pelotones en células corticales de ninguna de las cuatro especies de orquídeas. Los tratamientos con las cepas DC292, FO24380a, FO24462c, no formaron pelotones, pero generaron un gran micelio alrededor de las raíces, aparentemente sin causar daño a la plántula (Fig. 2H). El hongo 2TH-2M2 fue caracterizado morfológicamente por Cruz D. como *Acremonium* sp. perteneciente a los Hypocreales dentro de los Ascomicetes. Este hongo tuvo efectos nocivos sobre las plantas de las cuatro especies de orquídea, causando necrosis evidente en gran parte de las plántulas (Fig. 2I). En los tratamientos con los aislados DC309 y F124 no se observó interacción micorrícica con ninguna especie de orquídea, sin embargo las plántulas se mantuvieron sanas (Fig. 2J).

Resultados

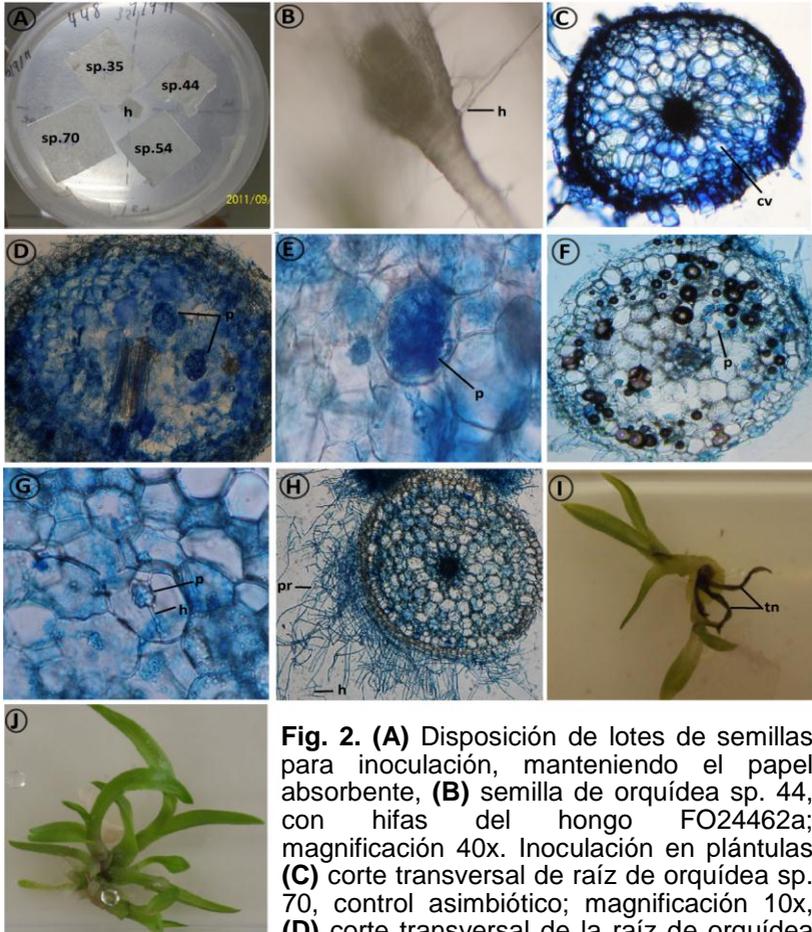


Fig. 2. (A) Disposición de lotes de semillas para inoculación, manteniendo el papel absorbente, (B) semilla de orquídea sp. 44, con hifas del hongo FO24462a; magnificación 40x. Inoculación en plántulas (C) corte transversal de raíz de orquídea sp. 70, control asimbiótico; magnificación 10x, (D) corte transversal de la raíz de orquídea sp. 44, se evidencia formación de pelotones; 10x, (E) corte transversal de la raíz de orquídea sp. 44, se evidencia la formación de pelotones; 40x, (F) corte transversal de la raíz de orquídea sp. 70, se evidencia formación de pelotones; 10x, (G) corte transversal de raíz de orquídea sp. 70, se evidencia formación de pelotones y presencia de hifas; 40x, (H) corte transversal de la raíz de orquídea sp. 70, hifas de DC292 desarrollándose junto a los pelillos radicales, (I) plántula inoculada con 2TH-2M2 muestra tejido necrótico, (J) plántulas en buen estado con cepas DC309 y F124 (h=hifas; p=pelotones; cv= células no colonizadas; pr=pelos radicales; tn=tejido necrótico).

Caracterización molecular y análisis filogenético

Molecularmente no se obtuvo secuencias desde los basidiomas o de cultivos aislados de las colectas.

Los especímenes en cultivos proporcionados desde Alemania, nos permitieron obtener secuencias que se incluyeron en los alineamientos desarrollados por Suárez *et al.* (2006) y Cruz *et al.* (2011). Resultado un árbol filogenético para la región nrDNA ITS-5.8S enraizado en su punto medio y otro árbol para la región nrDNA 28S enraizado con *Multiclavula mucida* AF7875 (Fig. 3, 4 y 5).

Para la región nrDNA 28S (Fig. 3), en el clado A se agrupan secuencias de F4306 y F448 junto con aislados de orquídea desde *T. epipactoides*. El clado B contiene únicamente secuencias de DC309. En el clado C se asocian secuencias de DC292, FO24380a y secuencias de aislados obtenidos desde orquídeas de los géneros *Stelis*, *Maxillaria* y *Epidendrum*. Formando el clado D están las secuencias de FO24462c.

Resultados

Para la región nrDNA ITS-5.8S se obtuvo dos árboles incluidos en dos sets de secuencias de *Tulasnellas* spp. (sets tres y siete datos no publicados). El primer árbol set tres (Fig. 4) muestra dos clados bien establecidos, en el A secuencias de F4306 y F448, en el clado B se concentra DC309. En el segundo árbol set siete (Fig. 5), está el clado C que contiene una secuencia de DC292, finalmente en el clado D se agrupan secuencias de FO24462c, para estos clados tampoco hay relación a secuencias de hongos obtenidas desde orquídeas. Los cuatro clados de la región nrDNA ITS-5.8S muestran congruencia con los clados establecidos con la región nrDNA 28S.

Resultados

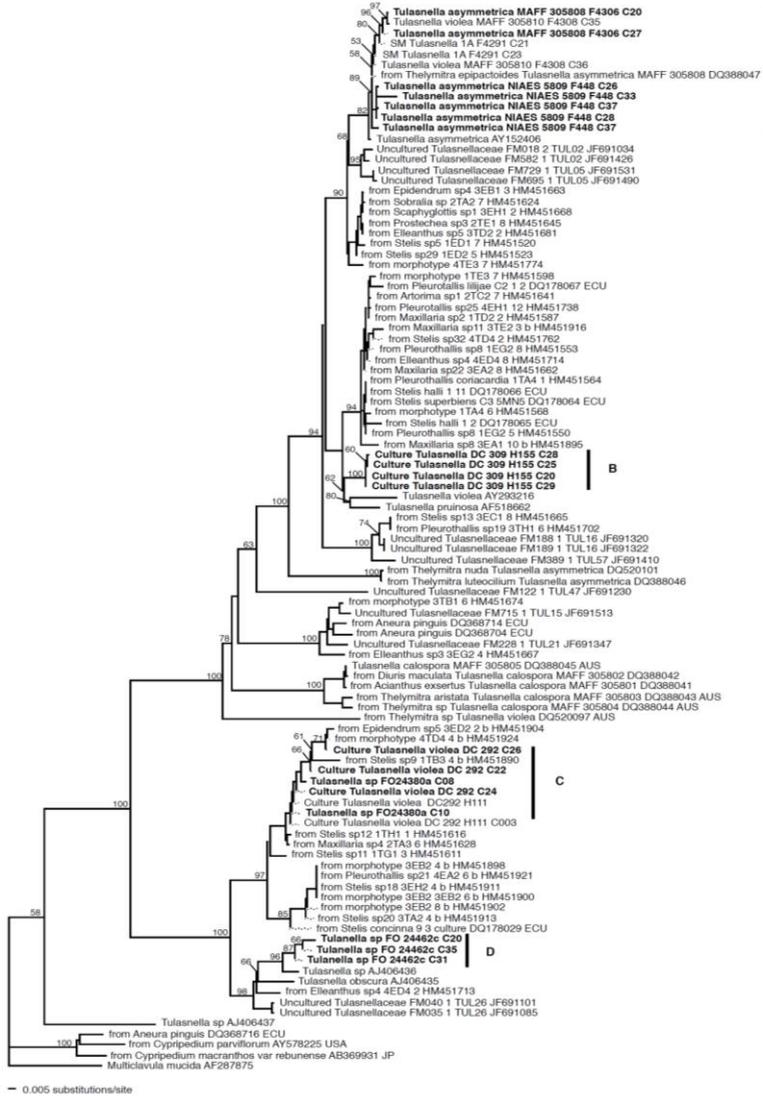


Fig. 3 Hipótesis filogenética para la región 28S, obtenida con secuencias de los cultivos DC309 y DC292, FO24462c; FO24380a; F448; F4306 mediante un Neighbor-joining (NJ), valores de bootstrap >50 y enraizamiento con *Multiclavula mucida* AF7875.

Resultados



Fig. 4 Hipótesis filogenética para la región ITS-5.8S, obtenida con secuencias de los cultivos DC309 y F4306 mediante un Neighbor-joining (NJ), valores de bootstrap >50 y enraizamiento en su punto medio.

Resultados

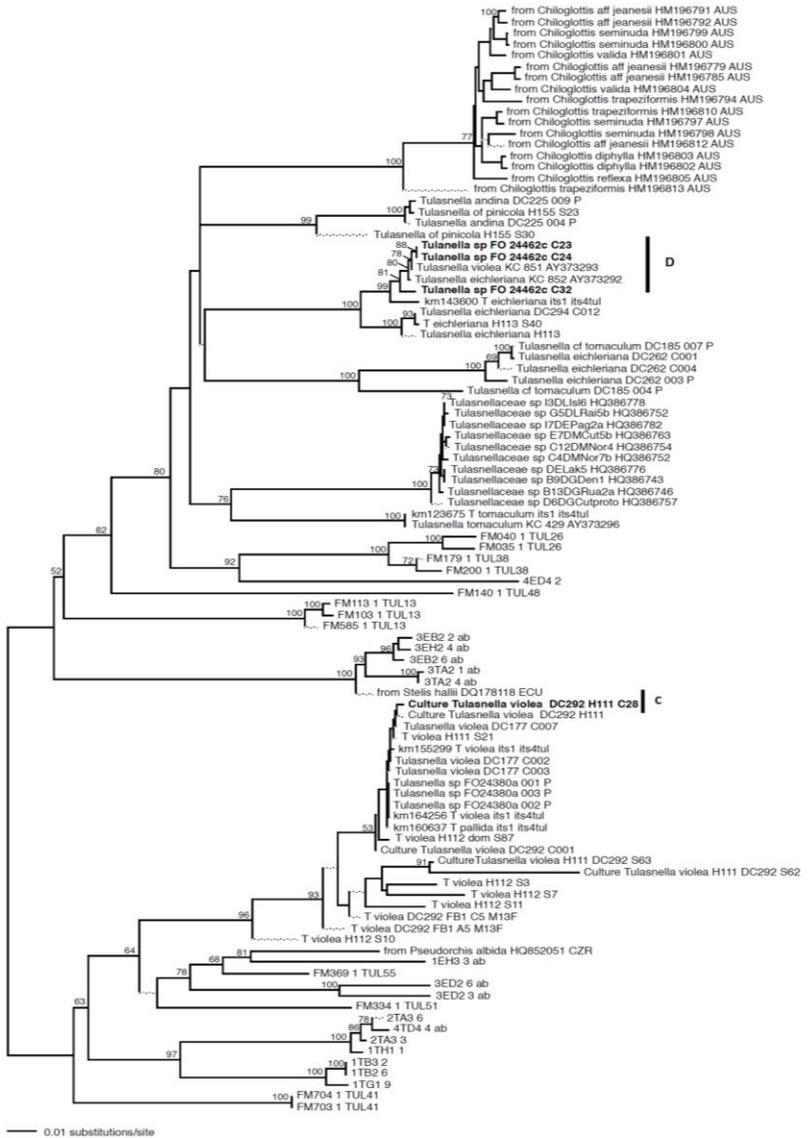


Fig. 5 Hipótesis filogenética para la región ITS-5.8S, obtenida con secuencias de los cultivos DC292, FO24462c mediante un Neighbor-joining (NJ), valores de bootstrap >50 y enraizamiento en su punto medio.

DISCUSIÓN

Discusión

Del total de 71 basidiomas colectados se logró obtener tres especímenes (SC038, SC040 y SC062) con características atribuibles al orden Sebaciales. Sin embargo, solo fue posible hacer la descripción del espécimen SC062, por que las características morfológicas de los otros dos especímenes fueron inmaduras. La dificultad de obtener fructificaciones, limita el estudio de estos individuos ya que en su mayoría son imperceptibles a simple vista en el medio natural (Cruz *et al.* 2011).

Nuestros intentos por aislar cultivos puros no fueron efectivos. Es así que la obtención de cultivos puros de hongos micorrícicos tanto desde raíces de orquídeas como desde basidiomas sigue siendo un reto. Para Sebaciales y Tulasnellales es conocido que tienen un fase saprotrófica (Roberts 1994b, 1999; Cruz *et al.* 2011.) y por tanto están rodeados por otros microorganismos como bacterias y hongos de rápido crecimiento y esporulación como los Ascomycota (Observación personal). Los hongos con características simbióticas como Glomeromycota, algunos Basidiomycota como Tulasnellales y ciertos Ascomycota como Pezizales, son muy difíciles de cultivar, por lo que

Discusión

existen pocos aislados establecidos (Smith & Read 2008).

Al no obtener cultivos desde el sector de estudio, se descartó la idea de usar aislados locales. En su lugar se probó por primera vez cuatro aislados de *Tulasnella* spp. obtenidos por Cruz D. y Oberwinkler F. en Alemania desde basidiomas, además dos cultivos aislados por Warcup & Talbot (1967, 1968) obtenidos desde raíces de orquídeas provenientes de Australia y un aislado desde raíces de orquídea terrestre de Ecuador, determinado como "*Tulasnella* sp." y actualmente corregido por Cruz D. como *Acremonium* sp. Estos cultivos nos sirvieron para establecer los ensayos de germinación simbiótica con orquídeas. El primer ensayo en el que se colocó las semillas sobre el agar y el hongo en crecimiento, no tuvo efectos favorables para la germinación. Probablemente debido a la humedad generada y la inmersión de las semillas en agua se produjo la pudrición del embrión. Otro factor que posiblemente influyó en la falta de germinación fue el abundante crecimiento del micelio del hongo sobre las semillas, evitando la oxigenación necesaria para su desarrollo (Arditti 1963).

Discusión

En el segundo ensayo el mantener el papel absorbente fue más efectivo, evitando que las semillas entren en contacto directo con el agar. El crecimiento micelial fue más lento sobre el papel y no creció agresivamente sobre las semillas, dejándole oportunidad para el intercambio de aire y humedad de una forma más controlada, conservándose algunos embriones vivos.

El hongo DC292 inoculado a semillas de *H. sanguinolenta* generó ensanchamiento de 10 semillas y los hongos DC309, F124, F4306 y FO24462c únicamente permitieron el ensanchamiento de tres semillas mostrándonos que las nuevas condiciones establecidas en el segundo ensayo brindan un mejor entorno para el proceso de germinación (Bonnardeaux *et al.* 2007, Swart *et al* 2010). En el resto de tratamientos con los hongos F448 y F24380a el micelio creció alrededor de las semillas sin algún efecto germinativo. El cultivo 2TH-2M2 fue de crecimiento micelial lento y el entorno fácilmente se contaminó de bacterias, afectando también el proceso germinativo. El hecho de que algunos hongos permitieron el ensanchamiento de los embriones y otros hongos crecieran alrededor de las semillas sin

Discusión

aparente daño no determina que haya existido una relación simbiótica hongo-orquídea.

Sin embargo no se puede concluir que el factor especificidad fue el causante de la falta de germinación, ya que algunos estudios muestran éxito en la germinación de semillas con hongos de diferente origen (Zettler *et al.* 1999). Además los periodos largos de almacenamiento, pueden afectar la viabilidad de semillas (Seaton & Pritchard 2011; Stewart & Kane 2007), como se observó en la diferencia significativa en la tasa de germinación luego de un año de almacenamiento (ver Tabla 1).

Las plántulas obtenidas de los controles asimbióticos en los ensayos de germinación simbiótica, se inocularon con ocho aislados de hongos (DC309, DC292, F124, F448, FO24462c, F4306, F24380a y 2TH-2M2), para analizar su compatibilidad, evaluando la formación de pelotones en células corticales.

Los hongos F448 y F4306 fueron los únicos que ingresaron a las células corticales de la raíz y formaron pelotones (Fig. 2 D-G). Esta interacción simbiótica observada *in vitro* no necesariamente se puede dar en la

Discusión

naturaleza, puesto que condiciones de estrés sobre la plántula pueden permitir el ingreso de hongos a las células corticales (McCormick *et al.* 2006). Posiblemente las orquídeas pueden cambiar de micobiontes frente a perturbaciones del ambiente externo.

Los hongos DC309, DC292, F124, FO24380 y FO24462 se desarrollaron alrededor de las raíces de las plántulas sin causar enfermedad o necrosis en los tejidos. En tanto que, la cepa 2TH-2M2 *Acremonium* sp. Det. por Cruz D., produjo coloración amarillenta y destrucción de tejidos, demostrando que grupos diferentes a los mencionados son nocivos para las orquídeas.

Los análisis moleculares para las secuencias obtenidas desde los cultivos puros de *Tulasnella* spp., utilizados en los ensayos de germinación *in vitro*, se agruparon en cuatro clados, tanto para la región nrDNA 28S y nrDNA ITS-5.8S. Los valores de soporte del test de bootstrap fueron: para el clado A (82 en 28S y 71 en ITS-5.8S); clado B (100 en 28S y 66 en ITS-5.8S); clado C 99 en ITS-5.8S y <50 en 28S) y clado D (96 en 28S y 99 en ITS-5.8S).

Discusión

El clado A incluye las secuencias desde los cultivos F448=NIAES 5809 de *T. epipactoides* (0591 Warcup 1968; MAFF 305809 y DQ388048) y F4306 de *T. epipactoides* (0302 Warcup 1967; MAFF 305808 y DQ388047) que son orquídeas terrestres (Warcup & Talbot 1967). Estas cepas fueron las que formaron pelotones en raíces de las plántulas de *E. parviflorum* y *E. archnoglossum* (orquídeas epifitas). Sugiriéndonos que estas cepas pueden tener una interacción simbiótica con las orquídeas mencionadas.

El clado B incluye secuencias del cultivo DC309 aislado desde una fructificación de *Tulasnella* sp., colectado desde madera en descomposición en Alemania, sin reporte de alguna orquídea cercana en los análisis de ITS-5.8S o 28S parcial. Una hipótesis probable es que este hongo son de vida saprófita, que puede pertenecer a una de las especies descritas por Roberts (1994a, b; 1999).

En el clado C se ubican las secuencias desde los cultivos DC292 aislada desde basidioma de *Tulasnella violea* encontrada en madera en descomposición y FO2438a aislada por Oberwinkler F. desde *Tulasnella*

Discusión

sp. En este clado para la región nrDNA 28S parcial tenemos secuencias obtenidas desde *Stelis* sp. y *Epidendrum* sp. (Herrera 2007—datos no publicados). Sin embargo para la región ITS-5.8S de este clado no hubo secuencias reportadas desde orquídeas.

El clado D incluye secuencias de la cepa FO24462c que fue aislada desde una *Tulasnella* sp. colectada por Oberwinkler F., filogenéticamente las secuencias desde este cultivo en el árbol de nrDNA ITS-5.8S se agrupan junto a secuencias nombradas como *Tulasnella eichleriana* AY373292 y *Tulasnella violea* AY373293, pero no se encontró secuencias reportadas como simbiontes de orquídeas. En el árbol de 28S parcial para este clado tenemos secuencia nombrada como *Tulasnella obscura* AJ406435, esta especie se la considera sinónimo de *T. eichleriana* en Roberts (1994) y cercana se ubica la secuencia aislada desde *Elleanthus* sp4 (Herrera 2010—datos no publicados).

Dejando abierta la posibilidad que especies de *Tulasnella* sean únicamente saprófitas de materia orgánica muerta, pudiendo ser otras más especializadas

Discusión

para la formación de micorrizas de orquídeas y otras consigan cumplir facultativamente con las dos acciones.

En futuros estudios se hace necesario incrementar los esfuerzos para la colección y aislamiento de basidiomas, así los cultivos puros podrán ser probados en ensayos de germinación simbiótica y ensayos de inoculación en plántulas. Con miras a la aplicabilidad en técnica *in situ*, como estrategia para la conservación.

Referencias Bibliográficas

- Arditti J. 1967 Factors affecting the germination of orchid seeds. *Botanical Review* 33:1-97
- Beck E, Makeschin F, Haubrich F, Richter M, Bendix J, Valarezo C. 2008 The ecosystem (Reserva Biológica San Francisco). In: Beck E, Bendix J, Kottke I, Makeschin F, Mosandl R (eds) *Gradients in a tropical mountain ecosystem of Ecuador. Ecological Studies* Springer Berlin 198:1–14
- Boldrini R, Santos W, Cruz Z, Ramos A. 2010 Bases da associação micorrízica orquídeide. *Natureza on line* 8: 140-145
- Bonnardeaux Y, Brundrett M, Batty A, Dixon K, Koch J, Sivasithamparam K. 2007 Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. *Mycological Research* III:51-61
- Bussmann R . 2001 Epiphyte Diversity in a Tropical Andean Forest-Reserva Biológica San Francisco, Zamora-Chinchipec, Ecuador. *Ecotropica* 7:43-59
- Bussmann R. 2005 Bosques andinos del sur de Ecuador, clasificación, regeneración y uso. *Revista Peruana de Biología* 12:203-216.
- Cameron D, Leake J, Read D. 2006 Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant–fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytologist* 171: 405–416
- Cruz D, Suárez JP, Kottke I, 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
- Dearnaley J. 2007 Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza* 17:475-486
- Florez J. 1998 *Farmacología humana*. Elsevier España: cap 67:1440
- Gascuel O. 1997 BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Molecular Biology and Evolution* 14:685–695

- Jorgensen P, Ulloa C, Maldonado C. 2006 Riqueza de Plantas Vasculares. Botánica Económica de los Andes Centrales pp. 37-50
- Kottke I, Haug I. 2004 The significance of mycorrhizal diversity of trees in the tropical mountain forest of southern Ecuador. *Lyona* 7:49-56
- Kottke I, Suárez JP, 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 of the Royal Society B: Biological Sciences* 277:1289-98
- McCormick MK, Whigham DF, O'Neill J. 2004 Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist* 163: 425–438
- McCormick MK, Whigham DF, Sloan D, O'Malley K, Hodkinson B. 2006 Orchid–fungus fidelity: a marriage meant to last? *Ecology* 87:903–911.
- Murashige T, Skoog F. 1962 A revised medium for rapid growth an bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473-97
- Otero J, Ackerman J, Bayman P. 2002 Diversity and host specificity of endophytic Rhizoctonia-Like fungi from tropical orchids. *Journal of Botany* 89(11): 1852-1858
- Otero T, Ackerman D, Bayman P. 2004 Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology* 13: 2393–2404
- Rasmussen HN. 1995 Terrestrial orchids. From seed to mycotrophic plant. Cambridge University Press, Cambridge.
- Roberts P. 1994a Long-spored *Tulasnella* species from Devon, with additional notes on allantoid-spored species. *Mycological Research* 98:1235–1244
- Roberts P. 1994b Globose and ellipsoid-spored *Tulasnella* species from Devon and Surrey, with a key to the genus in Europe. *Mycological Research* 98:1431–1452
- Roberts P. 1999 *Rhizoctonia-forming Fungi: a taxonomic guide*. Royal Botanic Gardens, Kew

- Roche S, Carter R, Peakall R, Smith L, Whitehead M, Linde C (2010) A Narrow group of monophyletic *Tulasnella* (Tulasnellaceae) symbiont lineages are associated with multiple species of *Chiloglottis* (Orchidaceae): Implications for orchid diversity. *American Journal of Botany* 97 (8): 1313-1327
- Seaton P, Pritchard H. 2011 Orchid seed stores for sustainable use: a model for future seed-banking activities. *Lankesteriana* 11(3): 349—353
- Smith S, Read D. 2008 *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd ed. San Diego, CA: Academic Press
- Stenberg ML, Kane ME. 1998 *In vitro* seed germination and greenhouse cultivation of *Encyclia boothiana* var. *erythrinoides*, an endangered Florida orchid. *Lindleyana* 13:101 – 112
- Stewart S, Kane M. 2007 Symbiotic seed germination and evidence for *in vitro* mycobiont specificity in *Spiranthes brevibrabris* (Orchidaceae) and its implications for species-level conservation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 43:178-186
- Suárez JP, 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: 1257–1270
- Suárez JP, Weiß M, Abele A, Oberwinkler F, Kottke I. 2008 Members of Sebaciniales subgroup B form mycorrhizae with epiphytic orchids in a neotropical mountain rain forest. *Mycological Progress* 7:75 -85
- Swarts N, Sinclair E, Francis A, Dixon K. 2010 Ecological specialization in mycorrhizal symbiosis leads to rarity in an endangered orchid. *Molecular Ecology* 19, 3226-3242
- Swofford DL. 2002 PAUP*4.0 phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Sinauer, Sunderland
- Taylor L, Bruns D. 1997 Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 94: 4510–4515

- Taylor L, McCormick M. 2007 Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytologist* 177: 1020–1033
- Warcup JH, Talbot PHB. 1967 Perfect states of Rhizoctonias associated with orchids I. *New Phytologist* 66:631–641
- White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. 1990 Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand H, Sninsky JS, White TJ (eds) *PCR-protocols and applications: a laboratory manual*. Academic, San Diego, pp 315–332
- Zettler LW, Burkhead JC, Marshall JA. 1999 Use of a mycorrhizal fungus from *Epidendrum conopseum* to propagate *Encyclia tampensis* from seed *in vitro*. *Lindleyana* 14:102-105
- Tesis*
- Acevedo R. 2010 Aislamiento e identificación de *Tulasnella* spp. a partir de raíces de orquídeas terrestres Trabajo de tesis previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja
- Guachizaca I. 2011 Influencia de condiciones de estrés y de reguladores de crecimiento vegetal en la inducción de embriogénesis somática en *Cattleya máxima* Lindl. Trabajo de tesis previo a la obtención del título de Ingeniero en Gestión Ambiental. Universidad Técnica Particular de Loja
- Herrera P. 2007 Aislamiento de *Tulasnella* spp. (Basidiomycota) a partir de raíces de cuatro especies de orquídeas epifitas. Trabajo de tesis previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico, Universidad Técnica Particular de Loja