

CS 2018.01.01.4

Bionatura Conference Series Vol 1. No 1. 2018

Publicación del IV CONGRESO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y  
BIODIVERSIDAD IV CIBB y XV FORO INTERNACIONAL BANANERO

INVESTIGATION / RESEARCH

[Previos](#) / [Index](#) / [Next](#)

## Identificación morfológica y molecular de hongos micorrízicos de especies del género *dracula* y *epidendrum* (*orchidaceae*)

Morphological and molecular identification of mycorrhizal fungi species of the *dracula* and *epidendrum* genus (*orchidaceae*)

Byron Fuertes-Flores<sup>1</sup>, Diego Mallitasig-Quishpe<sup>1</sup>, Marco Cerna-Cevallos<sup>1</sup>, Sara Gutiérrez<sup>2</sup>

Disponible en: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/CS/2018.01.01.4>

## RESUMEN

El objetivo principal de este estudio fue identificar hongos micorrízicos de orquídeas de los géneros *Dracula* y *Epidendrum* mediante técnicas morfológicas y moleculares, para lo cual se aislaron en un medio de cultivo PDA hongos micorrízicos de muestras de raíces de 17 especies de orquídeas, 9 especies del género *Dracula* y 8 del género *Epidendrum*, mediante la técnica de Screening, los cuales fueron empleados en estudios de identificación; posterior a ello se determinó las especies de hongos micorrízicos aislados mediante la observación de su morfología y análisis molecular de las secuencias ITS, con lo cual se pudo estudiar la relación que existe con cada especie de orquídea estudiada. Con la ayuda de la herramienta informática Blast se identificaron 19 hongos del filo Ascomyceto, 1 hongo del filo Basidiomiceto y dos hongos no clasificados taxonómicamente. Para finalizar se sometieron los hongos micorrízicos a pruebas de degradación de celulosa empleando el método de DNS con la finalidad de conocer si las especies aisladas podrían degradar materia orgánica y de esta manera otorgar los nutrientes

necesarios a las especies de orquídeas con quienes se relacionan. Destaca la especie *Cantharellales* sp. como la cepa con mayor capacidad de desdoblamiento de materia orgánica.

**Palabras Clave.** Simbiosis, micorriza, ITS, screening, degradación

## ABSTRACT

The main objective of this study was to identify mycorrhizal fungi of orchids of the genera *Dracula* and *Epidendrum* by means of morphological and molecular techniques, for which mycorrhizal fungi were isolated in a PDA culture medium from root samples of 17 orchid species, 9 species of *Dracula* genus and 8 of the genus *Epidendrum*, using the Screening technique, which were used in identification studies; Subsequently, the isolated mycorrhizal fungi species were determined by observing their morphology and molecular analysis of the ITS sequences, which allowed us to study the relationship that exists with each species of orchid studied. With the help of the Blast computer tool, 19 fungi were identified from the Ascomycota phylum, 1 basidiomycete fungus and 2 non-taxonomically classified fungi. To finish, the mycorrhizal fungi were subjected to cellulose degradation tests using the DNS method in order to know if the isolated species could degrade organic matter and in this way provide the necessary nutrients to the orchid species with which they are related. The *Cantharellales* sp. as the strain with the greatest capacity for splitting organic matter.

**Keywords.** Symbiosis, mycorrhiza, STI, screening, degradation

## INTRODUCCIÓN

Las orquídeas de belleza enigmática pertenecen a unas de las familias más numerosas en el reino vegetal con 25000 especies distribuidas por todo el mundo, excepto en los polos y algunos desiertos<sup>1</sup>. Este grupo de plantas posee flores que demoran en desarrollarse, además sus semillas son diminutas y con escasa reserva de nutrientes; por esta razón requieren una asociación simbiótica con hongos micorrízicos<sup>2,3</sup>. La distribución de orquídeas está influenciada por la disponibilidad de hongos específicos para inducir a la germinación, siendo un factor determinante en el desarrollo del protocormo y de la plántula<sup>4,5</sup>. De acuerdo con Durán et al, (2007)<sup>6</sup>, es imprescindible realizar estudios sobre aislamiento, identificación, aprovechamiento y conservación de hongos micorrízicos para la

creación de planes de propagación de orquídeas *in situ* <sup>6</sup>. La identificación morfológica de especies fúngicas tiene limitaciones y no permite identificar con exactitud el taxón al cual pertenecen. En la actualidad una prueba de identificación más específica hace referencia a la identificación molecular cuyos parámetros permiten establecer la taxonomía de cada microorganismo <sup>7</sup>.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Colección de raíces de Orquídeas de los géneros *Dracula* y *Epidendrum***

Raíces fueron proporcionadas por el Jardín Botánico “Orquídeas de Sarina” (Patente de manejo de vida silvestre N° 005-2017-FLO-DPAP-MA), ubicado en la parroquia El Quinche, cantón Quito, las muestras se tomaron de plantas que mantienen el sustrato original de su punto de colección y que no han sido sometidas a tratamientos químicos. Se cortaron segmentos de raíz de 5 cm, fueron almacenados en sobres de papel y etiquetados con un código de colección del libro de campo de Marco Cerna 2017, en el cual se registró los datos del origen de cada espécimen, taxonomía, morfología y fenología ocasional.

### **Desinfección de muestras colectadas**

Se utilizó el protocolo descrito por Hoyos y Rodríguez (2013)<sup>8</sup>, los segmentos de raíz fueron lavados con agua potable, luego con agua destilada estéril, a continuación, se retiró la capa externa denominada velamen empleando pinzas y bisturí. Los segmentos limpios fueron colocados en microtubos Eppendorf de 1,5ml con una solución de megacilina *Life* a una concentración de 20 ppm durante 24 horas a 24 °C en una incubadora modelo Memmert. Después las muestras fueron lavadas con agua destilada estéril por 2 minutos, alcohol al 70% por 2 minutos, agua destilada estéril por 2 minutos, hipoclorito de sodio marca Clorox al 2.5% por 1 minuto y finalmente agua destilada estéril por 2 minutos <sup>9</sup>.

### **Siembra de raíces y aislamiento de hongos**

Las raíces desinfectadas fueron cortadas en segmentos de 0,2 cm y sembradas en caja Petri plásticas de 90 x 15 mm marca Citotest, conteniendo medio PDA (potato dextrose agar) marca Difco, las muestras fueron incubadas entre 7 y 10 días a 25

°C, procedimiento descrito por <sup>10</sup>. Transcurrido el tiempo de incubación y visualizando la presencia de micelios se tomó una muestra del cultivo empleando una asa de platino marca HiMedia y se inoculó en nuevas cajas con medio de cultivo PDA, hasta obtener nuevamente cultivos con micelios, esto repitió 5 veces para obtener material fúngico puro y homogéneo.

### **Identificación Morfológica de hongos aislados**

En base la técnica descrita por *López et al.*,(2014) <sup>11</sup>, para obtener muestras de micelios se usó cinta adhesiva transparente de 2 cm de grosor marca FanTap, misma que fue colocada sobre el cultivo y luego pegada sobre un vidrio porta objetos que contenía una gota de lactofenol marca HiMedia. Las muestras fueron observadas en un microscopio modelo Micros Austria con aumentos de 40X y 100X, los micelios Fueron fotografiados y comparados con las muestras presentadas en el libro *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*.

### **Extracción de ADN e identificación molecular**

Se extrajo ADN de los cultivos de hongos puros empleando el método Fenol-Cloroformo descrito por Raeder y Broda (1985) <sup>12</sup>;Paredes y Yugsi (2016) <sup>13</sup>: en un microtubo de 1.5 ml se colocó 50mg de material celular Umesha et al, (2016) <sup>14</sup>, luego se añadió 500 µL de buffer de lisis (200 mM Tris - HCl pH 8.5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; SDS al 0.5%), se homogenizó la mezcla empleando un agitador de vidrio y luego en el vórtex *Mixer 502000* por un minuto, a continuación se incubó las muestras en el termo bloque *Accu Block* por 20 minutos a 37 °C; después se agregó 500 µL de una solución a 4 °C de fenol-cloroformo 1:1 Fisher scientific y se homogenizó en el vórtex por 5 minutos. Luego se centrifugó a 13000 rpm por 30 minutos, el sobrenadante fue transferido a un tubo de 1.5 mL y se añadió 400 µL de cloroformo a -20 °C, se mezcló un 1 minuto por inversión y nuevamente se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos, el sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo junto con 4 µL de ARNasa (10mg/mL) *Invitrogen*, se lo incubó a 37 °C por 30 minutos en un termo bloque. Después se agregó 500 µL de isopropanol *Merck* a 4°C, se mezcló por inversión durante 1 minuto y se incubó a -20 °C por 15 minutos en un congelador modelo *Templo*. A continuación se centrifugó por 5 minutos a 13000 rpm, se desechó el sobrenadante conservando el pellet formado, el cual fue lavado añadiendo 500 µL de etanol al 70% *AppliChem* a -20 °C y mezclando por inversión 1 minuto, finalmente se centrifugó por 5 minutos a 13000 rpm y el sobrenadante fue desechado conservando el pelet con ADN, este

fue suspendido en 50  $\mu$ L de TE y almacenado a -20 °C. La presencia de ADN se determinó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa *Caisson* al 1%, con 5  $\mu$ L de Sybr safe *Invitrogen* por cada 50 mL de TBE 1X, el proceso se desarrolló en una cámara electroforética *Enduro Gel XL*.

Usando el ADN obtenido se amplificó la región ITS, empleando los primers ITS1 (5'CCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), mediante la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR, utilizando un termo ciclador *Multi Gene*, bajo los siguientes parámetros: Desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, annealing a 53°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Los productos de PCR fueron secuenciados por la empresa Macrogen de Corea, bajo la técnica de Sanger. La validez de las secuencias fueron determinadas empleando el software *FinchTV* versión 1.4.0. La identificación molecular se la realizó mediante la herramienta *BLAST* del *National Center for Biotechnology Information NCBI* y finalmente se compararon las secuencias entre si alineándolas con el algoritmo *Muscle*, y elaborando un árbol filogenético con el método *Neighbor-joining* del programa *Mega 7*.

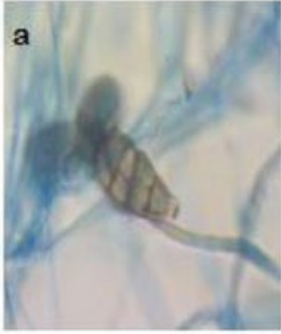
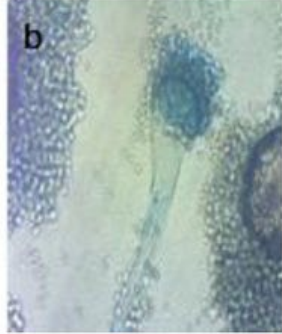
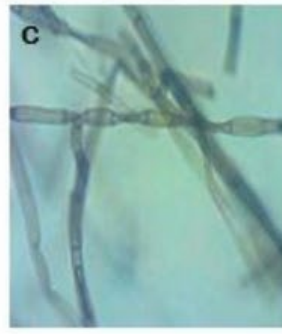

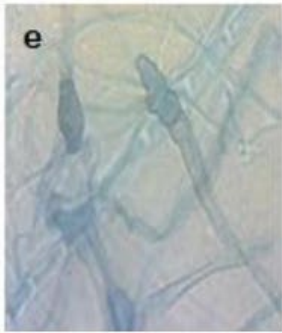

## **Análisis del potencial degradador de celulosa**

Se identificó a aquellos hongos con capacidad degradadora de materia orgánica y determinar su posible uso en cultivos simbióticos. Para ello en base a la técnica descrita por Jácome et al, (2009) <sup>15</sup> se cultivaron los hongos micorrízicos en matraces Erlenmeyer que contenían medios de cultivo compuestos de 10 g de peptona *Acumedia*, 10 g de NaCl y 1 g de extracto de carne *BD* para 1 L de agua suplementado con celulosa 1% obtenida de bagazo de caña previamente secado, pulverizado y tamizado a 1 mm de diámetro <sup>16</sup>, la mezcla se llevó a pH a 5.5 mediante adición de HCl 0.1N *Merck*. Se incubó por 5 días a 26 °C y agitación de 120 rpm en un agitador *TE-420*. Se tomaron muestras cada 24 horas para cuantificar los azúcares reductores liberados a partir de la degradación de celulosa, empleando el método de Ácido 3,5-Dinitrosalicílico DNS *Panreac*. Se realizaron lecturas en espectrofotómetro *Jasco* a una longitud de onda de 540 nm <sup>17</sup>.

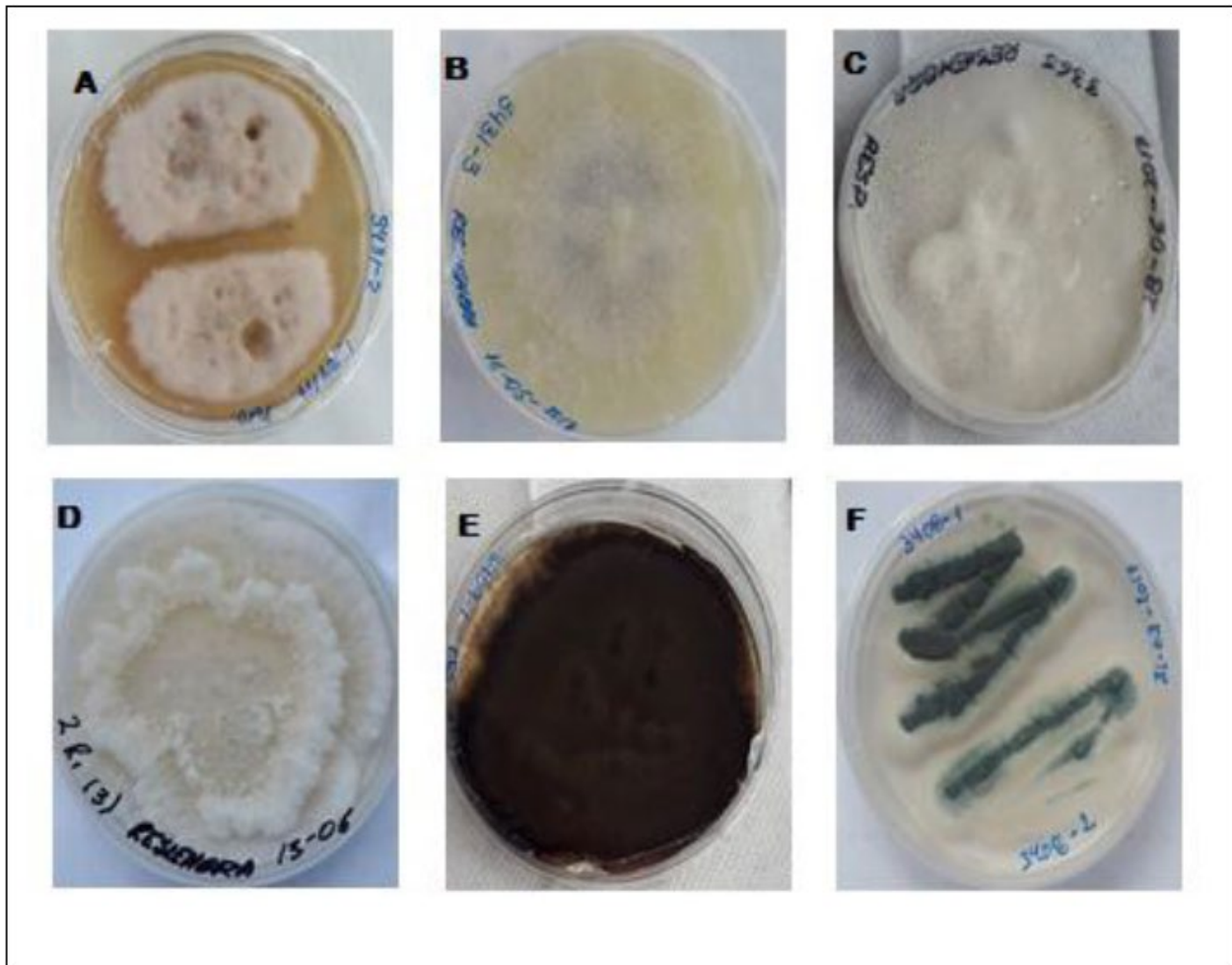
## **RESULTADOS**

Se obtuvieron 22 cultivos de hongos puros y posterior al análisis de secuencias se determinó que pertenecen a 20 especies diferentes de hongos micorrízicos.

A nivel morfológico 5 especies se las identificó a nivel del género *Alternaria*, *Aspergillus*, *Phoma* y *Trichoderma*, mientras que 17 especies no esporularon y se las ubicó dentro de los grupos: 8 en *Rhizoctonia*, 4 en *Sclerotium* y 5 en *Papulospora* de acuerdo a lo recomendado por Barnett y Hunter (1955) <sup>18</sup>.

 <p><i>Alternaria</i> sp., conidióforos oscuros con conidios ovoides separados longitudinalmente por septos, soportada acropetalmente en un apéndice apical.</p>	 <p><i>Aspergillus fumigatus</i>, conidióforos terminados en estructura globosa en masa con fialidas en el ápice.</p>	 <p><i>Xylariaceae</i> sp., Ausencia de conidios, esclerocios oscuros e irregulares, micelio delgado.</p>
 <p><i>Ilyonectria protearum</i>., conidióforos rectos hialinos, ápice inflado, conidios hialinos ovoides.</p>	 <p><i>Colletotrichum gloeosporioides</i>, esclerocios marrón e irregular.</p>	 <p><i>Fungal</i> sp 1, micelio color marrón claro, estructuras similares a esclerotio en grupos compactos a manera de bulbils.</p>

**Figura 1. Identificación microscópica de micorrizas aisladas. La clasificación taxonómica se incluyó en la tabla una vez realizada la identificación. Fuente: (Barnett y Hunter, 1955)**



**Figura 2. Identificación microscópica de micorrizas aisladas. A) *Phoma* sp., B) *Daldinia* cf. *loculatooides*, C) *Neopestalotiopsis* sp.2, D) *Phomopsis* sp., E) *Xylariaceae* sp., F) *Aspergillus fumigatus***

El ADN obtenido fue utilizado para amplificar la región ITS mediante la técnica PCR convencional y se obtuvieron bandas con una media de 525 pb, lo cual indica que corresponde al tamaño normal a la región ITS, siendo su tamaño variable entre 500 y 750 pb de acuerdo a lo mencionado por Poczai y Hyvönen, (2010) <sup>19</sup>.

Mediante identificación molecular, se pudo llegar a nivel de filo en 1 especie, a nivel de orden en 1 especie, a nivel de género en 9 individuos, a nivel de especie 9 y en dos individuos no existe información en la base de datos del NCBI ver tabla 1.

Código	Especie de orquídea	Identificación Morfológica	Identificación Molecular
3400	<i>Dracula simia</i>	Forma: <i>Sclerotium</i>	<i>Ascomycota</i> sp. (98%)
3401	<i>Dracula simula</i>	Forma: <i>Rhizoctonia</i>	<i>Cantharellales</i> sp. (95%)
3402	<i>Dracula vampira</i>	Forma: <i>Rhizoctonia</i>	<i>Ilyonectria liliigena</i> (99%)
3403	<i>Dracula sodiroi</i>	Género: <i>Alternaria</i>	<i>Alternaria</i> sp. (100%)
3408	<i>Dracula gigas (Rosada)</i>	Género: <i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> (100%)
3409	<i>Dracula navarrorum</i>	Forma: <i>Sclerotium</i>	<i>Xylariaceae</i> sp. (99%)
3419	<i>Dracula gigas</i>	Forma: <i>Populospora</i>	<i>Sordariomycetes</i> sp. (99%)
3420	<i>Dracula benedettii</i>	Forma: <i>Populospora</i>	<i>Ilyonectria protearum</i> (99%)
3431	<i>Dracula Gorgona</i>	Género: <i>Phoma</i>	<i>Phoma</i> sp. (100%)
		Forma: <i>Rhizoctonia</i>	<i>Daldinia</i> cf. <i>Loculatoides</i> (96%)
3365	<i>Epidendrum</i> sp.1	Forma: <i>Rhizoctonia</i>	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.1 (100%)
3454	<i>Epidendrum</i> sp.2	Forma: <i>Populospora</i>	<i>Ilyonectria</i> sp. (99%)
		Forma: <i>Rhizoctonia</i>	<i>Phomopsis</i> sp. (100%)
3459	<i>Epidendrum</i> sp.3	Forma: <i>Sclerotium</i>	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.2 (100%)
3460	<i>Epidendrum</i> sp.4	Forma: <i>Rhizoctonia</i>	<i>Pestalotiopsis microspora</i> (100%)
		Forma: <i>Papulospora</i>	<i>Calosphaerialis</i> sp. (80%)
3461	<i>Epidendrum</i> sp.5	Forma: <i>Rhizoctonia</i>	<i>Trichoderma koningiopsis</i> (100%)
		Forma: <i>Sclerotium</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (99%)
3462	<i>Epidendrum</i> sp.6	Forma: <i>Rhizoctonia</i>	<i>Fungal</i> sp.1 (99%)
3468	<i>Epidendrum</i> sp.7	Forma: <i>Papulospora</i>	<i>Fungal</i> sp.2 (99%)
		Género: <i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma viride</i> sp.1 (99%)
3470	<i>Epidendrum</i> sp.8	Género: <i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma viride</i> sp.2 (100%)

Elaborado por: Los autores

**Tabla 1. Hongos micorrízicos aislados de especies pertenecientes a los géneros *Dracula* y *Epidendrum* ORCHIDACEAE.**

En 12 especies de orquídeas se logró aislar 1 especie de micorriza, mientras que en 5 especies de orquídeas se pudo aislar 2 micorrizas distintas.



Hoyos y Rodríguez (2013)<sup>8</sup> estudiando los géneros *Oncidium*, *Pleurothallis*, *Stelis*, *Prostechea* y *Epidendrum* también encontraron una sola especie de micorriza para cada orquídea, lo cual es un indicador de que algunas especies de orquídeas realizan simbiosis específicamente con algunas especies de hongos. Girlanda et al, (2011)<sup>20</sup> encontraron que la especies *Ophrys fuciflora*, *Anacamptis laxiflora*, *Orchis purpurea* y *Serapias vomeracea* poseen especificidad fúngica correlacionada, mientras que Pecoraro et al. (2017)<sup>21</sup> aislaron 9 taxones de hongos en raíces de *Cephalanthera damasonium* y 9 tipos de hongos para *Cephalanthera longifolia* mencionado que estas especies de orquídeas son generalistas en sus asociaciones micorrízicas.

Dentro de las especies aisladas e identificadas se encuentra hongos que son patógenos para otras especies vegetales pero benéficas para orquídeas<sup>22</sup> como lo son *Aspergillus fumigatus* y *Phoma* sp que han sido aisladas en raíces de *Vanilla panifolia*<sup>23</sup>.

Vanegas et al, (2014)<sup>24</sup>, mencionan que cultivos *in vitro* de hongos no esporulan haciendo difícil su identificación morfológica siendo clasificados como *Mycelia sterilia*.

Se formó dos grupos, el primero comprendido por hongos del filo Ascomiceto y el segundo por una micorriza Basidiomiceto. Los sub grupos fueron formados en función de los géneros a los que pertenecían las especies de micorrizas. Dearnaley et al, (2012)<sup>25</sup> indican que las orquídeas hacen simbiosis del tipo micorriza con basidiomicetos y ascomicetos.

Las especies identificadas con el software BLAST como *Fungal* sp.1 y *Fungal* sp.2 se agrupan con un soporte de rama alto, sugiriendo que pertenecen a un mismo género, que incluye también a la especie *Daldinia* cf. *Loculatoides*; este grupo se ubicaría dentro del orden Xylariales.

Finalmente, los hongos micorrízicos se agruparon en función de su similitud genética y no presentan relación entre las especies de orquídeas hospederas ver figura 3.

El género *Ilyonectria* también fue aislado por Han, Xiao y Gao (2016)<sup>26</sup> a partir de raíces de la orquídea china en peligro de extinción *Paphiopedilum spicerianum*.

Respecto a la degradación de materia orgánica, se encontraron 20 especies de hongos micorrízicos degradadores de celulosa, las especies *Cantharellales* sp., *Ascomycota* sp., *Trichoderma koningiopsis*, *Aspergillus fumigatus* y *Phoma* sp., presentaron niveles de degradación de celulosa superior al promedio, ver tabla 2.

ESPECIES	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
	C (g/L)	C (g/L)	C (g/L)	C (g/L)	C (g/L)
<i>Cantharellales</i> sp.	1.135	1.651	1.067	1.171	5.579
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	0.091	2.508	2.313	1.702	5.464
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.651	2.857	0.45	2.786	4.81
<i>Ascomycota</i> sp.	1.631	2.944	2.607	2.052	4.734
<i>Phoma</i> sp.	0	0.639	0.738	4.433	4.313
<i>Fungal</i> sp. 2	0.54	1.127	1.552	0.409	4.179
<i>Daldinia loculatooides</i>	0.21	1.433	0.889	0	4.143
<i>Ilyonectria</i> sp.	0.345	2.627	1.492	0	4.103
<i>Sordariomycetes</i> sp.	0.425	1.94	1.472	1.036	4
<i>Ilyonectria liliigena</i>	1.278	3.222	2.175	1.798	3.913
<i>Fungal</i> sp. 1	1.512	1.143	0.651	2.242	3.829
<i>Alternaria</i> sp.	0	1.536	1.341	3	3.817
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	1.27	3.163	2.302	0.107	3.306
<i>Trichoderma viride</i>	0,1845	1,984	0,831	2,363	3,2225
<b>valor medio de concentración de azúcar en gramos/litro = 3,2183</b>					
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	0.389	2.21	0.968	1.425	3.107
<i>Ilyonectria protearum</i>	0.258	1.774	0.679	2.929	3.067
<i>Xylariaceae</i> sp.	1.242	1.028	0.131	2.48	2.948
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2	0	0.925	0.341	1.611	2.877
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	0	0.659	1.512	1.603	2.675
<i>Phomopsis</i> sp.	0.575	1.048	0.317	1.266	2.306

Cuantificación de azúcares reductores por espectrofotometría durante 5 días. C(g/L)

=concentración de azúcares en valores de gramos por litro

## **Tabla 2. Degradación de celulosa en base a la cuantificación de azúcares reductores**

Resultados similares fueron obtenidos por Chaparro y Rosas (2006)<sup>27</sup> quienes estudiando la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera, demostraron que la concentración de azúcares reductores producidos por la degradación de celulosa aumenta y disminuyen su concentración en el medio de cultivo en cada día de medición.

*Trichoderma viride* también ha sido reportada por Ayala y Romero (2013)<sup>28</sup> como productora de celulasas, *Pestalotiopsis microspora* fue identificada como degradadora de poliuretano por Rodríguez y Rodríguez (2015)<sup>29</sup>, el género *Phoma* también fue reportado con capacidad celulolítica por Castillo et al, (2015)<sup>30</sup>, la especie *Aspergillus fumigatus* ha sido descrita por Álvarez, Osorio, Díez y Marín (2014)<sup>31</sup> como con alta capacidad celulolítica y finalmente, Rodríguez (2009)<sup>32</sup> también menciona que los hongos basidiomicetos tienen capacidad celulítica secretando enzimas extracelulares que degradan residuos vegetales en tiempos cortos.

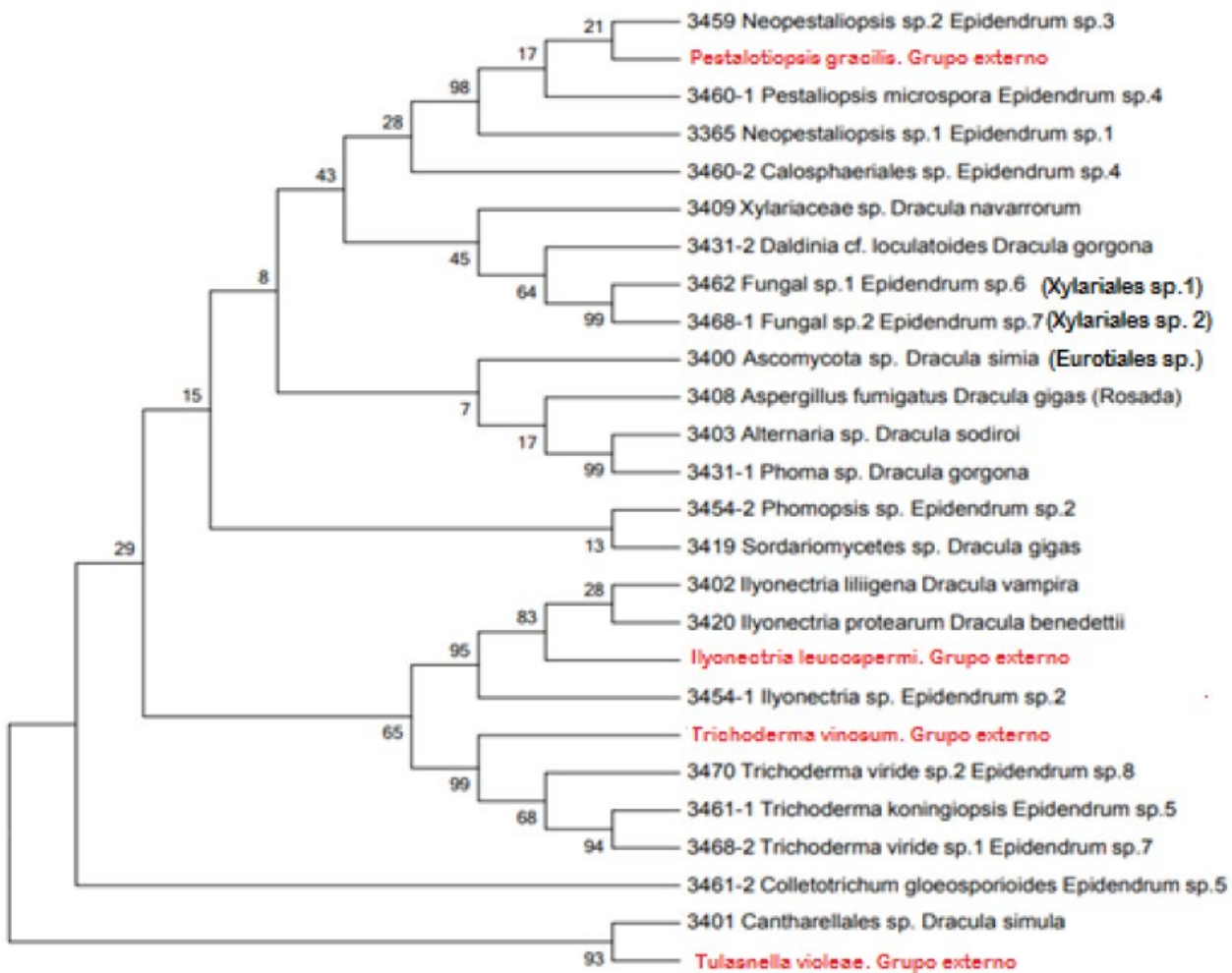
## **CONCLUSIONES**

En las raíces de las orquídeas pueden estar presentes más de una especie fúngica asociada, pero el método de aislamiento descrito en este trabajo puede haber excluido a especies presentes no ubicadas visualmente, para solventar este problema se debería usar otra técnica basada en secuenciamiento de última generación.

Mediante la técnica de identificación morfológica muchas especies de hongos no pueden ser identificadas a nivel de especie o género debido a que un elevado número de hongos cultivados *in vitro* no esporulan, las técnicas de identificación moleculares basadas en el análisis de la región ITS permiten discriminar las especies pero al no existir bases de datos completas no se puede determinar el nombre científico de todas los ejemplares.

Tradicionalmente se consideraba que la asociación tipo micorriza se daba solo con hongos del filo Basidiomiceto, pero resultados obtenidos tanto en este trabajo como en otros similares, demuestran que puede existir relación con hongos del filo Ascomiceto.

En base al árbol filogenético elaborado demuestra que no existe correlación entre la filogenia de las micorrizas y la filogenia de las orquídeas, observándose géneros de micorrizas que están presentes en diferentes géneros de orquídeas.



**Figura 3. Árbol filogenético elaborado a partir de las secuencias de la región ITS de las especies aisladas.**

En este trabajo se pudo determinar que existe especificidad fúngica en las orquídeas, es decir cada especie de orquídea tiene su propia especie de micorriza, no se identificó una especie de micorrizas que estén presente en varias especies de orquídeas.

En este trabajo se demostró la capacidad degradadora de celulosa al producir azúcares reductores que tienen los hongos micorrízicos, existiendo especies con mayor capacidad degradadora, estos pueden ser usados para desarrollar cultivos simbioses con las especies vegetales de donde fueron aislados, además tienen potencial para la producción de biofertilizantes y producción de etanol.

## REFERENCIAS

1. Novoa P, Espejo J, Alarcón D, Cisternas M, Domínguez E. Field Guide of the Chilean Orchids [Internet]. 2015. 120 p. Available from: [http://www.corma.cl/\\_file/material/guia-de-campo-orquideas-2015-web.pdf](http://www.corma.cl/_file/material/guia-de-campo-orquideas-2015-web.pdf)
2. Chávez H, Mosquera A, Otero J. Propagación in vitro de semillas de la orquídea *Comporettia falcata* Poepp. & Endl. (Orchidaceae) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas [In vitro propagation of seeds of the orchid *Comporettia falcata* Poepp. & Endl. (Orchidaceae) through symbiotic and asymbiotic techniques]. *Acta Agron.* 2014;64(2):125–33.
3. Vargas L, Victorino A. MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION AND THE ITS SEQUENCE OF FUNGAL ISOLATES ASSOCIATED WITH ORCHID ROOTS IN THE SUMAPAZS REGION [Internet]. UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA; 2015. Available from: <http://dspace.ucundinamarca.edu.co:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1467/C Morfológica Y de las Secuencias ITS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
4. Jiang JH, Lee YI, Cubeta MA, Chen LC. Characterization and colonization of endomycorrhizal *Rhizoctonia* fungi in the medicinal herb *Anoectochilus formosanus* (Orchidaceae). *Mycorrhiza* [Internet]. 2015;25(6):431–45. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4512280/pdf/572\\_2014\\_Article\\_616](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4512280/pdf/572_2014_Article_616)
5. Torres R. Molecular characterization of orchids of the genus *Teagueia* spp. . 2012;1–28. Available from: [http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/4262/3/Torres Quintero Rony Vladimir.pdf](http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/4262/3/Torres%20Quintero%20Rony%20Vladimir.pdf)
6. Durán C, Rivero M, Seemann P. Identification of endomycorrhizae in the native orchid *Gavilea araucana* (phil.). *Agro Sur* [Internet]. 2007;35(2):67–9. Available from: <http://mingaonline.uach.cl/pdf/agrosur/v35n2/art32.pdf>
7. Unda F, Agüero J, Fariñas MC, Martínez-Martínez L. Identification of fungi of clinical importance by molecular techniques. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2011;29(4):282–5. Available from: [http://apps.elsevier.es/watermark/ctl\\_servlet?](http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?)

8. Hoyos L, Rodríguez A. Isolation of Mycorrhizae in Six Species of Orchids Native to Ecuador for the Preparation of a Potentially Useful Biofertilizer in Orchid Rustication [Internet]. Tesis. 2013. Available from:  
<http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
9. Otero JT, Ackerman JD, Bayman P. Diversity and host specificity of endophytic Rhizoctonia-like fungi from tropical orchids. *Am J Bot* [Internet]. 2002;89(11):1852–8. Available from:  
<http://www.amjbot.org/content/89/11/1852.full.pdf+html>
10. Tandazo M. MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF PHYTOPATHOGEN FUNGI IN THE CULTIVATION OF YUCA (*Manihot esculenta*) IN THE SECTOR LOS LAURELES CANTON LA MANA- PERIODO 2015. 2015;19. Available from:  
[http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/4485/1/CD00736-2015-TRABAJO\\_COMPLETO.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/4485/1/CD00736-2015-TRABAJO_COMPLETO.pdf)
11. López L, Hernández M, Colín A, Ortega S, Cerón G, Franco R. The basic stains in the microbiology laboratory. 2014;3(1):10–8. Available from:  
<http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2014/ir141b.pdf>
12. Raeder U, Broda P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol*. 1985;(4875):17–20.
13. Paredes R, Yugsi E. MOLECULAR IDENTIFICATION OF YEAST SCALES WITH FERMENTATIVE CAPACITY AND ISOLATED ALCOHOLIC RESISTANCE OF PITAHAYA (*Stenocereus queretaroensis* f.a.c Weber) [Internet]. Tesis. 2016. Available from:  
<http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
14. Umesha S, Manukumar HM, Raghava S. A rapid method for isolation of genomic DNA from food-borne fungal pathogens. *3 Biotech* [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2016;6(2):1–9. Available from:  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4909022/pdf/13205\\_2016\\_Article\\_4](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4909022/pdf/13205_2016_Article_4)
15. Jácome E, Asanza H, Carrión F. Degradation of Lignin from sugarcane bagasse (*Saccharum officinarum*) using ascomycetes fungi. 2009; Available from:  
[https://es.slideshare.net/utplcbcm1/degradacin-de-lignina-del-bagazo-de-cao-saccharum-2008165?from\\_action=save](https://es.slideshare.net/utplcbcm1/degradacin-de-lignina-del-bagazo-de-cao-saccharum-2008165?from_action=save)

16. Nuñez R. Qué es la extracción de azúcar [What is sugar extraction?] [Internet]. 2016. Available from: <http://www.casasauza.com/procesos-tequila-sauza/extraccion-de-azucar>
17. Guzmán P, García G, Larios E. Determination of reducing sugars DNS method [Internet]. 2013. Available from: [https://www.academia.edu/4403544/DETERMINACION\\_DE\\_AZUCARES\\_REDUCIDOS](https://www.academia.edu/4403544/DETERMINACION_DE_AZUCARES_REDUCIDOS) auto=download
18. Barnett H, Hunter B. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. *Trans Br Mycol Soc.* 1955;38(4):480.
19. Poczai P, Hyvönen J. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: Problems and prospects. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2010;37(4):1897–912. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/26689796\\_Nuclear\\_ribosomal\\_spacer\\_regions\\_in\\_plant\\_phylogenetics](https://www.researchgate.net/publication/26689796_Nuclear_ribosomal_spacer_regions_in_plant_phylogenetics)
20. Girlanda M, Segreto R, Cafasso D, Liebel HT, Rodda M, Ercole E, et al. Photosynthetic Mediterranean meadow orchids feature partial mycoheterotrophy and specific mycorrhizal associations1. *Am J Bot* [Internet]. 2011;98(7):1148–63. Available from: <http://www.amjbot.org/content/98/7/1148.full.pdf+html>
21. Pecoraro L, Huang L, Caruso T, Perotto S, Girlanda M, Cai L, et al. Fungal diversity and specificity in *Cephalanthera damasonium* and *C. longifolia* (Orchidaceae) mycorrhizas [Internet]. 2017. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jse.12238/full>
22. Ordoñez N. Effect of endophytic fungi of orchids of the rhizoctonia group and other cultivable endophytes on the development of plants of *Vanilla planifolia* Jacks. 2012;65.
23. López, C., Vega, N., & Montoya M. Identificación Molecular De Microorganismos Asociados a La Rizosfera De Plantas De Vainilla En Colombia [Molecular Identification of Microorganisms Associated with the Rhizosphere of Vanilla Plants in Colombia]. *Acta Biológica Colomb.* 2013;18(2):293–306.
24. Vanegas K, Gutiérrez P, Marín M. Molecular Identification of Fungi Isolated from Bean Tissues with Anthracnose Symptoms. *Acta Biológica Colomb* [Internet]. 2014;19(2):143. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84902768068&partnerID=tZOtx3y1>

25. Dearnaley J, Martos F, Selosse M. Orchid Mycorrhizas: Molecular Ecology, Physiology, Evolution and Conservation Aspects. Fungal Assoc 2nd Ed [Internet]. 2012;9(September):1–406. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/251573935\\_Fungal\\_Associations](https://www.researchgate.net/publication/251573935_Fungal_Associations)
26. Han JY, Xiao HF, Gao JY. Seasonal dynamics of mycorrhizal fungi in *Paphiopedilum spicerianum* (Rchb. f) Pfitzer - A critically endangered orchid from China. Glob Ecol Conserv [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;6:327–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gecco.2016.03.011>
27. Chaparro DF, Rosas DC. Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera en la reserva natural la montaña del ocaso, Qimbaya - Quindío [Isolation and evaluation of the enzymatic activity of wood decomposing fungi in the mountain reserve of sunset, Qimbaya - Quindío]. Tesis. 2006;62.
28. Ayala H, Romero H. Enzymatic hydrolysis of rice husks using *Trichoderma reesei*. 2013;839–45. Available from: <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/11191>
29. Rodríguez A, Rodríguez Y. BIODEGRADATION OF POLYURETHANE THROUGH THE USE OF THE HONEY *Pestalotiopsis microspora* [Internet]. 2015. Available from: [https://www.academia.edu/14192074/BIODEGRADACIÓN\\_DE\\_POLIURETANO\\_](https://www.academia.edu/14192074/BIODEGRADACIÓN_DE_POLIURETANO_)
30. Castillo D, Viteri P, Viteri S. Development and Evaluation of an Inoculum of Cellulolytic Fungi. Rev UDCA Actual & Divulg Científica [Internet]. 2015;18(1):217–26. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-42262015000100025&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262015000100025&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
31. Álvarez C, Osorio W, Díez M, Marín M. Biochemical characterization of rhizospheric microorganisms of vanilla plants with potential as biofertilizers. 2014; Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43731480002>
32. Rodriguez MNS. Evaluation of the role of lignocellulolytic microorganisms on plant residues in rhizospheric soils of Creole potato *Solanum phureja* in municipalities of Cundinarma. 2009;149. Bogotá. Universidad Estatal de Colombia. Available from: <http://www.bdigital.unal.edu.co/8468/1/186302.2010.pdf>



*Byron Fuertes-Flores<sup>1</sup>, Diego Mallitasig-Quishpe<sup>1</sup>, Marco Cerna-Cevallos<sup>1</sup>, Sara Gutiérrez<sup>2</sup>*

Byron German Fuertes Flores, Ingeniero Biotecnólogo de los Recursos Naturales, Universidad Politécnica Salesiana, Auxiliar de laboratorio, Grupo de Investigación NUNKUI WAKAN, Campus Girón, Isabel La Católica N. 23-52 y Madrid, Quito, Telf: 2 3962900/ 0987969344, DC 170143, [bfuertes@ups.edu.ec](mailto:bfuertes@ups.edu.ec)

Diego Alejandro Mallitasig Quishpe, Ingeniero Biotecnólogo de los Recursos Naturales, AGROAMBIENTE Cia. Ltda., Técnico de registro de plaguicidas, Av. Colón Oe3-31 entre Versalles y Ulloa, Edificio Villareal, Quito, Telf: 2550124/ 098728336, [dmallitasig@agroambiente.com.ec](mailto:dmallitasig@agroambiente.com.ec)

Marco Fernando Cerna Cevallos, Biologo, PhD en técnicas moleculares, Universidad Politécnica Salesiana, Docente Investigador, Grupo de Investigación NUNKUI WAKAN, Campus Girón, Av. Isabel La Católica N. 23-52 y Madrid, Quito, Telf: 2 3962900/ 0997659069, DC 170143, [mcerna@ups.edu.ec](mailto:mcerna@ups.edu.ec)

Sara Gloria Gutiérrez Torres, Representante legal del Jardín Botánico y vivero comercial Orquídeas de Sarina, El Quinche, Telf: 022387242