



UNIVERSIDAD DEL AZUAY

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA, ECOLOGÍA Y GESTIÓN

**Efecto de la altitud en la composición y riqueza de hongos
micorrízicos de orquídeas epífitas en bosques montano altos del sur
del Ecuador**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE BIÓLOGO CON MENCIÓN EN ECOLOGÍA Y GESTIÓN**

AUTORES:

NUBIA ALEJANDRA GUZMÁN SALINAS

BYRON JAVIER MORENO CORONADO

DIRECTOR:

MARÍA ELENA CAZAR RAMÍREZ PH.D

CO-DIRECTOR:

JUAN PABLO SUÁREZ CHACÓN PH.D

CUENCA, ECUADOR

2014

DEDICATORIA

A nuestras familias

AGRADECIMIENTOS

A Dios, a nuestras familias por el apoyo incondicional y por siempre darnos la fuerza para afrontar los problemas para conseguir esta meta.

Especialmente a nuestros mentores en la investigación en micorrizas Juan Pablo Suárez Ph.D y al Msc. Paulo Herrera por su guía, sus observaciones y ayuda, gracias por abrirnos las puertas de su equipo de investigación en micorrizas de la Universidad Técnica Particular de Loja.

Nuestra gratitud a María Elena Cazar Ph.D, Dra. Raffaella Ansaloni y Gustavo Chacón Ph.D por su guía, comentarios y apoyo a lo largo de nuestra investigación.

A nuestros compañeros del Centro de Biología Celular y Molecular de la Universidad Técnica Particular de Loja por siempre colaborar con nosotros.

**EFFECTO DE LA ALTITUD EN LA COMPOSICIÓN Y RIQUEZA DE
HONGOS MICORRÍZICOS DE ORQUÍDEAS EPÍFITAS EN BOSQUES
MONTANO ALTOS DEL SUR DEL ECUADOR**

RESUMEN

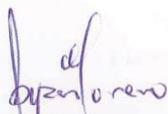
Orchidaceae es una de las familias más representativas en el Ecuador, éstas tienen una relación muy íntima con un grupo de hongos micorrízicos involucrados en su desarrollo, pero es muy poco lo que se sabe sobre la importancia de estos hongos. Este estudio comprende un acercamiento a la composición y riqueza de los hongos micorrízicos de orquídeas en los bosques montano altos del sur del Ecuador, en donde se evaluaron dos sitios a dos diferentes alturas: Mazán y Llaviucu, se usaron las especies de orquídeas: *Odontoglossum pardinum* y *Epidendrum marsupiale* con el objetivo de evaluar si existe una influencia de la altitud en la composición de estos micobiontes. Se describieron las especies de hongos (OTUs) presentes por medio de técnicas moleculares. Se obtuvieron un total de 8 OTUs pertenecientes a los grupos Ascomycota, Tulasnellaceae, Ceratobasidiaceae y Sebacinaceae. Estos resultados muestran una alta diversidad de estos hongos en este tipo de ecosistemas.

PALABRAS CLAVE: Micorrizas de orquídeas, orquídeas epífitas, ecología molecular, unidades taxonómicas operacionales.


Blgo. Edwin Javier Zárate Hugo
Director de escuela


María Elena Cazar Ramirez Ph.D
Directora de tesis


Nubia Alejandra Guzmán Salinas
Tesista

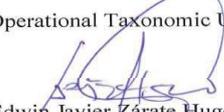

Byron Javier Moreno Coronado
Tesista

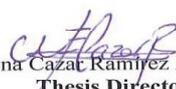
**EFFECT OF ALTITUDE IN THE COMPOSITION AND RICHNESS OF
MYCORRHIZAL FUNGI OF EPIPHYTIC ORCHIDS IN THE UPPER
MONTANE FORESTS OF SOUTHERN ECUADOR**

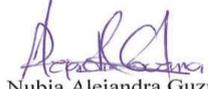
ABSTRACT

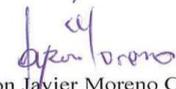
Orchidaceae is a representative plant family in Ecuador. Orchidaceae has intimate relationships with a group of mycorrhizal fungi that is involved in the plant development, although little is known about its specific importance. This study consists of an approach to know the composition and richness of mycorrhizal fungi in orchids of the upper montane forests of southern Ecuador, for which two sites in Mazán and Llaviucu at two different elevations were selected. The *Odontoglossum pardinum* and *Epidendrum marsupiale* orchid species were observed together with the fungi present in each of the sites. Fungal species (OTUs) present in the roots of the orchids were obtained by means of molecular techniques. Results showed 8 OTUs that belonged to Ascomycota, Tulasnellaceae, Ceratobasidiaceae and Sebacinaceae. These results show a very high diversity of fungi in these ecosystems.

KEY WORDS: Orchid Mycorrhiza, Epiphytic Orchids, Molecular Ecology, Operational Taxonomic Units.


Edwin Javier Zárate Hugo, Biologist
School Director


María Elena Cazal Ramírez Ph.D
Thesis Director


Nubia Alejandra Guzmán Salinas
Student


Byron Javier Moreno Coronado
Student




Translated by,
Lic Lourdes Crespo

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE DE CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	x
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1: MATERIALES Y MÉTODOS	6
1.1. Área de estudio	6
1.2. Diseño experimental / recolección de muestras	7
1.3. Análisis microscópico de las raíces	8
1.4. Extracción del velamen	9
1.5. Extracción de DNA	10
1.6. PCR, Reacción en Cadena de la Polimerasa	10
1.7. Clonación molecular y verificación	11
1.8. Análisis de secuencias y delimitación de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs).....	13
1.9. Análisis de la composición de la comunidad de hongos micorrízicos de orquídeas	14

CAPÍTULO 2	17
2. Resultados	17
CAPÍTULO 3	27
3. Discusión.....	27
CONCLUSIONES	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXOS	42

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Diseño de muestreo en los dos sitios de estudio	7
Figura 2: Representación de un corte transversal de una raíz de orquídea	8
Figura 3: Pelotones de micorrizas de orquídeas.....	9
Figura 4: Corte transversal de una raíz de orquídea.....	9
Figura 5: Bandas de DNA resultantes de la PCR	11
Figura 6: Bacterias de <i>E. coli</i> en medio sólido LB AGAR.....	12
Figura 7: Verificación de la inserción del DNA	12
Figura 8: Colonias sembradas en medio líquido.....	12
Figura 9: Cromatogramas de las secuencias de <i>Epidendrum marsupiale</i>	13
Figura 10: Porcentaje del número de secuencias reportadas para cada grupo de micobiontes de <i>Epidendrum marsupiale</i> y <i>Odontoglossum pardinum</i> en los dos sitios de estudio	18
Figura 11: Número de secuencias obtenidas para cada OTU de los micobiontes de <i>Epidendrum marsupiale</i> y <i>Odontoglossum pardinum</i> en los dos sitios de estudio ...	18
Figura 12: Riqueza de los grupos de micobiontes reportados para las especies estudiadas	19
Figura 13: Porcentaje de micobiontes reportados para los sitios de estudio.....	19
Figura 14: Comparación de la abundancia de OTUs reportadas en los dos sitios de estudio y el número de OTUs que se comparten.....	20
Figura 15: Porcentaje de micobiontes reportados para las especies de orquídeas	21
Figura 16: Comparación de los micobiontes reportados para las dos especies de orquídeas estudiadas.....	22
Figura 17: Porcentaje del número de micobiontes reportados para los dos niveles altitudinales de los bosques de Mazán y Llaviucu	22
Figura 18: Comparación de los micobiontes reportados para los sitios alto y bajo de los bosques de Mazán y Llaviucu	23
Figura 19: Curvas de acumulación de las especies <i>Epidendrum marsupiale</i> y <i>Odontoglossum pardinum</i>	24
Figura 20: Histograma de frecuencias representado para a) OTU8 perteneciente al grupo Ascomycota y b) Σ de OTUs para cada especie de orquídea muestreada	26

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Resultados de las curvas de acumulación para las especies <i>E. marsupiale</i> y <i>O. pardinum</i>	24
Tabla 2: Índices de similaridad calculados a nivel de especies, alturas y sitios.....	25
Tabla 3: Test de Montecarlo calculado para la OTU8 y para la Σ de todas las OTUs para las especies <i>E. marsupiale</i> y <i>O. pardinum</i>	25

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1: Secuencias con mayor similitud en la región ITS-5.8S nrDNA de hongos micorrízicos obtenidas de la búsqueda en el GenBank.....	42

Nubia Alejandra Guzmán Salinas

Byron Javier Moreno Coronado

Trabajo de Graduación

María Elena Cazar Ramírez, Ph.D

Octubre 2014

**EFFECTO DE LA ALTITUD EN LA COMPOSICIÓN Y RIQUEZA DE
HONGOS MICORRÍZICOS DE ORQUÍDEAS EPÍFITAS EN BOSQUES
MONTANO ALTOS DEL SUR DEL ECUADOR**

INTRODUCCIÓN

Las orquídeas, diversidad e importancia

Las orquídeas son un grupo muy carismático, tanto que han llegado a ser denominadas los “pandas del mundo vegetal”. Son especies representativas para la conservación de las plantas, apareciendo todas en los Apéndice I o II de la CITES (IUCN, 2012). Este grupo representa la familia más numerosa de plantas entre las monocotiledóneas, con 27.135 especies aceptadas (The Plant List, 2010). Su rango de distribución es amplio, va desde 0 hasta casi los 5000 m s.n.m., son consideradas omnipresentes encontrándose en todos los continentes, incluso en algunas islas antárticas (Swarts & Dixon, 2009).

En el Ecuador existen más de 4.200 especies de orquídeas conocidas, de estas más de 1.300 son especies endémicas (Ecuador Megadiverso, 2011), razón por la que el Ecuador se encuentra primero en el ranking mundial de orquídeas, una de cada cinco especies de orquídeas del mundo está presente en Ecuador (Kleinsy, 2013).

Las orquídeas son consideradas como una de las especies más fascinantes por los científicos y personas que gustan de ellas, pues, aparte de su vasta diversidad, sus flores poseen una extraordinaria forma y belleza, contando con estructuras especializadas que han dado lugar a mecanismos de polinización muy específicos

(Darwin, 1888), existiendo estrechas relaciones entre las flores, sus estructuras y sus polinizadores (Dodson & Frymire, 1961).

La familia Orchidaceae tiene una gran importancia económica, principalmente en la horticultura, en la industria alimenticia, farmacéutica y de fragancias (Medhi & Chakrabarti, 2009; IUCN, 2012). En los últimos años estas industrias se están desarrollando muy rápidamente y más especies de orquídeas son introducidas en el mercado (Liu *et al.*, 2010).

Aunque la familia Orchidaceae sea un grupo antiguo, es una de las familias de plantas más altamente modificadas de todos los taxos de Angiospermas, que incluso en la actualidad, pasa por una rápida diversificación y especiación, siendo la subfamilia Epidendroideae la más avanzada (Van Den Berg *et al.*, 2005). Esto se debe en gran medida a que el ciclo de vida de las orquídeas es complejo, depende principalmente de la interacción simbiótica con cierto grupo de hongos conocidos como micorrizas y de la interacción con polinizadores específicos (Waterman *et al.*, 2011)

Interacción con hongos que forman micorrizas

Alrededor del 90% de las especies de plantas Angiospermas forman asociaciones micorrízicas. Las micorrizas se forman por la asociación simbiótica entre las raíces y varios grupos de hongos del suelo (Smith & Read, 2008).

En la mayoría de las semillas de las plantas Angiospermas, el embrión se encuentra rodeado de un tejido nutritivo, el endospermo, en otros casos las sustancias de reserva se almacenan en órganos especiales llamados cotiledones; estas reservas permiten que el embrión crezca y se desarrolle hasta que la planta produzca sus primeras hojas y raíces. En el caso de las orquídeas, las semillas carecen de sustancias y órganos de reserva (Swarts & Dixon, 2009), de ahí la necesidad de un agente externo que aporte nutrientes al embrión en desarrollo.

Todas las especies pertenecientes a la familia Orchidaceae durante su germinación y establecimiento como plántulas dependen de hongos micorrízicos, por lo que son llamadas mico-heterótrofas en esta fase (Peterson *et al.*, 2004). Varias especies no fotosintéticas de orquídeas llegan a ser mico-heterótrofas parciales todo su ciclo de

vida y estas pueden ser más ampliamente distribuidas de lo que se conoce hasta el momento (Stöckel et al., 2014).

Las micorrizas de orquídeas son consideradas únicas, son de tipo endótrofo, lo que significa que las hifas del hongo viven en el interior de las células y no sólo en los espacios intercelulares, se encuentran formando pelotones que son un complejo de hifas enrolladas dentro de las células hospederas de la planta (Peterson & Massicotte, 2004).

Las raíces, rizomas y tejidos de las orquídeas están generalmente colonizados por estos hongos, los cuales desempeñan un rol fundamental en el aporte de nutrientes para el desarrollo de la planta (Peterson & Massicotte, 2004). Las hifas de estos hongos aportan al embrión los azúcares necesarios para su crecimiento, funcionando como pequeñas raíces que absorben sustancias nutritivas del medio circundante (Junta de Andalucía, 2012), siendo su principal función proveerles nutrientes orgánicos e inorgánicos para su germinación y oportuno desarrollo del protocormo, que es la estructura tuberosa que se forma tras la germinación de las semillas de orquídea y a partir de la cual se desarrolla una planta completa (Dearnaley, 2007).

Amenazas para la conservación

El Ecuador es un país con una riqueza de flora muy grande, a pesar de una superficie relativamente pequeña Ecuador tiene entre 20.000 y 25.000 especies de plantas vasculares frente a las 17.000 de toda América del Norte (Carbale, 1989). Los bosques montano altos, ecosistemas donde se realizó este estudio, poseen una alta diversidad de flora, se hallan aproximadamente 300 especies de plantas superiores (Montesinos, 1996), estos ecosistemas se caracterizan por el incremento exuberante de epífitas como huicundos, orquídeas (aprox. 92 especies) musgos y líquenes (ETAPA, 2005; Cañadas, 1983).

La difícil situación por la que atraviesa el Ecuador en la protección y uso racional de sus recursos naturales es preocupante. Se han establecido nueve grandes problemas ambientales en el país: erosión de suelos, deforestación, degradación de aguas dulces, degradación de pesquería y hábitats costeros, urbanización de tierras agrícolas, pérdida de biodiversidad, contaminación del aire, desastres naturales y abuso de pesticidas (Marmorek et al., 1991).

De las cuales las actividades humanas han ejercido y ejercen una continua perturbación a los ecosistemas naturales, la degradación, la fragmentación y la pérdida del hábitat son las principales amenazas para la biodiversidad en todo el mundo (Juárez *et al.*, 2014). El impacto causado por estas actividades han determinado un efecto considerable en el tamaño y la distribución de estos bosques, en la actualidad entre los últimos remanentes de vegetación original alto andina que queda en la provincia del Azuay se encuentra el bosque montano alto de Mazán (Montesinos, 1996).

Las especies de la familia Orchidaceae se encuentran entre las más vulnerables dado que son organismos muy sensibles a las perturbaciones ecológicas de los bosques (Brundrett, 2007; Medhi & Chakrabarti, 2009). Su especialización ecológica no sólo ha contribuido a su gran diversidad, sino que también se ha traducido en un alto nivel de amenaza en esta familia (Cribb *et al.*, 2003).

La conservación y el uso sustentable de las orquídeas es tema de suma importancia en la actualidad. En un contexto general incluyendo al Ecuador, es escasa la información que se tiene acerca de los roles de las comunidades de hongos asociados a las orquídeas, así también, se sabe muy poco acerca del papel que desarrollan las comunidades de hongos micorrízicos sobre el tamaño, la distribución y la genética de las poblaciones de orquídeas (McCormick *et al.*, 2004). Cualquier esfuerzo para conservar las orquídeas que no incluya también un esfuerzo para conservar sus hongos micorrízicos asociados será poco exitoso (Zettler, 1997; Kottke *et al.*, 2010).

La rareza de las especies se ha relacionado en su gran mayoría con rasgos ecológicos, sin embargo, un estudio previo ha demostrado que los hongos micorrízicos pueden afectar la diversidad (Van der Heijden *et al.*, 1998) y potencialmente la distribución de las especies de plantas (Swarts *et al.*, 2010). Así las micorrizas podrían limitar la distribución de las orquídeas, ya sea por la ausencia de un hongo micorrízico o la incapacidad para formar una simbiosis en ciertas condiciones ambientales. Por lo que es necesario conocer la distribución de los hongos de orquídeas dentro del suelo o en sus forófitos, para poder entender lo que limita el número y tamaño de las poblaciones de orquídeas, con independencia de que si es o no la rareza inducida por humanos o una característica natural de la especie (Phillips *et al.* 2011).

En nuestro país los estudios acerca del efecto del nivel altitudinal sobre la estructura de la comunidad de hongos micorrízicos son escasos. Investigaciones de esta índole están enfocadas a proveer de importante información acerca de las diferentes relaciones existentes en la interacción entre hongos y orquídeas.

El objetivo principal de este estudio es determinar la composición y riqueza de la comunidad de hongos micorrízicos, y establecer si existe una influencia del nivel altitudinal sobre la composición de estas comunidades, con el fin de responder las siguientes preguntas: ¿Existe una diferencia en la composición de la comunidad de micobiontes de las orquídeas como respuesta a la variación de la altitud? ¿Existe una diferencia en la composición de la comunidad de micobiontes entre poblaciones de orquídeas? Esta investigación pretende generar información para entender las interacciones ecológicas de este grupo de hongos con las poblaciones de orquídeas en los bosques de Mazán y Llaviucu, información que se podrá integrar a futuros planes de conservación de esta familia de plantas.

CAPITULO 1

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Área de estudio

El área de estudio comprende los bosques de Mazán y Llaviucu, éstos bosques se encuentran ubicados en la zona Este del Parque Nacional Cajas (P.N.C.), parte del área de éstos se encuentra fuera de los límites del Parque, pero dentro del área protegida actualmente por la Empresa Pública Municipal de Teléfonos y Agua Potable, ETAPA.

Estos bosques han sido definidos según Sierra (1999), como bosques siempre verdes montano altos, con una diversidad vegetal que consta de alrededor 300 especies de plantas vasculares, de éstas aproximadamente 50 son especies de árboles, 60 arbustos, 3 lianas, 7 bejucos, 40 epífitas entre orquídeas y bromelias y 140 son hierbas (ETAPA, 2005). Ambos sitios pertenecen al Macizo del Cajas considerado según la UNESCO como Reserva de la Biosfera en 2013.

Bosque de Mazán:

Se encuentra ubicado a 10 km al Noroeste de la ciudad de Cuenca, pertenece a las parroquias de Sayausí y San Joaquín. Tiene un total de 2640 ha (Montesinos, 1996), las cuales están cubiertas en la parte alta por páramo de pajonal con numerosas lagunas, bosque de *Polylepis* y bosque primario y secundario (BirdLife International, 2013), con aproximadamente 300 especies vasculares de las cuales 80 son leñosas (Montesinos, 1996).

El bosque ha sufrido una serie de alteraciones debido a las actividades humanas principalmente ligadas a la ganadería y agricultura (Rengel, 2004), desde los años ochenta se realizaron acciones de conservación que se han mantenido hasta la actualidad, permitiendo la recuperación del bosque. Hoy en día es considerado como uno de los sitios más diversos en la provincia del Azuay, formando parte de un

importante refugio de especies endémicas, amenazadas y claves para la conservación (ETAPA, 2005).

Bosque de Llaviucu:

Se encuentra ubicado a 17 km al Noroeste de la ciudad de Cuenca. Conformado por páramo de pajonal, bosque primario, secundario y pastizal (Rodas, 2005).

Al igual que el bosque de Mazán, Llaviucu ha sido alterado por actividades antrópicas especialmente relacionadas al área agropecuaria, debido a éstas en parte del bosque se fueron formando grandes zonas de pastizales ocupadas principalmente por el ganado vacuno (Rodas, 2005), que en la actualidad se encuentran en estado de recuperación. Con un 20% de especies vegetales catalogadas como útiles y raras (ETAPA, 2005) es un sitio de importancia para la conservación.

1.2. Diseño experimental / recolección de muestras

Se muestreó raíces de dos especies de orquídeas epífitas en dos sitios a distintas altitudes. En el bosque de Mazán a 3000 y 3400 m s.n.m. y en Llaviucu a 3100 y 3500 m s.n.m., (Figura 1). En cada sitio se muestreó 10 individuos de cada especie, cada individuo ubicado en un forófito (planta sobre la que crece la orquídea) distinto. En total se colectó 40 muestras de raíces de cada especie, 80 en total.

Figura 1: Diseño de muestreo en los dos sitios de estudio



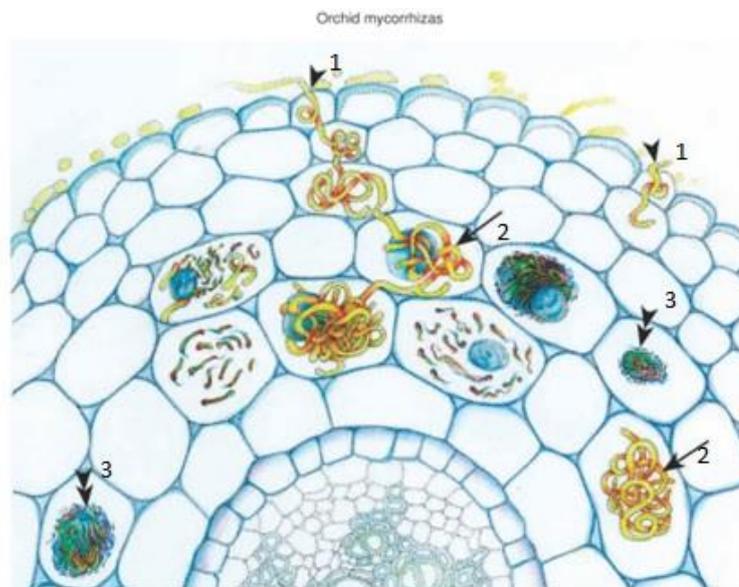
Fuente: Autores

Entre los meses de Mayo y Agosto del 2013 se realizó en sitio una estimación visual de las especies de orquídeas epífitas. En consecuencia se determinó que las especies de *Odontoglossum pardinum* y *Epidendrum marsupiale* ocurren en todos los sitios de estudio y en ambas altitudes. Se conservó las muestras de raíces en etanol al 50% para su posterior análisis en el laboratorio, para la identificación de las especies de orquídeas se tomó muestras de las flores.

1.3. Análisis microscópico de las raíces

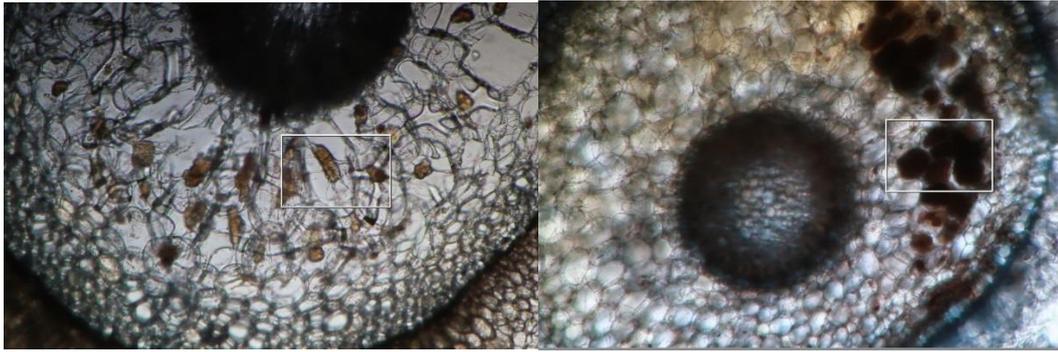
En el laboratorio se realizó por microscopía la verificación de la colonización de los hongos micorrízicos en las raíces colectadas, efectuando cortes transversales a las muestras, para después ser sometidas a una tinción con azul de metileno (0.05 % en ácido láctico, Merck C.I. 42780) siguiendo lo propuesto por Kottke *et al.* (2010) por 3 minutos, finalmente los cortes fueron observados al microscopio para constatar la presencia de pelotones con hifas viables dentro del tejido corticoidal o corteza en las raíces de las orquídeas (Figura 2-3).

Figura 2: Representación de un corte transversal de una raíz de orquídea



Fuente: Peterson *et al.*, 2004

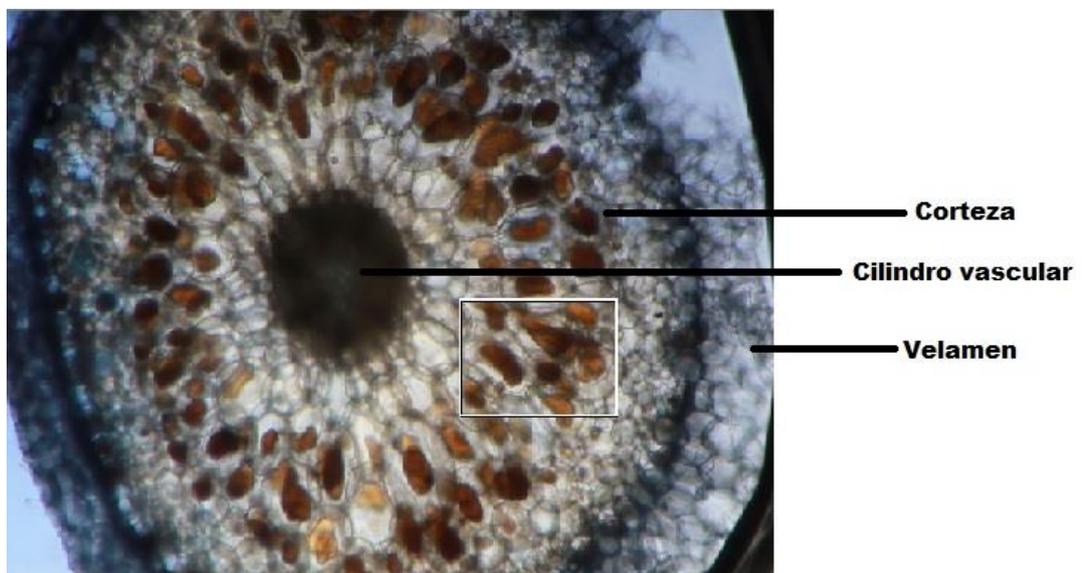
Las hifas penetran a la raíz a través de la epidermis (1) y forman las enroscaduras de hifas que son los llamados pelotones en las células corticales (2), estos pelotones se degradan con el tiempo (3).

Figura 3: Pelotones de micorrizas de orquídeas

Fuente: Autores

A la izquierda pelotones de hongos micorrízicos de orquídeas viables. A la derecha pelotones degradados.

Una vez realizada la verificación de la colonización, se esterilizaron los fragmentos bien colonizados de raíces siguiendo lo establecido por Herrera *et al.* (2010), las muestras fueron lavadas con agua destilada estéril más unas gotas de jabón líquido, sumergidas en alcohol etanol al 70 % por 30 segundos, después en una solución de Hipoclorito de Sodio al 20 % por un periodo de 10 minutos y finalmente enjuagadas en agua destilada estéril.

Figura 4: Corte transversal de una raíz de orquídea

Fuente: Autores

1.4.Extracción del velamen

La extracción del velamen (Figura 4) de las raíces de orquídeas se la realizó en ambientes estériles y asepticos para evitar posibles contaminaciones, el velamen de

cada muestra de raíz fue removido y descartado, la corteza resultante de cada muestra fue depositada en micro-tubos de 1.5-ml con algunas gotas de agua destilada estéril.

1.5.Extracción de DNA

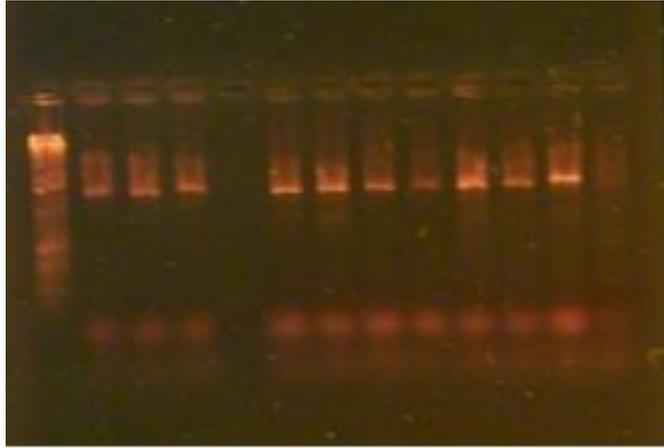
El DNA se extrajo usando el Kit plant mini (Quiagen, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se realizó la extracción de DNA de las 80 muestras colectadas, debido a ajustes en el presupuesto del proyecto se continuó los restantes análisis de biología molecular con 24 muestras, tres individuos de cada especie por sitio de muestreo.

1.6.PCR, Reacción en Cadena de la Polimerasa

Las regiones del gen ITS1-5.8S-ITS2 y parte de la región 28S rDNA se amplificaron utilizando una combinación de primers universales para Eucariotas ITS1 (50-TCC GTA GGT GAACCT GCG G-30; White et al., 1990) y TW14 (50-GCTATCCTGAGGGAACTTC-30; Cullings 1994). Se escogió esta combinación de primers ya que incrementa la posibilidad de amplificar una amplia diversidad de hongos en las muestras de raíces (Riofrío et al., 2013; Kottke et al., 2010). La concentración final de los primers fue 25 pmol/μl. Se usó la Taq Phusion High-Fidelity PCR Mastermix (Finnzymes, Espoo, Finland), se adicionó Bovine Serum Albumin 10% (BSA-SIGMA) y 2μl del extracto de DNA, además, se usó un blanco como control de la PCR. El programa del Termociclador usado fue de 98°C por 30 segundos (desnaturalización inicial), cada ciclo con desnaturalización a 98°C por 10 segundos, anillamiento a 60°C por 20 segundos, y la elongación a 72°C por 30 segundos (repetido por 30 ciclos) y la extensión final a 72°C por 10 minutos.

Se comprobaron las bandas resultantes de la PCR con una electroforesis, se utilizó gel de agarosa al 0.7 %, las muestras de PCR se tiñeron con una solución de bromuro de etidio 0.5 μg ml⁻¹ y el gel se corrió con las siguientes condiciones: 300mA, 180V y 25 minutos, se visualizó bajo luz UV. Una vez comprobada la buena calidad de las bandas (Figura 5) se continuó con el Cloning molecular.

Figura 5: Bandas de DNA resultantes de la PCR

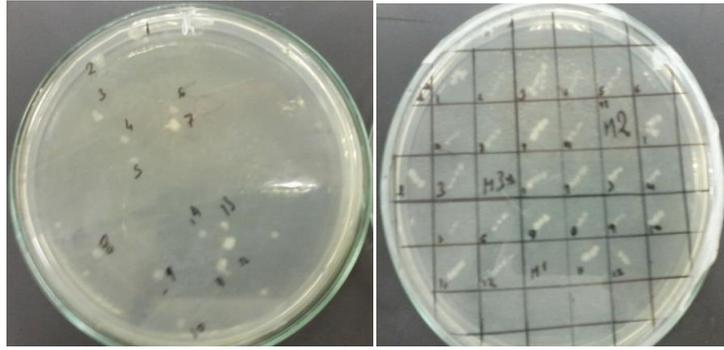
Fuente: Autores

1.7. Clonación molecular

La clonación molecular se realizó con el Kit Zero Blunt TOPO PCR Cloning (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las colonias de *E. coli* crecieron en medio sólido LB AGAR MILLER (Difco TM) (Figura 6); con el objetivo de verificar la inserción del DNA se escogió al azar 20 colonias de bacterias de cada muestra para realizar una nueva PCR con los primers modificados M13R (5'-TGAGCGGATAACAATTTACACAGG-3') y M13F (5'-CCAGGGTTTTCCCAGTCACGACG-3') Krüger *et al.* (2009).

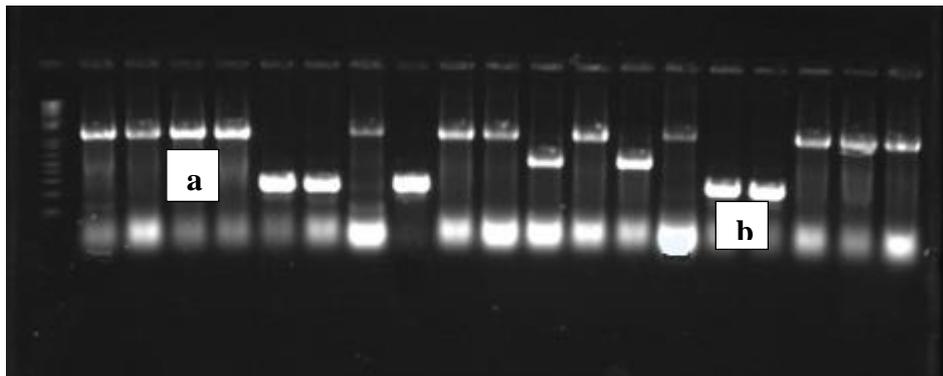
El programa del termociclador usado para las reacciones fue: desnaturalización inicial a 95°C por 5:00 minutos; 35 ciclos, cada ciclo consistiendo de un paso de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, anillamiento a 65 °C por 30 segundos, extensión 72 °C por 2 minutos; y una extensión final a 72 °C por 10 minutos. Se comprobó las bandas resultantes de la PCR con una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% (Figura 7). Las colonias de bacterias que tienen insertado el DNA fueron cultivadas en medio LB líquido, MILLER (Difco TM) (Figura 8), para luego ser purificadas siguiendo el protocolo de S.N.A.P.TM Plasmid DNA MiniPrep de Invitrogen.

Se utilizaron 10 clones por individuo, contando con un total de 240 clones a ser secuenciados.

Figura 6: Bacterias de *E. coli* en medio sólido LB AGAR

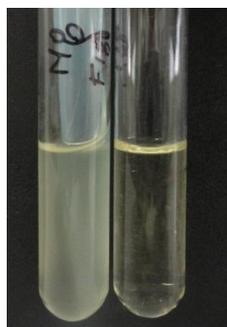
Fuente: Autores

Al lado izquierdo una fotografía de las colonias de *E. coli* sembradas en medio sólido LB AGAR. Al lado derecho las colonias re-sembradas para la verificación de la inserción del DNA.

Figura 7: Verificación de la inserción del DNA

Fuente: Autores

a) Bandas con inserción de DNA; b) Bandas sin inserción de DNA.

Figura 8: Colonias sembradas en medio líquido.

Fuente: Autores

A la derecha medio LB Broth MILLER; A la izquierda colonias cultivadas en el medio LB Broth MILLER.

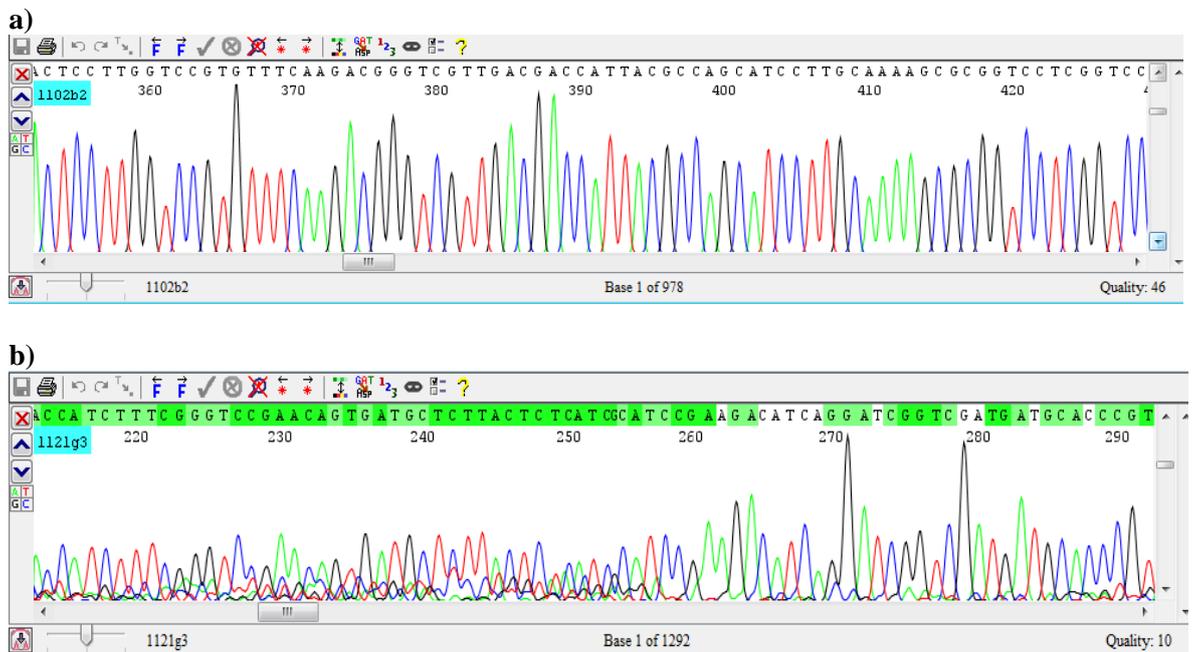
Los clones fueron secuenciados en la empresa Macrogen (Seul, Korea) usando los primers universales M13F forward y M13R reverse.

1.8. Análisis de secuencias y delimitación de Unidades Taxonómicas Operaciones (OTU)

Los cromatogramas de las secuencias se analizaron con el programa CodonCode Aligner versión 5.0.2 (Figura 9). Con los resultados obtenidos de las secuencias se realizaron asignaciones taxonómicas preliminares, comparando la similitud de las secuencias con las secuencias publicadas en el GenBank, mediante una búsqueda en BLAST (Altschul et al., 1997). Con esta comparación inicial se agruparon las secuencias en: Ascomycetes y Basidiomycetes, éstos últimos divididos en tres grupos: Tulasnellaceae, Ceratobasidiaceae y Sebacinaceae.

Las secuencias se alinearon usando el algoritmo G-INS-i en MAFFT (Katoh et al., 2002) ajustadas manualmente en el programa Sequence Alignment Editor (Se-AI) versión 2.0 (Rambaut, 1996).

Figura 9: Cromatogramas de las secuencias de *Epidendrum marsupiale*



a) Cromatograma válido; b) Cromatograma con ruido (descartado).

Para delimitar OTUs del grupo Ascomycota y Basidiomycota se calculó una tabla de p-distancia en PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002) con las regiones ITS1-5.8S-ITS2 para todas las secuencias, luego se agruparon con el programa OPTSIL (Göker *et al.*, 2009). Se utilizó un umbral del 1% para el grupo de Ascomycetes y del 3% para Basidiomycetes (Ceratobasidiaceae y Sebacinaceae), representación habitual para la delimitación de especies en este grupo (Martos *et al.*, 2012, Hughes *et al.*, 2009, Jacquemyn *et al.*, 2010), a excepción del grupo Tulasnellaceae en el que se usó un umbral del 5% debido a la alta variabilidad en las regiones de su DNA (Jacquemyn *et al.*, 2012).

1.9. Análisis de la composición de la comunidad de hongos micorrízicos

Curvas de acumulación

La curva de acumulación de especies es una muestra de la riqueza de especies acumulada frente a un esfuerzo de muestreo (Walther & Morand, 1998), en donde se asume que la riqueza total en el número de especies se encontrará con un esfuerzo de muestreo infinito, es decir, la asíntota (González *et al.*, 2010).

Para el análisis de acumulación de las especies se consideró como esfuerzo de muestreo cada individuo de orquídea; los datos fueron analizados con el programa EstimateS versión 7.5 (Colwell, 2013) para un proceso de “suavizado” de la curva, se usó un número de aleatorizaciones de 100, recomendado por Jiménez & Hortal (2003), los datos se ajustaron a la ecuación de Clench (Jiménez & Hortal 2003; Soberón & Llorente, 1993) con ayuda del programa Statistica 7.0.61.0, siguiendo las directrices de Jiménez & Hortal (2003).

A partir de los valores obtenidos se calculó:

La pendiente final de la curva, para evaluar la calidad del muestreo. Ésta pendiente, si es menor a 0.1 indica un muestreo completo y altamente fiable (Jiménez & Hortal, 2003).

$$\text{Pendiente de la curva} = a/(1+b \cdot n)^2$$

La proporción de especies registradas indica la calidad del inventario (Jiménez & Hortal, 2003).

$$\text{Proporción de especies registradas} = \text{Sobs} / (a/b)$$

Se estimó el esfuerzo de muestreo necesario para registrar una determinada (95%) proporción de las especies (Jiménez & Hortal, 2003).

$$\text{Esfuerzo de muestreo} = 0.95 / [b \cdot (1 - 0.95)] * 100$$

También se calculó el valor asintótico, usando la fórmula aplicada en la ecuación de Clench:

$$\text{Asíntota} = a/b$$

Índices de Chao-Jaccard y Chao-Sorensen

El índice de similitud de Jaccard y el índice de estrecha relación de Sorensen son los índices más antiguos y más utilizados para evaluar la similitud en la composición de las muestras, ambas medidas se basan en la presencia/ausencia de especies.

Se utilizaron los estimadores estadísticos desarrollados por Chao *et al.*, (2005) que proponen un método para estimar tanto los índices de Jaccard y Sorensen basados en la abundancia y la incidencia a partir de datos de la muestra, en estos se incorpora el efecto de las especies compartidas no detectadas.

El rango de estos índices va desde cero a uno, cero cuando no hay especies compartidas, uno cuando los dos sitios comparten las mismas especies (Villareal, 2006). Los análisis de los datos fueron calculados en EstimateS versión 9.1.0 (Colwell, 2013).

Test de Monte Carlo

El análisis estadístico de Monte Carlo forma parte de los métodos de randomización bayesianos. Este método brinda la posibilidad de producir un casi número infinito de números aleatorios, es decir, de randomizaciones distintas distribuidas acorde a una distribución observada (Robert & Casella, 2010). En el test de Monte Carlo la significancia de los datos observados son evaluados por medio de una comparación

con los datos aleatorios obtenidos, en donde se asume, que todos los modelos implicados y todos los datos ordenados son iguales probabilísticamente, mostrando si en un determinado número de ordenamiento aleatorio de los datos existe una tendencia significativa para aceptar o rechazar la hipótesis nula (Manly, 1997).

La hipótesis alternativa sugiere que existen evidencias de una tendencia o cierto tipo de patrón a surgir en los datos, mientras que la hipótesis nula indicaría lo contrario, en donde, si ese patrón observado está presente entonces es efecto puramente de la oportunidad de observaciones en un orden al azar (Robert & Casella, 2010; Manly, 1997).

Los análisis se efectuaron en el programa R version 3.1.1 (2014), siguiendo las directrices de Manly (1997).

CAPÍTULO 2

2. RESULTADOS

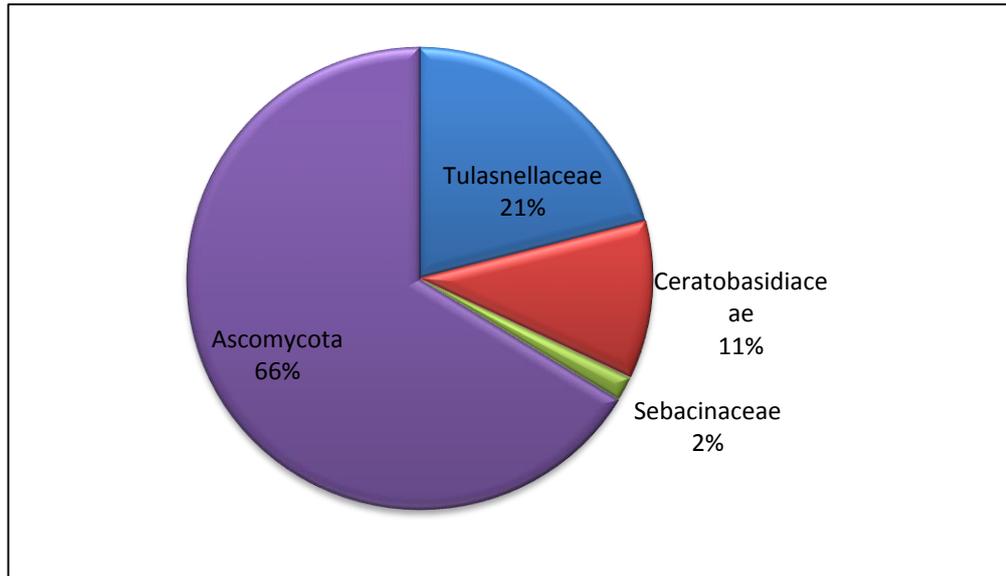
Se muestreó 10 individuos de las orquídeas, *Epidendrum marsupiale* y *Odontoglossum pardinum*, una por forófito ubicados en dos diferentes sitios a dos niveles altitudinales: Mazán 3000 y 3400 m s.n.m. y en Llaviucu a 3100 y 3500 m s.n.m., con un total de 80 muestras de raíces.

La extracción del DNA a partir de las raíces colectadas se la realizó para todos los individuos muestreados, sin embargo para los procesos de clonaje y secuenciación molecular se utilizaron 24 muestras, es decir, tres individuos por especie en cada sitio de muestreo.

Se obtuvo un total de 240 secuencias de micobiontes de aproximadamente 1500 pares de bases de longitud de la región completa de nrDNA ITS1-5.8S-ITS2 y parte de nrDNA 28S, de las cuales 57 secuencias se descartaron debido a la mala calidad de los cromatogramas. Se analizó un total de 183 secuencias.

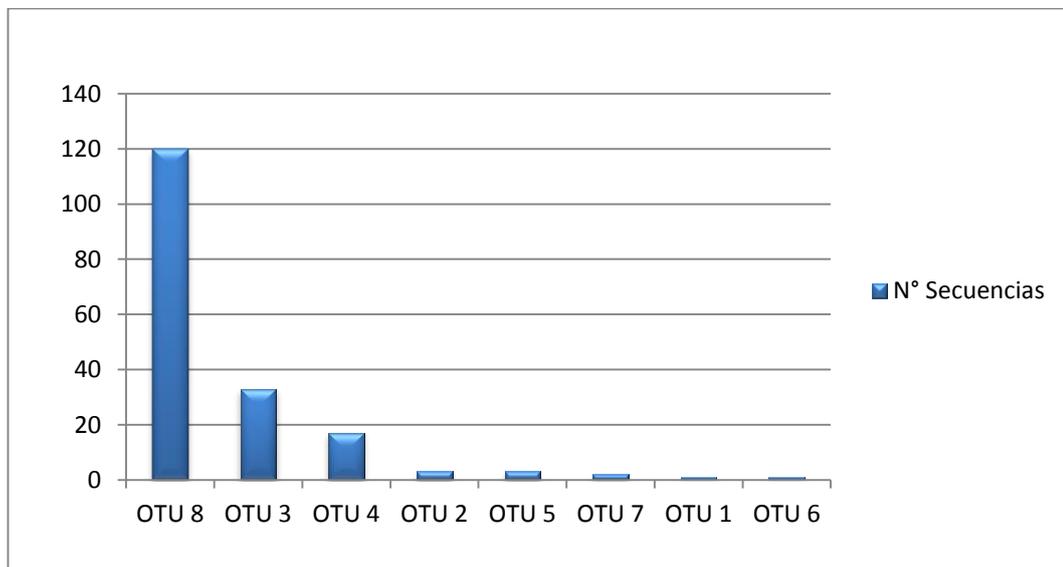
Con un porcentaje de similitud del 99% para el grupo Ascomycota se obtuvo un total de una OTU, **OTU 8** que incluye 120 secuencias (Figura 10 y 11). Para el grupo de Basidiomycetes se identificaron un total de 7 OTUs: para la familia Tulasnellaceae con un porcentaje de similitud del 95% se obtuvieron 3 OTUs, **OTU1** con 1 secuencia, **OTU2** con 3 secuencias, **OTU3** con 33 secuencias; para la familia Ceratobasidiaceae, con una similaridad del 93% en 20 secuencias se obtuvieron dos OTUs, **OTU4** con 17 secuencias, **OTU5** con tres secuencias; y finalmente para la familia Sebacinaceae, con un porcentaje de similaridad del 93% en tres secuencias se obtuvieron dos OTUs, **OTU6** con una secuencia y **OTU7** con dos secuencias (Figura 10 y 11).

Figura 10: Porcentaje del número de secuencias reportadas para cada grupo de micobiontes de *Epidendrum marsupiale* y *Odontoglossum pardinum* en los dos sitios de estudio



Fuente: Autores

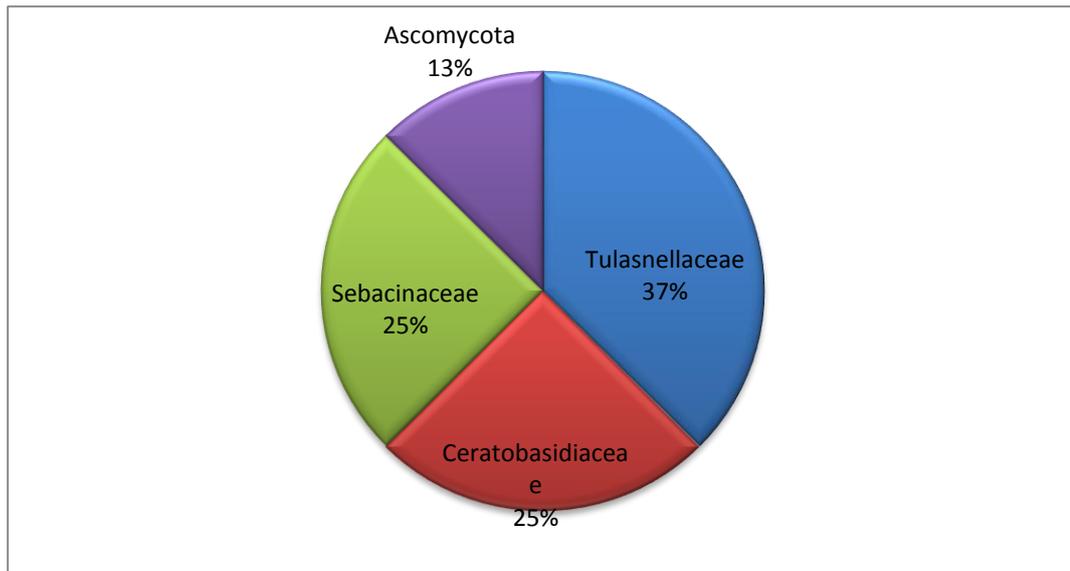
Figura 11: Número de secuencias obtenidas para cada OTU de los micobiontes de *Epidendrum marsupiale* y *Odontoglossum pardinum* en los dos sitios de estudio



Fuente: Autores

La abundancia de hongos para todos los sitios muestreados fue mayor para el grupo de OTUs de Tulasnellaceae con un 37% del total de la muestra, seguido por los grupos de OTUs Sebacinaceae y OTUs Ceratobasidiaceae con el 25%, finalmente un 13% la OTU de Ascomycota (Figura 12).

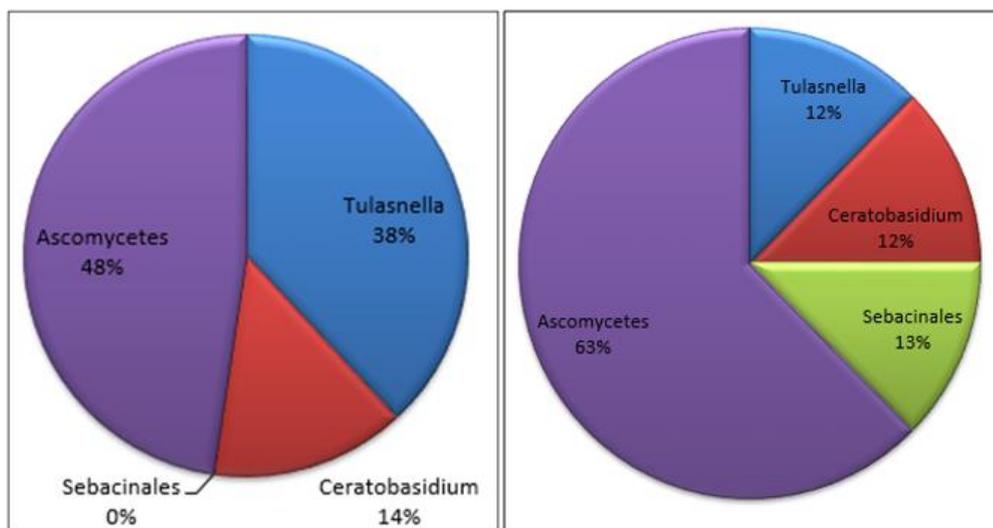
Figura 12: Riqueza de los grupos de micobiontes reportados para las especies estudiadas



Fuente: Autores

La riqueza para Mazán es de 5 OTUs: OTU2, OTU3, OTU4, OTU5 y OTU8, teniendo a la OTU2 perteneciente a la familia Tulasnellaceae reportada solo en este sitio. Del total de las secuencias detectadas en la muestras de Mazán el 48% corresponden a Ascomycota, seguido del grupo Tulasnellaceae con un 38% y el grupo de OTUs de Ceratobasidiaceae, el de menor riqueza reportada, con un 14% (Figura 13 y 14).

Figura 13: Porcentaje de micobiontes reportados para los sitios de estudio



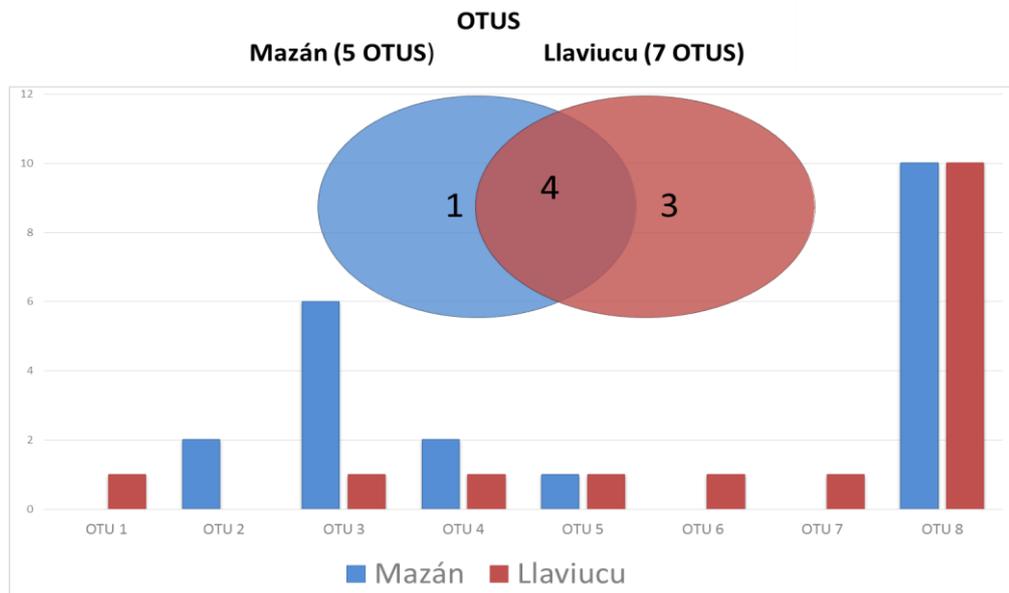
Fuente: Autores

Al lado izquierdo OTUs del bosque de Mazán; Al lado derecho OTUs del bosque de Llaviucu.

La riqueza para el sitio de Llaviucu es de 7 OTUs: OTU1, OTU3, OTU4, OTU5, OTU6, OTU7, OTU8, siendo tres OTUs exclusivas para este sitio, OTU1 de Tulasnellaceae, OTU6 y OTU7 de la familia Sebacinaceae. Del total de las secuencias detectadas en las muestras de Llaviucu el 63% corresponden a Ascomycota, seguido del grupo de OTUs de Sebacinaceae con un 13%, los grupos de OTUs de Tulasnellaceae y de Ceratobasidiaceae representaron el 12% (Figura 13 y 14).

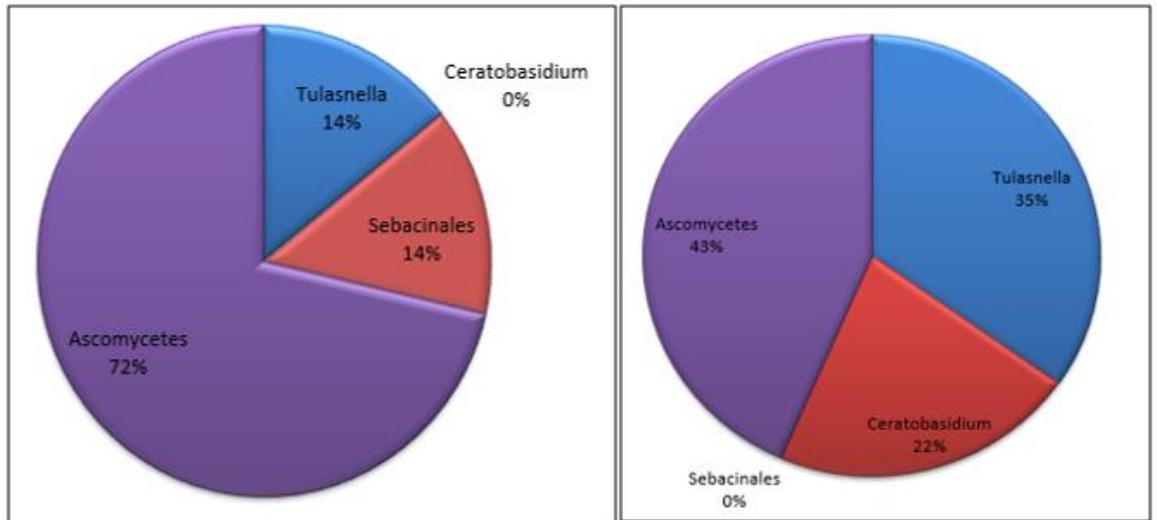
Cuatro OTUs se comparten entre ambos sitios: OTU3 de Tulasnellaceae; OTU4, OTU5 de Ceratobasidiaceae y OTU8 de Ascomycota (Figura 14).

Figura 14: Comparación de la abundancia de OTUs reportadas en los dos sitios de estudio y el número de OTUs que se comparten



Fuente: Autores

Para la comparación de riqueza de OTUs entre las dos especies de orquídeas muestreadas se obtuvo para *E. marsupiale* un total de 5 OTUs: OTU1 y OTU3 pertenecientes a Tulasnellaceae, OTU6 y OTU7 pertenecientes a Sebacinaceae y OTU8 a Ascomycota. El grupo de OTUs de Sebacinaceae OTU6 y OTU7 y OTU1 Tulasnellaceae solo se reportan para esta especie de orquídea. Del total de las secuencias detectadas en las muestras de *E. marsupiale* el 72% corresponden a Ascomycota, seguido del grupo de OTUs de Sebacinaceae y Tulasnellaceae con un 14%, no se tiene presencia de las OTUs de grupo Ceratobasidiaceae para esta especie (Figura 15 y 16).

Figura 15: Porcentaje de micobiontes reportados para las especies de orquídeas

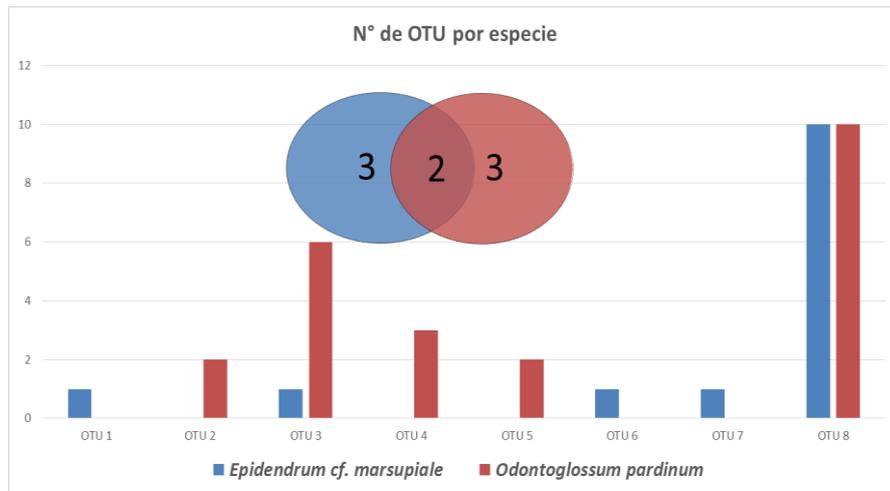
Fuente: Autores

Al lado izquierdo *Epidendrum marsupiale*; Al lado derecho *Odontoglossum pardinum*.

Para *O. pardinum* se obtuvo un total de 5 OTUs: OTU2, OTU3 pertenecientes a Tulasnellaceae; OTU4, OTU5 pertenecientes al grupo Ceratobasidiaceae y OTU8 de Ascomycota. OTU2 de Tulasnellaceae y el grupo de OTUs de Ceratobasidiaceae se reportaron solo en esta especie de orquídea. Del total de las secuencias detectadas en *O. pardinum* el 43% corresponden a Ascomycota, seguido del grupo de OTUs de Tulasnellaceae con un 35% y del grupo Ceratobasidiaceae con el 22%, no se tiene presencia de las OTUs de grupo Sebacinaceae para esta especie (Figura 15 y 16).

Dos fueron las OTUs de micobiontes compartidas entre las dos especies de orquídeas muestreadas, OTU3 y OTU8 de Tulasnellaceae y Ascomycota respectivamente, en la Figura 18 se muestra que la incidencia de hongos son exclusivas OTU1, OTU6 y OTU7 para *E. marsupiale* y para *O. pardinum* OTU2, OTU4 y OTU5.

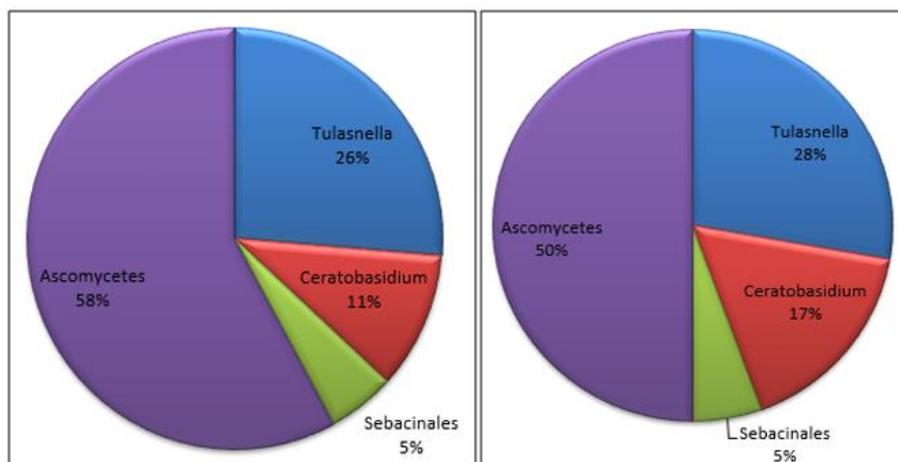
Figura 16: Comparación de los micobiontes reportados para las dos especies de orquídeas estudiadas en los sitios de muestreo



Fuente: Autores

En la comparación de OTUs de micobiontes de orquídeas entre los dos niveles altitudinales se obtuvo un total de seis OTUs para cada sitio. Siendo para los sitios bajos las OTUs: OTU1, OTU2 y OTU3 del grupo de Tulasnellaceae, OTU4 del grupo Ceratobasidiaceae, OTU7 del grupo Sebacinaceae y OTU8 de Ascomycota. Del total de las secuencias detectadas en las muestras para los sitios bajos el 58% corresponden a Ascomycota, seguido del grupo de Tulasnellaceae con un 26%, del grupo Ceratobasidiaceae con el 11% y del grupo Sebacinaceae con un 5% (Figura 17 y 18).

Figura 17: Porcentaje del número de micobiontes reportados para los dos niveles altitudinales de los bosques de Mazán y Llaviucu



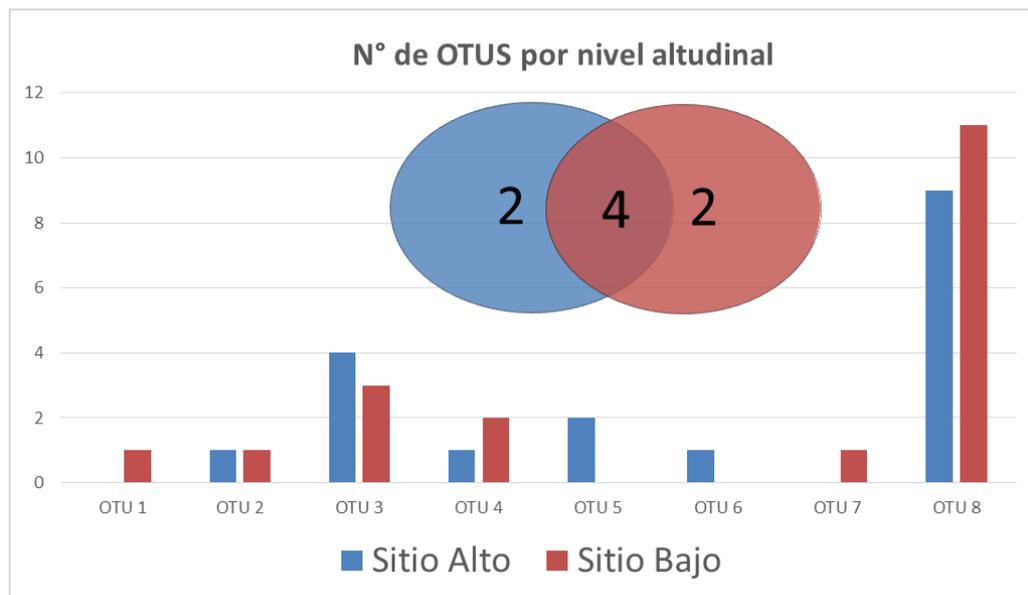
Fuente: Autores

Al lado izquierdo sitio bajo; Al lado derecho sitio alto.

Y para los sitios altos se reportó las OTUs: OTU2, OTU3 del grupo de Tulasnellaceae, OTU4, OTU5 del grupo Ceratobasidiaceae, OTU6 del grupo Sebacinaceae y OTU8 de Ascomycota. Del total de las secuencias detectadas en las muestras para los sitios altos el 50% corresponden a Ascomycota, seguido del grupo de OTUs de Tulasnellaceae con un 28%, del grupo Ceratobasidiaceae con el 17% y del grupo Sebacinaceae con un 5% (Figura 17 y 18).

Es importante recalcar que se reportó la OTU1 del grupo Tulasnellaceae y OTU7 del grupo Sebacinaceae solo para los sitios bajos de Mazán y Llaviucu. Y las OTU5 del grupo Ceratobasidiaceae y OTU6 del grupo Sebacinaceae solo para los sitios altos de Mazán y Llaviucu (Figura 18).

Figura 18: Comparación de los micobiontes reportados para los sitios alto y bajo de los bosques de Mazán y Llaviucu

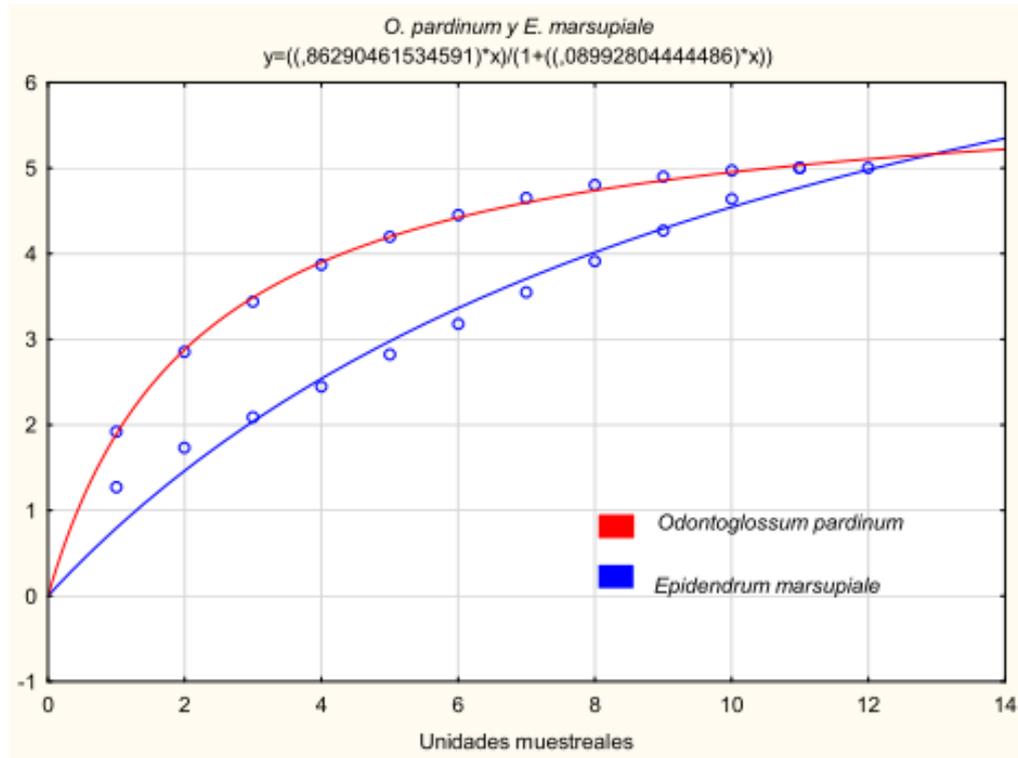


Fuente: Autores

Para el análisis de las curvas de acumulación de especies se consideró como unidades muestrales a los individuos de las dos especies de orquídeas estudiadas. Para la especie *Epidendrum marsupiale* la curva representada muestra que es necesario un mayor esfuerzo de muestreo (Figura 19), pues ésta no llega a la asíntota, por otro lado, en la especie *Odontoglossum pardinum* la pendiente de la curva, menor a 0.1, indica que el muestreo es significativo.

La proporción ideal de muestras calculada indica que para *E. marsupiale* se deberían obtener 211 muestras y para *O. pardinum* 42, y el porcentaje de especies registradas muestra un 52% y 83% respectivamente (Tabla 1).

Figura 19: Curvas de acumulación de las especies *Epidendrum marsupiale* y *Odontoglossum pardinum*



Fuente: Autores

Tabla 1: Curvas de acumulación para las especies *E. marsupiale* y *O. pardinum*.

Especies	Proporción de sp registradas	Esfuerzo muestreo (95%)	Asíntota	Pendiente
<i>E. marsupiale</i>	52 %	211	9.595499	0.21807311
<i>O. pardinum</i>	83 %	42	6.038423	0.06579243

Al comparar los sitios alto y bajo, el resultado del índice de Jaccard de 0.5 no demuestra una similitud o diferencia significativa entre la composición de OTUs de cada sitio, mientras que el resultado del índice de Sorensen de 0.66 evidencia una mayor tendencia a que la comunidad de OTUs entre altitudes sea más similar, se obtuvo iguales resultados al momento de comparar entre Mazán y Llaviucu.

Entre las especies *Epidendrum marsupiale* y *Odontoglossum pardinum* se obtuvo un resultado de 0.25 para el índice de Jaccard y 0.4 para el índice de Sorensen (Tabla 2) lo que evidencia una marcada diferencia en la composición de OTUs entre estas especies de orquídeas.

Tabla 2: Índices de similaridad calculados a nivel de especies, alturas y sitios

	Jaccard	Sorensen
Sitio alto vs. Sitio bajo	0.5	0.66
<i>E. marsupiale</i> vs. <i>O. pardinum</i>	0.25	0.4
Mazán vs. Llaviucu	0.5	0.66

Para comprobar si existen o no evidencias de una cierta tendencia o patrón en los hongos micorrízicos (OTUs) a escoger una u otra especie de orquídea se efectuó el test de Montecarlo. En este análisis se tomó en cuenta la OTU 8 de Ascomycota y la sumatoria de todas las OTUs presentes en *E. marsupiale* y *O. pardinum*, debido a que cada OTU por sí sola, a excepción de la OTU 8, no alcanzó una incidencia mayor al 20% que es una condición para aplicar este análisis.

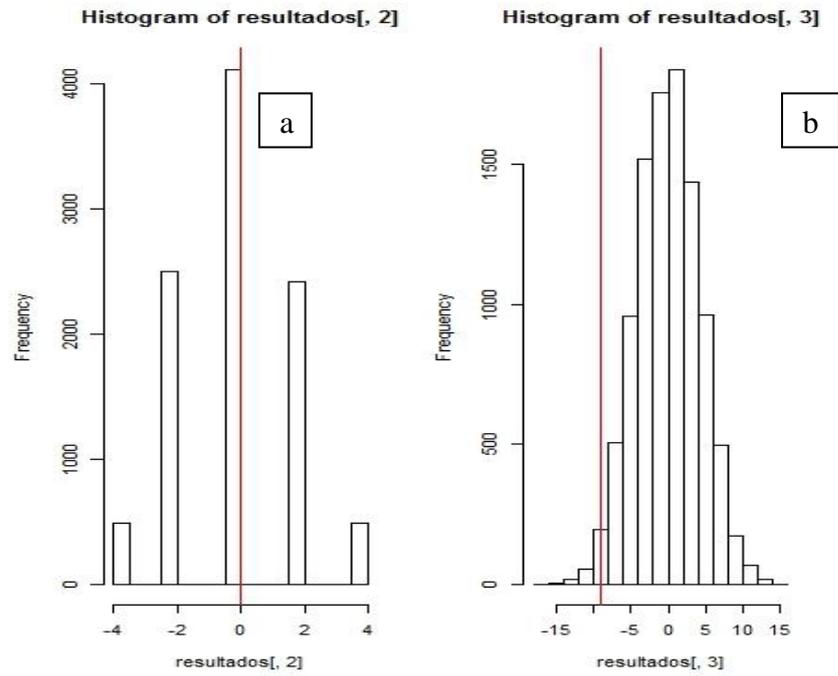
Con 10000 aleatorizaciones para la OTU8, el valor de significancia de p fue 0.7097 (Tabla 3), por lo que se acepta la hipótesis nula, en la que se consideró que los micobiontes no tienen preferencia hacia ninguna especie de orquídea (Figura 20a).

Tabla 3: Test de Montecarlo calculado para la OTU8 y para la Σ de todas las OTUs para las especies *E. marsupiale* y *O. pardinum*

<i>E. marsupiale</i> vs. <i>O. pardinum</i>	p
OTU 8	0.7097
Σ OTUs	0.0269

En la sumatoria de todas las OTUs reportadas para cada especie de orquídea, se obtuvo un valor de p de 0.0269 (Tabla 3), por lo que se acepta la hipótesis alternativa, en donde se plantea que existe evidencia de una tendencia a que los hongos micorrízicos se acumulen en una u otra especie de orquídea (Figura 20b).

Figura 20: Histograma de frecuencias representado para a) OTU8 perteneciente al grupo Ascomycota y b) \sum de OTUs para cada especie de orquídea muestreada.



Fuente: Autores

CAPÍTULO 3

3. DISCUSIÓN

Las especies se definieron a partir de Unidades Taxonómicas Operacionales OTUs, consideradas en muchas investigaciones al momento de definir especies a nivel molecular, tanto en organismos procariontes como eucariontes (Linde *et al.*, 2014; Herrera, 2012; Garnica *et al.*, 2012; Jones *et al.*, 2011), de otra manera resultaría muy complejo tener una aproximación a la diversidad de estos organismos (Herrera, 2012; Hibbett *et al.*, 2011).

Se utilizó la región ITS para la delimitación de las OTUs, no se descarta la idea que el uso de esta región podría sobreestimar o subestimar la diversidad de los hongos, ya que ésta es muy generalizada en el reino fungi (Schoch *et al.*, 2012). Por otro lado varios estudios demuestran que el uso de esta región es ampliamente utilizada en investigaciones que buscan dar una aproximación a la diversidad de la comunidad de hongos micorrízicos de orquídeas (e.g. Herrera, 2012; Kottke *et al.*, 2010; Suárez *et al.*, 2008) y si nos referimos a *Tulasnella*, ésta región provee un buen soporte filogenético para la delimitación de las especies (Linde *et al.*, 2014).

En cuanto a los umbrales de similitud para la determinación de OTUs, se consideró un umbral del 97% para Basidiomycota, tomando en cuenta, que generalmente, la variabilidad intra-específica de la región ITS fluctúa entre 0 y 3% (Ciardo *et al.*, 2006), la mayor parte de estudios que intentan delinear especies de micorrizas desde datos de secuencias de ITS consideran a éste umbral como una regla de oro (Linde *et al.*, 2014). Sin embargo estos niveles de variación de ITS pueden cambiar en algunas especies de hongos, estudios sugieren que se podría encontrar valores de ITS intra-específicos con una divergencia mayor al 3% (Nilsson *et al.*, 2008) como es el caso de *Tulasnella* (Taylor & McCormick 2008), por lo que, para este grupo se usó un umbral del 95% (e.g. Jacquemyn *et al.*, 2012; Herrera, 2012). Para Acomycetes se usó un umbral del 99%, debido a que en este grupo la región de ITS es muy conservada (Herrera *et al.*, 2010).

Las OTUs obtenidas en nuestro estudio pertenecen a los grupos Ascomycetes y Basidiomycetes, éste último incluye varios grupos de hongos formadores de asociaciones micorrízicas (Suárez et al., 2006), principalmente ligadas a la clase Agaricomycetes, de la cual obtuvimos tres grupos que han sido reportados como hongos micorrízicos de orquídeas epífitas: Ceratobasidiaceae (Martos et al., 2012; Graham and Dearnaley, 2012; Otero et al., 2002, 2004, 2007; Pereira et al., 2005), Tulasnellaceae (Martos et al., 2012; Kottke et al., 2008; Suárez et al., 2006) y Sebacinaceae (Martos et al., 2012; Suárez et al., 2008).

En este estudio se obtuvo una alta incidencia de Ascomycetes, representados con el 66% de las secuencias analizadas, lo que concuerda con estudios similares que reportan a este grupo de hongos como muy frecuentes (e.g. Kennedy et al., 2011; Rasmussen, 2002). Hasta el momento no existen evidencias de que este grupo de hongos haya sido reportado como micorrízico de orquídeas (Suárez et al., 2006), en algunos casos son considerados como hongos patógenos o necrotrofos de raíces (Kennedy et al., 2011), y en otros casos como ectomicorrízicos (Waterman et al., 2011), el hecho de que este grupo de hongos tenga reiteradas incidencias, se podrían ser considerados como hongos endófitos, por lo que su rol debe ser analizado con más atención (Julou et al., 2005).

Todas las secuencias analizadas del grupo Ascomycota, están ligadas a una única OTU (OTU8) perteneciente al orden Xylariales, esta alta incidencia definida en una sola especie reportada para todos los sitios y las especies estudiadas hace pensar, que probablemente, exista una relación más específica de estos hongos con las orquídeas epífitas, ya que este grupo es frecuentemente reportado en algunos estudios (e.g. Suárez et al., 2006), sin embargo hasta el momento no se ha probado experimentalmente o demostrado por ultraestructura que formen micorrizas con orquídeas (Suárez et al., 2006).

Las OTUs representantes de Tulasnellaceae fueron las más abundantes, lo que concuerda con los reportes de algunos estudios que señalan a esta familia como la más frecuente en orquídeas epífitas (Jacquemyn et al., 2013; Martos et al., 2012; Kottke et al., 2008; Suárez et al., 2006; McCormick et al., 2004), sugiriendo que *Tulasnella* podría ser el principal linaje de hongos implicados en la simbiosis de micorrizas de orquídeas (Martos et al., 2012).

Ceratobasidium también es un género de hongos micorrízicos comúnmente reportado para orquídeas epífitas (Dearnaley et al., 2012; Martos et al., 2012), en donde es probable que promuevan una relación simbiótica especialista con éstas (Graham & Dearnaley, 2012; Otero et al., 2004, 2007) en este estudio se observa una tendencia a que éste grupo de hongos tenga cierta preferencia hacia la especie *Odontoglossum pardinum*, aunque es necesario que esto sea corroborado con más estudios.

Ceratobasidium tiene una gran amplitud de nichos ecológicos, considerándose en algunos casos una especie parásita, en otros saprófita (Dearnaley et al., 2012; Smith & Read, 2008), e incluso es reportada en asociaciones ectomicorrízicas (Collier & Bidartondo, 2009), lo que lo hace un grupo clave para futuros estudios que experimenten los alcances de estos hongos en la conservación de las orquídeas (Otero et al., 2007) así como su potencial como biocontrolador (Mosquera et al., 2013).

Hasta el momento el género *Ceratobasidium*, refiriéndonos a ecosistemas tropicales, solo ha sido reportado en Brasil, Puerto Rico y Colombia (Pereira et al., 2005; Otero et al., 2007; Mosquera et al., 2010) aunque datos de microscopia electrónica sugerían su presencia en el Ecuador (Suárez et al., 2008). Este estudio aporta una evidencia clara de la presencia de este grupo de hongos probablemente como formadores de micorrizas en orquídeas epífitas en Ecuador.

Por último se obtuvo al grupo de OTUs de Sebacinacea, también reportado como micorrízico para orquídeas epífitas en el Ecuador (Setaro et al., 2012, Suárez et al., 2008), nuestros datos muestran que estos hongos presentan una baja frecuencia, lo que concuerda con estudios realizados en orquídeas y Ericaceas en nuestro país (Suárez et al., 2008) en donde este grupo no representa una alta diversidad en ecosistemas montanos y subandinos (Setaro et al., 2012; Garnica et al., 2012).

Se reporta a este grupo solo para la especie *Epidendrum marsupiale*, aunque no se tengan suficientes datos para sugerir que este grupo tenga una preferencia hacia esta especie de orquídea, estudios indican que éstos hongos son los primeros simbiosiontes micorrízicos en especies del orden Epidendrea, e incluso se los reporta como hongos conductores de carbón fotosintético en especies de este mismo orden (Kennedy et al., 2011).

Para evaluar el esfuerzo de muestreo se utilizaron curvas de acumulación, y de acuerdo con los resultados, las curvas no revelan una asíntota. Se denota la necesidad de un mayor esfuerzo de muestreo para lograr acercarnos a una diversidad óptima. La diversidad total posiblemente aumente con una mayor intensidad de muestreo, sin embargo al encontrar OTUs pertenecientes a tres principales grupos de especies formadoras de micorrizas de orquídeas (Taylor & McCormick, 2008; Dearnaley, 2007) podemos hablar de una diversidad notablemente alta (Pandey et al., 2013).

Las evidencias de los índices de Jaccard y Sorensen muestran que no hay similitud en la composición de hongos micorrízicos entre las dos especies en estudio, complementándose con los resultados del test de Monte Carlo, en donde se observa una tendencia de las OTUs a preferir una u otra especie de orquídea. Por otro lado, al considerar los sitios Mazán y Llaviucu, no se puede asumir con precisión si existe alguna posible variación en la composición de la comunidad de hongos encontrados, pero debido a que la mayoría de especies se encuentran presentes en cada uno de los sitios estudiados y considerando que éstos mantienen características ecosistémicas similares (Sierra, 1999) podemos decir que la composición de éstos hongos en todos los sitios sea la misma, y que esta diferencia este ligada de cierto modo a la predilección de las especies de orquídeas involucradas en este estudio.

En el caso de las altitudes, los índices de Jaccard y Sorensen no muestran resultados significativos para inferir si existe una diferencia en la composición de OTUs, además no se obtuvieron suficientes datos para dar una aproximación en donde se pueda concluir si existe un posible efecto del nivel altitudinal en la composición de los hongos micorrízicos. Sin embargo nuestros resultados inician los esfuerzos para comprender las interacciones entre orquídea-micobionte en los bosques siempre verdes montano altos del macizo del Cajas.

Se entiende que la necesidad de las orquídeas para desarrollarse principalmente en la etapa de germinación e incluso en la etapa adulta está ligada directamente con los hongos micorrízicos que la colonizan (Smith & Read, 2008; Peterson et al., 2004), siendo éstos generalistas o específicos (Otero et al., 2004, 2007; McCormick et al., 2004; Jacquemyn et al., 2010). Ésta premisa es la base para comprender la importancia de este tipo de investigaciones, que buscan entender el rol y el nivel de especificidad de la relación micobionte-orquídea (Dearnaley et al., 2012), teniendo

en cuenta que las relaciones específicas pueden ser más comunes de lo que hasta ahora se conoce (Mccormick et al., 2004), teniendo importantes consecuencias en la distribución y conservación de las orquídeas (Stöckel et al., 2014; Riofrío et al., 2013; Martos et al., 2012; Swarts & Dixon, 2009; Cribb et al. 2003).

Refiriéndonos específicamente a las orquídeas epífitas, se entiende que debido a las mayores limitaciones ambientales que tienen éstas en comparación con las orquídeas terrestres, como son: la poca disponibilidad de agua, nutrientes, irradiación, etc. (Dearnaley et al., 2012; Martos et al., 2012), la probabilidad de aumentar la frecuencia de las interacciones con micorrizas verdaderamente mutualistas se ve reflejada (Martos et al., 2012), manteniendo una estrecha relación con sus hospederos.

Las orquídeas estudiadas revelan una importante interacción con los hongos, debido a que la mayoría de los individuos de orquídeas tienen múltiples asociaciones con éstos, el 54% con más de una OTU presente. Son necesarios estudios sobre procesos de aislamientos y ensayos de germinación (Dearnaley, 2007), para poder determinar la diversidad total de éstos (Jacquemyn et al., 2013).

La distribución y composición de este tipo de hongos cumple un papel importante para las orquídeas, si existe una alteración en la comunidad de estos hongos, éstas podrían verse seriamente afectadas; se sabe poco y no se ha demostrado con certeza cuáles son los factores que impulsan la distribución de la mayoría de los micobiontes de orquídeas (McCormick et al., 2012). Entendemos entonces que su comprensión es fundamental para la conservación de muchas de éstas especies de plantas (Mccormick et al., 2012; Phillips et al., 2011; Swarts et al., 2010).

Con todas éstas características, finalmente se comprende que la relación entre la orquídea y el hongo es tan estrecha que en ella se encuentran inmersos una gran cantidad de variables, siendo las principales: estrés ambiental (Martos et al., 2012); procesos evolutivos (Rasmussen & Rasmussen, 2014); clima (McCormick et al., 2009) y las relaciones con polinizadores (Waterman et al., 2011). Razón por la cual se ve reflejada la necesidad de resolver estas complejas interacciones, en donde aún son necesarios muchos estudios que nos ayuden a entender el funcionamiento de los bosques en sus diferentes interacciones con las especies.

CONCLUSIONES

- Los datos no reflejan una influencia de la altitud en la composición de los hongos micorrízicos, más bien la diferencia se encuentra ligada a la preferencia de las especies de orquídeas estudiadas hacia éstos micobiontes.
- Se refleja una alta riqueza de micorrizas de orquídeas en este tipo de bosques, al reportar casi todos los grupos de éstos micobiontes: Tulasnellaceae, Sebacinaceae y Ceratobasidiaceae.
- Los resultados indican que tanto para *Odontoglossum pardinum* como para *Epidendrum marsupiale* existen hongos específicos, Ceratobasidiaceae y Sebacinaceae respectivamente.
- Los *primers* universales para eucariotas ITS1-TW14 para la amplificación del DNA mediante PCR, dieron buenos resultados, detectando la mayoría de estos micobiontes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. 1997. Gapped BLAST and PSI-Blast: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. Vol. 25; pp 3389–3402.

BIRDLIFE INTERNATIONAL. 2013. Important Bird Areas factsheet: Cajas-Mazán. [En línea] <http://www.birdlife.org>; consulta: 05 de Abril del 2013.

BRUNDRETT, M. 2007. Scientific approaches to Australian temperated terrestrial orchid conservation. *Australian Journal of Botany*. Vol. 55; pp. 293-207

C.M.A.O.T. Consejería de Medio Ambiente Ordenación y Territorio; Junta De Andalucía. Generalidades de las Orquídeas. [En Línea] <http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/portalweb> Consultado: el 31 de Enero 2014.

CAÑADAS, L. 1983. El mapa bioclimático y ecológico del Ecuador. Banco Central del Ecuador. 210 pp.

CARBALE, B. 1989. An assessment of biological diversity and tropical forest for Ecuador. The Center for International Development and Environment of the World Resources Institute. Washington D.D.

CHAO, A., Chazdon, R., Colwell, R. & Shen, T. 2005. A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecology Letters*. Vol. 8; pp 148–159.

CIARDO, D., Schär, G., Böttger, EC., Altwegg, M. & Bosshard, PP. 2006. Internal transcribed spacer sequencing versus biochemical profiling for identification of medically important yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 44; pp. 77–84.

COLLIER, F. & Bidartondo, M. 2009. Waiting for fungi: the ectomycorrhizal invasion of lowland heathlands. *Journal Ecology*. Vol. 97; pp. 950–963.

COLWELL, R. K. 2013. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 9. [En Línea] www.purl.oclc.org/estimates.

- CRIBB**, P.J., Kell, S., Dixon, K. & Barrett, R. 2003. Orchid conservation: a global perspective.
- CULLINGS**, K. 1994. Molecular phylogeny of the Monotropoideae (Ericaceae) with a note on the placement of the Pyroloideae. *Evolutionary Biology*. Vol. 7; pp 501–516.
- DARWIN**, C. 1888. The various contrivances by which orchids are fertilized by insects. John Murray, London.
- DEARNALEY**, D. W. 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. *Journal Mycorrhiza*. Vol. 17; pp. 475-486.
- DEARNALEY**, J., Martos, F. & Selosse, M. 2012. Orchid Mycorrhizas: Molecular Ecology, Physiology, Evolution and Conservation Aspects. Fungal Associations, 2^{da} Edition. The Mycota IX
- DODSON**, D. & Frymire, G. 1961. Natural pollination of orchids. Missouri Botanical Garden.
- ECUADOR MEGA DIVERSO**. 2011. El reino de las orquídeas. [En línea] <http://ecuadormegadiverso.wordpress.com/2011/05/23/el-reino-de-las-orquideas/>
Consulta: 27 de Enero del 2014.
- ETAPA**, Empresa Pública Municipal de Teléfonos, Agua Potable y Alcantarillado. 2005. Plan de manejo integral del Parque Nacional Cajas. Aprobado vía acuerdo ministerial el 1 de abril del 2005.
- GARNICA**, S., Riess, K., Bauer, R., Oberwinkler, F. & Weiß, M. 2012. Phylogenetic diversity and structure of sebacinoid fungi associated with plant communities along an altitudinal gradient. *FEMS Microbiol Ecol*. Vol 83.
- GÖKER**, M., García-Blázquez, G., Voglmayr, H., Tellería, M. & Martín, M. 2009. Molecular Taxonomy of Phytopathogenic Fungi: A Case Study in Peronospora. *PLoS ONE* Vol. 4.
- GONZÁLES**, J., De la Fuente, A., Hernández, L., Buzo, D. & Bonache, C. 2010. Evaluación de estimadores no paramétricos de la riqueza de especies. Un ejemplo con aves en áreas verdes de la ciudad de Puebla, México. *Animal Biodiversity and Conservation*. Vol. 33; pp 31–45.

- GRAHAM, R.** & Dearnaley, J. 2012. The rare Australian epiphytic orchid *Sarcochilus weinthalii* associates with a single species of *Ceratobasidium*. *Fungal Diversity*. Vol. 54; pp. 31–37.
- HERRERA, P.** 2012. Diversidad molecular de MOTUs de Tulasnellales en orquídeas epífitas y terrestres en un bosque tropical montano lluvioso del sur de Ecuador. Trabajo fin de Máster. Universidad Rey Juan Carlos. Madrid, España.
- HERRERA, P.,** Suárez, 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*. Vol.1.
- HIBBETT, D.,** Ohman, A. & Glotzer, D. 2011. Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal biology reviews*. Vol. 25; pp. 38-47.
- HUGHES, K.,** Petersen, R. & Lickey, E. 2009. Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental species delimitation across basidiomycete fungi. *New Phytologist*. Vol. 182; pp 795–798.
- IUCN** International Union for Conservation of Nature. 2012. Why are Orchids important? [En línea] <http://www.iucn.org> Consulta: 04 de Abril del 2013.
- JACQUEMYN, H.,** Brys, R., Merckx, V., Waud, M., Lievens, B. & Wiegand, T. 2013. Coexisting orchid species have distinct mycorrhizal communities and display strong spatial segregation. *New Phytologist*.
- JACQUEMYN, H.,** Deja, A., De Hert, K., Bailarote, B.C. & Lievens, B. 2012. Variation in mycorrhizal associations with tulasnelloid fungi among populations of five *Dactylorhiza* species. PLoS ONE.
- JACQUEMYN, H.,** Honnay, O., Cammue, B., Brys, R. & Lievens, B. 2010. Low specificity and nested subset structure characterize mycorrhizal associations in five closely related species of the genus *Orchis*. *Molecular Ecology*. Vol. 19; pp 4086–4095.
- JIMÉNEZ, A.** & Hortal, J. 2003. Las curvas de acumulación de especies y la necesidad de evaluar la calidad de los inventarios biológicos. *Revista Ibérica de Aracnología*. Vol. 8; pp 151 – 161.

- JONES, M., Ghoorah, A. & Blaxter, M.** 2011. jMOTU and Taxonator: Turning DNA Barcode Sequences into Annotated Operational Taxonomic Units. *PLoS ONE*. Vol. 6. e19259.
- JUÁREZ, L., Montaña, C. & Franco, M.** 2014. The viability of two populations of the terrestrial orchid *Cyclopogon luteoalbus* in a fragmented tropical mountain cloud forest: Dormancy delays extinction. *Biological Conservation*. Vol. 170; pp 162–168.
- JULOU, T., Burghardt, B., Gebauer, G., Berveiller, D., Damesin, C. & Selosse, M.** 2005. Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytologist*. Vol. 166; pp. 639–653
- KATOH, K., Misawa, K., Kuma, K. & Miyata, T.** 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast fourier transform. *Nucleic Acids Research*. Vol. 30; pp 3059–3066.
- KENNEDY, A., Taylor, D. & Watson, L.** 2011. Mycorrhizal specificity in the fully mycoheterotrophic *Hexalectris* Raf. (Orchidaceae: Epidendroideae). *Molecular Ecology*. Vol. 20; pp. 1303–1316.
- KLEINSY, B.** 2013. Ecuador, país mega diverso. Revista ñ, el punto de encuentro entre Korea y el mundo hispano. [En línea] <http://www.revistancorea.com/uncategorized/ecuador-pais-mega-diverso/> Consulta: 27 de Enero del 2014.
- KOTTKE, I., Haug, I., Setaro, S., Suárez, J., Weiß, M., Preußing, M., Nebel, M. & Oberwinkler, F.** 2008. Guilds of mycorrhizal fungi and their relation to trees, ericads, orchids and liverworts in a neotropical mountain rain forest. *Basic and Applied Ecology*. Vol. 9; pp. 13–23.
- 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. *Biological Sciences*. Vol. 277; pp 1289–1298.
- KRÜGER, M., Stockinger, H., Krüger, C. & Schüßler, A.** 2009. DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. Vol. 183; pp 212–223.

- LINDE**, C., Phillips, R., D. Crisp, M. & Peakall, R. 2014. Congruent species delineation of *Tulasnella* using multiple loci and methods. *New Phytologist*. Vol. 201; pp. 6-12.
- LIU**, H., Luo, Y. & Liu, H. 2010. Studies of Mycorrhizal Fungi of Chinese Orchids and Their Role in Orchid Conservation in China. *The New York Botanical Garden*. Vol. 76; pp 241–262.
- MANLY**, F. 1997. Randomization bootstrap and Monte Carlo methods in biology. 2nd edn. London: Chapman & Hall.
- MARMOREK**, D., Roe, N., Ortiz, F., Landaruri, H. & Lekstrum, T. 1991. A profile of Ecuador environmental problems and possible remedies. Prepared by ESSA Ltd. Vancouver. B.C. and Nicholas Roe & Associates Ltd. Calgary, Alberta for Andean Desk, Canadian International Development Agency, Hull, Quebec, 180p.
- MARTOS**, F., Muñoz, F., Pailler, T., Kottke, I., Gounneau, C. & Selosse, A. 2012. The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. *Molecular Ecology*.
- MCCORMICK**, M. K.; Whigham, D. F. & O'Neill, J. 2004. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *Journal New Phytologist*. Vol. 163; pp. 425–438.
- MCCORMICK**, M., Taylor, L., Juhaszova, K., Burnett, R., Whigham, D. & O'Neill, J. 2012. Limitations on orchid recruitment: not a simple picture. *Molecular Ecology*. Vol. 21; pp. 1511–1523
- MCCORMICK**, M., Whigham, D., O'Neill, J., Becker, J., Erner, S., Rasmussen, H., Runs, T. & Taylor, L. 2009. Abundance and distribution of *Corallorhiza odontorhiza* reflect variations in climate and ectomycorrhizae. *Ecological Monographs*. Vol. 79; pp. 619–635.
- MEDHI**, R. & Chakrabarti, S. 2009. Traditional Knowledge of NE people on conservation of wild orchids. *Indian Journal of Traditional Knowledge*. Vol. 8; pp 11-16.
- MONTESINOS**, F. 1996. Árboles y arbustos del bosque de Mazan. Tomo I. ETAPA. Empresa Pública Municipal de Teléfonos, Agua Potable y Alcantarillado.

- MOSQUERA, A.**, Bayman, P. & Otero, T. 2010. Ceratobasidium como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia. *Acta agronómica*. Vol. 59; pp. 316-326.
- MOSQUERA, A.**, Bayman, P., Prado, G., Gómez, A. & Otero, T. 2013. The double life of Ceratobasidium: orchid mycorrhizal fungi and their potential for biocontrol of *Rhizoctonia solani* sheath blight of rice. *Micologia*. Vol. 105; pp. 141-150
- NILSSON, RH.**, Kristiansson, E., Ryberg, M., Hallenberg, N. & Larsson, KH. 2008. Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics*. Vol. 4; pp. 193–201.
- OTERO, T.**, Ackerman, J. & Bayman. 2002. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*. Vol. 89; pp. 1852–1858.
- OTERO, T.**, Ackerman, J. & Bayman. 2004. Diversity in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology*. Vol. 13; pp. 2393–2404
- OTERO, T.**, Flanagan, N., Herre, A., Ackerman, J. & Bayman, P. 2007. Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (orchidaceae). *American Journal of Botany*. Vol. 94; pp. 1944–1950.
- PANDEY, M.**, Sharma, J., Taylor, D. & Yadon, V. 2013. A narrowly endemic photosynthetic orchid is non-specific in its mycorrhizal associations. *Molecular Ecology*.
- PEREIRA, OL.**, Kasuya, M., Borges, AC. & de Araujo, EF. 2005. Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. *Canadian Journal of Botany*. Vol. 83; pp. 54–65.
- PETERSON, R.** & Massicotte, H. 2004. Exploring structural definitions of mycorrhizas, with emphasis on nutrient-exchange interfaces. *Canadian Journal of Botany*. Vol. 82; pp. 1074 -1088.
- PETERSON, R.**, Massicotte, H. & Melville, L. 2004. *Mycorrhizas: Anatomy and cell biology*. Canadá.

PHILLIPS, R., Barrett, M., Dixon, K. & Hopper, S. 2011. Do mycorrhizal symbioses cause rarity in orchids? *Journal of Ecology*. Vol. 99; pp 858–869.

R Core Team. 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [En línea] <http://www.R-project.org> Consultado: 8 de julio 2014.

RAMBAUT, A. 1996. Se-AL: Sequence Alignment Editor ver. 2.0. Program distributed by the author. Department of Zoology, University of Oxford, Oxford. [En línea] <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>. Consultado: 19 de junio 2014.

RASMUSSEN, H. & Rasmussen, F. 2014. Seedling mycorrhiza: a discussion of the origin and evolution in Orchidaceae. *Botanical Journal of Linnean Society*.

RASMUSSEN, N. 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Journal Plant and Soil*. Vol. 244; pp. 149–163.

RENGEL, A. 2004. Conservación de cuencas hídricas: Adquisición del territorio: Una alternativa de conservación de las cuencas hídricas, Caso Mazán. PROMAS. Universidad de Cuenca, Ecuador.

RIOFRÍO, M., Cruz, D., Torres, E. De la Cruz, M., Iriondo, J. & Suárez, J. 2013. Mycorrhizal preferences and fine spatial structure of the epiphytic orchid *Epidendrum rhopalostele*. *American Journal of Botany*. Vol. 100; pp 2339–2348.

ROBERT, P. & Casella, G. 2010. Introducing Monte Carlo Methods with R. EEUU. Editorial Springer.

RODAS, F.; Contreras, X. & Tinoco, B. 2005. Aviturismo. Rutas del Austro. Ministerio de Turismo. Cuenca, Ecuador.

SCHOCH, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J., Levesque, C. & Chen, W. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* Vol. 109; pp. 6241–6246.

SETARO, S., Garnica, S., Herrera, P., Suárez, J & Göker, M. 2012. A clustering optimization strategy to estimate species richness of Sebacinales in the tropical Andes based on molecular sequences from distinct DNA regions. *Biodivers Conserv*. Vol. 21; pp. 2269–2285

- SIERRA, R.** 1999. Propuesta preliminar de un sistema de clasificación de vegetación para el Ecuador Continental. Proyecto INEFAN/GEF-BIRF y EcoCiencia. Quito, Ecuador. pp. 194.
- SMITH, E. & Read, J.** 2008. Mycorrhizal symbiosis. Third Edition. Elsevier. New York. pp. 769.
- SOBERÓN, J. & Llorente, J.** 1993. The use of species accumulation functions for the prediction of species richness. *Conservation Biology*. Vol. 7; pp 480-488.
- STÖCKEL, M., Tesitelová, T., Jersáková, J., Bidartondo, M. & Gebauer, G.** 2014. Carbon and nitrogen gain during the growth of orchid seedlings in nature. *New Phytologist*.
- SUÁREZ, J., 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. *Mycol Prog*. Vol. 7; pp. 75 – 85.
- SUÁREZ, 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*. Vol. 110; pp 1257-1270.
- SWARTS, N. & Dixon, K.** 2009. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. Faculty of Natural and Agricultural Science. University of Western Australia. *Annals of Botany*. Vol. 104; pp 543–556.
- SWARTS, N., Sinclair, E., Francis, A. & Dixon, K.** 2010. Ecological specialization in the orchid mycorrhizal interaction leads to rarity in the endangered terrestrial orchid *Caladenia huegleii*. *Molecular Ecology*. Vol. 19; pp 3226–3242.
- SWOFFORD, D.** 2002. Paup* phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland.
- TAYLOR, D. & McCormick, M.** 2008. Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytologist*. Vol. 177; pp. 1020–1033
- THE PLANT LIST.** 2010. The plant list, ver. 1. [En línea] <http://www.theplantlist.org>. Consulta: 01 de Abril del 2013.

VAN DEN BERG, C., Goldman, D., Freudenstein, J., Pridgeon, A., Cameron, K. & Chase, M. 2005. An overview of the phylogenetic relationships within epidendroideae inferred from multiple dna regions and recircumscription of epidendreae and arethuseae (orchidaceae). *American Journal of Botany*. Vol 92; pp. 613–624.

VAN DER HEIJDEN, M., Klironomos, J, Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A. & Sanders, I.R. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*. Vol. 396; pp 69-72.

VILLAREAL, H., Álvarez, M., Córdova, S., Escobar, F., Fagua, G. Gast, F., Mendoza, H., Ospina, M. & Umaña, A. 2006. Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad. Programa de Inventarios de Biodiversidad. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia. 236 p.

WALTHER, B. & Morand, S. 1998. Comparative performance of species richness estimation methods. *Parasitology*. Vol. 116; pp 395–405.

WATERMAN, R., Bidartondo, M., Stofberg, J., Combs, J., Gebauer, G., Savolainen, V., Barraclough, T. & Pauw, A. 2011. Defects of above and below ground mutualism on orchid speciation and coexistence. *American Naturalist*. Vol. 177; pp. 54-68.

WHITE, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.

ZETTLER, L. 1997. Terrestrial orchid conservation by symbiotic seed germination: techniques and perspectives. *Selbyana* Vol. 18; pp 188–194.

ANEXOS

Anexo 1: Secuencias con mayor similitud en la región ITS-5.8S nrDNA de hongos micorrízicos obtenidas de la búsqueda en el GenBank.

Código	Código Organismo relacionado (Blast)	Orden	Código de acceso (GenBank)	Similitud
1102b1	Daldinia	Xylariales	FJ890375.1	99%
1103c1	Daldinia childiae	Xylariales	EF562505.1	96%
1103c13	Sordariomycetes sp.	Xylariales	JQ758777.1	94%
1100a15	Uncultured Tulasnellaceae	Cantharellales	DQ925494.1	94%
1100a17	Uncultured Tulasnellaceae	Cantharellales	DQ925494.1	94%
1100a7	Uncultured Cantharellales	Cantharellales	DQ368714.1	93%
1130i9	Uncultured Cantharellales	Cantharellales	HM451595.1	100%
1197q14	Uncultured Tulasnellaceae	Cantharellales	DQ925494.1	94%
1197q28	Uncultured Tulasnellaceae	Cantharellales	DQ925495.1	95%
1224b1	Uncultured Cantharellales	Cantharellales	DQ368712.1	93%
1224c4	Uncultured Tulasnellaceae	Cantharellales	DQ925494.1	94%
1224c3	Uncultured Tulasnellaceae	Cantharellales	DQ925494.1	94%
1231d7	Uncultured Cantharellales	Cantharellales	HM451583.1	99%
1255 e 16	Uncultured Cantharellales	Cantharellales	HM451583.1	99%
1255 e 25	Uncultured Cantharellales	Cantharellales	HM451554.1	99%
1204r6	Uncultured Ceratobasidiaceae	Cantharellales	JQ972117.1	91%
1216s21	Ceratobasidium sp.	Cantharellales	KC336073.1	98%
1216s22	Ceratobasidium sp.	Cantharellales	GQ405535.1	92%
1216s23	Ceratobasidium sp.	Cantharellales	KC336073.1	98%
1227c5	Uncultured Ceratobasidiaceae	Cantharellales	JF449643.1	91%
1227c8	Ceratobasidium sp.	Cantharellales	KC336073.1	97%
1216s30	Ceratobasidium sp.	Cantharellales	GQ405535.1	93%
1264o12	Ceratobasidium sp.	Cantharellales	KC336073.1	98%
1264o32	Ceratobasidium sp.	Cantharellales	KC336073.1	98%
1264o35	Ceratobasidium sp.	Cantharellales	KC336073.1	98%
1264o44	Uncultured Ceratobasidiaceae	Cantharellales	JF449643.1	89%
1122f15	Uncultured Sebaciales	Sebaciales	HM451821.1	92%
1122f2	Uncultured Sebaciales	Sebaciales	HM451821.1	98%
1138k18	Uncultured Sebaciales	Sebaciales	HM451799.1	99%