

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y DE LAS SECUENCIA ITS DE
AISLAMIENTOS DE HONGOS ASOCIADOS A RAÍCES DE ORQUÍDEAS EN LA
REGIÓN DEL SUMAPAZS**



**LAURA DANIELA VARGAS RAYO
ANA MARÍA VICTORINO MANRIQUE**

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar el título de:

Ingeniero Agrónomo

**UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
INGENIERÍA AGRONÓMICA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN PROSAFIS
COLOMBIA, FUSAGASUGÁ
2015**

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y DE LAS SECUENCIA ITS DE AISLAMIENTOS DE HONGOS
ASOCIADOS A RAÍCES DE ORQUÍDEAS EN LA REGIÓN DEL SUMAPAZ

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y DE LAS SECUENCIA ITS DE
AISLAMIENTOS DE HONGOS ASOCIADOS A RAÍCES DE ORQUÍDEAS EN
LA REGIÓN DEL SUMAPAZ**

**LAURA DANIELA VARGAS RAYO
ANA MARÍA VICTORINO MANRIQUE**

Director

CESAR ALFONSO ARIZA CASTILLO

Ing. Agrónomo cM.Sc Ciencias Agrarias con énfasis en Fitomejoramiento
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
INGENIERÍA AGRONÓMICA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN PROSAFIS
COLOMBIA, FUSAGASUGÁ
2015**

AGRADECIMIENTOS

Al Grupo de Investigación PROSÁFIS, semillero SEMINAC de la Universidad de Cundinamarca.

Al laboratorio de microbiología de la Universidad de Cundinamarca sede Fusagasugá, por brindarnos el espacio para desarrollar cada uno de los ensayos y procedimientos y su encargado Alberto Suarez por su colaboración y disposición.

Gracias a los docentes Cesar Alfonso Ariza y Paola Moreno por su gran disposición, asesoría, por los conocimientos brindados y continuo apoyo durante el desarrollo de todo el trabajo de grado.

A nuestras familias por impulsarnos para cumplir nuestras metas y ser la columna de cada decisión tomada.

A quien nos colaboraron de alguna manera en procedimientos de laboratorio: David Vargas, Sebastián Daza, Milena Santos, Tatiana Moran, Silvia Espinosa y Felipe Victorino.

DEDICATORIA

A mis padres José Mario Victorino Acosta y Doris Manrique Sánchez por su apoyo, dedicación y amor que me dieron para culminar mis sueños

A Sebastián Daza Yate por su amor, apoyo, dedicación y compañía en todos los momentos para así llegar a culminar mi sueño. A mis hermanos porque son mi ejemplo a seguir de dedicación, aprendizaje y amor

A Dios por concedernos la sabiduría para culminar con este proyecto

Ana María Victorino Manrique

A mi familia y mis padres Pedro Vargas y Aide Rayo por ser la guía en mi camino y apoyo

A mis hermanos por la colaboración constate

A Paola Duque por su orientación y acompañamiento

Laura Daniela Vargas Rayo

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS.....	5
LISTA DE TABLAS	6
LISTA DE GRAFICAS.....	7
LISTA DE ANEXOS.....	8
RESUMEN.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	10
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	11
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo general.....	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3. MARCO REFERENCIAL.....	11
3.1 ORQUÍDEAS.....	13
3.1.1 Bio-ecología y clasificación taxonómica de las orquídeas.....	13
3.1.2 Características y tipos de orquídeas.....	14
3.1.3 Germinación y relación simbiótica en orquídeas.....	16
3.1.4 Las orquídeas en Colombia y en la región del Sumapaz.....	17
3.2 HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS Y ENDÓFITOS EN ORQUÍDEAS.....	18
3.2.1 Importancia y tipos de micorrizas.....	19
3.2.2 Reportes de hongos formadores de micorrizas orquidoideas.....	21
3.3 El complejo <i>Rhizoctonia</i>	24
3.3.1 Bioecología y clasificación taxonómica del complejo <i>Rhizoctonia</i>	24
3.3.2 Descripción macroscópica y microscópica de <i>Rhizoctonia</i>	25
3.3.3 Grupos de Anastomosis.....	29
3.4 Identificación Molecular.....	31
4. METODOLOGÍA.....	27
4.1 Colecta y muestreo de raíces de orquídeas en la reserva natural Quinini y Parque natural San Rafael.....	32
4.2 Siembra y aislamiento de hongos asociados a orquídeas.....	32
4.3 Aislamiento monomicelial.....	33
4.4 Extracción de ADN, PCR y secuenciación de las muestras.....	33
4.5 Identificación por secuenciación y construcción del árbol filogenético.....	34
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	35
5.1 Orquídeas muestreadas.....	35
5.2 Caracterización macroscópica de las muestras.....	36
5.3 Caracterización microscópica de las muestras.....	38
5.4 Análisis y comparación de las secuencias obtenidas.....	41

5.5	Árbol filogenético.....	51
6.	CONCLUSIONES	54
7.	RECOMENDACIONES	54
8.	BIBLIOGRAFÍA	55

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Orquídea reserva natural San Rafael fotografía	13
Figura 2 Raíz de orquídea (Tomado de Manual para la propagación de orquídeas, 2011).....	14
Figura 3 Raíz de orquídea (Tomado de Manual para la propagación de orquídeas, 2011)	15
Figura 4 Descripción hoja de orquídea. (Tomado de Manual para la propagación de orquídeas, 2011).....	15
Figura 5 Fruto y semilla de orquídeas (Tomado de Manual para la propagación de orquídeas, 2011).....	16
Figura 6 Formas florales y su disposición (Tomado de Manual para la propagación de orquídeas, 2011)	16
Figura 7 Clasificación de las micorrizas. Tomado y adaptado de (Read, 1999).....	24
Figura 8 Fotografía microscópica tomada por Reggio Emilia.....	26
Figura 9 Crecimiento de <i>Rhizoctonia</i> tipo I Tomado de IDESIA,2005.....	26
Figura 10 Crecimiento de <i>Rhizoctonia</i> tipo II Tomado de IDESIA,2005.....	26
Figura 11 Crecimiento de <i>Rhizoctonia</i> tipo III Tomado de IDESIA,2005.....	26
Figura 12 Crecimiento de <i>Rhizoctonia</i> tipo IV Tomado de IDESIA,2005.....	26
Figura 13 Esclerocios <i>Rhizoctonia</i> en PDA. Tomada de Nigel Cattlin.....	27
Figura 14 (a) Células monilioides, (b) Núcleos de hifas, (c) Núcleos de hifas en células monilioides. Tomadas de González, 2008.....	28
Figura 15 Corte transversal de la raíz de orquídeas (a) Velamen, (b) Cortex donde se observa pelotones 40X, (c) Pelotones viables y consumidos 100X. Tomada de Mosquera y Espinosa, 2008.....	29
Figura 16 Anastomosis en <i>Rhizoctonia</i> . Tomada de Otero, 2010.....	57
Figura 17 Muestra SRM1. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.....	57
Figura 18 Muestra SRM2. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.....	57
Figura 19 Muestra SRM3. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.....	58
Figura 20 Muestra SRM4. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.....	58
Figura 21 Muestra SRM5. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.....	58
Figura 22 Muestra SRM6. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.....	59
Figura 23 Muestra QiM1. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.....	59
Figura 24 Muestra QiM2. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.....	59
Figura 25 Muestra QiM3. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.....	59
Figura 26 Muestra QiM4. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.....	59
Figura 27 Muestra QiM5. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.....	59
Figura 28 Muestra QiM6. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.....	59
Figura 29 Muestra QiM7. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.....	60

Muestra QiM8. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.....60

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Clasificación taxonómica de orquídeas.....	13
Tabla 2 Clasificación taxonómica de <i>Rhizoctonia</i>	28
Tabla 3 Textura del micelio	37
Tabla 4 Color del micelio.....	38
Tabla 5 Tipo de crecimiento del micelio.....	39
Tabla 6 Formación de T.....	40
Tabla 7 Constricción de la hifa.....	40
Tabla 8 Células monilioides: cantidad de muestras presentes o ausentes.....	41
Tabla 9 Comparación de secuencias.....	41
Tabla 10 Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra UDECQiHR4_2 con la base de datos universal del GenBank.....	42
Tabla 11 Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra UDECQiHR4_2 con la base de datos universal de <i>Rhizoctonia</i>	42
Tabla 12 Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra UDECQiR1-2 con la base de datos universal del GenBank.....	43
Tabla 13 Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra UDECQiR1-2 con la base de datos de <i>Rhizoctonia</i>	43
Tabla 14 Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra UDECQiHR1-B con la base de datos universal del GenBank.....	44
Tabla 15 Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra UDECQiHR1-B con la base de datos de <i>Rhizoctonia</i>	44
Tabla 16 Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra UDECQiP13 con la base de datos universal del GenBank.....	45
Tabla 17 Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra SRM3R1-2 con la base de datos universal del GenBank.....	45
Tabla 18 Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra SRM3R1-2 con la base de datos de <i>Rhizoctonia</i>	46
Tabla 19 Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra SRM3R3-4 con la base de datos universal del GenBank.....	46
Tabla 20 Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra SRM3R3-4 con la base de datos de <i>Rhizoctonia</i>	47
Tabla 21 Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra SRM6R1-2 con la base de datos universal del GenBank.....	48
Tabla 22 Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra SRM6R1-2 con la base de datos de <i>Rhizoctonia</i>	48
Tabla 23 Porcentaje de identidad	52
Tabla 24 Porcentaje de identidad frente a <i>Rhizoctonia</i>	53

LISTA DE GRAFICAS

Grafica 1 Características de <i>Rhizoctonia</i>	27
Grafica 2 Diámetro del micelio.....	35
Grafica 1. Textura del micelio: tipo algodonosa y felposa.....	36
Grafica 2. Color del micelio.....	37
Grafica 3. Tipo de crecimiento del micelio.....	37
Grafica 4. Formación de T: presencia o ausencia.....	38
Grafica 5. Constricción: presencia o ausencia.....	39
Grafica 6. Células moniloides: presentes o ausentes.	40
Grafica 7. Árbol filogenético de las muestras	51
Grafica 8. Árbol filogenético secuenciado frente a muestra testigo (<i>Rhizoctonia</i>).....	52

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 Orquídeas muestreadas en la Reserva Natural San Rafael.....	57
Anexo 2 Características macroscópicas.....	61
Anexo 3 Características microscópicas.....	65
Anexo 4 Resultados de la comparación de la secuencia problema N° 3 contra la base de datos UNITE.....	67
Anexo 5 Alineamiento de secuencias multiple con muestra tetigo (<i>Rhizoctonia</i>).....	68
Anexo 6 Alineamiento de secuencias multiple.....	69

RESUMEN

Las semillas de orquídeas son polvosas y carentes de endospermo, por tal razón tienen pocas reservas energéticas para su germinación y establecimiento en medio natural. Con el fin de caracterizar morfológicamente y las secuencias ITS de aislamientos de hongos asociados a raíces de orquídeas en la región del Sumapaz, y Construir un árbol filogenético entre los aislamientos obtenidos de los hongos asociados a las raíces de orquídeas.

Se georeferenciaron y colectaron raíces de orquídeas sin identificar de diferentes hábitos biológicos. Colectadas en la Reserva Natural San Rafael y Parque Natural Quinini. Se caracterizó macroscópicamente y microscópicamente las muestras, los microorganismos aislados se identificaron hasta género. Por medio de cultivos monomiceliales se obtuvieron cepas genéticamente puras. Estos cultivos fueron procesados molecularmente y a partir de la extracción de ADN, y finalmente se secuenciaron las muestras. Por medio de cromatogramas se estableció la secuencia consenso y se construyeron árboles filogenéticos a través de un alineamiento de secuencias múltiple.

Morfológicamente se identificó *Rhizoctonia* sp bajo características microscópicas como la formación de «T», constricción en la bifurcación hifal. Por lo tanto se puede decir que con base en las características macroscópicas y microscópicas se tiene la presencia del género *Rhizoctonia*, aunque molecularmente las muestras presentan diferentes hongos como son: *Neofusicocum Parvum*, *Alternaria Alternata*, *Pleurotus sp*, *Bipolaris*.

Se concluyó que las orquídeas que se encuentran en la Reserva Natural del Quinini y el Parque Natural San Rafael generalmente presentan microorganismos fúngicos asociados a las raíces de las orquídeas. Se aislaron hongos con características morfológicas macroscópicas y microscopias, correspondientes al género *Rhizoctonia*. Al comparar las secuencias obtenidas con la base de datos del GenBank se encontró *Neofusicocum Parvum*, *Alternaria alternata*, *Pleurotus sp*. y *Bipolaris sp*. El árbol filogenético del alineamiento de las secuencias mostro que las muestras de *Alternaria alternata* son muy cercanas genéticamente y que las dos muestras de *Bipolaris sp* son muy cercanas genéticamente lo cual indico que si representan el mismo género. A pesar de que estas secuencias tienen un menor porcentaje de identidad con *Rhizoctonia* que es el hongo formador de micorriza orquidoide mas reportado, según las características microscópicas que presentaron si correspondía a este género.

1. INTRODUCCIÓN

Colombia es un país biodiverso, en cultura, fauna y flora. Dentro de estos factores es importante destacar la gran diversidad de orquídeas nativas que encontramos. (Alrededor de 9000 especies entre los bosques húmedos de Ecuador y Colombia), sin embargo, cabe aclarar que a pesar de este aspecto, se han reportado aproximadamente 3000 especies en peligro de extinción. (Orejuela, 2010). Este peligro de extinción se presenta por un mal uso del humano sobre la biodiversidad, por esto podemos agradecer a otros organismos que ayudan a mantener un equilibrio como son los hongos.

Los hongos son organismos muy comunes en la naturaleza, puesto que viven prácticamente en todos los medios (Gúzman *et.al.*, 1993). Tienen gran importancia en el mantenimiento de los bosques, porque además de ser degradadores de materia orgánica, son capaces de formar asociaciones con numerosos árboles (Santiago, 1992). Como lo son los hongos formadores de micorrizas que le ayudan a la planta a tomar nutrientes en esta asociación.

Los hongos que forman micorrizas con orquídeas, generalmente son saprófitos independientes o parásitos destructores de otros cultivos, representados principalmente por el género *Rhizoctonia* (Smith, 1963, citado por Oria, 1996; Rasmussen, 1992), lo que evidencia la estrecha especificidad que se establece en esta relación de planta - hongo.

Las micorrizas, son un fenómeno simbiótico general que se produce al asociarse uno o varios hongos con las raíces de las plantas en la cual hay un intercambio de nutrientes y minerales (Cameron, 2006). Los hongos pertenecientes al filo Basidiomycota, con los órdenes Tulasnellales, Sebaciniales, Ceratobasidiales y Atractielalles han sido reportados como los hongos micorrízicos más comunes de las orquídeas (Suárez *et al.* 2006, Kottke *et al.* 2010).

Por lo tanto se puede observar la importancia de un desarrollo de investigación de este tipo de hongos formadores de micorriza para la conservación de las orquídeas, que se encuentran en peligro de extinción en muchos lugares de Colombia como lo es la región del Sumapaz donde se realizó el proyecto. El Sumapaz cuenta con importantes zonas de conservación las dos más representativas son el Parque Natural del Quinini y la Reserva Natural San Rafael.

1. 1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Las orquídeas son indicadores de una alta diversidad biológica ya que la fauna y flora asociada a estos hábitats tropicales es altamente representativa y diversa (Duque, 2013). Todas las orquídeas necesitan de hongos formadores de micorriza para la germinación y establecimiento de sus semillas en el medio natural (Smith y Read, 1997). Por lo tanto la identificación de estos hongos formadores de micorriza en plantas orquídodes es de vital importancia para la conservación de orquídeas y para mejorar las estrategias de germinación de las mismas (Dixon *et al.* 2003; Otero *et al.* 2002; Zetter *et al.* 1997). Es significativamente importante caracterizar e identificar las relaciones hongo - planta para mejorar los procesos de conservación de la diversidad biológica de diferentes especies de orquídeas en Colombia.

En investigaciones la germinación artificial de semillas de orquídeas terrestres de zonas templadas es extremadamente difícil y requiere formulaciones de nutrientes muy específicas en medios asépticos de germinación (Arditti, 1992). Por tanto muchos cultivadores e investigadores utilizan hongos simbióticos para la propagación. Esto contrasta con el cultivo de muchas orquídeas epifitas tropicales, que en general son relativamente fáciles de germinar en condiciones asimbióticas, cabe destacar que es una técnica efectiva en orquídeas epifitas pero las pérdidas son enormes por el proceso de aclimatación y no se logra el establecimiento de las plantas. En consecuencia, los cultivadores de orquídeas tropicales no utilizan la germinación simbiótica para su propagación. Por estas razones se conocen mucho mejor las interacciones simbióticas de germinación de las orquídeas terrestres de zonas templadas que las de orquídeas epifitas tropicales. Sin embargo, las técnicas de germinación simbiótica de semillas epifitas tropicales podrían mejorar el éxito de cultivo de estas orquídeas tanto para fines comerciales como de conservación. Por esta razón la finalidad de este proyecto de investigación identificar morfológicamente y molecularmente hongos asociados a orquídeas en la región del Sumapaz.

Sin lugar a dudas una de las grandes problemáticas de la extinción de las orquídeas es lo anteriormente nombrado que son procesos de germinación para poder conservarlas, pero realmente la mayor amenaza de las orquídeas de Colombia y de los bosques de niebla es la destrucción de sus hábitats. Se estima que sólo cerca del 18% al 25% del bosque andino original se conserva en la actualidad en el país (Etter, 1998), hasta un 56,6% del territorio nacional ha sido intervenido sustancialmente y que frente a estos niveles de intervención el sistema de conservación es deficiente.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Colombia es uno de los países más biodiversos y en cuanto a orquídeas posee el 15% (más de 3500 spp.) del total de las especies del mundo (Sengas, 2001; Ortiz et al., 1994; Dressler, 1993; Arditti, 1992). Se reportan aproximadamente 3000 especies en peligro de extinción. Orejuela, JE (2010). A partir del alto número de especies de orquídeas en peligro de extinción y por el desconocimiento de las relaciones simbióticas entre hongos y orquídeas ya sean de carácter micorrízicos, por tanto este trabajo va dirigido a la identificación de los hongos asociados a la raíces de orquídeas nativas para la Región del Sumapaz.

Los estudios en micorrizas reflejan una potencial ayuda para la gran familia de orquidáceas y su conservación. Esta simbiosis hongo-planta permite brindar a la orquídea los nutrientes principales para germinar y desarrollarse; claramente los estudios en estos hongos nos pueden revelar datos de gran interés para promover, mejorar su desarrollo y conservación en un medio natural (Torres Bladimir, 2012), estas evaluaciones de hongos micorrízicos de orquídeas han sido restringidos a datos moleculares obtenidos desde raíces de orquídeas así como de cultivos (Ma. et al. 2003; Moore 1987; Pereira et al. 2003, 2005; Warcup 1980). ITS-5.8S y 28S son las regiones de nrDNA más usadas en análisis filogenéticos, por considerarse regiones que aportan suficiente información para distinguir especies como se

muestra en publicaciones de Suárez et al. (2006), Shefferson et al. (2007), Taylor et al. (2008), Kottke et al. (2010).

Anteriormente los análisis filogenéticos se limitaban a los estudios descriptivos y especulativos de las relaciones evolucionarias, en la actualidad los avances en esta metodología nos permiten comprender y explotar las dependencias estadísticas entre las secuencias que comparten un ancestro común en amplias áreas de investigación (Whelan et al. 2001). Los nuevos estudios nos brindan información útil para establecer nuevas estrategias de conservación de orquídeas en su medio natural (Dixon et al, 2003). Por lo tanto resulta útil para la investigación la ampliación de la caracterización molecular de los hongos asociados a las raíces de las orquídeas en la región del Sumpaz.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar morfológicamente y las secuencias ITS de aislamientos de hongos asociados a raíces de orquídeas en la región del Sumapaz.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar diferentes muestras de hongos asociados a raíces de diferentes tipos de orquídeas en la región del Sumapaz.
2. Obtener cultivos monomiceliales de los aislamientos realizados y caracterizar dichos cultivos monomiceliales hasta género.
3. Extraer y amplificar la secuencia del DNA de los cultivos monomiceliales con primers o cebadores universales para hongos.
4. Secuenciar los fragmentos de DNA amplificados.
5. Comparar las secuencias obtenidas con las secuencias del GenBank.
6. Construir un árbol filogenético entre los aislamientos obtenidos de los hongos asociados a las raíces de orquídeas.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 ORQUÍDEAS

La palabra orquídea proviene del griego *orchis* que significa testículo, de aquí surge dada la semejanza entre sus pseudobulbos y las partes del animal; aunque la descripción de Teofrasto se limita a las especies indígenas europeas (MAGA, 1986).

La orquídea es una flor de elevado atractivo comercial que resume belleza, encanto y caprichosas formas y colores; pudiendo convertirse en un importante renglón comercial. Las semillas de orquídeas tienen un embrión simple carente de endospermo, lo que la hace de difícil germinación y sobrevivencia, si no se encuentra un hongo formador de micorriza compatible el cual se encarga de suministrarle los carbohidratos y nutrimentos esenciales, aún hasta después de haber formado sus primeras hojas verdes (Richardson *et al.*, 1992).

3.1.1 Bioecología y clasificación taxonómica de las orquídeas

Las orquídeas se encuentran prácticamente en todos los continentes donde exista vegetación, se clasifica Reino: *plantae*, División: *Magnoliophyta* Clase: *Liliopsida* Orden: *Orchidales* Familia: *Orchidaceae* (tabla1); su distribución está especialmente concentrada en las regiones tropicales del planeta. Los factores que han sido asociados a la diversidad de orquídeas son varios, la diversidad de hábitat, la geología, la variabilidad climática y el grado de aislamiento (Pupulin, 2005). En Colombia las orquídeas se encuentran prácticamente en todos los ecosistemas naturales y en muchos de ellos hay un gran número de especies (Orejuela *et al.*, 2010).

Se encuentran en la mayor parte del mundo, si bien son especialmente abundantes en los trópicos. No obstante, su capacidad de adaptación les ha permitido conquistar un sin número de nichos ecológicos, desde los más secos y calientes del planeta hasta los más húmedos y fríos. Como podemos observar en la (figura1) una orquídea presente en la región del Sumapaz.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de orquídeas

Reino: <i>Plantae</i>
División: <i>Magnoliophyta</i>
Clase: <i>Liliopsida</i>
Orden: <i>Orchidales</i>
Familia: <i>Orchidaceae</i>
(Juss., nom. cons.)



Figura 1. Orquídea reserva natural San Rafael ((Autor de la fotografía: Victorino, 2015)

Las orquídeas constituyen un grupo extremadamente diverso de plantas, que pueden tener desde unos pocos milímetros de longitud (ciertas especies de los géneros *Bulbophyllum* y *Platystele*) hasta constituir gigantescas agregaciones de varios cientos de kilogramos de peso (algunas especies de *Grammatophyllum*) o presentar longitudes de hasta 13,4 m, como es el caso de *Sobralia altissima*, una orquídea recién descrita en 1999 en el Perú (Bennett y Christenson, 1999; Romero *et al*, 2009). Del mismo modo, las flores de las orquídeas varían en tamaño desde menos de 1 mm y difícilmente visibles a simple vista (*Platystele*) pasando por las grandes flores de 15 a 20 cm de diámetro en muchas especies de los géneros *Paphiopedilum*, *Phragmipedium* y *Cattleya* hasta los 76 cm de las flores de *Phragmipedium caudatum*. La fragancia de sus flores no es menos variable, desde el delicado aroma de *Cattleya* hasta el repulsivo hedor de las flores de ciertas especies de *Bulbophyllum*. (David E. Bennett Jr. y Eric A.) (Christenson (1999)).

Algunas especies de orquídeas reportadas en zonas tropicales y templadas de Colombia como Valle del Cauca y Antioquía de diferentes hábitats son *Arundina sp.*, *Bletia purpurea*, *Campylocentrum micranthum*, *Cattleya sp.*, *Cranichis sp.*, *Cyrtopodium sp.*, *Dendrobium sp.*, *Elleanthus sp.*, *Epidendrum sp.*, *Odontoglossum sp.*, *Oncidium sp.*, *Scaphyglottis sp.*, *Sobralia sp.* y *Vanilla sp.* entre algunas de las especies (Otero y Mosquera, 2010).

3.1.2 Características y tipos de orquídeas

La familia comprende aproximadamente 25.000 (algunas fuentes informan de 30.000) especies, y quizá otros 60.000 híbridos y variedades producidas por los horticultores, por lo que resulta ser una de las familias con mayor riqueza de especies entre las angiospermas. Pueden ser reconocidas por sus flores de simetría fuertemente bilateral, en las que la pieza media del verticilo interno de tépalos llamada labelo está profundamente modificada, y el o los estambres están fusionados al estilo, al menos en la base. (Stevens, P. F. 2001)

Las raíces de las orquídeas aéreas están forradas por unas fundas de células muertas y esponjosas llamadas velamen. Poseen clorofila bajo esa cubierta, lo que les permite realizar la fotosíntesis, y facilita la absorción de agua y minerales, ya que estas plantas dependen para su nutrición de las lluvias periódicas, nieblas y ramas húmedas; pueden crecer en todas direcciones y sirven para la sujeción, ya que abrazan al tronco o ramas de los árboles como se puede observar en (figura 2). (Font Quer, P.1982))



Figura 2. Raíz de orquídea (Tomado de Manual para la propagación de orquídeas. 2011)

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y DE LAS SECUENCIA ITS DE AISLAMENTOS DE HONGOS ASOCIADOS A RAÍCES DE ORQUÍDEAS EN LA REGIÓN DEL SUMAPAZ

Las flores son la parte más llamativa de estas plantas y debido a su aroma, forma, color y comportamiento, han sido la admiración de muchas personas. Fueron estudiadas por Darwin en 1877.

Aunque varían en su tamaño, estas flores tienen generalmente seis partes que son tres sépalos iguales entre sí, ubicados en la parte de atrás y tres pétalos que están enfrente, de los cuales dos son iguales y uno diferente; este último se encuentra al centro de la flor, siendo el labelo la parte más llamativa como se observa en la (figura 3).

El labelo es la parte de la flor que desarrolla mayores adaptaciones y tiene como finalidad atraer a los insectos polinizadores de la flor. También puede envolver o enmarcar a una pieza central llamada columna, la cual contiene los órganos sexuales femenino y masculino, por lo que la mayoría de las orquídeas son hermafroditas. (Menchaca, 2011).

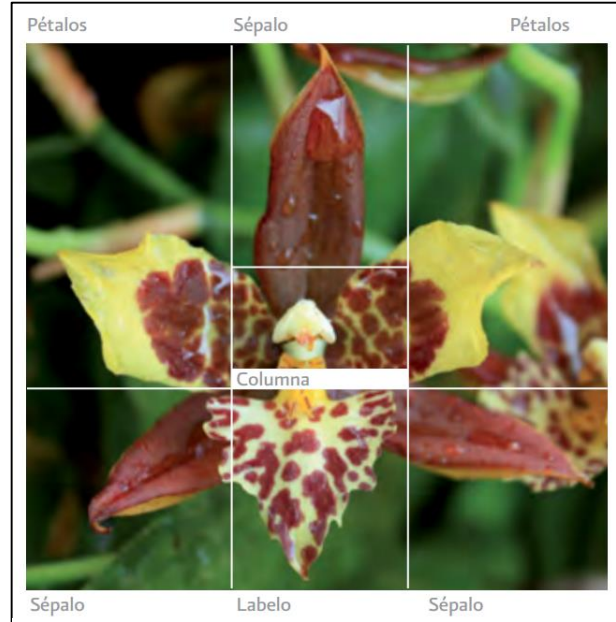
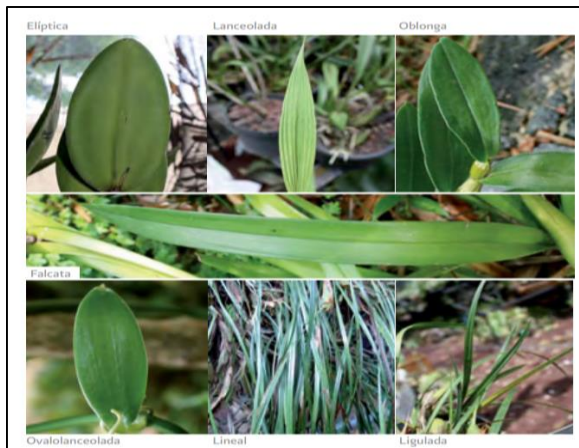


Figura 3. Descripción flor de orquídea. (Tomado de Manual para la propagación de orquídeas, 2011)



En todas las orquídeas, las hojas son siempre simples, los márgenes son enteros y no tienen aserraduras ni espinas, por lo general son alargadas y angostas (figura 4), las cuales se conservan durante muchos años. Las hojas de especies que viven en lugares muy calurosos son cilíndricas, lo que evita que se deshidraten rápido. (Menchaca, 2011).

Figura 4. Descripción hoja de orquídea. (Tomado de Manual para la propagación de orquídeas, 2011)

Sus semillas están hechas de una sola pieza o cotiledón (monocotiledóneas). En la parte interior de los frutos podemos encontrar miles de semillas. Su forma general varía desde forma de hilo (filiforme) o cilíndrica con punta (fusiforme) y en ocasiones parecen alas o protuberancias (figura 5). El tamaño varía desde pocas micras (muy pequeño) hasta unos 5 milímetros, y su peso varía de 1 a 22 microgramos. Consta de una cubierta y un embrión, viéndose desprovista de endospermo (sirve para alimentar al embrión mientras salen sus hojas). La testa o cáscara está formada por células muertas y el embrión por un rango de entre ocho y 200 células. Su dispersión se hace generalmente con ayuda del viento. (Menchaca, 2011).



Figura 5. Fruto y semilla de orquídeas (Tomado de Manual para la propagación de orquídeas, 2011)



Figura 6. Formas florales y su disposición (Tomado de Manual para la propagación de orquídeas, 2011)

Ya que las orquídeas tienen una gran diversidad de formas florales y disposición, se han clasificado por estas características de la siguiente forma: Por su inserción en la planta **Axilar**: La vara floral sale de entre el tallo y la hoja. **Basal**: La vara floral surge de la base del pseudobulbo. **Terminal**: Surge de la punta del tallo o pseudobulbo (Menchaca, 2011).

3.1.3 Germinación y relación simbiótica en orquídeas

Las semillas de orquídeas son conocidas usualmente como semillas de polvo porque son minúsculas y contienen pocas reservas de alimento. Usualmente estas semillas no germinan en el medio natural a menos que sean infectadas por un hongo formador de micorriza, el mismo que abastece a las plantas jóvenes con azúcares y nutrientes que necesitan hasta que sean lo suficientemente grandes para fabricar su propio alimento (Sheena et al., 2000).

“Hongo-raíz”, fue propuesto por Frank (1885), para definir asociaciones simbióticas (“vivir conjuntamente dos o más organismos”), mutualistas, no patógenas, entre raíces de plantas y micelios de hongos, en las que ambos resultan beneficiados. Actualmente, el concepto

de “micorriza” se considera en un sentido más amplio, para dar cabida a aquellas asociaciones simbióticas hongo-planta que no se establecen en raíces, sino en otros órganos de contacto, especializados para el intercambio de nutrientes, como ocurre en orquídeas y otras plantas aclorofilicas y en otras “plantas inferiores”, carentes de verdaderas raíces (Honrubia, 2009).

Las asociaciones conocidas como micorrizas orquidoides se presenta por que las orquídeas viven en mutualismo con hongos, es decir, establecen una relación en la cual los dos organismos obtienen beneficio cuando conviven juntos. Las semillas de las orquídeas requieren de la ayuda del hongo para la germinación. Hay diversos tipos de hongos que estimulan su germinación, pero predomina sobre todo *Rhizoctonia* (*Basidiomycota*). El hongo degrada la cubierta de la semilla y la libera de la dormición. Luego la semilla inicia a germinar y emite unos filamentos, los órganos subterráneos, y se establecen unas micorrizas orquidoides. La semilla en dormancia puede durar 20-30 años sin germinar, pero con la ausencia del el hongo no podrá germinar.

También existen hongos endófitos que son microorganismos que crecen dentro de los tejidos vegetales sin causar síntomas de enfermedad y, recientemente han empezado a ganar reconocimiento (Bayman y Otero, 2006; Brundrett, 2006; Stone *et al.*, 2000). La asociación endofítica describe dónde vive un microorganismo (Brundrett, 2006; Stone *et al.*, 2000), sin asumir o excluir la posibilidad de beneficio para ambas partes. Por el contrario, el concepto de micorrizas es funcional y describe una relación comúnmente mutualista (Smith y Read, 1997; Rasmussen, 2002; Cameron *et al.*, 2006, 2007).

Estos estudios resaltan el papel que cumplen estos microorganismos en la protección de la planta frente a ataques de patógenos, ya sea por la síntesis de metabolitos secundarios o por el mejoramiento en la nutrición a través de la disponibilidad de los nutrientes (Schulz, 2006). Igualmente mencionan, no sólo los beneficios generados para las plantas, sino también el potencial que poseen estos organismos endófitos y su batería de enzimas y metabolitos secundarios, (Singhet *al.*, 2011). No obstante, estas investigaciones dejan al descubierto la carencia de conocimiento en las implicaciones que tienen estas asociaciones y ponen en discusión la necesidad de conocer más a fondo estas interacciones y la importancia del papel que cumple en la fisiología tanto de la planta hospedera como del endófito (Bayman *et al.*, 1997).

3.1.4 Las orquídeas en Colombia y en la región del Sumapaz

En Colombia las orquídeas se encuentran prácticamente en todos los ecosistemas naturales y en muchos de ellos hay gran número de especies. Empero, numerosas especies de orquídeas, por particularidades de sus ciclos de vida, son raras o escasas y muchas están en peligro de extinción. Muchas orquídeas con rangos geográficos reducidos pueden estar gravemente amenazadas aun cuando algunas especies sean abundantes localmente. En Colombia las orquídeas ocupan el poco honroso primer lugar como la familia de plantas con el mayor número de especies amenazadas de extinción (Calderón y Sáenz, 2007). Las especies de los bosques de niebla del país tienen doble riesgo debido a sus niveles elevados de endemismo y las altas tasas de conversión de sus ecosistemas a usos como la agricultura y la ganadería (Dixon y Phillips, 2007; Orjuela, 2010).

Las especies colombianas se concentran principalmente en la región Andina, 87,2% donde la región paramuna posee el 15% de las especies. Le siguen las regiones Pacífica y Amazónica, 10,6% cada una, y las regiones más pobres en especies son la región Caribe y la Orinoquia, 5 y 4 %, respectivamente. De las especies registradas para Colombia 1.544 son endémicas distribuidas con preferencia en la región Andina, región que concentra el 93,4% de los endemismos (Sarmiento 2007). Los géneros más ricos en especies en el país son *Epidendrum*, *Pleurothallis*, *Lepanthes*, *Maxillaria*, *Masdevallia* y *Stelis*. Por otro lado, por lo menos el 1,7% de los géneros contiene una sola especie (Sarmiento 2007). Las áreas que exhiben una abundancia de orquídeas especialmente elevada siguen el patrón general de la diversidad vegetal; desde el punto de vista altitudinal la mayor diversidad se encuentra entre 1.800 y 2.000 msnm (Sarmiento 2007).

El cerro del Quininí se encuentra en Colombia en la cordillera oriental dentro del departamento de Cundinamarca. Cubre una extensión de 1947 hectáreas de reserva forestal, que actualmente se encuentran en cercanía con predios de uso agropecuario (fincas cafeteras, cultivos de plátano, ganadería) .Presenta altitudes que van desde los 1750 msnm hasta los 2.133 msnm en su cumbre, temperaturas de 10 – 20°C. El cerró del ambiente, así como del registro arqueológico de las tribus que habitaron el lugar.

La reserva natural del San Rafael se encuentra en Colombia está ubicada en la parte nororiental de Fusagasugá a 15 minutos del área urbana, en el corregimiento de La Aguadita. Con una distancia de recorrido de 3 km aproximadamente, una temperatura promedio de 8-10°C, altitud 2000-3000 msnm, la reserva natural San Rafael es la mayor reserva hídrica y forestal del municipio de Fusagasugá. Cuenta con 600 hectáreas aproximadamente de bosque nativo, amplia extensión de pantanos y humedales que forman los diversos nacederos que alimentan el variado ecosistema, con más de 500 especies entre plantas, insectos, aves y animales silvestres.

3.2 HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS Y ENDÓFITOS EN ORQUÍDEAS

Las relaciones simbióticas son importantes para la evolución y conservación de muchos, quizás todos, los organismos (Thompson, 1994). Para las plantas, las relaciones de simbiosis son especialmente importantes en la adquisición de nutrientes. Las micorrizas son simbiosis formada por hongos y raíces de plantas donde ellas obtienen algunos de sus nutrientes, incluidos los que limitan el crecimiento (Smith y Read, 1997), mientras que los endófitos son microorganismos que crecen dentro de los tejidos vegetales sin causar síntomas de una enfermedad (Bayman y Otero, 2006; Brundrett, 2006; Stone *et al.*, 2000).

Los hongos formadores de micorrizas se cree que han evolucionado al mismo tiempo que las plantas terrestres, lo que permite a este último colonizar los mismos ambientes que sus hospedantes, las plantas (Brundrett *et al.*, 2003). La literatura sobre endófitos y de micorrizas en orquídeas se encuentra muy ligada entre sí y a veces es imposible discutir estas asociaciones por separado. El concepto de micorrizas es funcional y describe una relación comúnmente mutualista (Smith y Read, 1997; Rasmussen, 1995; Cameron *et al.*,

2007), mientras que el concepto de endófitos principalmente describe dónde vive un organismo (Brundrett, 2006; Stone *et al.*, 2000), sin asumir o excluir la posibilidad de beneficio para ambas partes. Hay asociaciones que son un continuo de relaciones simbióticas y en contraste, hay relaciones que con el transcurso de la historia de vida de los organismos puede llegar a ser comensalismo, mutualistas, parasíticas, o viceversa (Bayman y Otero, 2006; Gao *et al.*, 2010).

Los hongos formadores de este tipo de micorriza corresponden a las clases Basidiomycetes, los cuales no desarrollan manto ni red de Hartig, sino que las hifas septadas forman ovillos intracelulares en las raicillas de las plantas Orquidáceas (Riquelme, 1991; Magaña, 1999). Orquidoides. Formada por basidiomicetos y plantas de la familia Orquidaceae. En esta asociación, la planta, que presenta una fase heterótrofa en su ciclo de vida, recibe compuestos carbonados a partir del hongo (Smith 1966). Éste penetra en las células de la raíz, invagina la membrana y forma ovillos dentro de la célula, así como agregados de hifas poco estructurados, conocidos como “pelotones”, que al degenerar liberan los nutrientes que contienen.

3.2.1 Importancia y tipos de micorrizas y endófitos

Estas relaciones entre hongos y orquídeas, también se complica por el hecho de que, a diferencia de la mayoría de las micorrizas, en las orquídeas no son conocidos por proporcionar ningún beneficio (Andersen y Rasmussen, 1996; Taylor *et al.*, 2002), en algunos casos y quizás en todos, la relación es en realidad parasitarias por parte de la planta en lugar de mutualistas. La distinción entre hongos de micorrizas y endófitos en orquídeas se complica por el uso inconsistente de la terminología en la literatura. La mayoría de estudios de los hongos referentes al género-forma *Rhizoctonia*, asumen que la relación es de micorrizas sin demostrar ningún beneficio funcional para la planta (Bayman y Otero, 2006), proponen una descripción que sería: "endófitos formadores de micorrizas".

Por otro lado, algunos autores son conscientes de este problema y evitan errar haciendo una precaución en el uso de los términos, prefiriendo llamar a sus hongos endófitos, basados en la falta de pruebas funcionales de una relación de micorrizas, a pesar, de que son casi con seguridad micorrizas cuando nos referimos a hongos de la forma género *Rhizoctonia*, y que ha sido aislado a partir de fragmento colonizados y en donde se observa las estructuras típicas (pelotones) de este tipo de micorriza (Currah, 1991; Currah *et al.*, 1997; Richardson y Currah ,1995; Otero *et al.*, 2002). Una definición propuesta por Brundrett (2004), separa las asociaciones de micorrizas de otro tipo de asociaciones con hongo de las raíces, como aquellas relaciones que se observan con hongos endófitos. Según esta definición, las asociaciones con hongos endófitos difieren de micorrizas obligadas por: i) ausencia de una interfase especializada (lugar donde se localizan las hifas), ii) ausencia de un desarrollo sincronizado planta-hongo, y iii) la falta de beneficios de la planta por la ausencia de transferencia de nutrientes, tres de los principales rasgos que definen las micorrizas y relaciones mutualistas. No obstante, las plantas pueden beneficiarse indirectamente de los hongos endófitos por i) Inducción de metabolitos de

defensa potenciales contra patógenos (Bayman *et al.*, 1997; Gao *et al.*, 2010), ii) Secreción de fitohormonas aumentando las tasas de crecimiento, iii) Movilización de nutrientes para la planta hospedera (Yuan *et al.*, 2009; Ovando *et al.*, 2005) y iv) Tolerancia al estrés (Brundrett, 2006; Gamboa y Gaitán, 2006). Estudios recientes (Chen *et al.*, 2011a, Chen *et al.*, 2011b, Sing *et al.*, 2011, Xing *et al.*, 2011), muestran la gran diversidad de endófitos no formadores de micorriza asociados a las raíces y parte aérea de las orquídeas. Ponen en manifiesto el papel que cumplen estos hospederos en la protección de la planta frente a ataques de patógenos, ya sea por la síntesis de metabolitos secundarios o por mejoras en la nutrición a través de la disponibilidad de los nutrientes. Así mismo, ponen en evidencia, no solo los beneficios generados para las plantas, si no también, el potencial que poseen estos organismos endófitos y su batería de enzimas y metabolitos secundarios por ejemplo en la industria de los combustibles (Sing *et al.*, 2011), y como antibióticos (Xing *et al.*, 2011).

Las micorrizas son simbiosis formada por hongos y raíces de plantas donde ellas obtienen algunos de sus nutrientes, incluidos los que limitan el crecimiento (Smith & Read, 1997), mientras que los endófitos son microorganismos que crecen dentro de los tejidos vegetales sin causar síntomas de una enfermedad (Bayman & Otero, 2006; Brundrett, 2006; Stone *et al.*, 2000). Los hongos formadores de micorrizas se cree que han evolucionado al mismo tiempo que las plantas terrestres, lo que permite a este último colonizar los mismos ambientes que sus hospedantes, las plantas (Brundrett *et al.*, 2003).

La literatura sobre endófitos y de micorrizas en orquídeas se encuentra muy ligada entre sí y a veces es imposible discutir estas asociaciones por separado. El concepto de micorrizas es funcional y describe una relación comúnmente mutualista (Smith & Read, 1997; Rasmussen, 1995; Cameron *et al.*, 2006, 2007), mientras que el concepto de endófitos principalmente describe dónde vive un organismo (Brundrett, 2006; Stone *et al.*, 2000), sin asumir o excluir la posibilidad de beneficio para ambas partes. Hay asociaciones que son un continuo de relaciones simbióticas y en contraste, hay relaciones que con el transcurso de la historia de vida de los organismos puede llegar a ser comensalismo, mutualistas, parasíticas, o viceversa (Bayman & Otero, 2006).

Estas relaciones entre hongos y orquídeas, también se complica por el hecho de que, a diferencia de la mayoría de las micorrizas, en las orquídeas no son conocidos por proporcionar ningún beneficio (Andersen & Rasmussen, 1996; Taylor *et al.*, 2002), en algunos casos y quizás en todos, la relación es en realidad parasitarias por parte de la planta en lugar de mutualistas.

La distinción entre hongos de micorrizas y endófitos en orquídeas se complica por el uso inconsistente de la terminología en la literatura. La mayoría de estudios de los hongos referentes al género forma Rhizoctonia, asumen que la relación es de micorrizas sin demostrar ningún beneficio funcional para la planta. Bayman & Otero (2006), proponen una descripción que sería: "endófitos formadores de micorrizas". Por otro lado, algunos autores son conscientes de este problema y evitan errar haciendo una precaución en el uso de los términos, prefiriendo llamar a sus hongos endófitos, basados en la falta de pruebas funcionales de una relación de micorrizas, a pesar, de que son casi con seguridad micorrizas cuando nos referimos a hongos de la forma género Rhizoctonia, y que ha sido aislado a partir de fragmento colonizados y en donde se observa las estructuras típicas (pelotones) de este tipo de micorriza (Currah, 1991; Otero *et al.*, 2002).

3.2.2 Reportes de hongos formadores de micorrizas orquidoideas

La mayoría de los hongos formadores de micorrizas de orquídeas se clasifican en la forma del género *Rhizoctonia* (Arditti, 1992) Este grupo incluye anamorfos de *Tulasnella*, *Ceratobasidium* y *Thanatephorus*. *Rhizoctonia* se puede clasificar de acuerdo con el número de núcleos de células jóvenes (multi-, bi- y uninucleado) (Taylor y Talbot, 1966).

¿tienen características morfológicas similares a *Rhizoctonia* (Bernard, 1909), lo que les ha valido el nombre coloquial de “rizoconias”, aunque realmente son un grupo artificial constituido por los teleomorfos (formas sexuales) de los géneros *Ceratobasidium*, *Thanatephorus*, *Tulasnella* y *Sebacina*, y sus estados anamorfos (formas asexuales) *Ceratorhiza*, *Epulorhiza*, *Moniliopsis* y *Rhizoctonia sensu strictu* (Warcup & Talbot 1966, 1967, 1971, 1980; Moore 1987; Sneh *et al.* 1991; Currah 1991; Currah *et al.* 1997a, 1997b; Roberts, 1999).

Estos grupos taxonómicos se distinguen por la morfología microscópica de sus estructuras reproductivas o basidiocarpos. Desafortunadamente, estas estructuras sexuales raramente se producen bajo condiciones de laboratorio. Por lo tanto, datos de secuencias del ADN se han convertido en la forma más precisa y fácil de identificarlos (Vilgalys y González 1990, Vilgalys y Cubeta 1994, Kuninaga *et al.* 1997, González *et al.* 2001, Kristiansen *et al.* 2001; Otero *et al.* 2002).

Aunque previamente las orquídeas fueron consideradas generalistas en sus interacciones micorrízicas (Hadley 1970), existe cierta variación en sus niveles de especificidad (Otero *et al.* 2002, 2004). Es más: los niveles de especificidad pueden variar dentro de especies filogenéticamente relacionadas (Otero *et al.*, 2002, 2004, Otero y Clements 2005). Sin embargo, en general, las micorrizas de orquídeas son relativamente más específicas que las de otras plantas (Taylor y Bruns 1997, 1999). La evidencia acumulada recientemente demuestra que las especies de orquídeas varían en su habilidad para germinar con diferentes hongos micorrízicos. Semillas de la orquídea terrestre *Platanthera clavellata* germinan con hongos de plantas adultas de la misma especie pero no con aquellas de otras especies de *Platanthera* (Zettler y Hoder 2002). El uso de secuencias de ADN en los estudios sistemáticos de orquídeas y de hongos provee una técnica importante para investigar la especificidad de la interacción micorrízica. Recientes estudios han mostrado que las orquídeas micoheterotróficas son altamente específicas en sus hongos micorrízicos (Taylor & Bruns 1997, 1999; Selosse *et al.* 2002; McKendrick *et al.* 2000, 2002; McCormick *et al.* 2004). Similarmente, algunas orquídeas 775 epífitas tropicales también presentan altos niveles de especificidad (Otero *et al.*, 2002, 2004; Pereira *et al.* 2005a, 2005b, 2005c), en contraste con predicciones previamente sugeridas (Arditti *et al.* 1990). Estos altos niveles de especificidad complican la aplicación biotecnológica de micorrizas en proyectos de conservación porque sugiere que cada especie de orquídeas necesita ser estudiada para saber cuál es el hongo micorrízico más apropiado para el desarrollo de sus estrategias de su conservación. Las consecuencias de la generalizada especificidad de micorrizas de orquídeas son las siguientes: 1) cada orquídea amenazada requiere de la identificación de sus hongos micorrízicos más eficientes; 2) diferentes hongos pueden tener diferentes

requerimientos de crecimiento, los cuales pueden resultar en diferentes programas de manejo. Sin embargo algunos hongos micorrízicos de orquídeas pueden ser útiles para inducir la germinación de semillas de orquídeas que no son filogenéticamente emparentadas (Vilgalys y González, 1990).

Se reconocen distintos tipos de micorrizas (Honrubia *et al.*, 2002; Barea y Honrubia, 2004; Smith y Read, 2008), en función de las especies fúngicas y vegetales que establecen la asociación y en función de su estrategia nutricional, que posibilita una penetración intracelular, o no, por parte del hongo dentro de las células corticales de la raíz del vegetal. En cualquier caso, en todos los tipos de micorrizas, se establece una interfase de contacto íntimo entre hifas y células vegetales, donde se produce el intercambio de nutrientes de manera bidireccional (los nutrientes minerales son transvasados disueltos en agua desde el hongo a la planta, mientras ésta cede al hongo los azúcares procedentes de su actividad fotosintética) o unidireccional, como hemos indicado para orquídeas y plantas aclorófilas.⁵

El carácter heterótrofo de los hongos les condiciona a obtener su fuente carbonada a partir de otros organismos. Las micorrizas requieren un desarrollo planta (raíz)- hongo (micelio) sincronizado, pues las hifas fúngicas solo colonizan raíces jóvenes, excepto en orquídeas, en las que el hongo puede infectar células del tallo. La planta, en cualquier caso, es quien realmente controla la intensidad de la simbiosis, por el crecimiento de su raíz, pero también por la digestión de la interfase de intercambio, en las endomicorrizas, o por la formación de un singular tipo de raíz (secundaria y de crecimiento limitado), en el caso de las llamadas ectomicorrizas. La raíz constituye en realidad un nicho ecológico donde se desarrolla el hongo, que éste aprovecha (Brundrett, 2002).

La asociación entre hepáticas foliosas con algunos Basidiomycota ha sido igualmente constatada. Read & al. (2000) comentan la presencia de doliporos en estudios ultraestructurales de los gametófitos subterrá - neos aclorófilos de *Cryptothallus* y sus aliados fotosintéticos *Aneura*. Aislamientos de estos hongos mostraron su capacidad para establecer ectomicorrizas con *Betula*, lo que evidencia su potencialidad en interconectar los sistemas radicales del abedul con el gametófito aclorófilico de la hepática (Read y *et al.*, 2000).

Aunque Ascomycota y Basidiomycota presenten la potencialidad y pudieran haber establecido esporádicas asociaciones simbióticas con las primeras plantas terrestres, parece evidente que quienes mejor debieron interpretar el concepto de mutualismo con los rizoides u otros tejidos gametofíticos o con las incipientes raíces de los esporófitos de pteridófitos, en el inicio de la colonización terrestre, fueron sin duda los ancestros de los actuales Glomeromycota.⁶

Evolutivamente, las ectomicorrizas se originaron de manera independiente de las arbusculares. Probablemente surgieron repetidas veces, en tiempo y espacio, como alternativa adaptativa de diversos grupos vegetales arbóreos a nuevas exigencias ecológicas. En tales ambientes, presumiblemente con predominio de Basidiomycota (aunque también con Ascomycota) adaptados a hábitos saprofíticos pero capacitados de elevada versatilidad trófica, dichas plantas diseñaron un novedoso tipo de raíz (secundaria

y de crecimiento limitado) que serviría de base estructural para el desarrollo de la nueva simbiosis mutualista. Una variante de ésta, con especialización de algunos Ascomycota, constituye las denominadas ectomicorrizas tipo E-strain.⁷

En su función como hongo micorrícico el género *Rhizoctonia* establece una asociación muy particular con orquídeas, ya que la planta en su estado de semilla es totalmente dependiente de los nutrientes que le suministra el micosimbionte para lograr una exitosa germinación (Bernard, 1909; Arditto, 1992; Otero y Bayman, 2009). Se encuentra que algunos aislamientos que cumplen la función micorrícica en 20 orquídeas son binucleados, con su teleomorfo principalmente en el género *Ceratobasidium* (Carling *et. al*, 1999 y Rubio *et. al*, 2000)

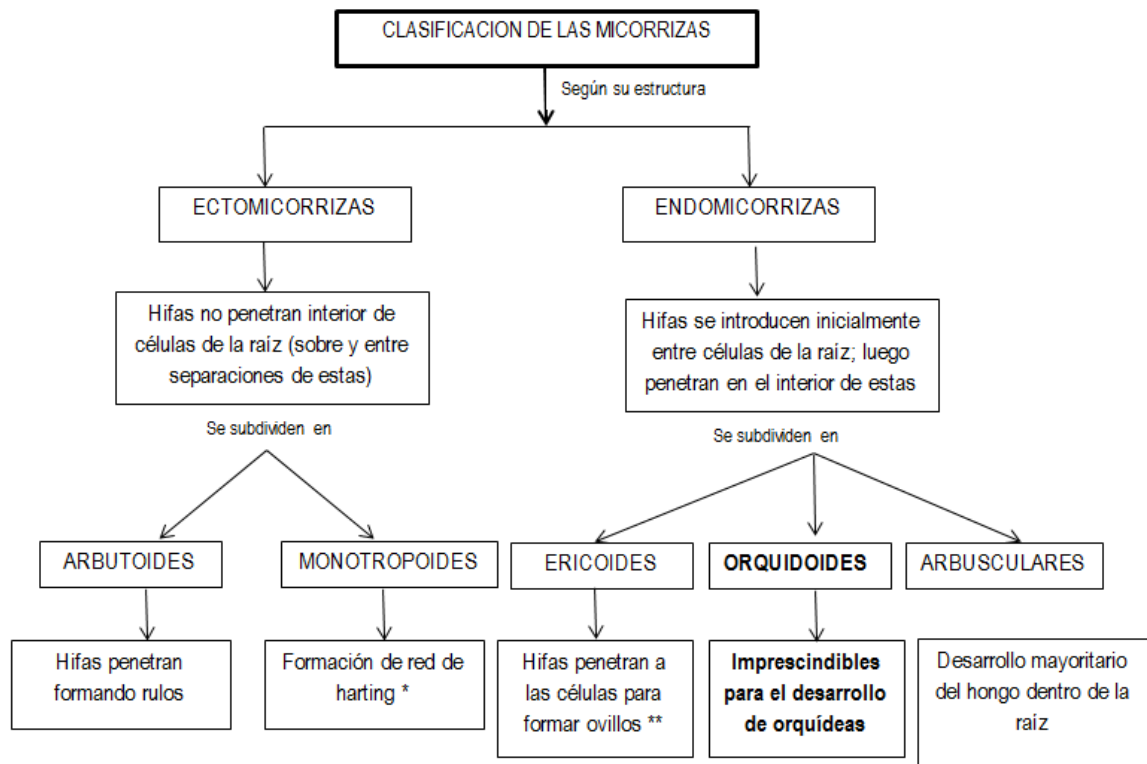


Figura 5. Clasificación de las micorrizas. Tomado y adaptado de (Read, 1999)

3.3 EL COMPLEJO RHIZOCTONIA

El género *Rhizoctonia* se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo, tanto en suelos cultivados como no cultivados. Ecológicamente, estas especies están diversificadas y pueden ser patógenos de numerosas especies vegetales o desarrollarse como saprófitos en el suelo (OGOSHI, 1987).

Los hongos del genero *Richoctonia* micorrizicos de orquídeas son binucleadas con su teleomorfo *Ceratobasidium* sp. y son menos frecuentes las multinucleadas, cuyo teleomorfo se expresa en el género *Thanatephorus* (Carling *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2000); otro grupo de *Rhizoctonia* binucleada corresponde al teleomorfo *Tulasnella* (Rubio *et al.*, 2000). No obstante, existen tres inconvenientes básicos al trabajar la taxonomía del género *Rhizoctonia* sp. de orquídeas a partir de aislamientos en cultivo puro: (1) al aislar los hongos en medios de cultivo artificial estos no esporulan y dificultan su identificación, por lo cual se agrupan en morfotipos; (2) la mayoría que logran crecer en medios artificiales son indistinguibles morfológicamente y se deben identificar por técnicas de sistemática molecular; y (3) algunos no crecen en medios artificiales, por lo cual la única manera de identificarlos es por amplificación directa de su ADN con primers específicos para hongos (Bayman y Otero, 2006).

3.3.1 Bioecología y clasificación taxonómica del complejo *Rhizoctonia*

Para la familia *Orchidaceae* el género-forma *Rhizoctonia* ha sido reportada como el hongo formador de micorrizas, entre ellos se incluyen *Rhizoctonia repens*, *R. goodyera-repentis* y *R. solani*. Para la familia *Orchidaceae*, *Rhizoctonia* sp. no se ha reportado como patógeno si no como hongo endófito formador de micorriza (Warcup y Talbot, 1967, 1980; Shen *et al.*, 1998; Roberts, 1999). Las características de la ramificación, la anatomía de poro septal y el número de núcleos por célula comúnmente son los criterios morfológicos disponibles para identificar al hongo como *Rhizoctonia* sp. aislado a partir de pelotones de orquídeas.

Reino: <i>Fungi</i> Filo: <i>Basidiomycota</i> Clase: <i>Hyphomycetes</i> Subclase: <i>Incertae sedis</i> Orden: <i>Agonomycetales</i> Familia: <i>Agonomycetaceae</i> Género: <i>Rhizoctonia</i>
J.G.Kühn, 1858

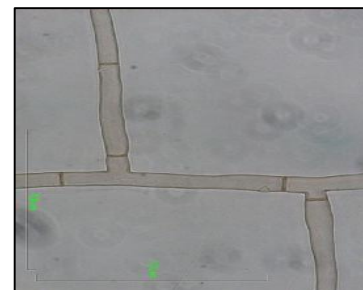


Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Rhizoctonia*

Figura 6. Fotografía microscópica tomada por Reggio Emilia.

En condiciones ambientales adversas (baja disponibilidad de nutrientes, temperatura, etc.), el hongo produce ramilletes de células cortas, anchas de forma oval o triangular que se asemejan a esclerocios, las cuales funcionan como clamidosporas o estructuras de protección y son denominadas células monilioides. Sin embargo, el micelio generalmente no presenta caracteres diferenciales suficientes que permitan la identificación a nivel específico (Shen *et al.*, 1998).

El género representa un conjunto de taxonómicamente diversos grupos que difieren en muchas características, incluyendo etapas anamorfo y teleomorfos (Curtis 1939, Warcup y Talbot 1966, 1967, 1980, Currah et al 1987). La mayoría de las especies de este género son *Mycelis sterilia* y una variedad de enfoques han sido desarrollados para identificarlos. El método convencional de identificación de estos hongos *Rhizoctonia* se ha basado en su morfología cultural, que incluye color de la colonia, las células monilioides, esclerocios, y otras características de micelio (Curtis 1939, Currah et al 1987). Grupo de anastomosis (AG) con base en el comportamiento de anastomosis de la fusión de hifas vegetativas y grupo intraespecífica (ISG) dentro de los AG basado en la evidencia combinada de comportamiento anastomosis patogenicidad, morfología y otros criterios han sido los métodos más frecuentemente adoptada para identificar *R. solani* y compleja estudiar su diversidad genética (Vilgalys y Cubeta 1994). Ramsay et al (1987) asignó algunas orquídeas australiana endófitos *Rhizoctonia* parecidos a cinco grupos de anastomosis. Sin embargo, los datos de ADN mostraron que mientras que la mayoría AGs representan unidades evolutivas monofiléticos, el comportamiento anastomosis hifal puede no ser la mejor indicación de la relación evolutiva entre diferentes ISGs (Vilgalys y Cubeta 1994).

3.3.2 Descripción macroscópica y microscópica de *Rhizoctonia*

Características macroscópicas de los tipos de crecimiento para la identificación de *Rhizoctonia*

- Crecimiento tipo I: color del micelio café. Crecimiento del micelio adherido al medio de cultivo. Esclerocios de color café, formas indefinidas, en aglomerados y sobre el agar.
- Crecimiento tipo II: Color del micelio café rojizo. Crecimiento del micelio más abundante que el tipo I y adherido al medio de cultivo. Esclerocios de color café rojizo, pequeño tamaño, individuales, e inmersos en el agar.
- Crecimiento tipo III: Color del micelio amarillo claro. Crecimiento del micelio aéreo y muy abundante. Escasa o nula formación de esclerocios, tamaño muy pequeño y color café muy oscuro, individuales e inmersos en el agar.
- Crecimiento tipo IV: Color del micelio amarillo claro (casi blanco). Crecimiento de micelio aéreo muy abundante. Escasa formación de esclerocios, de color casi negro y muy pequeño tamaño, individuales e inmersos en el agar.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y DE LAS SECUENCIA ITS DE AISLAMIENTOS DE HONGOS ASOCIADOS A RAÍCES DE ORQUÍDEAS EN LA REGIÓN DEL SUMAPAZ

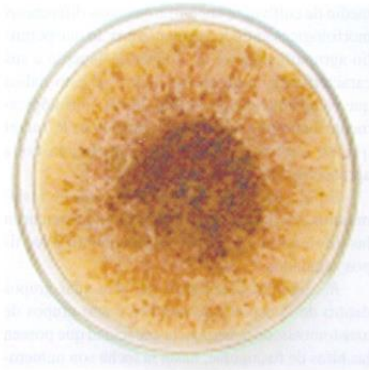


Figura 7. Crecimiento de *Rhizoctonia* tipo I. Tomado de IDESIA, 2005.

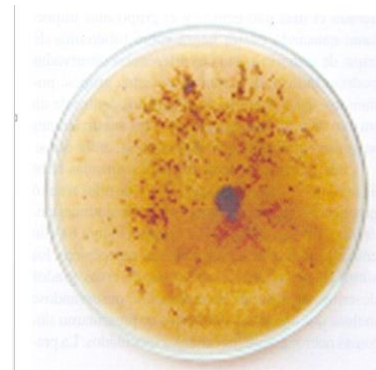


Figura 8. Crecimiento de *Rhizoctonia* tipo II. Tomado de IDESIA, 2005.



Figura 10. Crecimiento de *Rhizoctonia* tipo III. Tomado de IDESIA, 2005

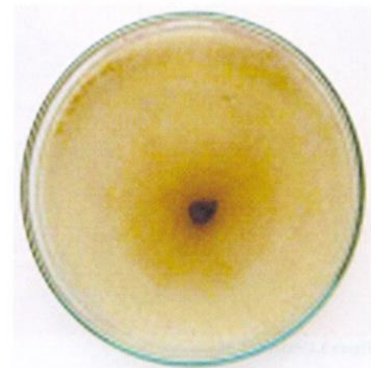


Figura 9. Crecimiento de *Rhizoctonia* tipo IV. Tomado de IDESIA, 2005

Los esclerocios también pueden formarse a partir de micelio secundario, producto del cruzamiento entre micelios distintos, a través de un proceso de anastomosis, es decir, el entrecruzamiento de hifas y de la unión de su contenido citoplasmático (plasmogamia), originando un micelio diploide, heterocarionte y multinucleado (Volk y Leonard, 1990; Pilz *et al.*, 2007)

La función de estas estructuras es acumular reservas y sobrevivir a condiciones adversas, para posteriormente diferenciarse y fructificar cuando exista un entorno adecuado (Ower *et al.*, 1986, 1988; Volk y Leonard, 1990)

- Desarrollo de esclerocios de *Rhizoctonia* sp.

El inicio de la formación de esclerocios en *Rhizoctonia* son filamentos monilioides que se van agrupando, dividiendo y ramificado, dando como resultado una masa de células. Podemos reconocer que hay cambios en la pigmentación y en el tamaño de las hifas:

inicialmente son claras, toman el color del colorante, aseptadas, un poco onduladas y delgadas; después se septan repetidamente encontrándose posteriormente estructuras de tipo clamidosporas en cadenas intercalares y terminales.

Esclerocio joven - estadio no. 1. Tamaño promedio $6 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$. es del tipo células moniloides, formando una trama hifal inicialmente floja, de pigmentación marrón claro.

Esclerocio intermedio - estadio no. 2 presenta al centro una estructura compacta formada por plecténquima de tipo pseudoparénquima. El área periférica continúa formada por células laxas unidas que no son más que remanentes de hifas moniloides, que contribuyeron a la formación de la trama central y forman un prosénquima muy flojo.

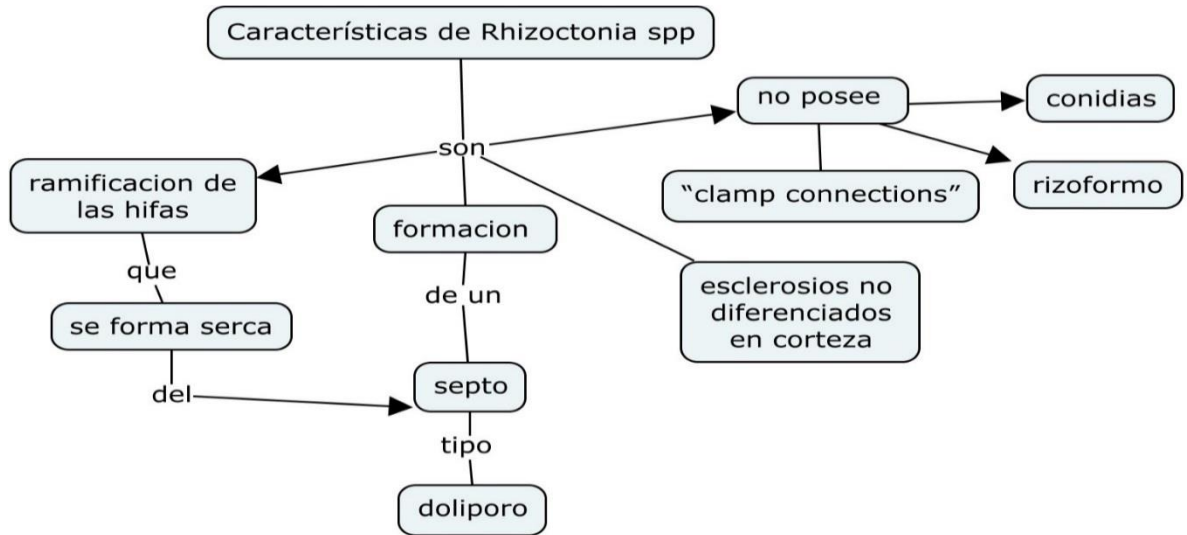
Esclerocio maduro - estadio no. 3. Se reconocen 4 zonas morfológicamente bien diferenciadas de afuera hacia adentro: – zona externa: con “tejido fungal” tipo prosenquimatoso o sea con hifas entrelazadas en diferentes direcciones de una forma poco compacta (figura 12). – zona media: area bien diferenciada con “tejido fungal”, tipo pseudoparénquimatoso o con hifas orientadas en una sola dirección de una forma poco compacta, las cuales en corte transversal presentan un diámetro amplio, con paredes finas y de pigmentación oscura.



Figura 11. Esclerocios *Rhizoctonia* en PDA. Tomada de Nigel Cattlin

- **Caracterización microscópica de *Rhizoctonia***

Las especies de este género presentan estados telomórficos pertenecientes a diferentes familias, órdenes e incluso clases. Hay actualmente alrededor de 120 especies, variedades o formas especiales descritas. Algunas de estas fueron erróneamente identificadas y no corresponden a éste, mientras otras se consideran sinónimos de especies descritas anteriormente (OGOSHI, 1996). Señalan que las características de *Rhizoctonia spp.*, son:



Grafica 9 Características de Rhizoctonia

Y una característica adicional a todos los sub-grupos de *Rhizoctonia* es que poseen un estado sexual que pertenece a los Basidiomycete.

Basados en las características antes mencionadas, los aislamientos de este género son divididos en tres grupos: uno es *Rhizoctonia* multinucleada, que posee tres o más núcleos por célula, hifas grandes- (de aproximadamente 6-10 μ m de diámetro), y el telomorfo pertenece al género *Tanatephorus Donk*. Otro grupo es el de *Rhizoctonia* binucleada, el cual tiene solamente dos núcleos por célula (raramente uno o tres), hifas pequeñas (de 4-7 μ m de diámetro), y el telomorfo pertenece al género *Ceratobasidium Rogers*.

El tercer grupo, incluye a *R. oryzae* y *R. zaeae*, los cuales son multinucleados y tienen el telomorfo en el género *Waitea Warcup* y Talbot (OGOSHI, 1987).

El género *Rhizoctonia* se caracteriza por la producción de esclerocios en una textura uniforme con redes hifales que unen el micelio con plantas. Esto ha provocado la clasificación de muchos hongos en el género *Rhizoctonia*. *Rhizoctonia solani* se caracteriza por pigmentos marrones oscuros de las hifas, ramificación cerca del septo central en la hifa vegetativa joven, estrangulamiento de la hifa y formación de septos a una corta distancia

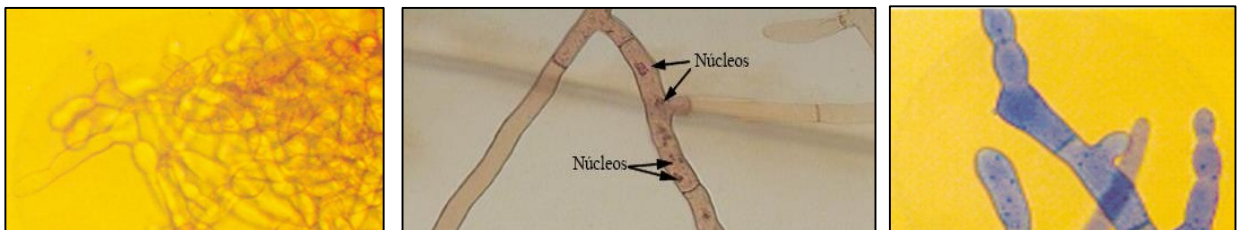


Figura 12. (a) Células moniloides, (b) Núcleos de hifas, (c) Núcleos de hifas en células moniloides. Tomadas de González, 2008.

del punto donde se originan las ramas hifales, sptos doliporos y células multinucleadas en la hifa vegetativa joven.

Los micorrícnicos se aíslan de las raíces de las orquídeas o de otras plantas colonizadas por *Rhizoctonia* no patogénicos. Las células corticales de las raíces de las orquídeas (corteza y/o velamen) sufren una hipertrofia a nivel de núcleo como consecuencia de la colonización del hongo, y éste forma unas estructuras denominadas “Pelotones” que corresponden a enrollamientos hifales, los cuales son degradados por la planta para obtener nutrientes (Hadley y Williamson, 1972).

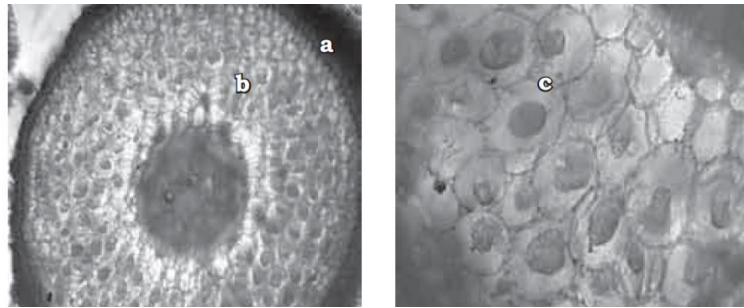


Figura 13. Corte transversal de la raíz de orquídeas (a) Velamen, (b) Corteza donde se observa pelotones 40X, (c) Pelotones viables y consumidos 100X. Tomada de Moquera y Espinosa, 2008.

3.3.3 Grupos de anastomosis

Es una fusión de hifas en el cual se produce intercambio genético a través de migración de núcleos del cual saldrán nuevos híbridos. Tiene que haber una compatibilidad y tiene que ver con frecuencia de alelos en otras palabras como si fuese un inicio de formación llevan un proceso de segregación que solo se reconocen entre ellos AGRIOS (1997), define anastomosis como la fusión de hifas que entran en contacto. ANDERSON (1982) la define como la manifestación de una incompatibilidad somática o vegetativa entre cepas diferentes

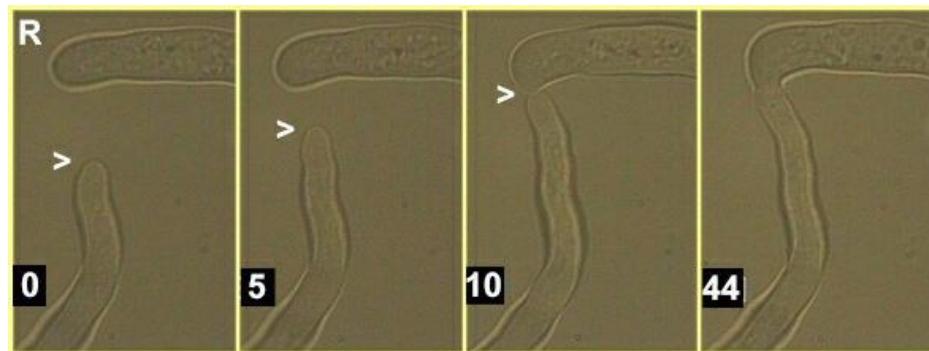


Figura 14. Anastomosis en *Rhizoctonia*. Tomada de Otero, 2010.

En el proceso de fusión de hifas se distingue, una fusión perfecta y una imperfecta, radicando la diferencia en que en la última de éstas, concretada la fusión de las hifas, se produce muerte celular (OGOSHI, 1987).

La fusión perfecta de las hifas de *R. solani* se resume como sigue: crecimiento de las hifas, secreción de una o más sustancias atrayentes, atracción a las sustancias, contacto entre las hifas, cese del crecimiento de las hifas, formación de proyecciones tipo rama, disolución de las paredes celulares y conexión del protoplasto. Un aislamiento de un AG puede reconocer y fusionarse sólo con miembros del mismo AG. Una hifa puede ser atraída por otra desde 100mm, cuando la punta de la hifa cambia su dirección de crecimiento hacia la otra hifa hasta establecer contacto físico.

Esta atracción sólo podría ser causada por sustancias secretadas por una hifa del mismo AG y se asume que estas sustancias son distintas entre los AGs (OGOSHI, 1987). 2.5.3 Número de grupos de anastomosis. Al respecto NEATE y WARCUP (1985) comentan que (Schultz, 1937; Richter y Schneider, 1953; Parmeter *et al.* 1969), propusieron cinco (I-V), seis (A-F) y cuatro (1-4) grupos, respectivamente. El AG-2 fue dividido en los tipos 1 y 2, basándose en la frecuencia de fusión de las hifas, ya que la anastomosis fue frecuente entre los aislamientos del mismo tipo 1 o 2, pero inusual entre ambos. Posteriormente se describió el AG-5 (OGOSHI, 1987).

Neate y warcup (1985) señalan que kuniaga en el año 1979 agregó el ag-bi (aislamiento puente) el cual es capaz de anastomosarse con el ag-2 tipo 1, ag-2 tipo 2, ag-3 y ag-6. a su vez, homma *et al.* (1983), citados por ogoshi (1987), describieron el ag-7, y neate y warcup (1985) describieron en australia el ag-8; carling *et al.* (1987) describieron en alaska el ag-9, y carlinn y summer (1992) encontraron otro ag de *r. solani* el cual tentativamente ellos llamaron ag-10; kumar *et al.* (1999) aislaron el ag-11 de muestras que fueron recolectadas en el oeste de australia y en arkansas, ee.uu. el ag-12 fue aislado de orquídeas micorrizadas en alaska, incluyéndose como un nuevo grupo de anastomosis (carling *et al.*, 1999).

No obstante, existen tres inconvenientes básicos al trabajar la taxonomía del género forma *Rhizoctonia* de orquídeas a partir de aislamientos en cultivo puro: (1) al aislar los hongos en medios de cultivo artificial estos no esporulan y dificultan su identificación, por lo cual se agrupan en morfotipos; (2) la mayoría que logran crecer en medios artificiales son indistinguibles morfológicamente y se deben identificar por técnicas de sistemática molecular; y (3) algunos no crecen en medios artificiales, por lo cual la única manera de identificarlos es por amplificación directa de su ADN con primers específicos para hongos (Bayman y Otero, 2006).

Se comprobó que en medio de cultivo artificial no siempre es posible aislar los hongos micorrízicos de orquídeas o se pierden después de lograrlo (Rasmussen, 2002). Ciertos medios artificiales pueden limitar o excluir el crecimiento de algunos hongos micorrízicos que se encuentran presentes en las raíces de las orquídeas (Porrás-Alfaro y Bayman, 2007).

3.4 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Los estudios de hongos micorrízicos de orquídeas han sido restringidos a datos moleculares obtenidos desde raíces de orquídeas así como de cultivos (Ma. et al. 2003; Moore 1987; Pereira et al. 2003, 2005; Warcup 1980). Las regiones ITS-5.8S y 28S de rDNA son las más usadas en análisis filogenéticos, por considerarse regiones que aportan suficiente información para distinguir especies (Suárez et al. (2006), Shefferson et al. (2007), Taylor et al. (2008), Kottke et al. (2010)).

La sistemática molecular ha avanzado sustancialmente en la taxonomía de *Rhizoctonia* spp. (Vilgalys y Gonzalez, 1990) y en las micorrizas orquidioides también (Taylor y Bruns, 1997) se han basado sobre todo en espaciador interno transcrito (ITS). Para el género *rhizoctonia* las características moleculares se presenta por medio de: la hibridación de ADN, los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs), el ADNpolimórfico amplificado al azar (RAPDs) y las secuencias de ADN (Neate et al., 1988; Carling y Kuninaga, 1990).

La identificación de especies fúngicas y especialmente aquellas que al ser manipuladas no presentan estructuras reproductivas que puedan llevar a su identificación se basa en la secuenciación de determinadas secuencias de ADN especialmente las regiones ITS.. Algunos de estas metodologías se basan en la utilización de primers universales para hongos .Además de la identificación, la utilización de marcadores moleculares como RAPDS (Random Amplified Polymorphic DNA - DNA polimórfico amplificado); los RAPS nos permiten una aproximación a la diversidad genética de una población, el nivel de diferenciación entre estas así como la distancia genética entre individuos y poblaciones; y CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence - Secuencias Polimórficas Amplificadas y Cortadas) permiten revelar relaciones filogenéticas entre individuos y poblaciones dependiendo de su conservación a través de todos lo taxones.Las aproximaciones a la filogenia de los aislamientos de *Rhizoctonia* obtenidos a partir de diferentes especies de orquídeas (Taylor y Bruns, 1999; Otero *et al.*, 2002; Giralanda *et al.*, 2006; Rasmussen, 2002). Por otra parte, estudios han reconocido aislamiento de *Rhizoctonia* binucleada (BNR) no patogénica e hipovirulenta mayormente del suelo, como efectivos biocontroladores de hongos patógenos del ecosistema tales como *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp. y *Pythium* sp., donde el mecanismo de acción que se propone se relaciona con la resistencia sistémica inducida (Sneh *et al.*, 1998; González *et al.*, 2006; Mosquera y Espinosa, 2010).

4. METODOLOGÍA

4.1 Colecta y muestreo de raíces de orquídeas en la Parque Natural Quínini y Reserva Natural San Rafael

- **Colecta de muestras de raíz del género orquidoide**

Se hizo un recorrido de reconocimiento general de la Reserva Natural San Rafael Y Parque Natural Quínini, identificando las plantas de la familia *orquideaceae*. Estas plantas fueron georeferenciadas y posteriormente muestreadas con un total de muestras recolectadas de: en la reserva natural san Rafael de y en el parque natural el Quínini de 21 muestras que posteriormente siguiendo la metodología propuesta por Otero *et al.* (2002) la cual consiste, en coleccionar raíces de la parte media del sistema radicular, con un bisturí que es desinfectado previamente con alcohol al 70% antes de cada corte. Posteriormente las muestras fueron envueltas en toallas de cocina ligeramente humedecida e introducidas en bolsas de e papel Kraff que fueron selladas y marcadas. Las muestras fueron procesadas máximo 24 horas después de haberse coleccionado en el laboratorio de microbiología de la Universidad de Cundinamarca sede Fusagasugá. Se coleccionaron raíces de orquídeas sin identificar de diferentes hábitos biológicos. (Terrestres, epifitas, hemiepifíticas y litoficas), donde fueron tomadas un total de 21 muestras de raíces donde 11 fueron coleccionadas de la Reserva Natural San Rafael y las 14 restantes en el Parque Natural Quínini.

Procesamiento de muestras y aislamiento de hongos asociados a orquídeas

De cada una de las muestras recolectadas se seleccionaron al azar 4 raíces con apariencia sana, que estuvieron en contacto directo con el sustrato, para asegurar una mayor probabilidad de la presencia de hongos asociados a la raíz (Suárez *et al.*, 2006). El aislamiento de los hongos asociados a las raíces de orquídeas se realizó siguiendo la metodología propuesta por (Mosquera *et al.*, 2002). Donde se realizaron cortes transversales a las muestras de raíces para obtener ex plantas de 5mm*5mm.

Los cortes se sometieron a un protocolo de desinfección con etanol al 70% por un minuto, hipoclorito de sodio al 2,5% por 30 segundos, etanol al 70% por un minuto y finalmente, se lavaron con agua destilada estéril por un minuto (Otero *et al.*, 2002); los fragmentos de raíz se secaron sobre toallas de papel estériles para realizar su siembra en medio de cultivo papa dextrosa y agar (PDA) suplementado con 0,05gr/l de cloranfenicol para evitar el crecimiento bacteriano y sobre medio selectivo Ko y Hora (Anexo 1), se realizó la siembra para hacer un extendido del micelio (Herrera, 2014); las muestras se incubaron a temperatura 27°C hasta observar desarrollo micelial de los hongos asociados a la raíz presentes.

Con base en las características macroscópicas de la caja Petri y microscópicas del micelio observadas por medio de montajes directos en azul de lacto fenol, los microorganismos aislados se identificaron hasta género por medio de la clave para hongos imperfectos desarrollada por Barnett y Hunter (1998) se repico en PDA y se conservaron en cultivo puro.

4.2 Aislamiento monomicelial

El procedimiento es obtener aislamientos de hongos genéticamente puros. Si el hongo se aísla de un tejido vegetal que presenta síntomas, éstos pueden ser producidos por varias cepas de un mismo hongo. Por eso es necesario purificar el hongo obtenido en el primer paso del aislamiento. Si el hongo no produce esporas en el medio de cultivo, se utilizan puntas de hifas (Castellanos et al, 2001).

Según la metodología propuesta por el CIAT (2001). Se tomó un cuadrado de aproximadamente 5mm*5mm del medio de cultivo PDA donde se observó que el hongo crecía, se transfirió el cuadro al centro de una caja de Petri con medio de cultivo PDA fresco, se llevó a la incubadora a 24 °C durante 24 horas.

Al día siguiente, bajo el estereoscopio y en cámara de flujo laminar, se observó el micelio del hongo en crecimiento y se enfocaron los bordes de la colonia para identificar las puntas de las hifas en crecimiento.

Luego con una aza recta flameada, se cortó un trozo de agar que tenía la punta de una sola hifa, con precaución de no tocar otras hifas alrededor de la que se estaba aislando, se hizo la siembra del trozo de agar con la hifa a una nueva caja Petri con medio de cultivo PDA fresco a razón de solo una hifa en cada caja. Se llevó a la incubadora a 24 °C durante 10 días. Al cabo de 10 días se obtuvo un cultivo genéticamente puro (Mosquera, 2010).

4.3 Extracción de ADN, PCR y secuenciación de las muestras

A partir de los cultivos monomiceliales 7 muestras al azar fueron procesados en el laboratorio CorpoGen donde se realizaron los siguientes procedimientos:

- Extracción del ADN.
- Amplificación por PCR con los iniciadores ITS4 e ITS5 de la región genética denominada ITS (Internal Transcribed Spacer) del DNA ribosomal fúngico.
- Purificación del fragmento amplificado.
- Secuenciación por extensión del iniciador de los fragmentos amplificados al menos dos diferentes iniciadores. (ITS1 e ITS2)

4.4 Identificación por secuenciación y construcción del árbol filogenético

Luego con secuencias generadas por CorpoGen se realizó:

- Una limpieza manual por medio del software Chromas de cada una de las secuencias de los fragmentos recibidos.
- Se ensamblaron las secuencias en el software Clustalw Omega tomando el ITS1 como forward y el ITS4 como reverse, generando la secuencia consenso.

- Se analizó taxonómicamente la secuencia consenso mediante la comparación contra la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank y UNITE.
- Se alineó y se generó de árbol filogenético utilizando las secuencia con mayor similitud a la secuencias consenso.
- Se clasificó taxonómicamente las secuencias consenso.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

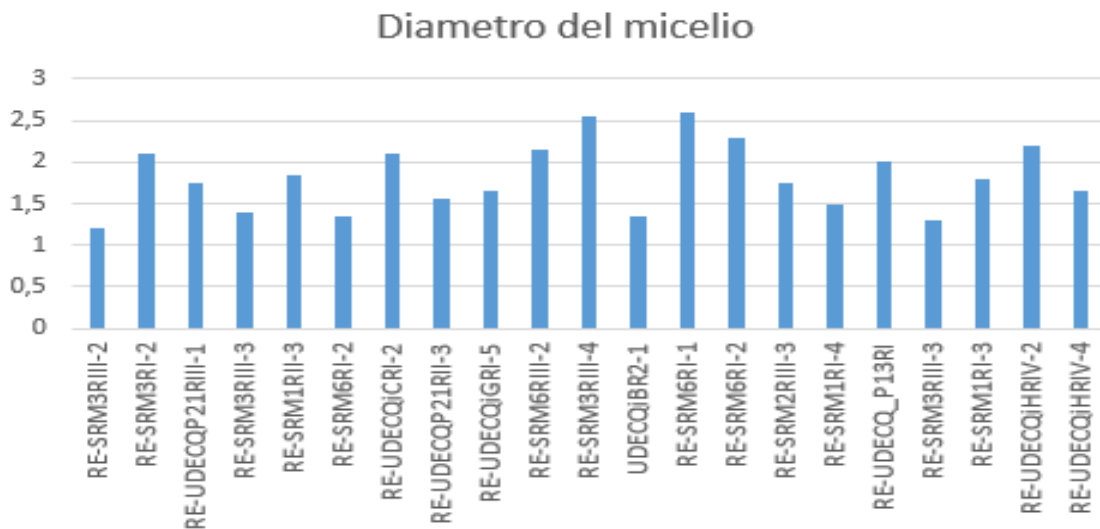
5.1 Orquídeas muestreadas

Se colectaron un total de 25 muestras, donde 11 de estas muestras fueron tomadas de la Reserva Natural San Rafael y las 14 restantes en el Parque Natural Quinini, tras este proceso de recolección cada muestra fue tomada de orquídeas diferentes. Las raíces de plantas de orquídeas recolectadas a individuos silvestres que no presentaban señales visibles de enfermedad (anexo 1). A cada muestra que fue procesada en el laboratorio se le asignó un código que indica el lugar de procedencia, el número de muestra y por último el número de repetición de la muestra, donde el **SR** corresponde a la Reserva Natural San Rafael **Qi** al Parque Natural Quinini. Del total de aislamientos 21 fueron caracterizado macroscópicamente y se seleccionaron los 15 más diferentes, los cuales fueron caracterizados microscópicamente. Solo 7 de estos aislamientos fueron secuenciados molecularmente.

5.2 Caracterización macroscópica de las muestras

Se caracterizó 21 aislamientos diferentes de muestras de hongos asociados a raíces de orquídeas, de acuerdo su morfología macroscópica se clasificaron con las siguientes características: diámetro micelial, textura, color, tipo de crecimiento y presencia del micelio, como se pueden observar en (Anexo 2).

El diámetro del micelio tomado tres días después de la siembra varía entre 1,3 a 2,7cm (grafica 2). En forma similar (Gutiérrez *et.al*, 2006) encontraron que *Rhizoctonia solani* que formación de agregados oscila en 9mm 24 horas después de la siembra. Por otra parte (Martínez *et.al*, 2015) reportan para *Pleurotus ostreatus* tasas de crecimiento de 2,1 cm en días de incubación, lo cual se ajusta más a los datos encontrados. Es importante mencionar que el medio de cultivo puede interferir en la capacidad de crecimiento del mismo (Agrios, 2007).

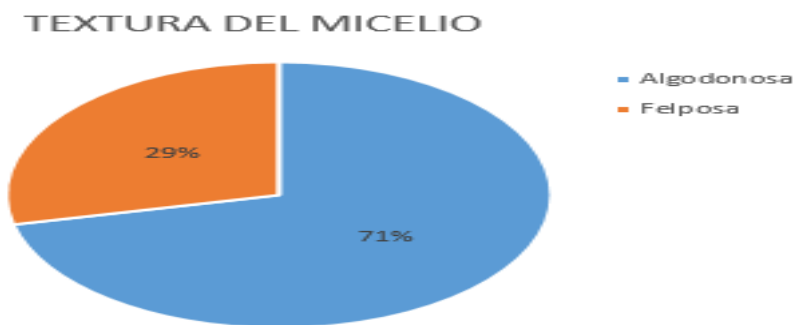


Grafica 10. Diámetro del micelio

La textura del micelio de las muestras se clasifico en dos opciones felposa o algodonosa (Grafica 3), donde la textura algodonosa predomino (Gutierrez *et. al*, 2006). Durbin (1959) encontró diferencias en la tasa de crecimiento entre aislamientos de *R. solani* con crecimientos aéreos, superficiales y subterráneos, siendo mayor la tasa de crecimiento en los aéreos y menor en los subterráneos (Durbin, 1959).

Las hifas cuando jóvenes son hialinas de 6 a 12 micras de diámetro, con tabiques gruesos, al envejecer adquieren color castaño a castaño rojizo, presenta características de ramificarse en ángulo recto. Produce esclerocios en forma de masa miceliales, color blanco, que luego se oscurecen hasta llegar a distintos tonos de castaño, irregulares, grandes de 1 a 8 mm visibles a simple vista, variando las condiciones en que se produce, de consistencia dura en cortes microscópicos muestran una constitución de hifas entrelazadas, de diámetro variable, cortas, elípticas, semejantes a diminutos barriles dispuestos en cadena (Sarasola et al, 1975).

Macroscópicamente las colonias típicas de este microorganismo se caracterizan por ser blancas, algodonosas, planas, sin embargo, dependiendo de la especie, puede presentarse tonalidades cremas amarillentas (Barnett et al, 1982).



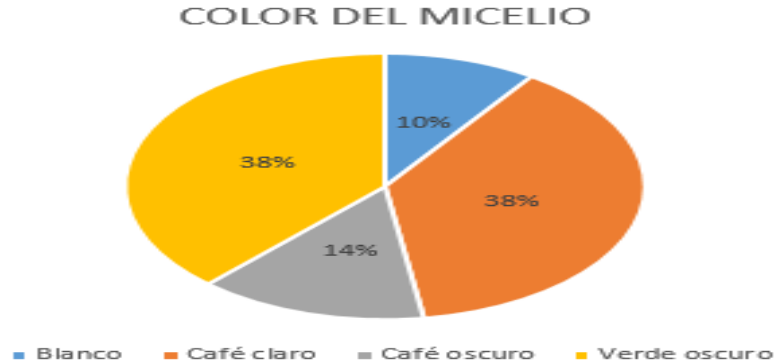
Grafica 11. Textura del micelio: tipo algodonosa y felposa

TEXTURA DEL MICELIO	cantidad de muestras	%
Algodonosa	15	71,4285714
Felposa	6	28,5714286
	21	100

Tabla 3. Textura del micelio

En el diagrama de torta (Grafica 4), refleja que el color del micelio tiene dos tipos de colores que abarcan el 38% cada uno (verde oscuro y café claro) correspondientes a la cantidad de muestras caracterizadas como se observa en (tabla 4), el 24% restante corresponde a el color blanco y el café oscuro con un 10% y 14%. Lo cual infiere que al momento de caracterizar a *Rhizoctonia*, el color café claro y verde oscuro tendrá predominancia, pero con base en la literatura el color café claro nos caracteriza a *Rhizoctonia* en un crecimiento tipo I o II, y al color blanco con un crecimiento tipo IV. El color del micelio con variaciones

desde pardo-claro hasta pardo-oscuro, dependiendo de la edad del cultivo. Esta descripción coincide con la reportada (Ogoshi, 1987) y (Sneh *et. al*, 1998).

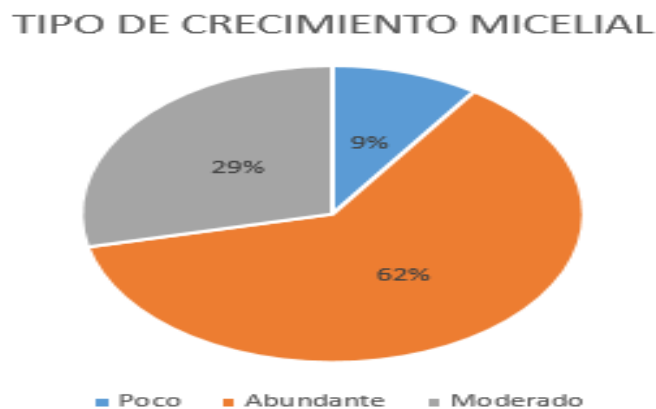


Grafica 12. Color del micelio

COLOR DEL MICELIO	cantidad de muestras	%
Blanco	2	9,52380952
Café claro	8	38,0952381
Café oscuro	3	14,2857143
Verde oscuro	8	38,0952381

Tabla 4. Color del micelio

En el diagrama de torta (Grafica 5), refleja que el crecimiento del micelio tipo abundante abarca un 62% de la cantidad de muestras caracterizadas como se observa en (tabla 5), el 29% corresponde a un crecimiento moderado y el 9 % restante a un poco crecimiento micelial. Lo cual infiere que al momento de caracterizar a *Rhizoctonia*, el tipo de crecimiento del micelio abundante puede presentarse en mayor cantidad de muestras. Durbin (1959) encontró diferencias en la tasa de crecimiento entre aislamientos de *R. solanicon* crecimientos aéreos, superficiales y subterráneos, siendo mayor la tasa de crecimiento en los aéreos y menor en los subterráneos (Durbin, 1959).



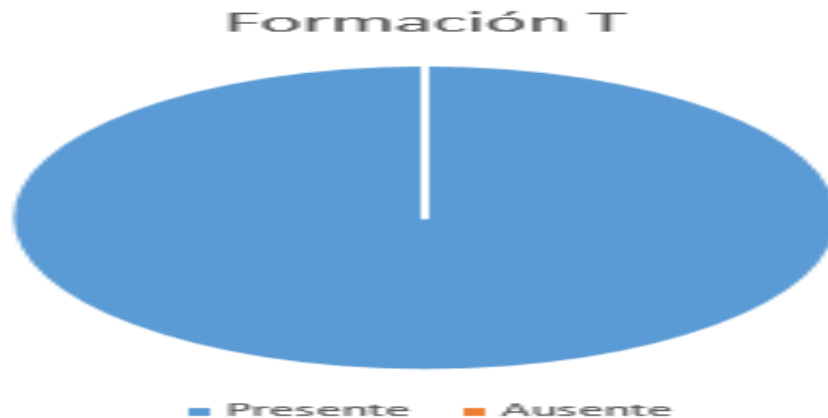
Grafica 13. Tipo de crecimiento del micelio

5.3 Caracterización microscópica de las muestras

De los 21 aislamientos caracterizados macroscópicamente, se caracterizaron microscópicamente los 21 con un resultado de que solo 15 de estos presentaron aunque sea una sola de las características microscópicas para determinar a *Rhizoctonia*, las cuales fueron: formación de T, presencia de constricción y presencia de células monilioides. Las cuales se podrán observar en los siguientes diagramas:

En el diagrama de torta (Grafica 6), refleja la formación de T con una presencia del 100% de la cantidad de muestras caracterizadas como se observa en (tabla 6), Lo cual infiere que al momento de caracterizar a *Rhizoctonia*, la formación de la T es una característica muy clara y específica que nos afirma la presencia del hongo como podemos observar en las imágenes (anexo 3). Durbin (1959) encontró diferencias en la tasa de crecimiento entre aislamientos de *R. solani* con crecimientos aéreos, superficiales y subterráneos, siendo mayor la tasa de crecimiento en los aéreos y menor en los subterráneos (Durbin, 1959).

(Giovannini C., et. al, 2005) indica que es posible encontrar individuos morfológicamente distintos dentro de la población de *R. solani*, pero morfológicamente se identifican por esta característica de bifurcación hifal de la formación de un ángulo recto.



Grafica 14. Formación de T: presencia o ausencia

Formación T	Cantidad de muestras	%
Presente	15	100
Ausente	0	0

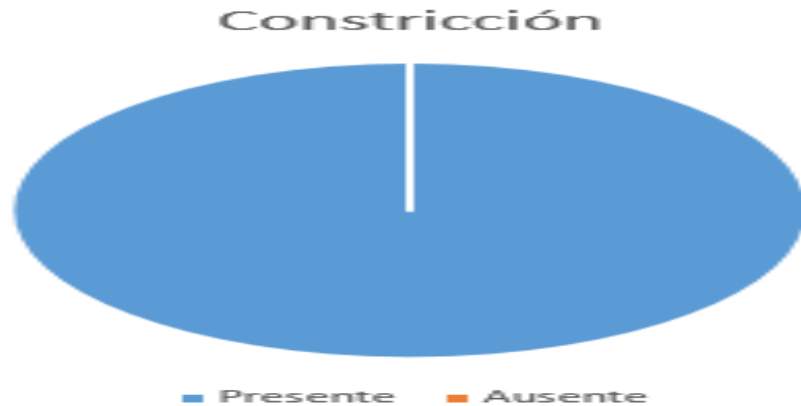
Tabla 5. Formación de T

En el diagrama de torta (Grafica 7), refleja que la constricción presenta el 100% de la cantidad de muestras caracterizadas como se observa en (tabla 7), Lo cual infiere que al momento de caracterizar a *Rhizoctonia*, la constricción de la hifa es una característica muy

clara y específica que nos afirma la presencia del hongo como podemos observar en las imágenes (anexo 3).

Constricción	Cantidad de muestras	%
Presente	15	100
Ausente	0	0

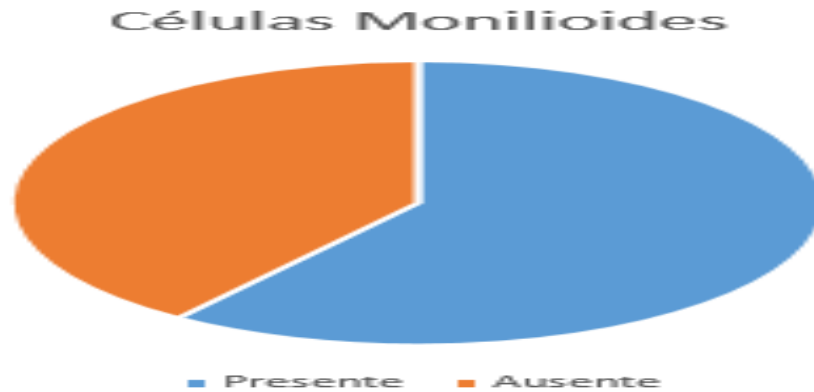
Tabla 6. Constricción de la hifa



Grafica 15. Constricción: presencia o ausencia

En el diagrama de torta (Grafica 7), refleja que la constricción presenta el 100% de la cantidad de muestras caracterizadas como se observa en (tabla 7), Lo cual infiere que al momento de caracterizar a *Rhizoctonia*, la constricción de la hifa es una característica muy clara y específica que nos afirma la presencia del hongo como podemos observar en las imágenes (anexo 3). La constricción hifal es una característica única del genero forma *Rhizoctonia* (Agrios 2001).

Las características de las hifas, junto con la presencia de células multinucleadas y formación de células moniloides descritas por Parmeter y Whitney (1970) como propias de *R. solani*, fueron observadas en todos los aislamientos, lo que permitió clasificarlos dentro de esta especie.



Grafica 16. Células monilioides: presentes o ausentes.

Células Monilioides	Cantidad de muestras	%
Presente	9	60
Ausente	6	40

Tabla 7. Células monilioides: cantidad de muestras presentes o ausentes.

Frente a los resultados anteriores se puede verificar que los 15 aislamientos caracterizados tanto macroscópicamente como microscópicamente presentan características que lleva a determinar que los hongos son pertenecientes al género *Rhizoctonia*, por lo tanto para realizar el análisis molecular se selecciona al azar 7 aislamientos de hongos micorrizicos con características microscópicas y macroscópicas correspondientes al género-forma *Rhizoctonia* (Sneh et al., 1991; Agrios, 2002).

5.4 ANÁLISIS Y COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS

El análisis y comparación de las secuencias se realizó para solo 7 de los 15 aislamientos caracterizados microscópicamente, ya que los recursos para poder llevar a cabo el proyecto estaban destinados solo para esta cantidad de secuencias, en las se obtuvo los siguientes resultados:

# MUESTRA	CODIGO	RESULTADOS NCBI			RESULTADOS UNITE		
		microorganismo	% identidad	% cobertura	microorganismo	% identidad	% cobertura
1	UDECQiHR4_2	<i>Neofusicocum Parvum</i>	100	100	<i>Neofusicocum Parvum</i>	100	100
2	UDECRC1_2	<i>Alternaria Alternata</i>	100	99,82	<i>Alternaria Alternata</i>	100	99,72
3	UDECQiHR4_4	<i>Alternaria Alternata</i>	100	100	<i>Alternaria Alternata</i>	100	100
4	UDECQiP13R1_4	<i>Pleurotus Sp</i>	100	100	<i>Pleurotus Sp</i>	100	100
5	SRM3R1_2	<i>Bipolaris Sp</i>	100	99,7	<i>Bipolaris Sp</i>	100	99,8
6	SRM3R3_4	<i>Bipolaris Sp</i>	100	99,1	<i>Bipolaris Sp</i>	100	99,1
7	SRM6R1_2	<i>Alternaria Alternata</i>	100	99,3	<i>Alternaria Alternata</i>	100	99,4

Tabla 8. Comparación de secuencias

1. Secuencia consenso de la muestra UDECQiHR4_2

```
>CCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTCCGCACCGGCGCCCTTCGGGGGGCTGGCCA
GCGCCCGCCAGAGGACCATAAACTCCAGTCAGTGAACCTTCGCAGTCTGAAAAACAAGT
TAATAAACTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC
ATTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCT
CTGCTTGGTATTGGGCTTCGTCTCCACGGACGCGCCTTAAAGACCTCGGCGGTGGCGTC
TTGCCTCAAGCGTAGTAGAAAACACCT.
```

La secuencia consenso de la muestra UDECQiHR4_2 alineada con la base de datos universal del GenBank presento 590 pares de bases apareadas y alineamientos significativos del 100% para *Neofusicocum parvum* como se observa en la (tabla 3). Este no presenta

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y DE LAS SECUENCIA ITS DE AISLAMIENTOS DE HONGOS ASOCIADOS A RAÍCES DE ORQUÍDEAS EN LA REGIÓN DEL SUMAPAZ

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results					
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
Neofusicoccum parvum isolate AF30F internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	590	590	100%	4e-165	100%
Neofusicoccum parvum isolate AF29F internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	590	590	100%	4e-165	100%
Neofusicoccum parvum isolate AF10F internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	590	590	100%	4e-165	100%
Neofusicoccum parvum isolate AF9F internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	590	590	100%	4e-165	100%
Neofusicoccum parvum strain 2D 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	590	590	100%	4e-165	100%
Neofusicoccum parvum strain CMW39328 clone M276 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	590	590	100%	4e-165	100%
Neofusicoccum parvum isolate HPP121 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	590	590	100%	4e-165	100%
Neofusicoccum parvum isolate B171 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	590	590	100%	4e-165	100%
Neofusicoccum parvum isolate 110-R 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	590	590	100%	4e-165	100%
Neofusicoccum parvum genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, strain TUN7	590	590	100%	4e-165	100%

Tabla 9. Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra UDECQiHR4_2 con la base de datos universal del GenBank.

La secuencia consenso UDECQiHR4_2 alineada con la base de datos de *Rhizoctonia* del GenBank, presento alineamientos significativos del 49 al 87% con: *Thanatephorus cucumeris* y *Rhizoctonia solani* como se observa en la (tabla 4)

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results					
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
Thanatephorus cucumeris isolate Rs 23 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	329	329	87%	4e-91	87%
Thanatephorus cucumeris isolate Rs 18 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	280	280	57%	2e-76	93%
Thanatephorus cucumeris strain Rs clone 4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	280	280	57%	2e-76	93%
Rhizoctonia solani isolate F556 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	266	266	65%	4e-72	87%
Rhizoctonia solani isolate F555 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	266	266	65%	4e-72	87%
Rhizoctonia solani strain RRS3 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	262	262	53%	5e-71	93%
Rhizoctonia sp. 62B 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	251	251	53%	9e-68	92%
Rhizoctonia solani genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, isolate PG1	248	248	53%	1e-66	91%
Rhizoctonia solani isolate wb550 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	241	241	48%	2e-64	94%
Rhizoctonia solani voucher CYA15 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	235	235	49%	7e-63	93%

Tabla 10. Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra UDECQiHR4_2 con la base de datos universal de *Rhizoctonia*.

2. Secuencia consenso de la muestra UDECQiR1-2

```
>GCGTACTTCTTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCCTAGGACAAACATAAACCTTTTGT
AATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGG
TTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAAATCAG
TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGT
TCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTG
CTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAAG
TCGCACTCTCTATCAGCAAAG.
```

La secuencia consenso de la muestra UDECQiR1-2 alineada con la base de datos universal del GenBank presento 580 pares de bases apareadas y alineamientos significativos del 100% para *Alternaria sp* y *Alternaria alternata* como se observa en la (tabla 12). El cual es reportado por (Merchan, 2012) reportado en un orquideario de la Universidad de Cuenca en Ecuador la incidencia y severidad e identifico hongos patógenos, entre ellos *Alternaria sp*, por lo tanto se puede inferir que puede pertenecer a un hongo patógeno de la orquídea o un hongo endófito que se encontraba en la raíz.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
<input type="checkbox"/>	Alternaria sp. 1SW-5 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S	580	580	100%	7e-162	100%
<input type="checkbox"/>	Alternaria sp. 2SW-2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S	580	580	100%	7e-162	100%
<input type="checkbox"/>	Alternaria sp. CD-2B internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S	580	580	100%	7e-162	100%
<input type="checkbox"/>	Alternaria alternata isolate 6R2SN12 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete se	580	580	100%	7e-162	100%
<input type="checkbox"/>	Alternaria alternata isolate 6R2SN05 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete se	580	580	100%	7e-162	100%
<input type="checkbox"/>	Alternaria alternata isolate Shimla internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spa	580	580	100%	7e-162	100%
<input type="checkbox"/>	Alternaria tenuissima strain MSEF30 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete se	580	580	100%	7e-162	100%
<input type="checkbox"/>	Uncultured Alternaria clone MTJR-F30 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	580	580	100%	7e-162	100%
<input type="checkbox"/>	Alternaria sp. XN-2-1-3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2,	580	580	100%	7e-162	100%
<input type="checkbox"/>	Alternaria sp. XN-3-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, c	580	580	100%	7e-162	100%

Tabla 11. Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra UDECQiR1-2 con la base de datos universal del GenBank.

La secuencia consenso UDECQiR1-2 alineada con la base de datos de *Rhizoctonia* del GenBank, presento alineamientos significativos del 50% al 63% con: *Thanatephorus cucumeris* y *Rhizoctonia solani* como se observa en la (tabla 13)

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y DE LAS SECUENCIA ITS DE AISLAMIEN-
TOS DE HONGOS ASOCIADOS A RAÍCES DE ORQUÍDEAS EN LA REGIÓN DEL SUMAPAZ**

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results					
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
Thanatephorus cucumeris isolate Rs 23 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	286	286	61%	4e-78	92%
Rhizoctonia solani isolate F556 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	260	260	63%	2e-70	89%
Rhizoctonia solani isolate F555 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	260	260	63%	2e-70	89%
Thanatephorus cucumeris isolate Rs 18 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	248	248	54%	1e-66	91%
Thanatephorus cucumeris strain Rs clone 4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	248	248	54%	1e-66	91%
Rhizoctonia solani strain RRS3 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, complete sequence	241	241	53%	2e-64	91%
Rhizoctonia sp. 62B 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	235	235	53%	7e-63	91%
Rhizoctonia solani genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, isolate PG1	232	232	52%	8e-62	91%
Rhizoctonia solani isolate vb550 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	228	228	52%	1e-60	90%
Rhizoctonia sp. CNPAF_0211 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, complete sequence	226	226	50%	3e-60	91%

Tabla 12. Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra UDECQiR1-2 con la base de datos de *Rhizoctonia*.

3. Secuencia consenso de la muestra UDECQiHR1-B

```
>TTTTGCGTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGACAAACATAAACCTTTT
GTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTG
GTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTC
AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCT
GTTGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTT
GCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACA
AGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCC
```

La secuencia consenso de la muestra UDECQiHR1-B alineada con la base de datos universal del GenBank, presento 508 pares de bases apareadas y alineamientos significativos del 100% para *Alternaria sp* y *Alternaria alternata* como se observa en la (tabla 14)

Sequences producing significant alignments:					
Select: All None Selected: 0					
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results					
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
Alternaria sp. 1SW-5 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	508	508	100%	3e-140	100%
Alternaria sp. 2SW-2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	508	508	100%	3e-140	100%
Alternaria sp. CD-2B internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	508	508	100%	3e-140	100%
Alternaria alternata isolate 6R2SN12 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	508	508	100%	3e-140	100%
Alternaria alternata isolate 6R2SN05 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	508	508	100%	3e-140	100%
Alternaria alternata isolate Shimia internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, complete sequence	508	508	100%	3e-140	100%
Alternaria tenuissima strain M5EF30 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	508	508	100%	3e-140	100%
Uncultured Alternaria clone MTJR-F30 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	508	508	100%	3e-140	100%
Alternaria sp. XN-2-1-3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	508	508	100%	3e-140	100%
Alternaria sp. XN-3-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	508	508	100%	3e-140	100%

Tabla 13. Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra UDECQiHR1-B con la base de datos universal del GenBank.

La secuencia consenso UDECQiHR1-B alineada con la base de datos de *Rhizoctonia* del GenBank, presento alineamientos significativos del 50% al 63% con: *Thanatephorus cucumeris* y *Rhizoctonia solani* como se observa en la (tabla 15)

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments					
Download GenBank Graphics Distance tree of results					
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value Ident
<input type="checkbox"/>	Thanatephorus cucumeris isolate Rs 23 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	286	286	58%	5e-78 92%
<input type="checkbox"/>	Rhizoctonia solani isolate F556 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	260	260	59%	2e-70 89%
<input type="checkbox"/>	Rhizoctonia solani isolate F555 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	260	260	59%	2e-70 89%
<input type="checkbox"/>	Thanatephorus cucumeris isolate Rs 18 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	248	248	51%	1e-66 91%
<input type="checkbox"/>	Thanatephorus cucumeris strain Rs clone 4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	248	248	51%	1e-66 91%
<input type="checkbox"/>	Rhizoctonia solani strain RRS3 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, complete sequence	241	241	50%	2e-64 91%
<input type="checkbox"/>	Rhizoctonia sp. 62B 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	235	235	50%	7e-63 91%
<input type="checkbox"/>	Rhizoctonia solani genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, isolate PG1	232	232	48%	9e-62 91%
<input type="checkbox"/>	Rhizoctonia solani isolate wb550 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	228	228	49%	1e-60 90%

Tabla 14. Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra UDECQiHR1-B con la base de datos de *Rhizoctonia*.

4. Secuencia consenso de la muestra UDECQiP13

```
>TAACCCCCTGCACCTCTTATAAAAAGTTGGGGTGGGGGGTCCCCTGGGGTTTTTTTTT
AATAGAAAAACCCCTTGTGTTTTCAAAAAAATTTTTTATATTCACCCACCCCAAAGT
ATGTTTTATTATGAATGGTTTATAATGGCAAGGCCCTGAACCTTATTAATTAATTCAA
TTTCAACAAAGGATTTTTTGGCTTTTGGATTGGTGAAGAAAGGAAGGAAATTCGATAA
GTAAATTGAAATGCCGAATTCCATGGATTATTGGATTTTTGAACGCCCCCTGGGCCCT
TTGGTTTTTCGAAGGGCCAGCCTGTTTGAGGGTCCCTATTTTTTTTTTGAAGGTTCGGCT
CCTCTTAAATGCATTAGCGGGACTTTGTTGCCTCTGCGCATAGTGTGATAATTATCTA
CGCTAGACGCATGCAATTCTTATATTGTCCAGCTTCTAATCGTCTCAAGGGACAATTA
CTTTGACAATTGA
```

La secuencia consenso de la muestra UDECQiP13 alineada con la base de datos universal del GenBank, presento 361 pares de bases apareadas y alineamientos significativos del 97% para *Pleurotus sp* como se observa en la (tabla 16).

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y DE LAS SECUENCIA ITS DE AISLAMIENTOS DE HONGOS ASOCIADOS A RAÍCES DE ORQUÍDEAS EN LA REGIÓN DEL SUMAPAZ

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
<input type="checkbox"/>	Pleurotus sp. BAB-5074 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	361	361	97%	1e-95	79%
<input type="checkbox"/>	Pleurotus djamor voucher El Colegio de la Frontera Sur ECS-0159 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	361	361	97%	1e-95	79%
<input type="checkbox"/>	Pleurotus djamor voucher Colegio de Posgraduados CP-170 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	361	361	97%	1e-95	79%
<input type="checkbox"/>	Pleurotus djamor voucher El Colegio de la Frontera Sur ECS-0151 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	361	361	97%	1e-95	79%
<input type="checkbox"/>	Pleurotus djamor voucher El Colegio de la Frontera Sur ECS-0150 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	361	361	97%	1e-95	79%
<input type="checkbox"/>	Pleurotus djamor voucher El Colegio de la Frontera Sur ECS-0123 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	361	361	97%	1e-95	79%
<input type="checkbox"/>	Pleurotus djamor voucher SP445798 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	357	357	97%	1e-94	78%
<input type="checkbox"/>	Pleurotus djamor voucher El Colegio de la Frontera Sur ECS-0162 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	357	357	97%	1e-94	78%
<input type="checkbox"/>	Pleurotus sp. BAB-5008 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	355	355	97%	5e-94	78%
<input type="checkbox"/>	Pleurotus djamor isolate TFB11718 voucher TENN F-59778 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	353	353	93%	2e-93	79%

Tabla 15. Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra UDECQIP13 con la base de datos universal del GenBank.

5. Secuencia consenso de la muestra SRM3R1-2

```
>TGCGCACTTGTGTTGTTTCCTGGGCGGGTTCGCCCGCCACCAGGACCAAACCATAAACCTTT
TTTTTATGTAGTTGCAATCAGCGTCAGTAAAAACAATGTAATTATTACAACCTTTCAACAA
CGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAAAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAA
TTGCAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAA
GGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTTTTTG
TCTCTCGTTCTCGGGAGACTCGCCTTAAAACGATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAG
CGCAGCACATATTTTGCCTTTGTATCAGGAGAAAAGGAC
```

La secuencia consenso de la muestra SRM3R1-2 alineada con la base de datos universal del GenBank, presento 609 pares de bases apareadas y alineamientos significativos del 100% para *bipolaris sp.* y *cochiobolus sativus* como se observa en la (tabla 17). El cual es reportado como hongo endófito en orquídeas de las especies *Drobium* (Chen et al., 2012), *Stelis*, *Lepanthes*, *Maxillaria*, *Epidendrum* (Bayman, 2006) y *Odontoglossum* (Singh et al., 2011). Por esto se puede inferir que este sea un hongo endófito asociado a las raíces de las orquídeas.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y DE LAS SECUENCIA ITS DE AISLAMIENTOS DE HONGOS ASOCIADOS A RAÍCES DE ORQUÍDEAS EN LA REGIÓN DEL SUMAPAZ

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results					
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
Bipolaris sp. 3 TT-2014 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 2	609	609	100%	2e-170	99%
Uncultured fungus clone LX040429-122-035-A01 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal t	609	609	100%	2e-170	99%
Cochliobolus sativus genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, isolate: CSMMA1	609	609	100%	2e-170	99%
Cochliobolus sativus strain CAP33B 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcrib	609	609	100%	2e-170	99%
Cochliobolus sativus strain C20 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequenc	609	609	100%	2e-170	99%
Cochliobolus sativus strain C17 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequenc	609	609	100%	2e-170	99%
Cochliobolus sativus strain M94 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; ε	609	609	100%	2e-170	99%
Cochliobolus sativus strain M8.2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed s	609	609	100%	2e-170	99%
Cochliobolus sativus strain M73 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed s	609	609	100%	2e-170	99%
Cochliobolus sativus strain M64.2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed	609	609	100%	2e-170	99%

Tabla 16. Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra SRM3R1-2 con la base de datos universal del GenBank.

La secuencia consenso SRM3R1-2 alineada con la base de datos de *Rhizoctonia* del GenBank, presento alineamientos significativos del 45% al 55% con: *Thanatephorus cucumeris*, *Rhizoctonia solani* y *Rhizoctonia sp* como se observa en la (tabla 18)

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results					
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
Thanatephorus cucumeris isolate Rs 23 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transc	259	259	55%	6e-70	90%
Rhizoctonia solani isolate F566 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	242	242	46%	5e-65	94%
Rhizoctonia solani isolate F555 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	242	242	46%	5e-65	94%
Thanatephorus cucumeris isolate Rs 18 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transc	228	228	50%	1e-60	89%
Thanatephorus cucumeris strain Rs clone 4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra	228	228	50%	1e-60	89%
Rhizoctonia sp. 62B 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, com	221	221	45%	2e-58	91%
Rhizoctonia solani strain RRS3 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2	221	221	48%	2e-58	90%
Rhizoctonia solani genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, isolate PG1	219	219	51%	6e-58	88%
Rhizoctonia sp. CNPAF_0211 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, i	215	215	45%	7e-57	90%
Rhizoctonia sp. CNPAF_0149 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, i	215	215	45%	7e-57	90%

Tabla 17. Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra SRM3R1-2 con la base de datos de *Rhizoctonia*.

6. Secuencia consenso de la muestra SRM3R3-4

```
>GTTTCCTGGGCGGGTTCGCCCGCCACCAGGACCAACCATAAACCTTTTTTTTTTATGTAGT
TGCAATCAGCGTCAGTAAAAACAATGTAATTATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT
TCTGGCATCGATGAAAAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAAATTCAG
TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTT
```


CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y DE LAS SECUENCIA ITS DE AISLAMIENTOS DE HONGOS ASOCIADOS A RAÍCES DE ORQUÍDEAS EN LA REGIÓN DEL SUMAPAZ

CGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTTTTTGTCTCTCGTTCTCGG
GAGACTCGCCTTAAAACGATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACATATTTT
GCGCTTTGTATCAGGAGAAAA

La secuencia consenso de la muestra SRM3R3-4 alineada con la base de datos universal del GenBank, presento 578 pares de bases apareadas y alineamientos significativos del 100% para *bipolaris sp.* y *cochiobolus sativus* como se observa en la (tabla 19)

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results					
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
Bipolaris sp. 3 TT-2014 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 2	578	578	100%	2e-161	99%
Uncultured fungus clone LX040429-122-035-A01 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal t	578	578	100%	2e-161	99%
Cochliobolus sativus genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, isolate: CSMMA1	578	578	100%	2e-161	99%
Cochliobolus sativus strain CAP33B 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcrib	578	578	100%	2e-161	99%
Cochliobolus sativus strain C20 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequenc	578	578	100%	2e-161	99%
Cochliobolus sativus strain C17 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequenc	578	578	100%	2e-161	99%
Cochliobolus sativus strain M94 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; a	578	578	100%	2e-161	99%
Cochliobolus sativus strain M8 2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed s	578	578	100%	2e-161	99%

Tabla 18. Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra SRM3R3-4 con la base de datos universal del GenBank.

La secuencia consenso SRM3R3-4 alineada con la base de datos de Rhizoctonia del GenBank, presento alineamientos significativos del 48 % al 58 % con: *Thanatephorus cucumeris* y *Rhizoctonia solani* como se observa en la (tabla 20)

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results					
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
Thanatephorus cucumeris isolate Rs 23 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transc	259	259	58%	6e-70	90%
Rhizoctonia solani isolate F556 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	242	242	48%	5e-65	94%
Rhizoctonia solani isolate F555 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	242	242	48%	5e-65	94%
Thanatephorus cucumeris isolate Rs 18 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transc	228	228	53%	1e-60	89%
Thanatephorus cucumeris strain Rs clone 4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra	228	228	53%	1e-60	89%
Rhizoctonia sp. 62B 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, com	221	221	48%	1e-58	91%
Rhizoctonia solani strain RRS3 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2	221	221	50%	1e-58	90%
Rhizoctonia solani genomic DNA containingq ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, isolate PG1	219	219	53%	5e-58	88%
Rhizoctonia sp. CNPAF_0211 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, 	215	215	48%	6e-57	90%
Rhizoctonia sp. CNPAF_0149 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, 	215	215	48%	6e-57	90%

Tabla 19. Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra SRM3R3-4 con la base de datos de Rhizoctonia.

7. Secuencia consenso de la muestra SRM6R1-2

```
>TTTCCTGGGCGGGTTTCGCCCGCCACCAGGACCAAACCATAAACCTTTTTTTTTTTATGCAGT
TACCATCAGCGTCAGTAAAAACAATGTAATTAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTG
GTTCTGGCATCGATGAAAAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAAAATTC
AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCT
GTTGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTTTTGTCTCCCTCTTT
CTGGGAAACTCGCCTTAAAACGATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAT
AATTTGCGCTTTGTATCAGGAGAAAAGGACGGTAATCCATC
```

La secuencia consenso de la muestra SRM6R1-2 alineada con la base de datos universal del GenBank, presento 508 pares de bases apareadas y alineamientos significativos del 100% para Alternaria sp y Alternaria alternata como se observa en la (tabla 21).

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
Bipolaris zeicola strain ACCC38965 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcrib	603	603	100%	6e-169	99%
Bipolaris zeicola strain ACCC38964 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcrib	603	603	100%	6e-169	99%
Bipolaris zeicola strain ACCC38963 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcrib	603	603	100%	6e-169	99%
Bipolaris zeicola strain ACCC38962 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcrib	603	603	100%	6e-169	99%
Bipolaris zeicola strain ACCC38961 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcrib	603	603	100%	6e-169	99%
Bipolaris zeicola strain ACCC38960 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcrib	603	603	100%	6e-169	99%
Bipolaris zeicola strain ACCC38959 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcrib	603	603	100%	6e-169	99%
Bipolaris zeicola isolate B36 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; ;	603	603	100%	6e-169	99%
Bipolaris zeicola isolate B30 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; ;	603	603	100%	6e-169	99%
Bipolaris zeicola isolate B29 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; ;	603	603	100%	6e-169	99%

Tabla 20. Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra SRM6R1-2 con la base de datos universal del GenBank.

La secuencia consenso SRM6R1-2 alineada con la base de datos de *Rhizoctonia* del GenBank, presento alineamientos significativos del 50% al 63% con: Thanatephorus cucumeris y Rhizoctonia solani como se observa en la (tabla 22).

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y DE LAS SECUENCIA ITS DE AISLAMIENTOS DE HONGOS ASOCIADOS A RAÍCES DE ORQUÍDEAS EN LA REGIÓN DEL SUMAPAZ

Sequences producing significant alignments:

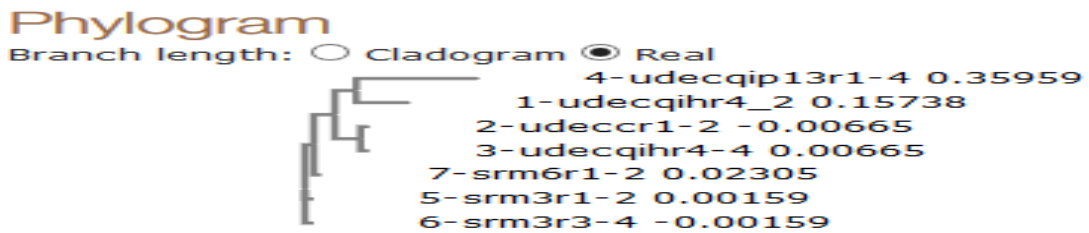
Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments		Download	GenBank	Graphics	Distance tree of results
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
<input type="checkbox"/> Thanatephorus cucumeris isolate Rs 23 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	268	268	61%	1e-72	89%
<input type="checkbox"/> Rhizoctonia solani isolate F556 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	242	242	46%	5e-65	94%
<input type="checkbox"/> Rhizoctonia solani isolate F555 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	242	242	46%	5e-65	94%
<input type="checkbox"/> Thanatephorus cucumeris isolate Rs 18 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	235	235	54%	7e-63	88%
<input type="checkbox"/> Thanatephorus cucumeris strain Rs clone 4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	235	235	54%	7e-63	88%
<input type="checkbox"/> Rhizoctonia solani strain RRS3 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, complete sequence	226	226	51%	4e-60	89%
<input type="checkbox"/> Rhizoctonia sp. 62B 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	223	223	47%	5e-59	90%
<input type="checkbox"/> Rhizoctonia solani genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, isolate PG1	219	219	51%	6e-58	88%
<input type="checkbox"/> Rhizoctonia sp. CNPAF_0211 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, complete sequence	215	215	45%	7e-57	90%
<input type="checkbox"/> Rhizoctonia sp. CNPAF_0149 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, complete sequence	215	215	45%	7e-57	90%

Tabla 21. Alineamiento de la secuencia consenso de la muestra SRM6R1-2 con la base de datos de *Rhizoctonia*.

5.5 ARBOL FILOGENETICO

En este arbol podemos observar el alineamiento de secuencias múltiple el cual arroja como resultado la siguiente grafica



Grafica 17. Árbol filogenético del alineamiento de secuencias múltiple de las siete muestras evaluadas

Se puede evidenciar en la (grafica 9) que el alineamiento de secuencias múltiple se divide en cuatro grupos, llegando a evidenciar que las dos primeras muestras (4) udecqip13r1-4 y 1) udecqih4_2) los cuales pertenecen al mismo grupo pero se encuentran a largas distancias donde no llegan a tener una similaridad, que se confirma con los resultados arrojados por el NCBI anteriormente nombrados los cuales dicen que la muestra 4) pertenece a la especie *Pleurotus* sp y la muestra 1) pertenece a la especie *Neufosicocum Parvum* por tanto se puede presentar la lejanía entre las muestras. El segundo grupo compuesto por las muestras 2-udeccr1-2 y 3-udecqih4_4 presentan un alineamiento muy cercano que se confirma con los resultados arrojados por el NCBI anteriormente nombrados los cuales dicen que las dos muestras pertenecen a la especie *Alternaria Alternata* por lo tanto se puede definir la cercanía entre las muestras. El tercer grupo pertenece a la muestra 7-srm6r1_2 la cual tiene un alineamiento muy cercano con el grupo cuatro pero

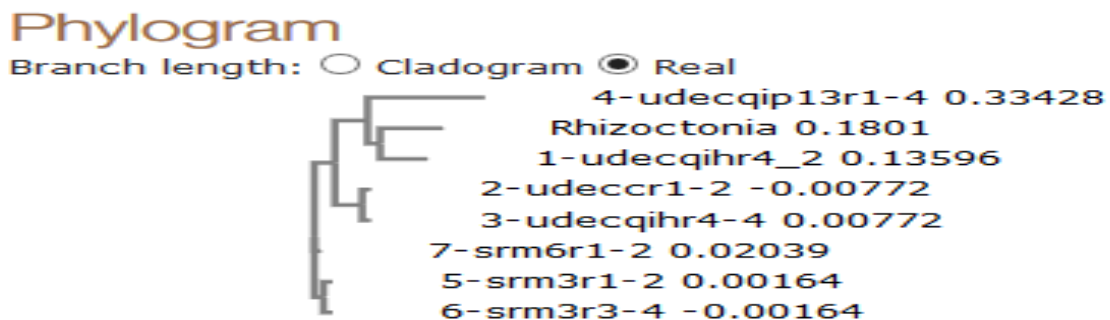
también una cercanía con el grupo dos lo cual no la define claramente entre alguno de los dos grupos. En el cuarto grupo se puede observar que las muestras 5-srm3r1-2 y 6-srm3r3-4 presentan un alineamiento muy cercano que se confirma con los resultados arrojados por el NCBI anteriormente nombrados los cuales dicen que las dos muestras pertenecen a la especie *Bipolaris sp* por lo tanto se puede definir la cercanía entre las muestras.

Tabla 22. porcentaje de identidad de comparacion entre las muestras

# MUESTRA	CODIGO	UDECQIP13R1_4	UDECQIHR4_2	UDECCR1_2	UDECQIHR4_4	SRM6R1_2	SRM3R1_2	SRM3R3_4
4	UDECQIP13R1_4	100	48,3	50	48,87	50	50,89	51,32
1	UDECQIHR4_2	48,3	100	71,22	71,26	69,74	70,03	71,51
2	UDECCR1_2	50	71,22	100	100	85,09	86,54	86,65
3	UDECQIHR4_4	48,87	71,26	100	100	81,96	85,05	85,71
7	SRM6R1_2	50	69,74	85,09	81,96	100	97,17	97,14
5	SRM3R1_2	50,89	70,03	86,54	85,05	97,17	100	100
6	SRM3R3_4	51,32	71,51	86,65	85,71	97,14	100	100

En la (tabla 23) se evidencian los porcentajes de identidad de las muestras. Los que se encuentran resaltado en color amarillo presentan una comparación entre si, los cuales no serán tomados en cuenta. Los que se encuentran resaltados en color rojo presentan un porcentaje de identidad del 100 % que nos define la similaridad entre las muestras; estos resultados se pueden constatar con la (grafica) que define que las muestras 2 y 3 (*Alternaria Alternata*), 5 y 6 (*Bipolaris sp*) presentan un alto porcentaje de identidad.

En la siguiente grafica se puede observar las mimas muestras del alineamiento multiple anterior comparadas frente a un testigo que es la secuencia de *Rhizoctonia* (thanateforus) que se presento con mayor porcentaje de identidad del NCBI.



Grafica 18. Árbol filogenético del alineamiento de secuencias múltiple de las siete muestras evaluadas secuenciado frente a muestra testigo (*Rhizoctonia*).

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y DE LAS SECUENCIA ITS DE AISLAMIENTOS DE HONGOS ASOCIADOS A RAÍCES DE ORQUÍDEAS EN LA REGIÓN DEL SUMAPAZ

Tabla 23. Porcentaje de identidad frente a *Rhizoctonia*

# MUESTRA	CODIGO	UDECQIP13R1_4	Rhizoctonia	UDECQIHR4_2	UDECCECR1_2	UDECQIHR4_4	SRM6R1_2	SRM3R1_2	SRM3R3_4
4	UDECQIP13R1_4	100	46,54	48,3	50	48,87	50	50,89	51,32
testigo	Rhizoctonia	46,54	100	68,39	63,13	62,25	60,9	59,8	61,15
1	UDECQIHR4_2	48,3	68,39	100	71,22	71,26	69,74	70,03	71,51
2	UDECCECR1_2	50	63,13	71,22	100	100	85,09	86,54	86,65
3	UDECQIHR4_4	48,87	62,25	71,26	100	100	81,96	85,05	85,71
7	SRM6R1_2	50	60,9	69,74	85,09	81,96	100	97,17	97,14
5	SRM3R1_2	50,89	59,8	70,03	86,54	85,05	97,17	100	100
6	SRM3R3_4	51,32	61,15	71,51	86,65	85,71	97,14	100	100

En la (tabla 24) se evidencian los porcentajes de identidad de las muestras frente a la muestra testigo (*Rhizoctonia*), en la cual se evidencia que el mayor porcentaje es de 68,39 % que presenta la muestra N° 1, la cual muestra una similitud entre estos, los demás presentan un porcentaje bajo.

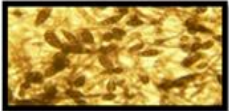

MICROORGANISMO	TAXONOMÍA	CARACTERÍSTICAS	ECOLOGÍA	IMAGEN
<i>Neofusicocum Parvum</i>	Ascomycota Botryosphaeriaceae	Las colonias en PDA inicialmente son pálidas, oscureciendo gradualmente con la edad a color gris. Una característica distintiva es la producción de un pigmento amarillo que se difunde en el agar.	Las especies de la familia Botryosphaeriaceae se distribuyen en zonas de climas templados y tropicales por todo el planeta (Barr 1972). La mayor parte de los géneros incluidos en esta familia se han considerado endófitos y se han encontrado en casi todas las plantas leñosas que se han analizado, tanto en angiospermas como en gimnospermas (Slippers y Wingfield 2007).	
<i>Alternaria Alternata</i>	Ascomycota	Hongo filamentososo con conidióforos simples, de color pardo, con septos transversales y verticales de disposición irregular	Es un hongo extremadamente común en abonos, plantas (fresas, crisantemos, tomates, zanahorias y espárragos), pulpa de madera y madera podrida.	
<i>Pleurotus Sp</i>	Basidiomycota	Es un género de setas con el himenio laminado que incluye a algunas especies comestibles	Especies comestibles de gran interés comercial, como el champiñón ostra (<i>Pleurotus ostreatus</i>) o la seta de cardo (<i>Pleurotus eryngii</i>).	
<i>Bipolaris Sp</i>	Ascomycota	Producción de conidios marrón Hifas septadas, Conidióforos café, rectos, geniculados., unicelular. Colonias aterciopeladas o algodonosas, inicialmente blancas, marrón o grisáceas que se convierten en verde oliva	<i>Bipolaris</i> crece en restos de plantas, el suelo, y es reportado como hongo endófito en especies orquidoides.	

Tabla 24 Características taxonómicas, morfológicas y ecológicas de los hongos obtenidos

Morfológicamente se identificó *Rhizoctonia sp* bajo características microscópicas como la formación de «T», constricción en la bifurcación hifal, ya que según géneros de *Rhizoctonia* no se producen conidias y sólo rara vez producen basidiosporas, ya que en condiciones de laboratorio se presenta como un micelio estéril. La clasificación de estos hongos a menudo ha sido difícil, se basan principalmente en diferencias en la morfología observados mediante el cultivo del hongo (Paulo Ceresini, 2010). Por lo tanto se puede decir que con base en las características macroscópicas y microscópicas se tiene la presencia del género *Rhizoctonia*, aunque molecularmente las muestras presentan diferentes hongos como son:

- *Neofusicocum Parvum* que presenta unas características del micelio de color pálido y una pigmentación amarilla como se puede observar en la (tabla 25), las cuales no presentan ningún parentesco con las características de *Rhizoctonia*, pero de acuerdo con su ecología. Se ha reportado como endófitos en plantas leñosas lo cual pone en duda tanto el resultado morfológico como molecular de la muestra.
- *Alternaria Alternata* que presenta características morfológicas similares a *Rhizoctonia* como es el color pardo y la presencia de septos como se observa en la (tabla25), es común encontrarlo en pulpa de madera o madera podrida.
- *Pleurotus sp* comparte en el mismo phylum con *Rhizoctonia* pero algunas de estas especies son comestibles (cita) con gran interés comercial. Muchas de las orquídeas muestreadas crecen sobre el mantillo, por tanto es posible que este hongo pueda estar asociado a este.
- *Bipolaris* aunque difieren de phylum, *Rhizoctonia* siendo un basidiomycete y *Bipolaris* siendo un ascomycota, comparte ciertas características morfológicas microscópicas, como hifas septadas y la formación de T hifal, en las muestras no se encontraron conidias y tampoco conidióforo, por el contrario se evidenciaron células monilioides que son características de *Rhizoctonia*.

CONCLUSIONES

1. Las orquídeas que se encuentran en la Reserva Natural del Quinini y el Parque Natural San Rafael generalmente presentan microorganismos fúngicos asociados a las raíces de las orquídeas, ya se han de carácter formador de micorrizas o no, o se presenten como hongos endófitos de las raíces de orquídeas.
2. Se aislaron hongos con características morfológicas macroscópicas y microscopias, correspondientes al género *Rhizoctonia*
3. Al comparar las secuencias obtenidas con la base de datos del GenBank se encontró *Neofusicocum Parvum*, *Alternaria alternata*, *Pleurotus sp.* y *Bipolaris sp.* en la Reserva Natural del Quinini y el Parque Natural San Rafael.
4. El árbol filogenético del alineamiento de las secuencias mostro que las muestras de *Alternaria Alternata* son muy cercanas o están alineadas, y que las dos muestras *bipolaris sp* se son muy cercanas alinearon lo cual indico que si representan el mismo género.
5. A pesar de que estas secuencias tienen un menor porcentaje de identidad con *Rhizoctonia* que es el hongo formador de micorriza orquidoide mas reportado, según las características microscópicas que presentaron si correspondía a este género.

RECOMENDACIONES

- Para próximos estudios se recomienda realizar transeptos generalizados a la Región del Sumapaz con el fin de abarcar el mayor territorio posible.
- Para futuros estudios de micorrizas enfocados al hongo formador de micorriza *Rhizoctonia*, identificar los enrollamientos hifales en las raíces de las orquídeas (pelotones) y hacer siembra de estos, además amplificar las regiones IT'S 5,8s e IT'S 28s específicos para este género, teniendo en cuenta que los cebadores permitan la amplificación de estas regiones en amplitudes mayores a 1000pb.
- Identificar las funciones ecológicas de los hongos endófitos asociados a las raíces de orquídeas encontrados en el presente trabajo.
- Para posteriores trabajos se recomienda rectificar la presencia de estos posibles hongos endófitos (*Neofusicocum Parvum*, *Alternaria alternata*, *Pleurotus sp.* y *Bipolaris sp*) presentes en las orquídeas.
- Para próximos estudios tomar varias muestras por género de orquídea encontrada y en lo posible en estados juveniles.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ARDITTI, J. (1992). Fundamentals of orchid biology. New York, John Wiley & Sons. 691 p.
- ARDITTI, J., Ghani, A. (2000). Tansley Review No. 110. Numerical and physical properties
- AGRIOS, N. G. (2002). Fitopatología. Editorial Limusa, S.A., Segunda edición traducción de Plant Pathology, México. 830 p.
- AJU M. (2009) Las orquídeas bases generales para su conocimiento y enseñanza. Maestría en docencia universitaria. Universidad de San Carlos Guatemala.
- American Orchid Society (AOS).1995. Orchid Pests and Diseases. West Palm Beach, Florida, AOS. 118 p.
- BARNET, H.L., y HUNTER, B.B. (1998) Illustrated genera of imperfect fungi. 4 edition
- CABRERA M, GALMIRINI M, FLASCHSLAND E (2012) colletotrichum gloeosporioides de orquides en el Ne de argentina.
- CERDEÑOS, L, (2008). Método fácil y confiable para teñir núcleos en hongos del complejo *Rhizoctonia* sp., Bioagro 20(3).
- CONSTITUCION POLÍTICA DE COLOMBIA ARTICULO 8°, 79°, 95°,196°
- CHUNG, P.(2005) opción productiva aplicada a las plantaciones forestales. Aspectos generales. INFOR 55P.
- EcuRed. (2012). *Alternaria alternata*. Recuperado el 16 de julio de 2012, de http://www.ecured.cu/index.php?title=Alternaria_alternata&action=edit.
- FAO (1999). State of the world's forests-1999. Roma: FAO.
- FRANCO NAVARRO J (2012) efecto beneficioso de las micorrizas sobre las plantas. Universidad de Sevilla. España
- GUZMÁN O, CASTAÑO J Y VILLEGAS B (2009) Diagnóstico de enfermedades de plantas de origen biótico.
- HERNANDEZ Y. (2010) Identificación hongos asociados a las principales enfermedades que atacan las orquídeas en Michocan. universidad Michocana San Nicolas de Hidalgo. México
- HERNANDEZ Y, (2009) relación hospedante patógeno. Clase 3 universidad central de Maracay. venezuela
- MERCHAN F. (2013) evaluación de hongos y pseudohongos patógenos en el orquídarío de la facultad de ciencias agropecuarias de la universidad de cuenca. Agropecuarias de la universidad de cuenca. Ecuador.
- MILLER, R. M. y JASTROW J. D. (2000). Mycorrhizal fungi influence soil structure. En: Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function (Y Kapulnik y DD Douds Jr, eds), pp 3-18. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

- MORTON, J. B. y REDECKER, D. (2001). Two new families of Glomales, *Archaeosporaceae* and *Paraglomaceae*, with two genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 93:181-195.
- MOSQUERA, ANA., BAYMAN, P., TUPAC, J., (2010). *Ceratobasidium sp* como hongo micorrícico de orquídeas en Colombia.
- MOSQUERA ESPINOSA, A. 2010 Evaluación Del Efecto Biocontrolador De *Rhizoctonia* De Orquídeas Sobre *Rhizoctonia Solani* Kühn Patogeno Del Suelo En Arroz (*Oryza sativa* L.)
- OREJUELA, J., 2010. SILVA HERRERA J. 2012. El calvario de la flor nacional. Periódico EL TIEMPO www.eltiempo.com/vida-de-hoy/ecologia/articulo-web-new_nota_interior-10938531
- ORDÓEZ N, DIEZ M, OTERO J. (2012). La vainilla y los hongos formadores de micorrizas. Universidad nacional de Colombia sede Medellín.
- ORDÓEZ C, FIORELA N, OTERO J, DIEZ. (2012) Hongos endófitos de orquídeas y su efecto sobre el crecimiento en *vanilla planifolia*, *acta agronómica* vol.61, num 3, pp.282-290
- OTERO J. T., ACKERMAN J. D., BAYMAN P., (2002). Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *Am. J. Bot.* 89:1852 - 1858.
- OTERO J. T., ACKERMAN J. D., & BAYMAN P. (2004), Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Mol. Ecol* 13:2393 - 2404.
- OTERO J. T., BAYMAN P., ACKERMAN J. D., 2005. Variation in mycorrhizal performance in the epiphytic orchid *Tolumnia variegata in vitro*: The potential for natural selection. *Evol. Ecol.* 19:29 43.
- OTERO, T.; Ackerman, J. and Bayman, P. 2002. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia* – Like fungi from tropical Orchids. *American Journal of Botany* 89 (11): 1852-1858.
- OTERO, J.T.; ACKERMAN J. AND BAYMAN, P. 2004. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology.* 10: 207-212.
- SALAZAR W, (2009). Descripción de problemas fitosanitarios de orquídeas en dos ambientes zona protectora cerros de la carpintera Cartago y orquidiario 25 de mayo, sabanilla de montes de oca. Universidad nacional. Heredia costa rica.
- SALAZAR W, RIVERA G Y CORRALES G (2007). Comparación de los problemas fitosanitarios en orquídeas de poblaciones silvestres y de cultivo, como evaluación de riesgos de plagas y epidemias.
- Protect an Annual Grass from Root Pathogenic Fungi in the Field.
- Rivera.(1998 y 1999) descripción de problemas fitosanitarios en orquídeas pdf.
- David E. Bennett Jr. y Eric A. Christenson (1999). «*Sobralia altissima*». *Orchids* (en inglés) 68 (11): 1112–1113.

ANEXO 1

Orquídeas muestreadas en la Reserva Natural San Rafael



Figura 15. Muestra SRM1. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.



Figura 16. Muestra SRM2. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.



Figura 17. Muestra SRM3. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y DE LAS SECUENCIA ITS DE AISLAMIENTOS DE HONGOS ASOCIADOS A RAÍCES DE ORQUÍDEAS EN LA REGIÓN DEL SUMAPAZ



Figura 18. Muestra SRM5. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.



Figura 19. Muestra SRM6. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.



Figura 20. Muestra SRM4. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.

Orquídeas muestreadas en el parque natural Quínini



Figura 21. Muestra QiM1. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.



Figura 22. Muestra QiM2. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.



Figura 24. Muestra QiM3. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.



Figura 23. Muestra QiM4. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.



Figura 25. Muestra QiM5. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.



Figura 26. Muestra QiM6. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y DE LAS SECUENCIA ITS DE AISLAMIENOS DE HONGOS ASOCIADOS A RAÍCES DE ORQUÍDEAS EN LA REGIÓN DEL SUMAPAZ








Figura 27. Muestra QiM7. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.



Figura 28. Muestra QiM8. Fotografías tomadas por C. Ariza, 2014.

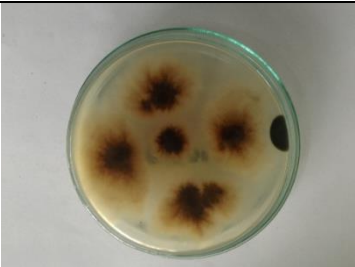





ANEXO 2

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS							
No	Código	Ø (cm)	Tipo crecimiento	Presencia de micelio aéreo	Color	Textura	Imagen
1	RE-SRM3RII I-2	1,2	Poco	Poco	Blanco	Algodonosa	
2	RE-SRM3RII-2	2,1	Abundante	Abundante	Café	Algodonosa	
3	RE-UDECQ P21RIII-1	1,75	Abundante	Abundante	Café	Algodonosa	
4	RE-SRM3RII I-3	1,4	Moderado	Poco	Verde oscuro	Felposa	
5	RE-SRM1RII-3	1,85	Moderado	Moderado	Verde muy oscuro	Felposa	



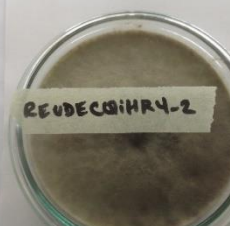

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y DE LAS SECUENCIA ITS DE AISLAMIENTOS DE HONGOS ASOCIADOS A RAÍCES DE ORQUÍDEAS EN LA REGIÓN DEL SUMAPAZ

6	RE-SRM6RI-2	1,35	Poco	Poco	Café claro	Algodonosa	
7	RE-UDECQi CRI-2	2,1	Abundante	Abundante	Café oscuro	Algodonosa	
8	RE-UDECQ P21RII-3	1,55	Abundante	Abundante	Café claro	Algodonosa	
9	RE-UDECQi CRI-5	1,65	Abundante	Moderado	Verde oscuro	Algodonosa	
10	RE-SRM6RII I-2	2,15	Moderado	Poco	Verde muy oscuro	Felposa	
11	RE-SRM3RII I-4	2,55	Abundante	Abundante	Café claro	Algodonosa	

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y DE LAS SECUENCIA ITS DE AISLAMIENTOS DE HONGOS ASOCIADOS A RAÍCES DE ORQUÍDEAS EN LA REGIÓN DEL SUMAPAZ

12	UDECQIB R2-1	1,35	Moderado	Poco	Café claro	Algodonosa	
13	RE- SRM6RI- 1	2,6	Abundante	Abundante	Café claro	Algodonosa	
14	RE- SRM6RI- 2	2,3	Moderado	Poco	Café claro	Algodonosa	
15	RE- SRM2RIII- 3	1,75	Abundante	Moderado	Café oscuro	Algodonosa	
16	RE- SRM1RI- 4	1,5	Abundante	Poco	Verde oscuro	Felposa	
17	RE- UDECQ_ P13RI-4	2	Abundante	Moderado	Blanco	Algodonosa	

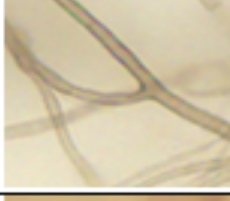
CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y DE LAS SECUENCIA ITS DE AISLAMIENTOS DE HONGOS ASOCIADOS A RAÍCES DE ORQUÍDEAS EN LA REGIÓN DEL SUMAPAZ

18	RE-SRM3RIII-3	1,3	Moderado	Poco	Verde oscuro	Felposa	
19	RE-SRM1RI-3	1,8	Abundante	Abundante	Verde sectorizado	Algodonosa	
20	RE-UDECQIH RIV-2	2,2	Abundante	Poco	Café oscuro	Algodonosa	
21	RE-UDECQIH RIV-4	1,65	Abundante	Poco	Verde oscuro	Felposa	

ANEXO 3

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS					
No	Código	Formación T	Constricción	Células <u>Moniliodes</u>	Fotos
1	RE-UDECQICRI-5	Presente	Presente	Ausente	
2	RE-UDECQIHRIV-4	Presente	Presente	Presente	
3	RE-SRM6RI-2	Presente	Presente	Ausente	
4	RE-SRM3RI-2	Presente	Presente	Presente	
5	UDECQIBR2-1	Presente	Presente	Presente	
6	RE-UDECQP13RI-4	Presente	Presente	Presente	
7	RE-SRM3RIII-4	Presente	Presente	Presente	
8	RE-UDECQ_P13RI-2	Presente	Presente	Ausente	

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y DE LAS SECUENCIA ITS DE AISLAMIENTOS DE HONGOS ASOCIADOS A RAÍCES DE ORQUÍDEAS EN LA REGIÓN DEL SUMAPAZ

9	RE-SRM1RII-3	Presente	Presente	Ausente	
10	RE-SRM2RIII-3	Presente	Presente	Presente	
11	RE-SRM6RI-2	Presente	Presente	Presente	
12	RE-UDECQP21RIII-1	Presente	Presente	Presente	
13	RE-UDECQiHRIV-2	Presente	Presente	Ausente	
14	RE-UDECQiCRI-2	Presente	Presente	Presente	
15	RE-SRM3RIII-4	Presente	Presente	Ausente	

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y DE LAS SECUENCIA ITS DE AISLAMIENTOS DE HONGOS ASOCIADOS A RAÍCES DE ORQUÍDEAS EN LA REGIÓN DEL SUMAPAZ

ANEXO 4

Tabla Resultados de la comparación de la secuencia problema N° 3 contra la base de datos UNITE

Query= NoName

Length=572

sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E Value
JQ936187	Alternaria arborescens	1032	0.0
KM246282	Alternaria arborescens	1029	0.0
KM215624	Alternaria sp G57	1029	0.0
KM215615	Alternaria sp G40	1029	0.0
KF731832	Alternaria alternata	1029	0.0
JX454533	Alternaria arborescens	1029	0.0
JQ910882	uncultured fungus (Alternaria)	1029	0.0
JN867467	Alternaria sp KJ_2012	1029	0.0
JN867461	Alternaria sp KJ_2012	1029	0.0
JN867442	Alternaria sp KJ_2012	1029	0.0
JN867441	Alternaria sp KJ_2012	1029	0.0
JN867438	Alternaria sp KJ_2012	1029	0.0
GU721930	uncultured fungus (Alternaria)	1029	0.0
GUS84951	Alternaria sp I426	1029	0.0
GUS84947	Alternaria sp I598	1029	0.0
GUS84946	Alternaria sp I461	1029	0.0
AY154706	Alternaria arborescens	1029	0.0
AY154694	Alternaria sp IA244	1029	0.0
AY154682	Alternaria alternata	1029	0.0
EF504952	uncultured endophytic fungus (Alternaria)	1027	0.0
JX960578	Alternaria sp H02_711S_2	1025	0.0
FM875864	fungus sp TBF_V (Alternaria)	1025	0.0
KJ722535	Alternaria longipes	1023	0.0
KF542552	Alternaria brassicicola	1023	0.0
JQ936168	Alternaria sp MBP13A	1023	0.0
EU490167	uncultured Ascomycota (Alternaria)	1023	0.0
EF505061	uncultured endophytic fungus (Alternaria)	1023	0.0
EF505044	uncultured endophytic fungus (Alternaria)	1023	0.0
AY714488	Alternaria sp MUC1_45333	1023	0.0
AY154699	Alternaria sp IA249	1023	0.0
AY154698	Alternaria sp IA248	1023	0.0
KM887499	Alternaria sp ZL_1	1021	0.0
KM816642	Alternaria tenuissima	1021	0.0
KM268674	Alternaria sp YTY2(1)	1021	0.0
KM246233	Alternaria arborescens	1021	0.0
KM215618	Alternaria sp G47	1021	0.0
KJ082100	Alternaria tenuissima	1021	0.0

Tabla Resultados de la comparación de la secuencia problema N° 1 contra la base de datos UNITE

Query= NoName

Length=578

Sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E Value
UDB020925	Neoscytalidium dimidiatum Brazil	708	0.0
UDB020917	Phyllosticta yuccae Brazil	504	7e-143
UDB020916	Phyllosticta yuccae Brazil	500	9e-142
UDB019814	Hainesia Netherlands	479	3e-135 LOCKED by Ave Suija
UDB019824	Hainesia Netherlands	473	1e-133 LOCKED by Ave Suija
UDB019821	Hainesia Netherlands	473	1e-133 LOCKED by Ave Suija
UDB019819	Hainesia Netherlands	471	4e-133 LOCKED by Ave Suija
UDB023354	Hainesia Netherlands	470	2e-132 LOCKED by Ave Suija
UDB019811	Hainesia Iceland	468	5e-132 LOCKED by Ave Suija
UDB022915	Abrothallus Italy	462	2e-130 LOCKED by Ave Suija
UDB016230	Skyttea nitschkei United Kingdom	462	2e-130 LOCKED by Ave Suija
UDB015017	Alectoria sarmentosa Estonia	462	2e-130
UDB019809	Hainesia Netherlands	457	1e-128 LOCKED by Ave Suija
UDB015045	Geltingia associata Iceland	457	1e-128 LOCKED by Ave Suija
UDB015028	Flectocarpon lichenum United States	457	1e-128
UDB019840	Geltingia associata United States	455	3e-128 LOCKED by Ave Suija
UDB015019	Alectoria sarmentosa Estonia	453	1e-127
UDB019808	Phaeopyxis punctum Estonia	444	6e-125 LOCKED by Ave Suija
UDB023749	Cetraria islandica Estonia	439	3e-123
UDB015012	Evernia divaricata Estonia	439	3e-123
UDB003062	Heyderia abietis Estonia	439	3e-123 LOCKED by Kadri Pärtel
UDB019763	Bulgaria inquinans Estonia	437	9e-123
UDB003014	Crocicreas furvum Lithuania	437	9e-123 LOCKED by Kadri Pärtel
UDB023754	Evernia prunastri Estonia	435	3e-122
UDB023666	Bulgaria inquinans Estonia	435	3e-122
UDB022974	Hainesia brevicladoniae Austria	435	3e-122 LOCKED by Ave Suija
UDB023750	Usnea dasypoga Estonia	430	1e-120
UDB003049	Crocicreas epicalamia Estonia	430	1e-120 LOCKED by Kadri Pärtel
UDB015014	Evernia divaricata Estonia	428	5e-120
UDB022995	Pezizella ucrainica Belarus	421	7e-118 LOCKED by Ave Suija
UDB022864	Hypocenomyce anthracophila Estonia	421	7e-118
UDB016716	Evernia divaricata Estonia	419	2e-117
UDB016451	Unguiculariopsis lettaui Estonia	417	8e-117 LOCKED by Ave Suija
UDB016450	Unguiculariopsis lettaui Estonia	417	8e-117 LOCKED by Ave Suija
UDB020914	Phyllosticta bifrenariae Brazil	416	3e-116
UDB017872	Geoglossum atropurpureum Estonia	416	3e-116
UDB017812	Unguiculariopsis lettaui Estonia	416	3e-116 LOCKED by Ave Suija

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y DE LAS SECUENCIA ITS DE AISLAMIENTOS DE HONGOS ASOCIADOS A RAÍCES DE ORQUÍDEAS EN LA REGIÓN DEL SUMAPAZ

ANEXO 5

Resultados de la comparación de la secuencia problema N° 3 contra la base de datos UNITE

CLUSTAL O (1.2.1) multiple sequence alignment

```
4-udeccqip13r1-4      TAACCCCTGACACCTTATAAAAAGTTGGGGTGGGGGGTCCCTTGGGGTTTTTTTTTAAT
1-udeccqih4_2        -----CCTCTGTTGCTTTGGCGGGCC
2-udeccr1-2          -----GCCTACT
3-udeccqih4-4        -----TTTTGCGTACT
7-srm6r1-2          -----
5-srm3r1-2          -----TGCGCACT
6-srm3r3-4          -----

4-udeccqip13r1-4      AGAA-AAACCCCTTGTGTTTTCAAAAAAATTTTTTATATTCACCCA---CCCCAAAAGT
1-udeccqih4_2        GCGGTCTCCGACCGGCGCCCTT-CGGGGGGCTGGCCAGCGCC-----GCCAGAG
2-udeccr1-2          TC-----TTGTTCCCTT--GGTGGTTGCGCCACCCTAGGACAAAACATAAAC
3-udeccqih4-4        TC-----TTGTTCCCTT--GGTGGTTGCGCCACCCTAGGACAAAACATAAAC
7-srm6r1-2          -----TTTCCTG--GGCGGGTTCGCCCCGCCACGAGCCAAACCCATAA
5-srm3r1-2          TG-----TTGTTCCCTG--GGCGGGTTCGCCCCGCCACGAGCCAAACCCATAA
6-srm3r3-4          -----GTTTCCTG--GGCGGGTTCGCCCCGCCACGAGCCAAACCCATAA
          *          *          *          *

4-udeccqip13r1-4      ATGTTTTATTATGAATGGTTTTATAATGGCAAGGCCCTGAACCTTATTAATAATTCAA
1-udeccqih4_2        GACCATAAACTCCAGTCAGTGAACTTCGCACTCTGAAAAACAAGTTAATAAACTAAAC
2-udeccr1-2          C-----TTTTGTAATTCGAATCAGCGTCA---GTAACAAATTAATAATTACAA
3-udeccqih4-4        C-----TTTTGTAATTCGAATCAGCGTCA---GTAACAAATTAATAATTACAA
7-srm6r1-2          ACCTTTTTTTTTATGCAAGTTACCATCAGCGTCAGTAAAAACAATGTAATTAATTACA
5-srm3r1-2          ACCTTT-TTTTTATGATGTTGCAATCAGCGTCAGTAAAAACAATGTAAT-TATTACA
6-srm3r3-4          ACCTTT-TTTTTATGATGTTGCAATCAGCGTCAGTAAAAACAATGTAAT-TATTACA
          *          *          *          *          *          *

4-udeccqip13r1-4      TTCAACAAGGATTTTTGGCTTTGGATTGGTGAAGAAAGGAAGGAAATTCGATAAGT
1-udeccqih4_2        TTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGT
2-udeccr1-2          TTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGT
3-udeccqih4-4        TTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGT
7-srm6r1-2          TTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGT
5-srm3r1-2          TTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGT
6-srm3r3-4          TTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGT
          *          *          *          *          *          *          *

4-udeccqip13r1-4      AAATTGAAATGCCGAATCCATGGATTATTGGATTTTTGAACGCCCCCTGGGCCCTTTGG
1-udeccqih4_2        AATGTGAATTCAGAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGG
2-udeccr1-2          AGTGTGAATTCAGAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGG
3-udeccqih4-4        AGTGTGAATTCAGAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGG
7-srm6r1-2          AGTGTGAATTCAGAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGG
5-srm3r1-2          AGTGTGAATTCAGAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGG
6-srm3r3-4          AGTGTGAATTCAGAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGG
          *          *          *          *          *          *          *

4-udeccqip13r1-4      TTTTCGAAGGGCCAGCCGTTGTTGAGGGTCCCTTATTTTTTTTTGAAGGTCGGCTCCCTT
1-udeccqih4_2        TATTCGAGGGCCAGCCGTTGTTGAGGGTCCCTTATTTTTTTTTGAAGGTCGGCTCCCTT
2-udeccr1-2          TATTCGAAGGGCCAGCCGTTGTTGAGGGTCCCTTATTTTTTTTTGAAGGTCGGCTCCCTT
3-udeccqih4-4        TATTCGAAGGGCCAGCCGTTGTTGAGGGTCCCTTATTTTTTTTTGAAGGTCGGCTCCCTT
7-srm6r1-2          TATTCGAAGGGCCAGCCGTTGTTGAGGGTCCCTTATTTTTTTTTGAAGGTCGGCTCCCTT
5-srm3r1-2          TATTCGAAGGGCCAGCCGTTGTTGAGGGTCCCTTATTTTTTTTTGAAGGTCGGCTCCCTT
6-srm3r3-4          TATTCGAAGGGCCAGCCGTTGTTGAGGGTCCCTTATTTTTTTTTGAAGGTCGGCTCCCTT
          *          *          *          *          *          *          *

4-udeccqip13r1-4      AAATGCATTAGCGG--GACHTTGTGCTCTGCGCATAGTGTGATAAATATCTACGGCTAG
1-udeccqih4_2        GGCTTCCTCTCCACGGACCGCCCTTAAAGACCTCGGGCGGTGGCG-----TCITGCTT--
2-udeccr1-2          GGCTTCCTT-GTCTTAGCTTGTCTGGAGACTCGCCCTTAAAGTAAATGGCAGCCGGCCCTA-
3-udeccqih4-4        GGCTTCCTT-GTCTTAGCTTGTCTGGAGACTCGCCCTTAAAGTAAATGGCAGCCGGCCCTA-
7-srm6r1-2          GGCTTTTTTGTCTCCCTCTTCTGTTGGAACCTCGCCCTTAAAGTAAATGGCAGCCGGCCCTA-
5-srm3r1-2          GGCTTTTTTGTCTCTCTCTCT--CG--GAGACTCGCCCTTAAAGTAAATGGCAGCCGGCCCTA-
6-srm3r3-4          GGCTTTTTTGTCTCTCTCTCT--CG--GAGACTCGCCCTTAAAGTAAATGGCAGCCGGCCCTA-
          *          *          *          *          *          *          *

4-udeccqip13r1-4      ACGCATGCAATTCCTTATATGTTCCAGCTTCT--AATCGTCTCAAGGGACAAATTAATTG
1-udeccqih4_2        -----CAAGCGTAGTAGAAAAACCTT-----
2-udeccr1-2          -----CTGGTTTCGGAGCGGACACAAAGTCCGACCTCTTATCAGCAAAAG-----
3-udeccqih4-4        -----CTGGTTTCGGAGCGGACACATAAATTTGCGCTTGTATCAGGAGAAAGGACCGGTA
7-srm6r1-2          -----CTGGTTTCGGAGCGGACACATAAATTTGCGCTTGTATCAGGAGAAAGGACCGGTA
5-srm3r1-2          -----CTGGTTTCGGAGCGGACACATAAATTTGCGCTTGTATCAGGAGAAAGGACCGGTA
6-srm3r3-4          -----CTGGTTTCGGAGCGGACACATAAATTTGCGCTTGTATCAGGAGAAAGGACCGGTA
          *          *          *          *          *          *          *

4-udeccqip13r1-4      ACAATTGA
1-udeccqih4_2        -----
2-udeccr1-2          -----
3-udeccqih4-4        TTAAGCC-
7-srm6r1-2          ATCCATC-
5-srm3r1-2          -----
6-srm3r3-4          -----
```

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y DE LAS SECUENCIA ITS DE AISLAMIENTOS DE HONGOS ASOCIADOS A RAÍCES DE ORQUÍDEAS EN LA REGIÓN DEL SUMAPAZ

ANEXO 6

Alineamiento de secuencias multiple con muestra tetigo (*Rhizoctonia*)

```
CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

4-udecqip13r1-4      -----TAACCCCTGCACCTCTTATAAAAGITGGGGT-GGGGGGTCCCCTGGG----
2-udeccr1-2          -----
3-udecqihr4-4        -----
7-sxm6r1-2           -----
5-sxm3r1-2           -----
6-sxm3r3-4           -----
Rhizoctonia          TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCGGTCTAACACCGGATGCT
1-udecqihr4_2        -----

4-udecqip13r1-4      ---GTTTT---TTTTAATAGAAAACCCCTTGTGTTTTCAAAAAACITTTTTATATTC
2-udeccr1-2          -----GC--GTACTTCTT---GTTTCCTTGGTGGGTT-CGCCCACC
3-udecqihr4-4        -----TTTTGC--GTACTTCTT---GTTTCCTTGGTGGGTT-CGCCCACC
7-sxm6r1-2           -----TTTTCTGGGCGGGTT-CGCCCACC
5-sxm3r1-2           -----TGC--GCACTTGT---GTTTCCTGGGCGGGTT-CGCCCACC
6-sxm3r3-4           -----GTTTCCTGGGCGGGTT-CGCCCACC
Rhizoctonia          GATGTTTATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTTCGTTGCCTCCGGGGAGCGACCCTGCCTTC
1-udecqihr4_2        ----CCTCTGTTGCTTTGGCGCCGCGGTC-CTCCGACCCGCGCC-TTCGGGGGCT

4-udecqip13r1-4      ACCCA---CCCCAAAAGTATGTTTTATTATGAATGTTTTATAATGGCAAGGCCCTGAACC
2-udeccr1-2          ACTAGGACAAACATAAAC-----TTTTGTAATTGCAATCAGCGTCA----GTAA
3-udecqihr4-4        ACTAGGACAAACATAAAC-----TTTTGTAATTGCAATCAGCGTCA----GTAA
7-sxm6r1-2           ACCAGGACCAAAACATAAACCTTTTTTTTTATGCAGTTACCATCAGCGTCAGTAAAAAC
5-sxm3r1-2           ACCAGGACCAAAACATAAACCTTT-TTTTTATGTAGTTGCAATCAGCGTCAGTAAAAAC
6-sxm3r3-4           ACCAGGACCAAAACATAAACCTTT-TTTTTATGTAGTTGCAATCAGCGTCAGTAAAAAC
Rhizoctonia          GGGCGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAATCTTTCGTAACCTTTCAGTCTGAGTAACT
1-udecqihr4_2        GGCCAGCGCCCGCAGAGGACCATAAAACCTCAGTCAGTGAACCTCAGTCAGTAAAAAC

4-udecqip13r1-4      TTATTAATAATAATTCAAATTTCAACAAAGGATTTTTTGGCTTTTGGATTGGTGAAGAAAG
2-udeccr1-2          CAAATTAATAATAACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG
3-udecqihr4-4        CAAATTAATAATAACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG
7-sxm6r1-2           AATGTAATAATAACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG
5-sxm3r1-2           AATGTAAT-TATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG
6-sxm3r3-4           AATGTAAT-TATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG
Rhizoctonia          TAATTAATAATAATAACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG
1-udecqihr4_2        AAGTTAATAAATAACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG
* * * * *

4-udecqip13r1-4      GAAGGAAATTCGATAAGTAAATGAAATGCCGAATCCATGGATTATGGATTTTGAAC
2-udeccr1-2          CAGCGAAATCGGATAAGTAGTGTGAATGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCITTTGAAC
3-udecqihr4-4        CAGCGAAATCGGATAAGTAGTGTGAATGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCITTTGAAC
7-sxm6r1-2           CAGCGAAATCGGATAAGTAGTGTGAATGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCITTTGAAC
5-sxm3r1-2           CAGCGAAATCGGATAAGTAGTGTGAATGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCITTTGAAC
6-sxm3r3-4           CAGCGAAATCGGATAAGTAGTGTGAATGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCITTTGAAC
Rhizoctonia          CAGCGAAATCGGATAAGTAAATGAAATGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCITTTGAAC
1-udecqihr4_2        CAGCGAAATCGGATAAGTAAATGAAATGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCITTTGAAC
* * * * *

4-udecqip13r1-4      GCCCCCTGGGCCCTTTGGTTTTTTCGAAGGGCCAGCCTGTTTGGAGGTCCTTATTTTTTT
2-udeccr1-2          GCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGAGCTCATTGTACCCCTC
3-udecqihr4-4        GCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGAGCTCATTGTACCCCTC
7-sxm6r1-2           GCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGAGCTCATTGTACCCCTC
5-sxm3r1-2           GCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGAGCTCATTGTACCCCTC
6-sxm3r3-4           GCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGAGCTCATTGTACCCCTC
Rhizoctonia          GCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGAGCTCATTGTACCCCTC
1-udecqihr4_2        GCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGAGCTCATTGTACCCCTC
* * * * *

4-udecqip13r1-4      TGAAGGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCGG--ACTTGTGCTCTGCGCATAGTGT
2-udeccr1-2          AAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTCTT-GTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGT
3-udecqihr4-4        AAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTCTT-GTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGT
7-sxm6r1-2           AAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTITTTGTCTCCCTCTTTCTGGGAAACTCGCCTTAAAC
5-sxm3r1-2           AAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTITTTGTCTCTCGTTCT-CG-GAGACTCGCCTTAAAC
6-sxm3r3-4           AAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTITTTGTCTCTCGTTCT-CG-GAGACTCGCCTTAAAC
Rhizoctonia          AAGCTTCTGCTTGGTATTGGGCAACCGGTCGCGCCGCTCGCTCAAATCGACCGGCTGGGT
1-udecqihr4_2        AAGCTTCTGCTTGGTATTGGGCTTCTGCTCCACGGACGCGCTTAAAGACTCGGCGGTG
* * * * *

4-udecqip13r1-4      GATAATTATCTACG-----CTAGACGCATGCAATCTTATATTGTCAGCTTTCTAATC
2-udeccr1-2          AATTGGCAGCCCGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCA---CTCTATCAGC
3-udecqihr4-4        AATTGGCAGCCCGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCA---CTCTATCAGC
7-sxm6r1-2           GATTGGCAGCCCGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACATAATTTG---CGCTTGTATCA
5-sxm3r1-2           GATTGGCAGCCCGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACATAATTTG---CGCTTGTATCA
6-sxm3r3-4           GATTGGCAGCCCGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACATAATTTG---CGCTTGTATCA
Rhizoctonia          CTCTGTCCCTAAGC-----GTTGTGAAACTATTGCTAAAGGG---TGCTCGGGAGGC
1-udecqihr4_2        GCGTCTTGCCTCAAGC-----GTAGTAGAAAACACTT-----
* * * * *
```

