

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Aislamiento y caracterización de hongos presentes en orquídeas del Jardín Botánico

de Quito

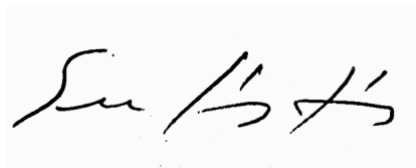
Fitopatología

PAULO EMILIO ZAMBRANO SÁNCHEZ

Quito, 2023

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del Sr. Paulo Emilio Zambrano Sánchez ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Susana del Consuelo León Yáñez', is centered on a light gray rectangular background.

Susana del Consuelo León Yáñez, MSc.

Directora de la Disertación

Quito, 23 de febrero de 2023

DEDICATORIA

A mis padres y hermano.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Carlos y Jacqueline por siempre estar para mí, en cada momento que les he necesitado, gracias por todos sus consejos y enseñanzas.

A mi hermano Nicolas, por apoyarme y preocuparse por mi bienestar dentro de lo personal y académico. Tu ejemplo y consejos han sido muy valiosos para mí.

A Jamie Mora por su cariño incondicional y apoyo durante parte de este proceso.

A mi perrita Nieve por estar en cada momento para quererme.

A Erika Caicedo por brindarme siempre los espacios, materiales y conocimiento necesario para la resolución de este trabajo. Y darme una mano en los procesos de mi tesis.

A Cristina Toapanta por su interés, apoyo, guianza y por aclararme dudas dentro del proceso de mi tesis.

A Susana León por el interés, apoyo y orientaciones para la elaboración de este trabajo.

A Ricardo Zambrano y al Jardín Botánico de Quito por permitir el estudio de las oquídeas y proporcionar materiales para la realización de este trabajo.

A los hongos y orquídeas.

A mí, por el amor, empeño, dedicación y cariño con el que hice esta tesis.

TABLA DE CONTENIDO

1.	RESUMEN	1
2.	ABSTRACT.....	2
3.	INTRODUCCIÓN	3
	OBJETIVOS.....	7
	OBJETIVO GENERAL	7
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
4.1.	COLECCIÓN, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE HONGOS	8
4.1.1	Colección.....	8
4.1.2	Aislamiento	8
4.1.3	Purificación	9
4.2.	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	9
4.2.1	CARACTERES MACROSCÓPICOS DE LAS LESIONES EN LAS HOJAS .	9
4.2.2	CARACTERES MACROSCÓPICOS DE LAS COLONIAS	9
4.2.3	CARACTERES MICROSCÓPICOS DE LAS COLONIAS	9
4.3.	EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN ITS DEL ADN RIBOSOMAL.....	10
4.4.	ANÁLISIS DE SECUENCIAS	10
5.	RESULTADOS.....	12
5.1.	NÚMERO DE MUESTRAS COLECTADAS E INDIVIDUOS AISLADOS	12
5.2.	EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN ITS DEL ADN RIBOSOMAL.....	13
5.3.	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS INDIVIDUOS AISLADOS	15
5.3.1	CARACTERES MACROSCÓPICOS DE LAS LESIONES EN LAS HOJAS...	15

5.4.	CARACTERES MACROSCÓPICOS Y MICROSCÓPICOS DE LAS COLONIAS.....	17
5.4.1	GÉNERO: <i>Acremonium</i>	17
5.4.2	GÉNERO: <i>Cercospora</i>	18
5.4.3	GÉNERO: <i>Cladosporium</i>	19
5.4.4	GÉNERO: <i>Colletotrichum</i>	20
5.4.5	GÉNERO: <i>Coprinellus</i>	22
5.4.6	GÉNERO: <i>Curvularia</i>	24
5.4.7	GÉNERO: <i>Didymella</i>	25
5.4.8	GÉNERO: <i>Hypomyces</i>	26
5.4.9	GÉNERO: <i>Meira</i>	27
5.4.10	GÉNERO: <i>Mycosphaerella</i>	28
5.4.11	GÉNERO: <i>Parasola</i>	29
5.4.12	GÉNERO: <i>Phaeophleospora</i>	30
5.4.13	GÉNERO: <i>Neoschizothecium</i>	31
5.4.14	SUBCLASE: <i>Sordariomycetidae</i>	32
5.4.15	GÉNERO: <i>Xylaria</i>	33
5.5.	DIVERSIDAD FÚNGICA EN LAS MUESTRAS DE HOJAS DEL JBQ.....	34
5.5.1	Hongos encontrados según sus orquídeas hospedadoras.....	34
5.5.2	Diversidad funcional de los hongos encontrados.....	36
6.	DISCUSIÓN.....	37
7.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	40
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Hoja de *Dracula terborchii*.** Lesión en la punta de la hoja. Morfotipo 2: Mancha marrón negruzca con anillos y manchas blancas en la punta de la hoja. 12
- Figura 2. Aislado puro de *Dracula terborchii*.** Colonia rosada blanquecina. Posible *Colletotrichum sp.* 12
- Figura 3. Morfología de *Acremonium charticola*.** a. Morfotipo de lesión 30: Mancha negra sin borde e interior blanco, b. Colonia de *Acremonium charticola*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Dendrochilum cobbianum*, c. Microscopía 40X de *Acremonium charticola*. 17
- Figura 4. Morfología de *Acremonium sordidulum*.** a. Morfotipo de lesión 20: Mancha negra única, b. Colonia de *Acremonium sordidulum*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Stanhopea sp.*, c. Microscopía 100X de *Acremonium sordidulum*..... 18
- Figura 5. Morfología de *Cercospora sp.*** a. Morfotipo de lesión 24: Manchas negras redondeadas pequeñas, b. Colonia de *Cercospora sp.*. Hongo obtenido de lesión de hoja de especie indeterminada, c. Microscopía 100X de *Cercospora sp.*..... 19
- Figura 6. Morfología de *Cladosporium sphaerospermum*.** a. Morfotipo de lesión 20: Mancha negra única, b. Colonia de *Cladosporium sphaerospermum*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Trichopilia sp*, c. Microscopía 40X de *Cladosporium sphaerospermum*.20
- Figura 7. Morfología de *Colletotrichum boninense*.** a. Morfotipo de lesión 2: Mancha marrón negruzca con anillos y manchas blancas en la punta de la hoja, b. Colonia de *Colletotrichum boninense*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Dracula amaliae*, c. Microscopía 40X de *Colletotrichum boninense*. 21
- Figura 8. Morfología de *Colletotrichum sp.*** a. Morfotipo de lesión 4: Mancha en la punta de la hoja sin anillos y blanquecina, b. Colonia de *Colletotrichum sp.* Hongo obtenido de lesión de hoja de *Prostechea sp.*, c. Microscopía 40X de *Colletotrichum sp.* 22

- Figura 9. Morfología de *Coprinellus disseminatus*.** a. Morfotipo de lesión 2: Mancha marrón negruzca con anillos y manchas blancas en la punta de la hoja, b. Colonia de *Coprinellus disseminatus*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Dracula sp*, c. Microscopía 40X de *Coprinellus disseminatus*. 23
- Figura 10. Morfología de *Coprinellus xanthothrix*.** a. Morfotipo de lesión 4: Mancha en la punta de la hoja sin anillos y blanquecina, b. Colonia de *Coprinellus xanthothrix*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Masdevallia sp.*, c. Microscopía 40X de *Coprinellus xanthothrix*. 24
- Figura 11. Morfología de *Curvularia coatesiae*.** a. Morfotipo de lesión 6: Mancha en la punta de la hoja con un solo anillo negro, b. Colonia de *Curvularia coatesiae*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Trichopilia sp.*, c. Microscopía 40X de *Curvularia coatesiae*. 25
- Figura 12. Morfología de *Didymella keratinophila*.** a. Morfotipo de lesión 18: Hoja esporada, b. Colonia de *Didymella keratinophila*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Dracula sp*, c. Microscopía 40X de *Didymella keratinophila*. 26
- Figura 13. Morfología de *Hypomyces sp.*** a. Morfotipo de lesión 13: Mancha negra opaca cerca del peciolo, b. Colonia de *Hypomyces sp.*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Masdevallia platyglossa*, c. Microscopía 100X de *Hypomyces sp.*..... 27
- Figura 14. Morfología de *Meira miltonrushii*.** a. Morfotipo de lesión 27: Puntos negros sin borde definido en el envés, b. Colonia de *Meira miltonrushii*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Stanhopea sp.*, c. Microscopía 100X de *Meira miltonrushii*. 28
- Figura 15. Morfología de *Mycosphaerella coacervata*.** a. Morfotipo de lesión 7: Manchas negras en la punta, b. Colonia de *Mycosphaerella coacervata*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Dracula robledorum*, c. Microscopía 10X de *Mycosphaerella coacervata*. 29
- Figura 16. Morfología de *Parasola lactea*.** a. Morfotipo de lesión 24: Machas negras redondeadas pequeñas, b. Colonia de *Parasola lactea*. Hongo obtenido de lesión de hoja de especie indeterminada, c. Microscopía 40X de *Parasola lactea*. 30

- Figura 17. Morfología de *Phaeophleospora pteridivora*.** a. Morfotipo de lesión 15: Mancha redondeada con interior blanco y borde negro, b. Colonia de *Phaeophleospora pteridivora*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Masdevallia sp.*, c. Microscopía 40X de *Phaeophleospora pteridivora*. 31
- Figura 18. Morfología de *Neoschizothecium glutinans*.** a. Morfotipo de lesión 22: Numerosas manchas negras dispersas por toda la hoja., b. Colonia de *Neoschizothecium glutinans*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Milioniopsis sp.*, c. Microscopía 40X de *Neoschizothecium glutinans*. 32
- Figura 19. Morfología de *Sordariomycetidae sp.*** a. Morfotipo de lesión 33: Mancha negra con interior naranja., b. Colonia de *Sordariomycetidae sp.*. Hongo obtenido de lesión de hoja de especie *Schlimmia sp.*, c. Microscopía 40X de *Sordariomycetidae sp.* 33
- Figura 20. Morfología de *Xylaria sp.*** a. Morfotipo de lesión 7: Manchas negras en la punta., b. Colonia de *Xylaria sp.*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Masdevallia angulata* c. Microscopía 40X de *Xylaria sp.* 34
- Figura 21. Electroforesis** 52

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Géneros y/o especies de hongos encontrados	13
Tabla 2. Morfotipos de lesiones en las hojas de las orquídeas.....	15
Tabla 3. Hongos encontrados y sus orquídeas hospedadoras.....	34
Tabla 4. Diversidad funcional de los hongos.....	36

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN	46
Anexo 2. Protocolo para PCR.....	47
Anexo 3. Códigos y especies de orquídeas colectadas.....	48
Anexo 4. Códigos y número de extracciones de ADN por código	51
Anexo 5. Resultados en gel de agarosa de PCR de extracciones de ADN de las muestras.....	52
Anexo 6. Morfotipos de lesiones en las hojas	53

1. RESUMEN

Las orquídeas y los hongos tienen singularidades compartidas, ambos organismos tienen una amplia diversidad de especies y sus abundancias se concentran en los trópicos, por tanto, existen numerosas interacciones entre los dos grupos. Las orquídeas son reconocidas por su gran riqueza de especies y especificidad en cuanto a las relaciones con micorrizas y polinizadores. En Ecuador es la familia de plantas con mayor número de especies endémicas, aportando con un tercio de especies al fitoendemismo del país. Los hongos cumplen diversas funciones dentro las plantas, pueden ser simbioses al ser micorrizas endófitos o líquenes, patógenos al generar enfermedades en sus hospedadoras y saprófitos al descomponer materia orgánica. La colección de orquídeas del Jardín Botánico de Quito fue muestreada para analizar los hongos presentes en las lesiones de sus hojas, encontrando los posibles responsables fitopatógenos de las enfermedades que presentan estas plantas. Se tomaron fragmentos de hojas con lesiones, se desinfectaron y se inocularon en cajas petri en condiciones controladas. Luego del crecimiento de los hongos, estos se reaislaron y purificaron. Se describieron los caracteres macroscópicos de las lesiones de las hojas y macro y microscópicamente los caracteres de las colonias de hongos. Se realizaron extracciones de ADN y se amplificaron las regiones ITS del ADN ribosomal de cada individuo fúngico. Posteriormente las muestras se secuenciaron en MacroGen Korea. Los hongos se identificaron al comparar las secuencias obtenidas con las disponibles en GenBank. Se encontró una gran diversidad de hongos provenientes de las hojas con lesiones de orquídeas del Jardín Botánico de Quito, de los cuales *Cercospora sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Colletotrichum boninense* y *Phaelospora pteridivo* se identificaron como los posibles responsables de las enfermedades que generan daños en las hojas de las orquídeas. Es de gran importancia realizar más estudios sobre la fitopatología de las orquídeas, siendo estos indispensables para mejorar el manejo de las enfermedades de estas plantas tan representativas del Ecuador y así además contribuir al manejo de las orquídeas del Jardín Botánico de Quito.

Palabras clave: Fitopatógeno, orquídeas, hongos, ITS, descripción

2. ABSTRACT

Orchids and fungi have shared singularities, both organisms have a wide diversity of species, and their abundances are concentrated in the tropics; therefore, there are numerous interactions between the two groups. Orchids are recognized for their great species richness and specificity in their relationships with mycorrhizae and pollinators. In Ecuador, it is the family of plants with the largest number of endemic species, contributing with a third of species to the phytoendemism of the country. Fungi fulfil various functions within plants; they can be symbionts by being endophytic mycorrhizae or lichens, pathogens by generating diseases in their hosts, and saprophytes by decomposing organic matter. The orchid collection of the Quito Botanical Garden was sampled to analyze the fungi present in the lesions on its leaves, finding the possible phytopathogenic causes of the diseases that these plants present. Fragments of leaves with lesions were taken, disinfected and inoculated in petri dishes under controlled conditions. After the growth of the fungi, they were reisolated and purified. The macroscopic characters of the leaf lesions and the macroscopic and microscopic characters of the fungal colonies were described. DNA extractions were performed, and the ITS regions of the ribosomal DNA of each fungal individual was amplified. After this, the samples were sequenced at Macrogen Korea. The fungi were identified by comparing the sequences obtained with those available in GenBank. A great diversity of fungi from the orchid leaves with lesions from the Quito Botanical Garden was found, of which *Cercospora sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Colletotrichum boninense* and *Phaelospora pteridivora* were identified as the possible responsible for the diseases that cause damage to the orchid leaves. It is of great importance to carry out more studies on the phytopathology of orchids to improve the management of diseases of these representative plants of Ecuador and thus also contribute to the management of orchids in the Botanical Garden of Quito.

Key words: Phytopathogen, orchids, fungi, ITS, description

3. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, se estima que existen entre 1,5 y 12 millones de especies de hongos. De este total se han descrito solo 150.000 (Bhunjun et al., 2022). Los hongos intervienen profundamente en los ecosistemas globales. Modifican hábitats y son esenciales para diversas funciones de los ecosistemas. Entre estas funciones está la formación del suelo, reciclaje de nutrientes, degradación de madera y asociación para el crecimiento de las plantas. Nos alimentan, envenenan, parasitan y nos curan (Blackwell et al., 2006).

Los hongos pueden desarrollarse en la mayoría de hábitats de la Tierra, superados solamente por las bacterias en su capacidad para soportar temperaturas extremas y aprovechar fuentes de carbono. Se cree que las regiones tropicales del mundo tienen la mayor diversidad. Generalmente no tienen flagelos y presentan cuerpos filamentosos con carbohidratos característicos en la pared celular como la quitina. Interactúan con todos los grandes grupos de organismos. Constituyen un linaje eucariota principal gracias a su descendencia de un ancestro común compartido con los animales hace 500 a 1000 millones de años. El grupo incluye mohos, levaduras, setas, políporos, royas, tizones parásitos de plantas entre otros (Blackwell, 2011).

La diversidad fúngica que interactúa con las plantas puede ser de tipo simbiote, patógeno y saprófito. Donde pueden encontrarse especímenes de varias divisiones fúngicas como Glomeromycota, Basidiomycota, Ascomycota y Zygomycota (Ordoñez, 2020). Dentro de esta diversidad muchas especies causan enfermedades en las plantas, provocando grandes pérdidas económicas y de producción en la industria agrícola en todo el mundo. Los hongos encargados de producir estas enfermedades en las plantas son llamados fitopatógenos, generando problemas graves en la productividad de los cultivos y plantas silvestres. Es por esto que la interacción fúngica con otros organismos como las plantas es de gran interés. Los estudios de los hongos fitopatógenos son necesarios para mejorar la identificación de patógenos, comprender el mecanismo de la patogenicidad y virulencia, implementando estrategias de control (Salvatore & Andolfi, 2021). Las interacciones entre fitopatógenos y plantas, desembocan en diversos resultados, que van desde la resistencia sin síntomas, hasta enfermedades graves e incluso la muerte de las plantas infectadas (Saur & Hüchelhoven, 2021).

Desde el advenimiento de las técnicas moleculares para el procesamiento de ADN, se ha demostrado que muchas especies de hongos fitopatógenos representan complejos de especies o que se incluyen en géneros poli o parafiléticos. Resolver estos conceptos genéricos y de especies por lo tanto, es de suma importancia para la salud vegetal y el comercio mundial de plantas (Marin-Felix et al., 2017).

Por otro lado, ampliamente distribuidas por todo el globo, principalmente en zonas tropicales, las orquídeas son reconocidas por su gran riqueza de especies y especificidad en cuanto a las relaciones con polinizadores y micorrizas (Djordjević & Tsiftsis, 2020). La familia Orchidaceae es la familia más grande dentro de las angiospermas, contando con más de 800 géneros y más de 27.000 especies de plantas terrestres, epífitas y saprofitas en todo el mundo (Givnish et al., 2016).

Las orquídeas crecen más abundantemente en bosques tropicales y subtropicales, donde en mayor medida son epífitas. Es el grupo de plantas monocotiledóneas más avanzado evolutivamente, teniendo mecanismos de adaptación que les permite prosperar en una amplia gama de entornos. Las más notables son estructuras especializadas para la captación y el almacenamiento de agua, permitiéndoles retener líquido de la atmósfera circundante, aumentar la absorción de nutrientes y reducir la pérdida de agua. Además, tienen asociaciones con hongos micorrízicos orquideoides para satisfacer sus necesidades nutricionales (Srivastava, Kadooka & Uchida, 2018).

Esta familia de plantas es muy diversa y económicamente importante por su gran número de plantas ornamentales distribuidas comercialmente (Judd, Campbell, Kellog, Stevens, & Donoghue, 2008). Sus cultivos son perennes y de crecimiento lento, por tanto, necesitan entre dos y diez años para alcanzar la madurez reproductiva. Dependiendo del tipo de orquídea, las plantas maduras pueden florecer continuamente, o sólo una o dos veces al año. Los géneros más distribuidos en el mundo son *Cattleya*, *Dendrobium*, *Epidendrum*, *Paphiopedilum*, *Phalaenopsis*, *Vanda*, *Brassia*, *Cymbidium*, *Laelia*, *Miltonia*, *Oncidium*, *Encyclia* y *Coelogyne* (Hew & Yong, 2004).

Las orquídeas han sido comercializadas durante mucho tiempo como plantas ornamentales y medicinales. Su producción y comercialización representa una parte

importante del comercio mundial de flores (Zhang et al., 2018). Existen más de 100.000 híbridos registrados en el mundo, el número es tan alto, debido a que entre géneros y especies de orquídeas existe un alto grado de compatibilidad genética. En la actualidad, los principales países que participan en la producción comercial de orquídeas son: Estados Unidos, Gran Bretaña, Japón, China, Taiwán, Tailandia, Australia y Singapur. En Estados Unidos actualmente las orquídeas son uno de los cultivos ornamentales más importantes y representativos, teniendo ganancias anuales de hasta 288 millones de dólares (Srivastava, Kadooka & Uchida, 2018).

El reciente aumento de la oferta y demanda de cultivos ornamentales exóticos como las orquídeas ha llevado a un aumento de la producción internacional y por tanto a un aumento considerable en el número de plantas que se transporta entre países y continentes. Junto con las plantas, las enfermedades también se están moviendo e introduciendo en nuevas zonas y cultivos. El género *Fusarium* es uno de las principales causantes de enfermedades en las orquídeas, que está siendo propagada a través del comercio internacional. Los síntomas de esta enfermedad son la pudrición de raíces, tallos y pseudobulbos (Fernandez et al., 2020). Se han identificado varias especies de *Fusarium* asociadas con las orquídeas, algunas son patógenas y causan síntomas como manchas en las hojas y flores. También manchas en hojas o vaina, pseudocetas o podredumbres de raíces (Srivastava, Kadooka & Uchida, 2018).

Otro genero de hongo causante de enfermedades importantes en orquídeas es *Colletotrichum*, siendo uno de los géneros más importantes y comunes de hongos fitopatógenos, afectando a casi todas las plantas cultivadas del mundo. *Colletotrichum* genera manchas en hojas y flores en orquídeas, causando antracnosis, manchas y tizones en las partes aéreas de las plantas. Además puede producir pudriciones posteriores a la cosecha (Dean et al., 2012). Otros fitopatógenos registrados que producen enfermedades en orquídeas son los hongos del genero *Botrytis* y *Phyllosticta*. *Botrytis cinerea* es un importante fitopatógeno que causa enfermedades antes y después de la cosecha en mas de 500 especies de plantas incluídas las orquídeas (Hua et al., 2018). Por otro lado, las especies de *Phyllosticta* causan manchas foliares y enfermedades de frutos en un amplio rango de hospedantes. En orquídeas del género *Dendrobium*, *Phyllosticta* causa manchas amarillas en las hojas, que conforme la enfermedad avanza y necrosa el tejido invadiendo toda la hoja (Uchida, 1999).

Por otro lado, la diversidad vegetal a nivel global está disminuyendo rápidamente producto de distintas actividades devastadoras, que incluyen las malas prácticas agrícolas y forestales, la urbanización, la contaminación ambiental, los cambios en el uso de la tierra, las especies exóticas invasoras y el cambio climático. Es por esto que el interés y los esfuerzos para desarrollar enfoques de conservación para especies de plantas deben ir en aumento. Los jardines botánicos en el mundo cumplen estas funciones clave dentro de la conservación, la investigación científica y la educación ciudadana. Proporcionando así servicios importantes y necesarios para la sostenibilidad de la diversidad de plantas (Chen & Sun, 2018). El Jardín Botánico de Quito se centra en estos propósitos.

El mantenimiento de las orquídeas se ha convertido en un reto importante en el Jardín Botánico de Quito, esto debido a que las orquídeas están siendo afectadas por distintos fitopatógenos. El desconocimiento de cuáles son las enfermedades y los agentes causales ha provocado un dificultoso mantenimiento de las plantas y sus tratamientos.

Es necesario recalcar que Orchidaceae es la familia de plantas con mayor número de especies endémicas del Ecuador, en total 1707 spp, aportando así con aproximadamente un tercio del fitoendemismo del país (Endara et al., 2017). Los estudios de enfermedades y sus agentes causales en orquídeas del Ecuador son escasos (Sinchire, 2010). El manejo de estas enfermedades depende de diagnósticos precisos, comprensión detallada del ciclo y biología de la enfermedad, identificación de posibles acciones que incluyen resistencia genética, cuarentena, saneamiento e higiene, gestión del suelo y el agua y fungicidas (Thomas, Murphy & Murray, 2017). Por tanto, la importancia de proporcionar información sobre la fitopatología de las orquídeas se vuelve indispensable para mejorar el manejo de las enfermedades de estas plantas tan representativas del Ecuador y así además contribuir al manejo de las orquídeas del Jardín Botánico de Quito.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar molecular y morfológicamente hongos de orquídeas del Jardín Botánico de Quito

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar morfotipos de lesiones en las hojas
- Identificar morfotipos de crecimiento de las colonias en las cajas Petri
- Identificar a nivel molecular y morfológico (macroscópico y microscópico) a hongos que se aislaron de las orquídeas.
- Identificar posibles patógenos de orquídeas
- Contribuir con información relevante sobre los posibles patógenos de orquídeas para mejorar los procesos de control de enfermedades en el Jardín Botánico de Quito

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. COLECCIÓN, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE HONGOS

4.1.1 Colección

Se hicieron 2 colectas para tomar muestras de hojas con lesiones de orquídeas del Jardín Botánico de Quito (JBQ), los géneros de las orquídeas recolectadas fueron *Dracula*, *Masdevallia*, *Stanhopea*, entre otros. Las colectas se realizaron con un mes de diferencia debido a que las plantas eran fumigadas una vez cada 3 o 4 semanas, por tanto, el muestreo se dio días previos a la fumigación para evitar que esto influyera en los resultados. Durante las colectas se realizó un reconocimiento general de las plantas enfermas en los invernaderos, identificando el tipo de lesiones que tenían las hojas para determinar que muestras se recogerían. En algunos casos se tomó más de una muestra por planta porque las lesiones en sus hojas eran diferentes. Para tomar las muestras se utilizó tijeras, fundas plásticas, marcador, guantes y un cuaderno de apuntes. Se tomó de 1 a 3 muestras por cada planta que se encontraba con lesiones. Para esto, se recortó generalmente la punta o parte de la hoja y muy pocas veces se tomó la hoja completa. Estos fragmentos se introdujeron en fundas plásticas y se las infló para conservar la humedad dentro de ellas y evitar que las hojas se secaran. Luego de tomar todas las muestras se transportaron al Fungario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

4.1.2 Aislamiento

Este proceso se realizó dentro de una cámara de flujo laminar BioAir. Los fragmentos de hoja se sumergieron durante 1 minuto en solución de cloro al 0,5% con el fin de eliminar la flora normal presente en el tejido. Posteriormente, se enjuagaron sumergiéndolos en agua destilada estéril para eliminar los residuos de desinfectante que pudiesen interferir con el desarrollo normal del patógeno. Después bajo condiciones asépticas, se secaron los fragmentos de tejido utilizando una toalla de papel estéril. Los fragmentos de tejido se inocularon en medio Agar Papa Dextrosa (PDA), colocando de 1 a 3 fragmentos de tejido en posición equidistante en la placa de agar. Las placas inoculadas crecieron a ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) en incubadoras. Para el manejo de datos, los cultivos de hongos se nombraron con el mismo

código de sus plantas de origen, esto para diferenciar los hongos que provenían de cada planta. Todas las cajas petri con aislados puros presentan el código de la planta de origen, fecha de inoculación y morfotipo de lesión de la hoja de origen (Han et al., 2015).

4.1.3 Purificación

Se permitió que los hongos crezcan entre 1 y 2 semanas. Una vez observado el crecimiento de hongos, estos se reaislaron en placas con el mismo medio de cultivo y en algunos casos en medio Sabouraud, esto con el fin de obtener cultivos puros de cada hongo (Han et al., 2015).

4.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

4.2.1 CARACTERES MACROSCÓPICOS DE LAS LESIONES EN LAS HOJAS

Para clasificar el tipo de lesiones de las hojas se empleó desde la colecta y en el laboratorio un método en el que se diferenció las muestras por su forma, color, disposición y distribución de la lesión en la hoja.

4.2.2 CARACTERES MACROSCÓPICOS DE LAS COLONIAS

Posterior a la purificación de los cultivos. Se caracterizó las colonias macroscópicamente, basándose en su color, forma, margen, consistencia y superficie (Arias & Piñeros, 2008). Las fotografías de las colonias se tomaron con una cámara Canon EOS60D.

4.2.3 CARACTERES MICROSCÓPICOS DE LAS COLONIAS

Para analizar las características microscópicas de los cultivos se utilizó un microscopio Axiostar Zeiss junto con una cámara para microscopio Infinity 2 1RC. Se utilizó el método de cinta pegante. Esto consistió en tomar una tira de cinta de alrededor de 4 centímetros, el lado adhesivo de la cinta se presionó con firmeza contra la superficie de la colonia para extraer las estructuras del hongo en la cinta. Posterior a esto se colocó una gota de azul de

lactofenol sobre un portaobjetos y sobre esta se colocó la cinta, tiñendo las estructuras microscópicas del hongo (Arias & Piñeros, 2008). Posteriormente se tomaron fotografías de las estructuras encontradas, analizando la presencia de estructuras sexuales o asexuales e hifas basándose en la literatura (Domingues et al., 2020).

4.3. EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN ITS DEL ADN RIBOSOMAL

Las extracciones de ADN fueron realizadas con el Kit de extracción Wizard Genomic DNA Purification de Promega, descrito en el Anexo 1. Este protocolo fue adaptado para la extracción a partir de micelio creciendo en cajas Petri con agar. Posterior a las extracciones, se realizaron diluciones del ADN extraído con agua Milli Q para las reacciones de PCR, proceso descrito en el Anexo 2.

La identificación de los hongos se basó en el análisis filogenético de las secuencias de la región ITS del ADN ribosomal. Para esto se utilizó el cebador ITS-1F, e ITS-4, ambos cebadores generales para hongos. La región que se amplificó incluía 18s, ITS1, 5.8s, e ITS2. Algunos cultivos fueron a propósito sometidos más de una vez a PCR, esto debido a que la morfología de sus colonias era distinta y se quiso comprobar su identidad (Toapanta, 2014).

Los materiales necesarios para las PCR fueron: muestras de ADN, tubos Eppendorf de 0.5ml y 0.2ml, agua Milli Q, Buffer 10X, MgCl₂, dNTPs, primers ITS-1F (forward) e ITS-4 (reverse) y taq polimerasa, en sus respectivas concentraciones finales. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Multigene Labnet). Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1% en 0,5X TBE, separados mediante electroforesis durante 35 minutos, con un voltaje de 100V y un miliamperaje de 500mA.

4.4. ANALISIS DE SECUENCIAS

Las PCR fueron enviadas a Macrogen Corea para su secuenciamiento. Las secuencias obtenidas se visualizaron y editaron con el programa Geneious 6.0.6. Se obtuvieron secuencias consenso de entre 550-800 pb que incluían la región 18S, ITS-1F, 5.8S e ITS-4 del ADNr. Se pudo confirmar el género y/o especie de algunas muestras a partir de la

comparación con secuencias disponibles en GenBank a través del programa BLASTn (Toapanta, 2014).

5. RESULTADOS

5.1. NÚMERO DE MUESTRAS COLECTADAS E INDIVIDUOS AISLADOS

Se colectaron un total de 107 muestras de hojas de 84 orquídeas del JBQ (Anexo 3) (Figura 1). De las que se obtuvieron aproximadamente 111 cultivos puros sin tomar en cuenta duplicados de cada uno (Figura 2). Se escogieron 42 individuos al azar para realizar estudios moleculares y morfológicos.



Figura 1. Hoja de *Dracula terborchii*. Lesión en la punta de la hoja. Morfotipo 2: Mancha marrón negruzca con anillos y manchas blancas en la punta de la hoja.



Figura 2. Aislado puro de *Dracula terborchii*. Colonia rosada blanquecina. Posible *Colletotrichum* sp.

5.2. EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN ITS DEL ADN RIBOSOMAL

Los productos de PCR para las 42 extracciones de ADN amplificaron correctamente (Anexo 4 y 5). Se identificaron 18 especies dentro de 15 géneros. Los géneros más abundantes fueron *Colletotrichum*, *Xylaria* y *Coprinellus*. El porcentaje de máxima verosimilitud para designar especies fue mayor al 99% en la mayoría de los casos, tanto en cobertura como identidad, excepto en dos, que presentaron 92.5% (*Meira miltonrushii*) y 54.6% (*Xylaria sp.*) (Tabla 1).

Tabla 1. Géneros y/o especies de hongos encontrados

Aislado fúngico	Coincidencias más cercanas en GenBank	Secuencia de coincidencia BLAST Identidad máxima (%)
7702	<i>Acremonium charticola</i>	98.0%
7606	<i>Acremonium sordidulum</i>	98.0%
5145	<i>Cercospora sp.</i>	100.0%
7377	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	99.8%
8632B	<i>Colletotrichum boninense</i>	93.2%
8568B	<i>Colletotrichum boninense</i>	99.7%
8632D	<i>Colletotrichum boninense</i>	100.0%
8655	<i>Colletotrichum boninense</i>	98.8%
8906	<i>Colletotrichum boninense</i>	99.5%
8632A	<i>Colletotrichum boninense</i>	99.5%
8568A	<i>Colletotrichum boninense</i>	100.0%
8632C	<i>Colletotrichum boninense</i>	100.0%
8851A	<i>Colletotrichum sp.</i>	99.7%
8851B	<i>Colletotrichum sp.</i>	99.7%
8875A	<i>Colletotrichum sp.</i>	100.0%
8875B	<i>Colletotrichum sp.</i>	100.0%
11718	<i>Coprinellus aff. Xanthothrix</i>	100.0%
6559B	<i>Coprinellus disseminatus</i>	100.0%
6559A	<i>Coprinellus disseminatus</i>	99.9%

Aislado fúngico	Coincidencias más cercanas en GenBank	Secuencia de coincidencia BLAST Identidad máxima (%)
8013	<i>Coprinellus disseminatus</i>	100.0%
13637	<i>Coprinellus disseminatus</i>	100.0%
13064	<i>Curvularia coatesiae</i>	99.7%
2517	<i>Didymella keratinophila</i>	100.0%
12344	<i>Hypomices sp.</i>	99.5%
7554	<i>Meira miltonrushii</i>	92.5%
26440	<i>Mycosphaerella coacervata</i>	100.0%
6164	<i>Parasola lactea</i>	100.0%
65500	<i>Parasola lactea voucher</i>	100.0%
63600	<i>Parasola lactea voucher</i>	100.0%
6451	<i>Phaeophleospora pteridivora</i>	99.4%
8532	<i>Phaeophleospora pteridivora</i>	99.9%
8681	<i>Phaeophleospora pteridivora</i>	99.9%
14296	<i>Neoschizothecium glutinans</i>	100.0%
7534	<i>Sordariomycetidae sp.</i>	99.7%
4113	<i>Sordariomycetidae sp.</i>	100.0%
12655	<i>Sordariomycetidae sp.</i>	99.5%
8411	<i>Xylaria sp.</i>	100.0%
9609	<i>Xylaria sp.</i>	100.0%
26465B	<i>Xylaria sp.</i>	100.0%
26465A	<i>Xylaria sp.</i>	54.6%
26465C	<i>Xylaria sp.</i>	100.0%
23463	<i>Xylaria sp.</i>	100.0%

5.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS INDIVIDUOS AISLADOS

5.3.1 CARACTERES MACROSCÓPICOS DE LAS LESIONES EN LAS HOJAS

Las muestras de hojas tomadas en el JBQ presentaron distinta morfología entre sí (Anexo 7). Se contabilizaron 33 morfotipos. El tipo de lesión más común que se observó fue el morfotipo 2, con 24 muestras (Tabla 2).

Tabla 2. Morfotipos de lesiones en las hojas de las orquídeas.

Morfotipo	Descripción morfológica de la lesión en la hoja	Número de muestras
1	Mancha negra en el borde de la hoja	1
2	Mancha marrón negruzca con anillos y manchas blancas en la punta de la hoja	24
3	Mancha negra en la punta de la hoja con puntos negros	1
4	Mancha en la punta de la hoja sin anillos y blanquecina	11
5	Manchas negras con centro amarillo	1
6	Mancha en la punta de la hoja con un solo anillo negro	7
7	Manchas negras en la punta	2
8	Mancha negra en el envés	1
9	Manchas marrones claras	4
10	Mancha redondeada en la punta del envés de la hoja con bordes amarillentos	1
11	Manchas negras sin forma en el envés	1
12	Puntos negros en el haz	1
13	Mancha negra opaca cerca del peciolo	1
14	Manchas negras, amarillas y blancas en toda la hoja	1

Morfotipo	Descripción morfológica de la lesión en la hoja	Número de muestras
15	Mancha redondeada con interior blanco y borde negro	1
16	Mancha redondeada con interior amarillento y plomizo con borde negro	5
17	Hoja seca con esporas	3
18	Hoja esporada	3
19	Manchas blancas en toda la hoja	2
20	Mancha negra única	6
21	Mancha marrón única	5
22	Numerosas manchas negras dispersas por toda la hoja	3
23	Mancha marrón con numerosos anillos	1
24	Manchas negras redondeadas pequeñas	5
25	Manchas marrones, negras y amarillentas en toda la hoja	3
26	Hoja con lesiones blancas y negras pequeñas	3
27	Puntos negros sin borde definido en el envés	2
28	Mancha negra en el nervio central	1
29	Mancha marrón con borde negro e interior blanco	1
30	Mancha negra sin borde e interior blanco	3
31	Mancha marrón con borde amarillo y manchas negras	1
32	Manchas marrones deformes en toda la hoja	1
33	Mancha negra con interior naranja	1

5.4. CARACTERES MACROSCÓPICOS Y MICROSCÓPICOS DE LAS COLONIAS

5.4.1 GÉNERO: *Acremonium*

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocreaceae

5.4.1.1 *Acremonium charticola* 7702

Características macroscópicas

Colonia en PDA presentó forma filamentosa, margen filiforme, elevación plana, superficie algodonosa y blanca, reverso amarillento.

Características microscópicas

Se realizaron varias microscopías, no se encontraron estructuras asexuales ni sexuales, las hifas son ramificadas y septadas.

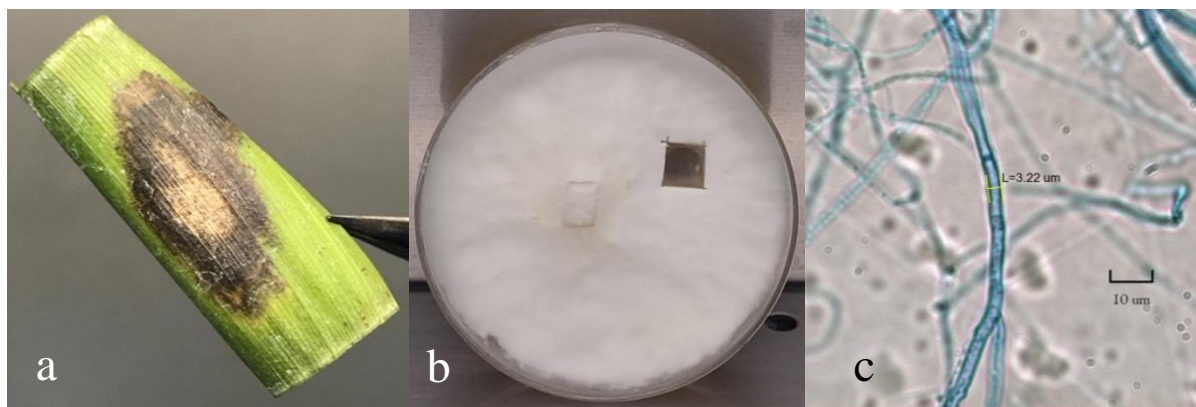


Figura 3. Morfología de *Acremonium charticola*. a. Morfotipo de lesión 30: Mancha negra sin borde e interior blanco, b. Colonia de *Acremonium charticola*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Dendrochilum cobbianum*, c. Microscopía 40X de *Acremonium charticola*.

5.4.1.2 *Acremonium sordidulum* 7606

Características macroscópicas

Colonia en Sabouraud presenta forma irregular, elevación plana, margen ondulado, superficie rugosa de color rosado y reverso blanco.

Características microscópicas

Se encontraron hifas ramificadas y septadas. Los conidios agrupados fueron catenulados de entre 1.9 a 2.1 μm que nacen de conidióforos simples.

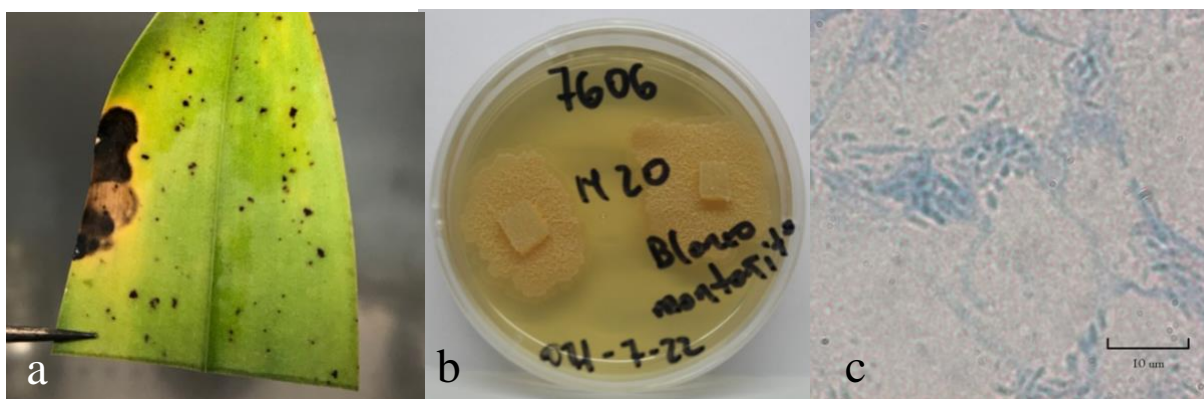


Figura 4. Morfología de *Acremonium sordidulum*. a. Morfotipo de lesión 20: Mancha negra única, b. Colonia de *Acremonium sordidulum*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Stanhopea sp.*, c. Microscopía 100X de *Acremonium sordidulum*.

5.4.2 GÉNERO: *Cercospora*

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Mycospharellales

Familia: Mycospharellaceae

5.4.2.1 *Cercospora sp.* 5145

Características macroscópicas

Colonia en Sabouraud presenta forma irregular-rizoide, elevación plana, margen ondulado, superficie rugosa-mucosa-filamentosa dependiendo de la edad de la colonia. Forma anillos de color marrón, blanco y verdoso, el reverso es blanco-marrón.

Características microscópicas

Se observaron hifas ramificadas y septadas. Conidios de hasta 3.1 μ m de ancho x 15.40 μ m de largo, solitarios, tubulados, obclavado-cilíndricos, rectos, base truncada con cicatriz conspicua y ápice agudo, liso, de forma filamentosa y hialinas.

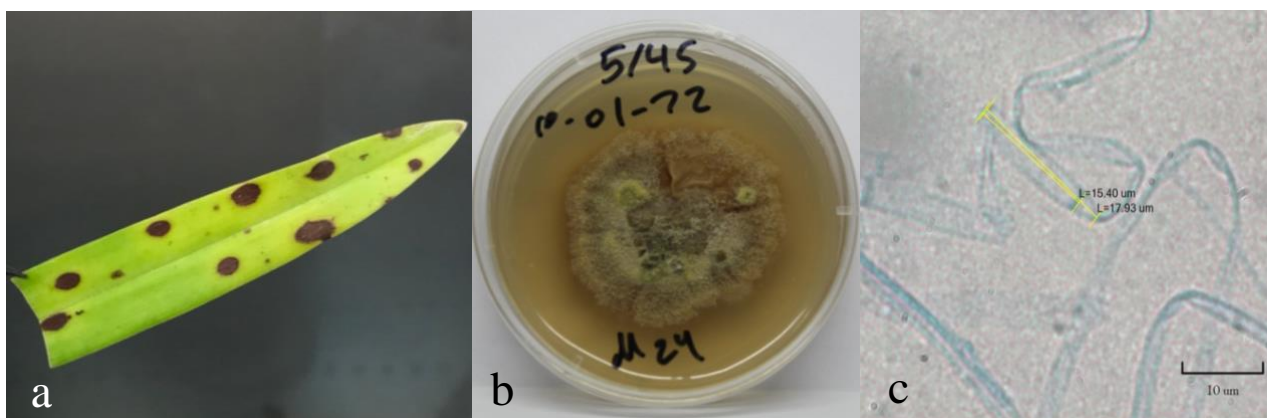


Figura 5. Morfología de *Cercospora sp.* a. Morfotipo de lesión 24: Manchas negras redondeadas pequeñas, b. Colonia de *Cercospora sp.*. Hongo obtenido de lesión de hoja de especie indeterminada, c. Microscopía 100X de *Cercospora sp.*.

5.4.3 GÉNERO: *Cladosporium*

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Capnodiales

Familia: Cladosporiaceae

5.4.3.1 *Cladosporium sphaerospermum* 7377

Características macroscópicas

Colonia en PDA presenta forma circular, elevación plana, margen filiforme, superficie pulverulenta de color verdoso y reverso negro.

Características microscópicas

Hongo oscuro con hifas ramificadas y septadas, que no se tiñen con el tinte azul de lactofenol. Los conidioforos forman estructuras similares a árboles, ensambladas principalmente por cadenas ramificadas de numerosos conidios redondos oscuros subglobosos de entre 2-5 x 3-7 μm .

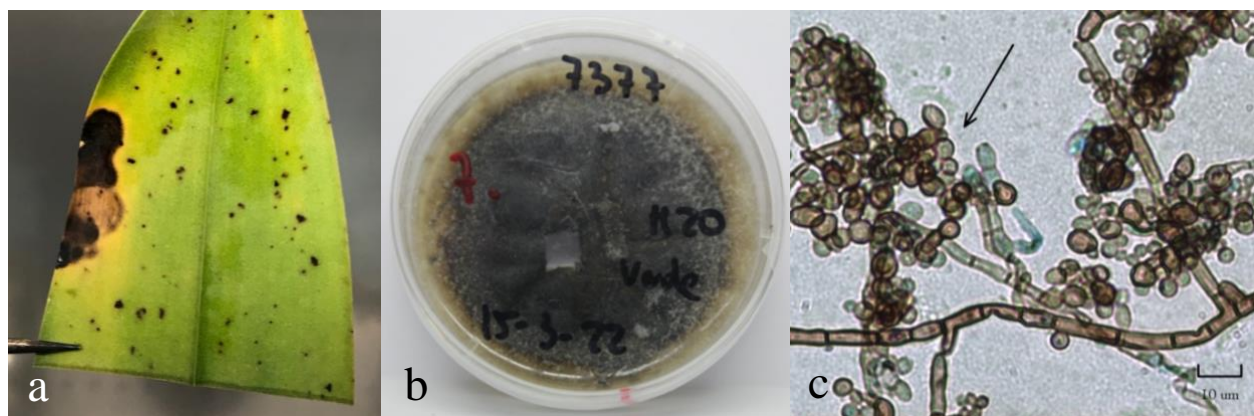


Figura 6. Morfología de *Cladosporium sphaerospermum*. a. Morfotipo de lesión 20: Mancha negra única, b. Colonia de *Cladosporium sphaerospermum*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Trichopilia sp*, c. Microscopía 40X de *Cladosporium sphaerospermum*.

5.4.4 GÉNERO: *Colletotrichum*

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Glomerellales

Familia: Glomerellaceae

5.4.4.1 *Colletotrichum boninense* 8906

Características macroscópicas

Colonia en Sabouraud presenta forma filamentosa-rugosa, elevación plana, margen filiforme, superficie filamentosa-pulvurenta de color rosado o blanco, reverso rosado.

Características microscópicas

Se observó hifas ramificadas con septos. Varios conidios hialinos, de paredes lisas, aseptados, rectos, cilíndricos a clavados, ápice redondeado, base redonda con un hilio prominente.

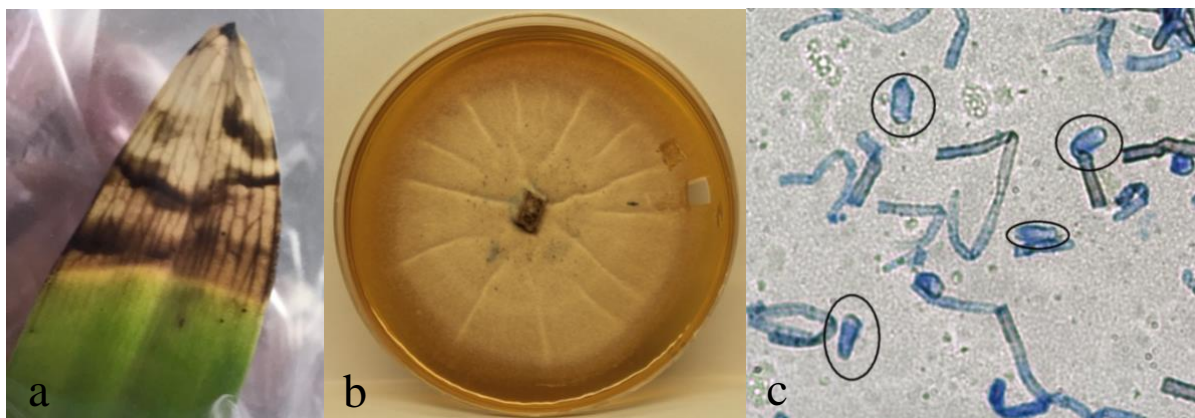


Figura 7. Morfología de *Colletotrichum boninense*. a. Morfotipo de lesión 2: Mancha marrón negruzca con anillos y manchas blancas en la punta de la hoja, b. Colonia de *Colletotrichum boninense*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Dracula amaliae*, c. Microscopía 40X de *Colletotrichum boninense*.

5.4.4.2 *Colletotrichum* sp. 8891

Características macroscópicas

Colonia en PDA presenta forma filamentosa-rugosa, elevación plana, margen filiforme, superficie filamentosa-polvurenta de color blanco a rosado, reverso blanco.

Características microscópicas

Se encontraron hifas ramificadas y septadas. Se observaron varios conidios inmaduros de entre 3-7 μm de largo, hialinos, de paredes lisas, aseptados, ápice redondeado, base redonda con un hilo prominente.

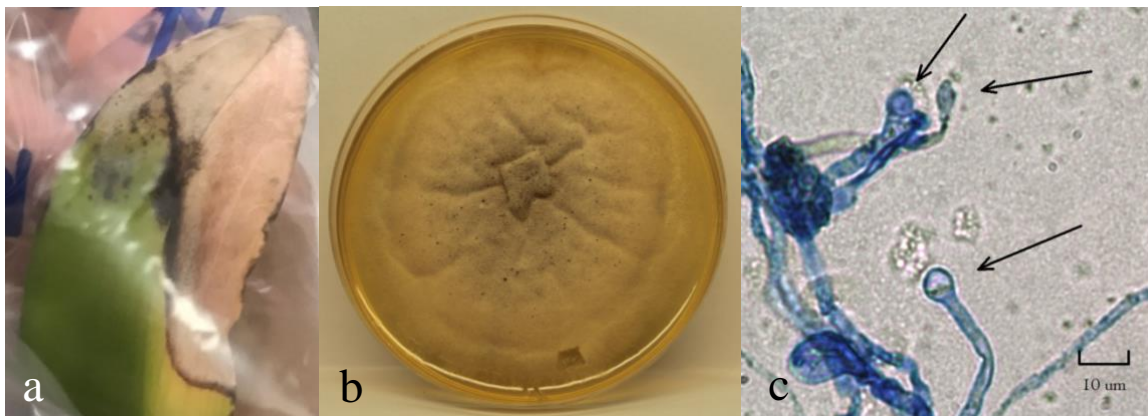


Figura 8. Morfología de *Colletotrichum sp.* a. Morfotipo de lesión 4: Mancha en la punta de la hoja sin anillos y blanquecina, b. Colonia de *Colletotrichum sp.* Hongo obtenido de lesión de hoja de *Prostechea sp.*, c. Microscopía 40X de *Colletotrichum sp.*.

5.4.5 GÉNERO: *Coprinellus*

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Agaricomycetes

Orden: Agaricales

Familia: Psathyrellaceae

5.4.5.1 *Coprinellus disseminatus* 6559

Características macroscópicas

Colonia en PDA presenta forma filamentosa elevada, margen filiforme, superficie filamentosa de color blanco, reverso blanco.

Características microscópicas

Se encontraron hifas ramificadas septadas. Algunas hifas presentaron hinchazones que variaban mucho en tamaño. No se encontraron más estructuras microscópicas.

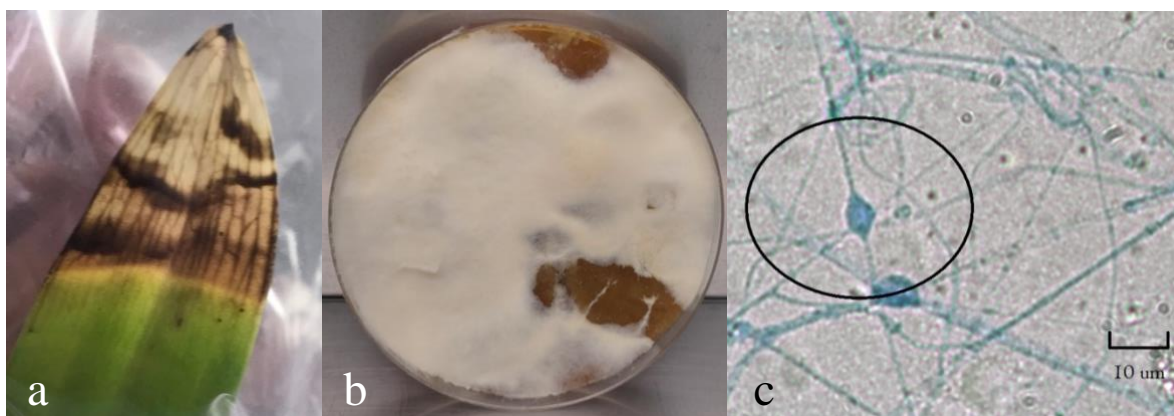


Figura 9. Morfología de *Coprinellus disseminatus*. a. Morfotipo de lesión 2: Mancha marrón negruzca con anillos y manchas blancas en la punta de la hoja, b. Colonia de *Coprinellus disseminatus*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Dracula sp*, c. Microscopía 40X de *Coprinellus disseminatus*.

5.4.5.2 *Coprinellus xanthothrix* 11718

Características macroscópicas

Colonia en PDA presenta forma filamentosa elevada, margen entero, superficie algodonosa de color blanco, reverso blanco.

Características microscópicas

Se encontraron hifas ramificadas y septadas. Algunas hifas presentaron hinchazones que variaban mucho en tamaño. No se encontraron más estructuras microscópicas.

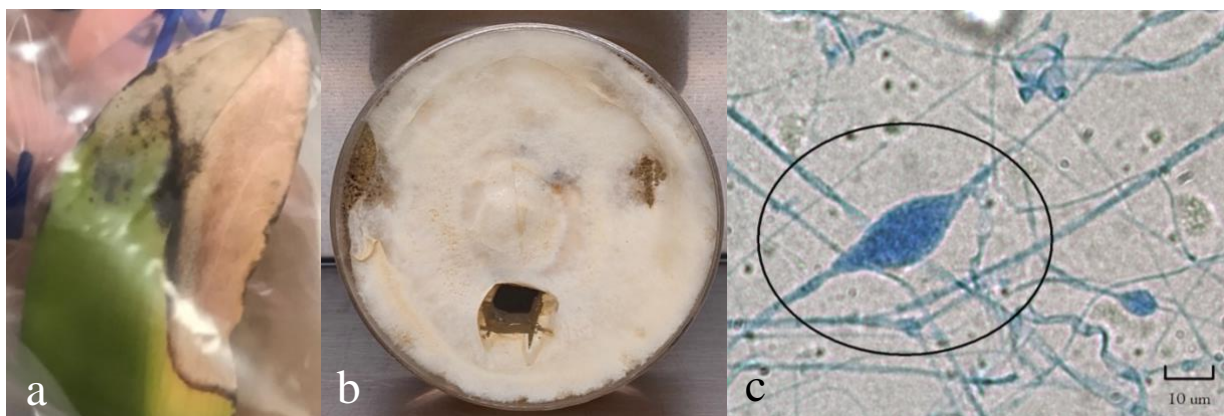


Figura 10. Morfología de *Coprinellus xanthothrix*. a. Morfotipo de lesión 4: Mancha en la punta de la hoja sin anillos y blanquecina, b. Colonia de *Coprinellus xanthothrix*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Masdevallia sp.*, c. Microscopía 40X de *Coprinellus xanthothrix*.

5.4.6 GÉNERO: *Curvularia*

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Pleosporales

Familia: Pleosporaceae

5.4.6.1 *Curvularia coatesiae* 13064

Características macroscópicas

Colonia en PDA presenta forma irregular, margen filamentoso, superficie lisa, seca de color blanco con muchos puntos de distintos colores, puntos negros en el reverso.

Características microscópicas

Se observaron hifas oscuras ramificadas y septadas. Se observaron conidióforos erectos. Los conidios distoseptados de aproximadamente 10 um de largo fueron elipsoidales a obovoides, asimétricos, hila no protuberante, engrosada y oscurecida.

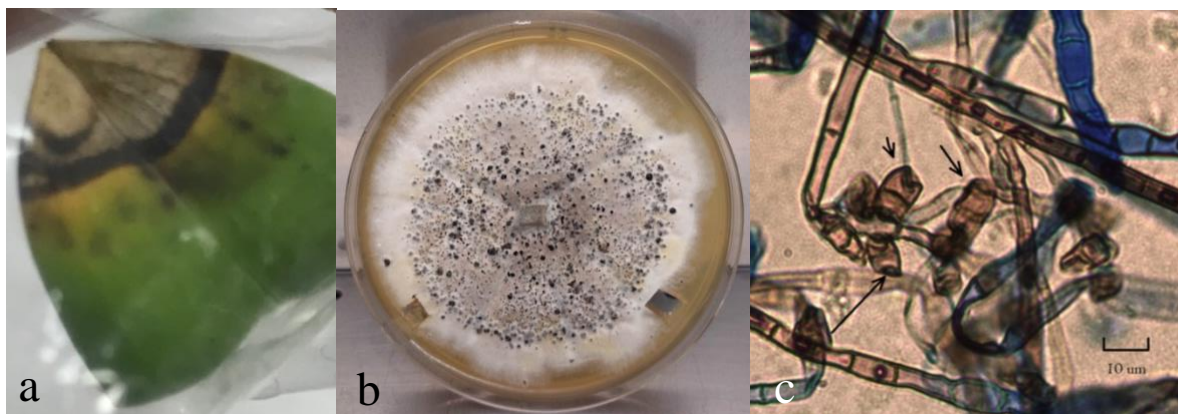


Figura 11. Morfología de *Curvularia coatesiae*. a. Morfotipo de lesión 6: Mancha en la punta de la hoja con un solo anillo negro, b. Colonia de *Curvularia coatesiae*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Trichopilia sp.*, c. Microscopía 40X de *Curvularia coatesiae*.

5.4.7 GÉNERO: *Didymella*

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Pleosporales

Familia: Didymellaceae

5.6.7.1 *Didymella keratinophila* 26517

Características macroscópicas

Colonia en PDA presenta forma filamentosa, margen filiforme, superficie plana y pulverenta de color negro – grisáceo. El color de la colonia joven es blanca y al envejecer se torna marrón-rojizo, el reverso es negro.

Características microscópicas

Se encontraron hifas marrón pálido, de paredes lisas, septadas. Se observaron conidios de entre 4-5 µm de largo, aseptados, hialinos, de paredes lisas, ovoides a cilíndricos.

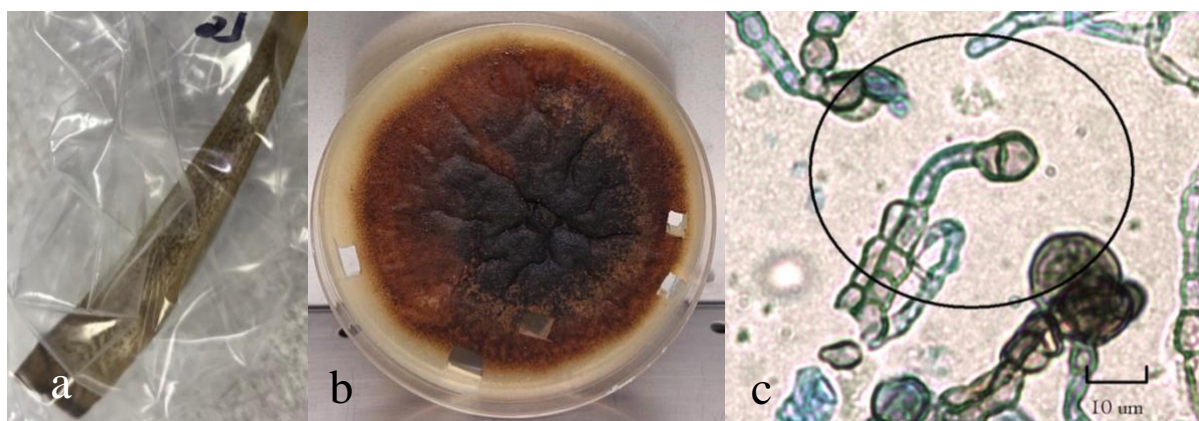


Figura 12. Morfología de *Didymella keratinophila*. a. Morfotipo de lesión 18: Hoja esporada, b. Colonia de *Didymella keratinophila*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Dracula sp*, c. Microscopía 40X de *Didymella keratinophila*.

5.4.8 GÉNERO: *Hypomyces*

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocreaceae

5.4.8.1 *Hypomyces sp.* 12944

Características macroscópicas

Colonia en PDA presenta forma irregular-rizoide, margen irregular, superficie rugosa de color blanco-habano, con puntos blancos y el reverso es negro.

Características microscópicas

No se evidenciaron hifas. Se observaron numerosos conidios solitarios, aseptados, ovoides de aproximadamente 2 µm.

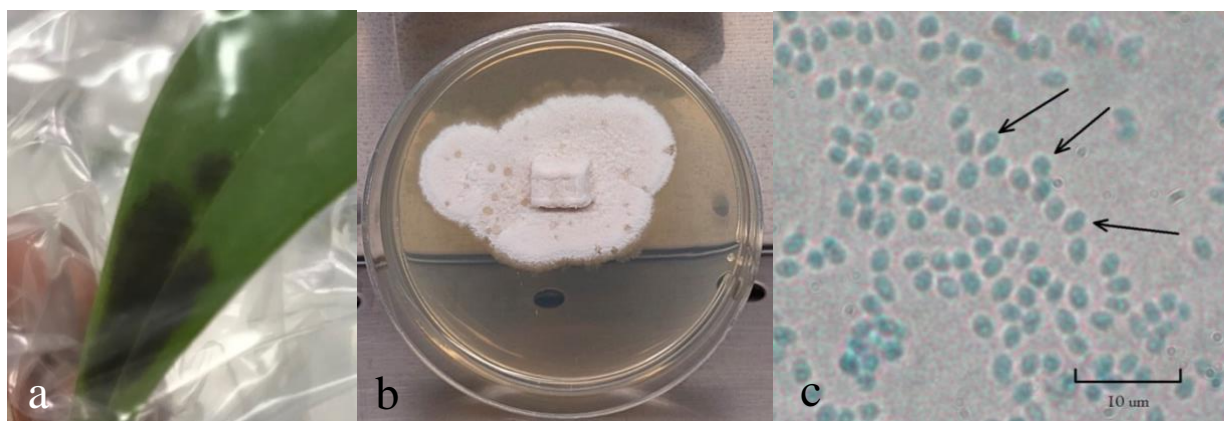


Figura 13. Morfología de *Hypomyces sp.* a. Morfotipo de lesión 13: Mancha negra opaca cerca del peciolo, b. Colonia de *Hypomyces sp.*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Masdevallia platyglossa*, c. Microscopía 100X de *Hypomyces sp.*.

5.4.9 GÉNERO: *Meira*

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Exobasidiomycetes

Orden: Exobasidiales

Familia: Brachybasidiaceae

5.4.9.1 *Meira miltonrushii* 7554

Características macroscópicas

Colonia en Sabouraud presenta forma irregular-rizoide, margen ondulado, superficie rugosa, mucosa y húmeda de color crema-naranjado, de apariencia venosa con muchas ramificaciones, el reverso es de color naranja.

Características microscópicas

No se encontraron hifas. Se observaron numerosas blastoconidias oscuras, aceptadas, aciculares de 2 x 0.5 μm .

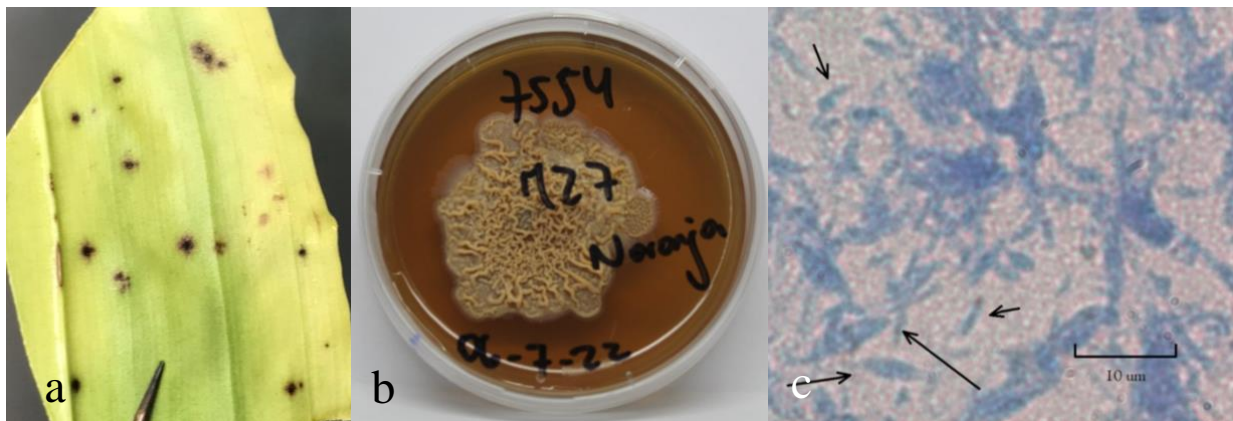


Figura 14. Morfología de *Meira miltonrushii*. a. Morfotipo de lesión 27: Puntos negros sin borde definido en el envés, b. Colonia de *Meira miltonrushii*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Stanhopea sp.*, c. Microscopía 100X de *Meira miltonrushii*.

5.4.10 GÉNERO: *Mycosphaerella*

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Mycosphaerellales

Familia: Mycosphaerellaceae

5.4.10.1 *Mycosphaerella coacervata* 26440

Características macroscópicas

Colonia en Sabouraud presenta forma irregular-rizoide, margen filiforme, elevación plana y radiada, superficie rugosa-polvorenta de color blanco con tonalidades marrones y grises desde el centro hacia el borde. El reverso es de color negro.

Características microscópicas

Se encontraron hifas ramificadas delgadas y sin septos. Se observaron estructuras parecidas a picnidios de entre 150-200 µm, con centro amarillento y borde rugoso que se tiñieron con azul de lactofenol.

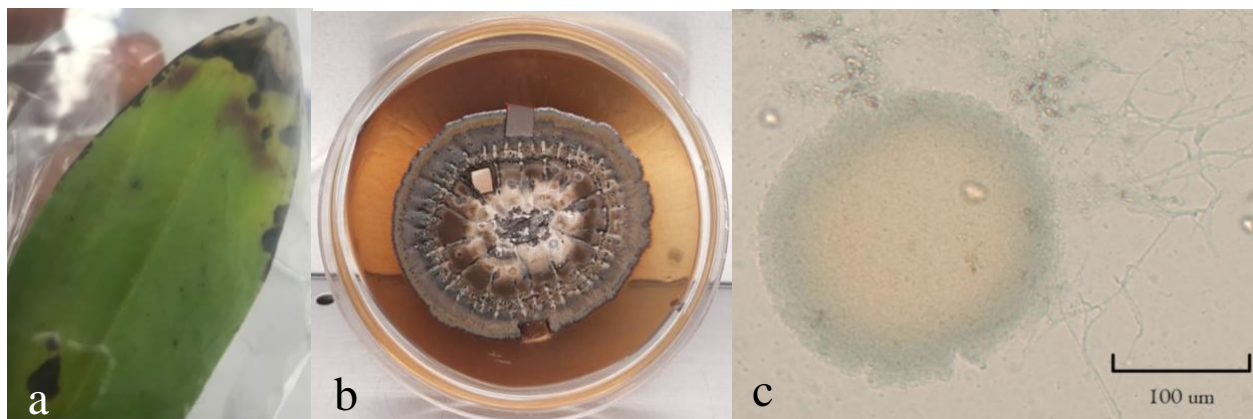


Figura 15. Morfología de *Mycosphaerella coacervata*. a. Morfotipo de lesión 7: Manchas negras en la punta, b. Colonia de *Mycosphaerella coacervata*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Dracula robledorum*, c. Microscopía 10X de *Mycosphaerella coacervata*.

5.4.11 GÉNERO: *Parasola*

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Agaricomycetes

Orden: Agaricales

Familia: Psathyrellaceae

5.6.11.1 *Parasola lactea* 69600

Características macroscópicas

Colonia en PDA presenta forma circular, margen filiforme, elevación plana, superficie lisa de color blanco, el reverso es de color blanco amarillento.

Características microscópicas

Se encontraron hifas septadas y ramificadas. No se encontraron estructuras reproductivas.

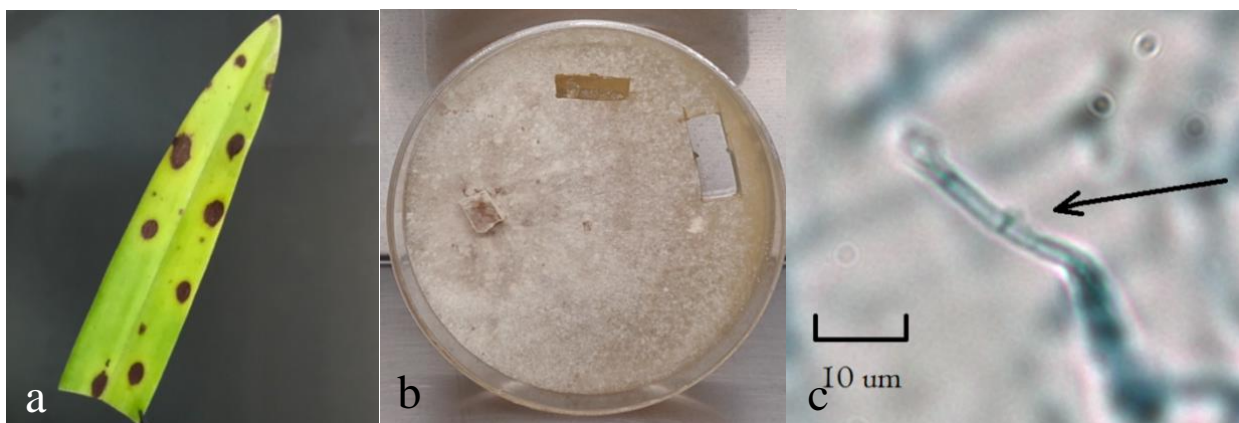


Figura 16. Morfología de *Parasola lactea*. a. Morfotipo de lesión 24: Machas negras redondeadas pequeñas, b. Colonia de *Parasola lactea*. Hongo obtenido de lesión de hoja de especie indeterminada, c. Microscopía 40X de *Parasola lactea*.

5.4.12 GÉNERO: *Phaeophleospora*

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Mycosphaerellales

Familia: Mycosphaerellaceae

5.4.12.1 *Phaeophleospora pteridivora* 6451

Características macroscópicas

Colonia en PDA presenta forma circular, margen filiforme, elevación umbonada, superficie aterciopelada-pulvurenta de color blanco en el centro y gris hacia los bordes, el reverso es de color negro.

Características microscópicas

Se encontraron hifas septadas y ramificadas. Se observó además que las hifas presentaban surcos e hinchazones. No se encontraron estructuras reproductivas.

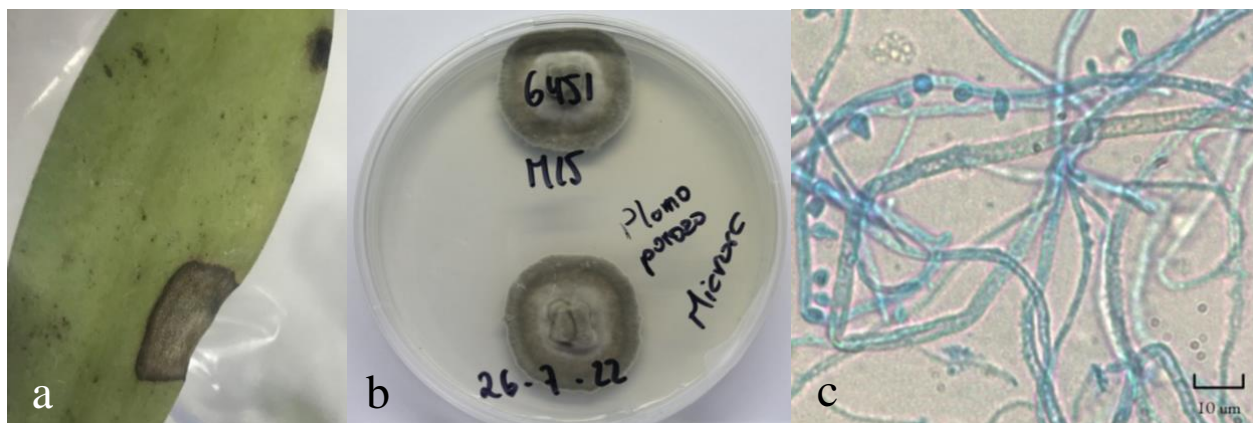


Figura 17. Morfología de *Phaeophleospora pteridivora*. a. Morfotipo de lesión 15: Mancha redondeada con interior blanco y borde negro, b. Colonia de *Phaeophleospora pteridivora*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Masdevallia sp.*, c. Microscopía 40X de *Phaeophleospora pteridivora*.

5.4.13 GÉNERO: *Neoschizothecium*

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sorfariomycetes

Orden: Sordariales

Familia: Podosporaceae

5.4.13.1 *Neoschizothecium glutinans* 14296

Características macroscópicas

Colonia en PDA presenta forma filamentosa, margen filiforme, elevación plana, superficie aterciopelada-polvorientada de color grisáceo-verdoso, el reverso es de color negro.

Características microscópicas

Se observaron hifas septadas y ramificadas. Se encontraron varios conidióforos con conidios que medían entre 5-10 μm, aceptados, redondeados, hialinos, de paredes lisas.

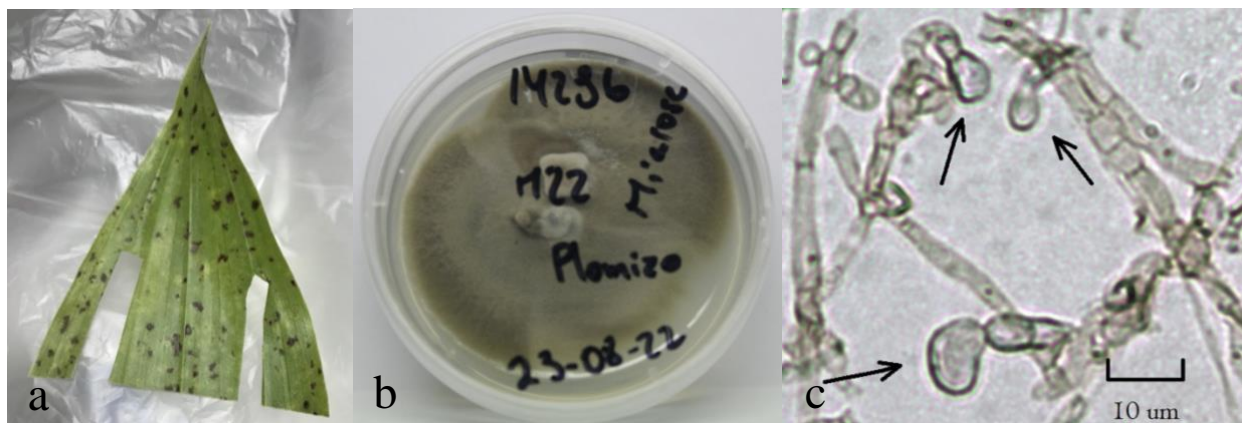


Figura 18. Morfología de *Neoschizothecium glutinans*. a. Morfotipo de lesión 22: Numerosas manchas negras dispersas por toda la hoja., b. Colonia de *Neoschizothecium glutinans*. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Miltoniopsis sp*, c. Microscopía 40X de *Neoschizothecium glutinans*.

5.4.14 SUBCLASE: *Sordariomycetidae*

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

5.6.14.1 *Sordariomycetidae sp.* (12655)

Características macroscópicas

Colonia en PDA presenta forma de espiral-rizoide, margen entero, elevación plana, superficie mucosa, arrugada y brillante de color habano. El reverso es de color habano.

Características microscópicas

No se encontraron ni hifas ni estructuras reproductivas. Se encontró una estructura de aproximadamente 2 μm pero no se pudo determinar qué es.

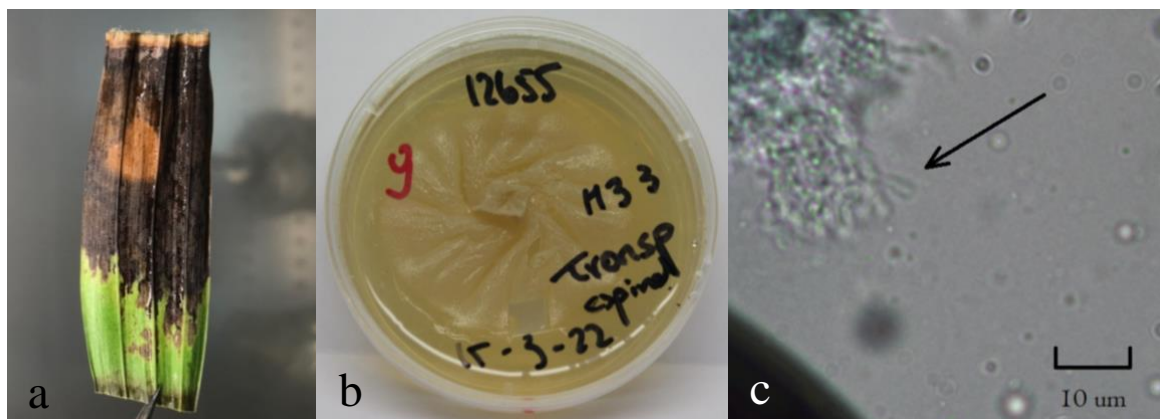


Figura 19. Morfología de Sordariomycetidae sp.. a. Morfotipo de lesión 33: Mancha negra con interior naranja., b. Colonia de Sordariomycetidae sp.. Hongo obtenido de lesión de hoja de especie *Schlimmia sp*, c. Microscopía 40X de Sordariomycetidae sp..

5.4.15 GÉNERO: *Xylaria*

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Xylariales

Familia: Xylariaceae

5.6.15.1 *Xylaria sp.* 14296

Características macroscópicas

Colonia en PDA presenta forma filamentosa, margen filiforme, forma cordones hifales, superficie de color blanco que al envejecerse torna blanca y negra. El reverso es de color blanco y negro.

Características microscópicas

Se encontraron hifas septadas y ramificadas. No se encontraron estructuras reproductivas.

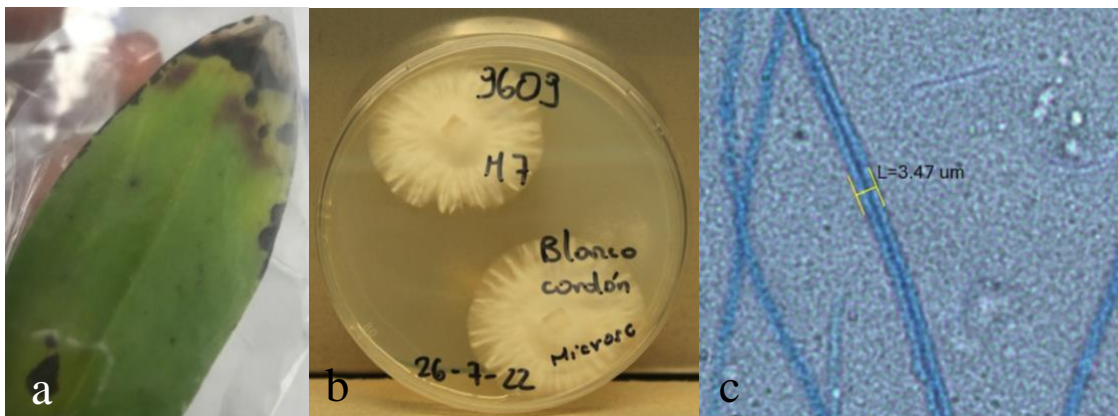


Figura 20. Morfología de *Xylaria* sp.. a. Morfotipo de lesión 7: Manchas negras en la punta., b. Colonia de *Xylaria* sp.. Hongo obtenido de lesión de hoja de *Masdevallia angulata* c. Microscopía 40X de *Xylaria* sp..

5.5. DIVERSIDAD FÚNGICA EN LAS MUESTRAS DE HOJAS DEL JBQ

5.5.1 Hongos encontrados según sus orquídeas hospedadoras

Tabla 3. Hongos encontrados y sus orquídeas hospedadoras

Género y/o especie de hongo	Género y/o especie de planta
<i>Acremonium charticola</i>	<i>Dendrochilum cobbianum</i>
<i>Acremonium sordidulum</i>	<i>Stanhopea</i> sp.
<i>Cercospora</i> sp.	Indeterminada
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	<i>Trichopilia</i> sp.
<i>Colletotrichum boninense</i>	<i>Dracula</i> sp.
<i>Colletotrichum boninense</i>	Indeterminada
<i>Colletotrichum boninense</i>	<i>Dracula fuligifera</i>
<i>Colletotrichum boninense</i>	<i>Dracula amaliae</i>
<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Prostechea</i> sp.
<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Dracula chestertonii</i>
<i>Coprinellus aff. xanthothrix</i>	<i>Masdevallia</i> sp.

Género y/o especie de hongo	Género y/o especie de planta
<i>Coprinellus disseminatus</i>	<i>Dracula sp.</i>
<i>Coprinellus disseminatus</i>	<i>Stanhopea sp.</i>
<i>Coprinellus disseminatus</i>	<i>Masdevallia sertula</i>
<i>Curvularia coatesiae</i>	<i>Trichopilia sp.</i>
<i>Didymella keratinophila</i>	<i>Dracula sp.</i>
<i>Hypomices sp.</i>	<i>Masdevallia platyglossa</i>
<i>Meira miltonrushii</i>	<i>Stanhopea sp.</i>
<i>Mycosphaerella coacervata</i>	<i>Dracula robledorum</i>
<i>Parasola lactea</i>	<i>Dracula sp.</i>
<i>Parasola lactea</i>	Indeterminada
<i>Phaeophleospora pteridivora</i>	<i>Masdevallia sp.</i>
<i>Phaeophleospora pteridivora</i>	<i>Dracula sp.</i>
<i>Phaeophleospora pteridivora</i>	<i>Dracula sp.</i>
<i>Neoschizothecium glutinans</i>	<i>Miltoniopsis sp.</i>
<i>Sordariomycetidae sp.</i>	<i>Stanhopea sp.</i>
<i>Sordariomycetidae sp.</i>	<i>Stanhopea florida</i>
<i>Sordariomycetidae sp.</i>	<i>Schlimmia sp.</i>
<i>Xylaria sp.</i>	<i>Dracula chestertonii</i>
<i>Xylaria sp.</i>	<i>Masdevallia angulata</i>
<i>Xylaria sp.</i>	<i>Dracula navarroorum</i>
<i>Xylaria sp.</i>	<i>Dracula radiosa</i>

5.5.2 Diversidad funcional de los hongos encontrados

Tabla 4. Diversidad funcional de los hongos

Género y/o especie de hongo	Tipo de hongo
<i>Acremonium charticola</i>	Simbionte endófito en orquídeas (Liu et al., 2022)
<i>Acremonium sordidulum</i>	Micoparásito de <i>Colletotrichum</i> (Singh et al., 1978)
<i>Cercospora sp.</i>	Patógeno en orquídeas (McMillan et al., 2008)
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	Simbionte endófito en orquídeas (Mangunwardoyo et al., 2012)
<i>Colletotrichum boninense</i>	Patógeno en orquídeas (Chowdappa et al., 2012)
<i>Colletotrichum sp.</i>	Patógeno de plantas (Chowdappa et al., 2012)
<i>Coprinellus aff. Xanthothrix</i>	Micorrizico orquidiode (Yagame et al., 2018)
<i>Coprinellus disseminatus</i>	Micorrizico orquidiode (Yagame et al., 2018)
<i>Curvularia coatesiae</i>	Desconocido. Este es el primer registro en orquídeas. (Tan, Crous & Shivas, 2018)
<i>Didymella keratinophila</i>	Asociado a humanos (Valenzuela, 2018)
<i>Hypomices sp.</i>	Micoparásito obligado (Thormann, Osis & Richards, 2006)
<i>Meira miltonrushii</i>	Asociado a plantas y ácaros. Primer reporte de Sudamérica y orquídeas (Li et al., 2022)
<i>Mycosphaerella coacervata</i>	Endófito. Primer reporte en orquídeas (Hodkinson, 2019)
<i>Parasola lactea</i>	Saprófito (Readhead et al., 2001)
<i>Phaeophleospora pteridivora</i>	Patógeno de plantas. Primer reporte en orquídeas (Guatimosim et al., 2016)
<i>Neoschizothecium glutinans</i>	Coprófilo (Mungai et al., 2012)
<i>Sordariomycetidae sp.</i>	-
<i>Xylaria sp.</i>	Simbionte endófito en orquídeas (Ratnaweera et al., 2014)

6. DISCUSIÓN

Diversidad de hongos en las hojas de orquídeas del JBQ

Se encontró una gran diversidad fúngica en las hojas de orquídeas del JBQ. Todos los hongos encontrados pertenecieron a especies o géneros dentro de las divisiones Ascomycota y Basidiomycota. Muchos de estos hongos no están necesariamente relacionados a orquídeas, ya que no cumplen su ciclo de vida directamente en las plantas, algunos lo hacen en animales o insectos que están relacionados a las orquídeas. Se halló individuos como *Curvularia coatesiae*, una especie recientemente descrita, en la que no está definido su ciclo de vida ni las relaciones que presenta con otros organismos. *C. coatesiae* se aisló por primera vez en el fruto descompuesto de *Litchi chinensis* una fruta tropical, en Australia. Sin embargo, *Curvularia* es un género rico en especies de patógenos y saprófitos asociados con plantas en todo el mundo. También se han reportado especies en sustratos como el aire, ambientes acuáticos y suelo, por tanto no se descarta que este hongo se encuentre relacionado a las orquídeas (Tan, Crous & Shivas, 2018). Muchos de los hongos encontrados en este estudio han sido reportados anteriormente en otros hospederos como plantas y animales de otros continentes, es la primera vez que algunos de ellos son reportados en Ecuador y en orquídeas. No se llegó a nivel de especies o géneros en muchos de los individuos analizados, es de esperarse que existan nuevas especies fúngicas dentro de los hongos caracterizados en este estudio.

Diversidad funcional de los hongos encontrados en las hojas de orquídeas

Los hongos que fueron aislados de hojas de orquídeas del JBQ presentaron una gran diversidad en el tipo de interacciones que cumplen con otros organismos. Se hallaron micoparásitos, coprófilos, patógenos de humanos, saprófitos, simbioses endófitos, micorrízicos y patógenos de plantas.

Los micoparásitos obligados *Hypomyces sp.* y *Acremonium sordidulum* son hongos que como lo dice su nombre parasitan a individuos fúngicos, en este caso *A. sordidulum* es parásito de *Colletotrichum sp.* (Thormann, Osis & Richards, 2006; Singh et al., 1978). *Neoschizothecium glutinans* un hongo relacionado a heces de animales se aisló por primera

vez en Kenia. En este caso de estudio, este hongo pudo haber estado presente por contaminación o estaba en la hoja al momento de tomar la muestra (Mungai et al., 2012). Por otro lado, *Didymella keratinophila* un hongo patógeno de humanos causante de infecciones en la piel, pudo estar presente en las orquídeas debido a una contaminación o se encontraba en las hojas por la manipulación de las plantas (Valenzuela, 2018).

Dentro de los hongos relacionados a plantas *Parasola lactea* un hongo saprófito, es decir que degrada material vegetal muerto, pudo haber estado presente en las hojas de las orquídeas como hongo oportunista o en forma de espora (Readhead et al., 2001). Dentro de los simbiontes endófitos se halló a *Acremonium charticola* un hongo que solo se ha aislado en Asia antes de este estudio y *Cladosporium sphaerospermum*, ambos reportados anteriormente en orquídeas (Liu et al., 2022; Manguwardoyo et al., 2012). *Meira miltonrushii* un hongo que se cree es simbiote de plantas ha sido encontrado anteriormente en hojas de *Magnolia grandiflora*. Se piensa que este género de hongos puede estar relacionado tanto a plantas como a sus organismos asociados como los ácaros (Rush & Aime, 2013; Li et al., 2022). *Mycosphaerella coacervata* y *Xylaria sp.* se han reportado como simbiontes endófitos de plantas, esta es la primera vez que se los encuentra en orquídeas (Hodkinson, 2019; Ratnaweera et al., 2014). Dentro del grupo de hongos micorrícicos orquideóides se halló a *Coprynellus xanthothrix* y *Coprynellus disseminatus* (Yagame et al., 2018).

Los hongos encontrados que realmente pueden generar daños en las hojas de las orquídeas son *Cercospora sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Colletotrichum boninense* y *Phaelospora pteridivora*. Las especies del género *Cercospora* ya han sido reportadas como causantes de enfermedades foliares en orquídeas con anterioridad, como la enfermedad de la mancha foliar en *Dendrobium spp.*, reportada en la mayoría de zonas tropicales del mundo donde se cultivan (McMillan et al., 2008). *Colletotrichum boninense* es uno de los fitopatógenos más comunes causantes de antracnosis en zonas templadas, subtropicales y tropicales, con un rango de hospederos extremadamente amplio incluyendo cultivos hortícolas, forrajeros, frutales y ornamentales (Chowdappa et al., 2012). *Phaelospora pteridivora* es un fitopatógeno que ha sido reportado como causante de enfermedades en plantas tropicales como *Eugenia uniflora* y *Serpocaulon triseriale*, este es el primer reporte en orquídeas (Guatimosim et al., 2016).

Elusividad en la descripción de individuos del reino fungi

Los caracteres morfológicos de los hongos son a menudo elusivos, subjetivos y su interpretación depende del observador, por lo que a menudo son inadecuados. Estos pueden verse influidos por las condiciones ambientales y de cultivo. Por tanto, utilizar solo el análisis morfológico para demarcar los límites de las especies puede conducir a errores de identificación. Los retos dentro de la descripción de los individuos del reino fungi son importantes, ya que muchas especies son crípticas, es decir, morfológicamente indistinguibles (Chethana, 2021). Es por esto que en este estudio los caracteres morfológicos no fueron decisivos al momento de identificar a los individuos aislados de las hojas de orquídeas, fue de gran y mayor importancia el uso de técnicas moleculares para detallar los taxones. Por otro lado, es necesario reportar y caracterizar morfológicamente a los hongos generando así mas información comparable y mayor conocimiento sobre cada individuo.

Posibles soluciones a lesiones de hojas de orquídeas del JBQ

Los individuos micoparásitos encontrados en las orquídeas como *Hypomices sp.* y *Acremonium sordidulum* pueden utilizarse como control biológico frente a los fitopatógenos como *Colletotrichum sp.* posible causante de las enfermedades en las orquídeas del JBQ. Es necesario analizar la posibilidad de su uso como biocontrol de estos hongos. El género *Cercospora* siempre ha generado problemas para los cultivadores de orquídeas. Se ha probado anteriormente que la acción de pycadostrobin + boscalid F 38%WG a 340,2 g por 379 L (0,75 lb por 100 gal) de agua o pyraclostrobin 20%WG a 226,8 g por 379 L (0,50 lb por 100 gal) de agua son efectivos contra *Cercospora* en el género *Dendrobium* (McMillan et al., 2008).

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Existe una amplia diversidad de hongos en las hojas de orquídeas del JBQ. Este estudio es de gran importancia para entender la diversidad fúngica presente en las orquídeas de Ecuador. Es de esperarse que existan nuevas especies por describir dentro de los hongos encontrados.

Las técnicas y herramientas moleculares y morfológicas fueron de gran importancia para la determinación taxonómica de los individuos extraídos de las orquídeas del JBQ. No se logró identificar a todos los individuos hasta nivel de especie y/o género, por lo que se sugiere utilizar marcadores moleculares adicionales en próximas investigaciones, así como técnicas microscópicas más precisas para lograr mejores identificaciones.

A pesar de que este estudio se centró en encontrar posibles patógenos de orquídeas, la diversidad fúngica fue muy variada en las funciones que cumplen los hongos dentro y fuera de las orquídeas. Siendo los fitopatógenos encontrados muy escasos en relación al total de hongos identificados.

El mantenimiento correcto de jardines botánicos es de mucha importancia. El estudio permitió identificar algunos de los responsables fúngicos que pueden causar el deterioro de las orquídeas en el JBQ. En próximos estudios se recomienda realizar postulados de Koch para verificar si estos patógenos son los verdaderos responsables de las enfermedades en las orquídeas. Hay que recalcar que con la información recopilada en este estudio se puede mejorar los tratamientos y técnicas antifúngicas para controlar las enfermedades en las orquídeas.

Los hallazgos de este estudio son de gran importancia para la conservación y mantenimiento de la diversidad de orquídeas ecuatorianas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arias Cifuentes, E. L., & Piñeros Espinosa, P. A. (2008). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestra de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde. Universidad Javeriana de Bogotá.
- Aslam, S., Tahir, A., Aslam, M. F., Alam, M. W., Shedayi, A. A., & Sadia, S. (2017). Recent advances in molecular techniques for the identification of phytopathogenic fungi—a mini review. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 493-504.
- Blackwell, M., Hibbett, D. S., Taylor, J. W., & Spatafora, J. W. (2006). Redes de coordinación de investigación: una filogenia para los hongos del reino (Hypha profunda). *Mycologia*, 98(6), 829-837.
- Bhunjun, C. S., Niskanen, T., Suwannarach, N., Wannathes, N., Chen, Y. J., McKenzie, E. H., ... & Lumyong, S. (2022). The numbers of fungi: are the most speciose genera truly diverse?. *Fungal Diversity*, 1-76.
- Chen, G., & Sun, W. (2018). The role of botanical gardens in scientific research, conservation, and citizen science. *Plant diversity*, 40(4), 181-188.
- Chethana, K. W., Manawasinghe, I. S., Hurdeal, V. G., Bhunjun, C. S., Appadoo, M. A., Gentekaki, E., ... & Hyde, K. D. (2021). What are fungal species and how to delineate them?. *Fungal Diversity*, 109(1), 1-25.
- Chowdappa, P., Chethana, C. S., Bharghavi, R., Sandhya, H., & Pant, R. P. (2012). Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sac. Isolates causing anthracnose of orchids in India. *Biotechnol. Bioinf. Bioeng*, 2(1), 567-572.
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ... & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430.

- Djordjević, V., & Tsiftsis, S. (2020). The role of ecological factors in distribution and abundance of terrestrial orchids. *Orchids phytochemistry, biology and horticulture, reference series in phytochemistry. Fundamentals and applications*, 1-71.
- Domingues, S. C. O., Oliveira, L. C. A., Rocha, K. S. M., Colpo, L. A., Carvalho, M. A. C., Matos, D. L., & Karsburg, I. V. (2020). Pathogens associated with diseases in native orchids of the region of Southern Amazonia. *Scientific Electronic Archives*, 13(4), 23-27.
- Endara, L., Hirtz, A., Jost, L., Reynolds, A., Neubig, K., Hagsater, E., Philip, C., Simpson, N., Cornejo, X. 2017. En: León-Yáñez, S., R. Valencia, N. Pitmam, L. Endara, C. Ulloa y H. Navarrete (Eds). *Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador*. Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito. <<https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/ListaEspeciesPorFamilia/500330>>, acceso miércoles, 22 de febrero de 2023.
- Fernández-Herrera, E., Ramírez-Bustos, I. I., Moreno-Salazar, S. F., Ochoa-Meza, A., & Villar-Luna, E. (2020). Principales enfermedades fúngicas de las orquídeas (Orchidaceae). *Agro Productividad*, 13(1).
- Guatimosim, E., Schwartsburd, P. B., Barreto, R. W., & Crous, P. W. (2016). Novel fungi from an ancient niche: cercosporoid and related sexual morphs on ferns. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 37(1), 106-141.
- Givnish, T. J., Spalink, D., Ames, M., Lyon, S. P., Hunter, S. J., Zuluaga, A.,...Cameron, K. M. (2016). Orchid historical biogeography, diversification, Antarctica and the paradox of orchid dispersal. *Journal of Biogeography* 43, 1905-1916
- Han, K. S., Park, J. H., Back, C. G., & Park, M. J. (2015). First report of *Fusarium subglutinans* causing leaf spot disease on *Cymbidium* orchids in Korea. *Mycobiology*, 43(3), 343-346.8
- Hew, C. S., & Yong, J. W. (2004). *Physiology Of Tropical Orchids In Relation To The Industry*, The World Scientific Publishing Company.

- Hodkinson, T. R., Doohan, F. M., Saunders, M. J., & Murphy, B. R. (Eds.). (2019). *Endophytes for a growing world*. Cambridge University Press.
- Hua, L., Yong, Ch., Zhanquan, Z., Boqiang, L., Guozheng, Q. & Shiping, T. (2018). Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Quality and Safety* 3, 111-119.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., & Donoghue, M. J. (2008). *Plant Systematics A Phylogenetic Approach* (Third ed.). Sinauer Associates, Inc.
- Li, Y. Y., Wang, M. M., Groenewald, M., Li, A. H., Guo, Y. T., Wu, F., ... & Begerow, D. (2022). Proposal of Two New Combinations, Twenty New Species, Four New Genera, One New Family, and One New Order for the Anamorphic Basidiomycetous Yeast Species in Ustilaginomycotina. *Frontiers in Microbiology*, 12, 777338.
- Lins, S. R., & Coelho, R. S. (2004). Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. *Fitopatologia Brasileira*, 29, 332-335.
- Liu, N., Jacquemyn, H., Liu, Q., Shicheng, S., Ding, G., & Xing, X. (2022). Effects of a dark septate fungal endophyte on the growth and physiological response of seedlings to drought in an epiphytic orchid. *Frontiers in Microbiology*, 2590.
- Mangunwardoyo, W., Suciati, S., & Gandjar, I. (2012). Frequency of endophytic fungi isolated from *Dendrobium crumenatum* Sw.(Pigeon orchid) and antimicrobial activity. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 13(1).
- Marin-Felix, Y., Groenewald, J. Z., Cai, L., Chen, Q., Marincowitz, S., Barnes, I., ... & Crous, P. W. (2017). Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. *Studies in mycology*, 86, 99-216.
- McMillan Jr, R. T., Palmateer, A. J., & Vendrame, W. A. (2008). *Cercospora* leaf spot caused by *Cercospora dendrobii* on *Dendrobium antennatum* Lindl. And its control. In *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* (Vol. 121, pp. 353-355).

- Mungai, P. G., Njogu, J. G., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2012). Studies of coprophilous ascomycetes in Kenya: Coprophilous Schizothecium from wildlife dung. *Curr Res Environ Appl Mycol*, 2, 84-97.
- Ordoñez, M. E. (12 de Junio de 2020). *Hongos plantas 2020 [Diapositivas de PowerPoint]*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Ratnaweera, P. B., Williams, D. E., de Silva, E. D., Wijesundera, R. L., Dalisay, D. S., & Andersen, R. J. (2014). Helvolic acid, an antibacterial norriterpenoid from a fungal endophyte, *Xylaria* sp. Of orchid *Anoectochilus setaceus* endemic to Sri Lanka. *Mycology*, 5(1), 23-28.
- Redhead, S. A., Vilgalys, R., Moncalvo, J. M., Johnson, J., & Hopple Jr, J. S. (2001). *Coprinus* Pers. And the disposition of *Coprinus* species sensu lato. *Taxon*, 50(1), 203-241.
- Rush, T. A., & Aime, M. C. (2013). The genus *Meira*: phylogenetic placement and description of a new species. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103, 1097-1106.
- Salvatore, M. M., & Andolfi, A. (2021). Phytopathogenic fungi and toxicity. *Toxins*, 13(10), 689.
- Saur, I. M., & Hüchelhoven, R. (2021). Recognition and defence of plant-infecting fungal pathogens. *Journal of Plant Physiology*, 256, 153324.
- Sinchire, R. N. C. (2010). Identificación de hongos parásitos en 14 especies del género *Dracula* sembradas bajo invernadero (Disertación de pregrado), Universidad Técnica Particular de Loja, Loja.
- Singh, U. P., Vishwakarma, S. N., & Basuchaudhury, K. C. (1978). *Acremonium sordidulum* mycoparasitic on *Colletotrichum dematium* f. *truncate* in India. *Mycologia*, 70(2), 453-455.

- Srivastava, S., Kadooka, C., & Uchida, J. Y. (2018). Fusarium species as pathogen on orchids. *Microbiological research*, 207, 188-195.
- Tan, Y. P., Crous, P. W., & Shivas, R. G. (2018). Cryptic species of *Curvularia* in the culture collection of the Queensland Plant Pathology Herbarium. *MycKeys*, (35), 1.
- Thormann, M. N., Osis, M., & Richards, B. (2006). North American Mycological Association–Edmonton Mycological Society Foray report.
- Thomas, B., Murphy, D. J., & Murray, B. G. (2017). Encyclopedia of applied plant sciences.
- Toapanta Albán, C. E. (2014). *Diversidad del orden Polyporales en un área de bosque intervenido y un área de bosque primario en la Estación Científica Yasuní* (Bachelor's thesis, PUCE).
- Uchida, J. Y. & Aragaki, M. 1991. Phytophthora diseases of orchids in Hawaii. Research extension series 129. College of Tropical Agriculture and Human Resources. University of Hawaii, Honolulu, Hawaii.
- Valenzuela-Lopez, N., Cano-Lira, J. F., Guarro, J., Sutton, D. A., Wiederhold, N., Crous, P. W., & Stchigel, A. M. (2018). Coelomycetous Dothideomycetes with emphasis on the families Cucurbitariaceae and Didymellaceae. *Studies in mycology*, 90(1), 1-69.
- Yagame, T., Funabiki, E., Yukawa, T., & Nagasawa, E. (2018). Identification of mycobionts in an achlorophyllous orchid, *Cremastra aphylla* (Orchidaceae), based on molecular analysis and basidioma morphology. *Mycoscience*, 59(1), 18-23.
- Zhang, S-B., Yang, Y., Li, J., Qin, J., Zhang, W., Huang, W. & Hu, H. (2018). Physiological diversity of orchids. *Plant Diversity* 40(4), 196-208.

9. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN

Protocolo de uso de Kit de extracción “Wizard Genomic DNA Purification Kit” de Promega (Catálogo A1125).

1. Colocar 400 ul de Nuclei Lysis Solution en un tubo Eppendorf de 1.5ml.
2. Tomar con un asa bacteriológica previamente esterilizada, el micelio de la caja de cultivo formando una esfera (esfera de 5mm de diámetro, evitar recoger agar).
3. Colocar el micelio en el tubo Eppendorf.
4. Añadir 20 ul de Proteinasa K (20 mg/ml, no incluida en el kit)
5. Incubar en un termobloque a 65°C por 15 minutos el tubo con la muestra.
6. Retirar el tubo del termobloque y macerar el micelio por dos minutos con ayuda de un pistilo estéril para tubos Eppendorf (el micelio debe desvanecerse).
7. Incubar el tubo con la muestra a 65° C por 45 minutos más. Opcional: Se puede dejar el tubo con la muestra a 55°C toda la noche.
8. Retirar el tubo del termobloque. Esperar que el tubo esté a temperatura ambiente y añadir 3 ul de *RNA se A Solution*; dar un ligero vórtex a la muestra e incubarla a 37°C por 15 minutos.
9. Retirar el tubo del termobloque y añadir 140 ul de *Protein Precipitation Solution*; homogenizar la mezcla dando un vórtex de 10 segundos (la mezcla se vuelve blanquecina); incubar por 5 minutos a -20° C. Si la muestra se congeló, esperar a que se descongele y dar otro vórtex de 10 segundos.
10. Centrifugar el tubo a 13000 RPM por 10 minutos.
11. Transferir aproximadamente 400 ul del sobrenadante (aquí está el ADN) a un tubo limpio de 1.5 ml. Evitar recoger o disgregar el pellet (aquí están los restos celulares).

12. Añadir 400 μ l de isopropanol puro a temperatura ambiente. Mezclar el tubo por inversión (se puede visualizar como el ADN se va aglutinando).
- 13.- Centrifugar el tubo a 13000 RPM por 10 minutos.
- 14.- Eliminar el sobrenadante del tubo y conservar el pellet (ADN precipitado)

Anexo 2. Protocolo para PCR

Adaptado del manual del protocolo de PCR del Fungario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Los materiales necesarios para las PCR fueron: muestras de ADN, tubos Eppendorf de 0.5ml y 0.2ml, agua Milli Q, Buffer 10X, MgCl₂, dNTPs, primers ITS-1F (forward) e ITS-4 (reverse) y taq polimerasa, en sus respectivas concentraciones finales. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Multigene Labnet). Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1% en 0,5X TBE, separados mediante electroforesis durante 35 minutos, con un voltaje de 100 y un miliamperaje de 500.

1. Para las diluciones de ADN en tubos radiados de 0.5ml poner 8 μ l de agua PCR (Milli Q) y 2 μ l de las muestras de ADN.
2. Según el número de individuos hacer N+1 reacciones según la hoja guía. Dependiendo del número de muestras (N) sumar otro tubo de 0.5ml (N+1) siendo este tubo extra el control negativo (sin ADN) o positivo (una muestra que si haya amplificado correctamente antes).
3. Hacer master MIX en tubo de 1.5ml, la taq polimerasa al final (porque debe estar fría), esto siguiendo la hoja guía para PCR.
4. Luego poner 24 μ l del master MIX y 1 μ l de dilución de ADN en tubos Eppendorf de 0.2ml.
5. Centrifugar los tubos.
6. En el termociclador programar el programa ITS y esperar.
7. Cuando acabe, sacar los tubos y hacer el gel de agarosa para electroforesis. O dejar toda la noche en la refrigeradora a 4°C.
8. Para visualizar los productos PCR, realizar gel de agarosa al 1% en 0.5X TBE.

9. Los productos PCR serán separados durante 35 minutos en una cámara de electroforesis con un voltaje de 100 y miliamperaje de 500.

10. Visualizar los productos PCR en la electroforesis.

Anexo 3. Códigos y especies de orquídeas colectadas

# de orquídeas	Código	Género y/o especie
1	6164	<i>Dracula sp.</i>
2	25754	<i>Dracula chimaera</i>
3	8932	<i>Dracula sp.</i>
4	8968	Indeterminada
5	8879	<i>Dracula chestertonii</i>
6	23410	<i>Dracula terborchii</i>
7	8906	<i>Dracula amaliae</i>
8	8854	<i>Dracula chiroptera</i>
9	13961	<i>Dracula antonii</i>
10	8681	<i>Dracula sp.</i>
11	27507	<i>Dracula sp.</i>
12	6122	<i>Dracula gorgona</i>
13	26465	<i>Dracula navarroorum</i>
14	8411	<i>Dracula chestertonii</i>
15	8640	<i>Dracula fuliginosa</i>
16	8634	<i>Dracula radiosa</i>
17	9121	<i>Dracula vampira</i>
18	8659	<i>Dracula fuligifera</i>
19	6559	<i>Dracula sp.</i>
20	6164	<i>Dracula sp.</i>
21	23463	<i>Dracula radiosa</i>

# de orquídeas	Código	Género y/o especie
22	12944	<i>Masdevallia platyglossa</i>
23	8681	<i>Dracula sp.</i>
24	9609	<i>Masdevallia angulata</i>
25	26517	<i>Dracula sp.</i>
26	12533	<i>Masdevallia sp.</i>
27	8632	<i>Dracula sp.</i>
28	6365	<i>Masdevallia sp.</i>
29	11718	<i>Masdevallia sp.</i>
30	6836	<i>Masdevallia don-quijote</i>
31	13637	<i>Masdevallia sertula</i>
32	9447	<i>Dracula sp.</i>
33	6168	Indeterminada
34	6451	<i>Masdevallia sp.</i>
35	26440	<i>Dracula robledorum</i>
36	8843	<i>Dracula chestertonii</i>
37	7606	<i>Stanhopea sp.</i>
38	4113	<i>Stanhopea florida</i>
39	13064	<i>Trichopilia sp.</i>
40	14872	<i>Stanhopea sp.</i>
41	7606	<i>Stanhopea sp.</i>
42	7120	<i>Stanhopea florida</i>
43	7616	Indeterminada
44	14872	<i>Stanhopea sp.</i>
45	8013	<i>Stanhopea sp.</i>
46	9637	<i>Oncidium sp.</i>
47	7531	<i>Stanhopea sp.</i>

# de orquídeas	Código	Género y/o especie
48	7377	<i>Trichopilia sp.</i>
49	9406	<i>Stanhopea sp.</i>
50	7732	<i>Stanhopea sp.</i>
51	5125	<i>Cattleya sp.</i>
52	7598	<i>Stanhopea sp.</i>
53	9637	<i>Oncidium sp.</i>
54	7598	<i>Stanhopea sp.</i>
55	5145	Indeterminada
56	9406	<i>Stanhopea sp.</i>
57	7554	<i>Stanhopea sp.</i>
58	5145	Indeterminada
59	28044	<i>Stanhopea sp.</i>
60	15110	<i>Stanhopea sp.</i>
61	7534	<i>Stanhopea sp.</i>
62	3180	<i>Odontoglossum sp.</i>
63	14296	<i>Miltoniopsis sp.</i>
64	8707	<i>Cyrtorchilum sp.</i>
65	9257	<i>Coelogyne sp.</i>
66	12183	<i>Brassia sp.</i>
67	26838	<i>Odontioda sp.</i>
68	26838	<i>Odontioda sp.</i>
69	13372	<i>Odontioda sp.</i>
70	14220	<i>Gongora sp.</i>
71	14220	<i>Gongora sp.</i>
72	11080	<i>Brassia sp.</i>
73	12655	<i>Schlimmia sp.</i>

# de orquídeas	Código	Género y/o especie
74	7702	<i>Dendrochilum cobbianum</i>
75	8412	<i>Brassia sp.</i>
76	7590	<i>Stanhopea sp.</i>
77	7564	<i>Stanhopea sp.</i>
78	9056	<i>Prostechea sp.</i>
79	10024	<i>Ada aurantiaca</i>
80	69600 o 65600	Indeterminada
81	5883	<i>Ada aurantiaca</i>
82	8891	<i>Prostechea sp.</i>
83	14771	<i>Stanhopea sp.</i>
84	6180	<i>Spilotantha pachyura</i>

Anexo 4. Códigos y número de extracciones de ADN por código

Código	Número de extracciones	Código	Número de extracciones
8932	1	6451	1
8968	2	26440	1
8879	2	7606	1
8906	1	4113	1
26465	3	13064	1
8411	1	8013	1
8659	1	7377	1
6164	1	7554	1
6559	2	5145	1

23463	1	7534	1
12944	1	14296	1
8681	1	12655	1
9609	1	7702	1
26517	1	69600	2
8632	4	8891	2
11718	1	Total	42
13637	1		

Anexo 5. Resultados en gel de agarosa de PCR de extracciones de ADN de las muestras

Se realizaron PCR para las 42 extracciones de ADN. Posterior a esto se realizó 2 electroforesis. Se obtuvo la correcta amplificación de las bandas en el 90% de los casos.

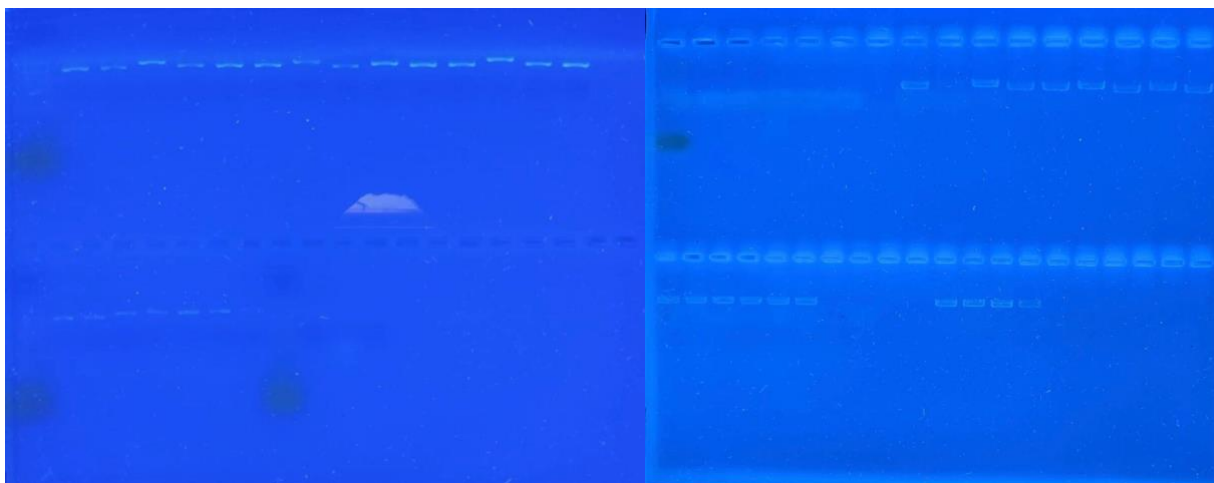












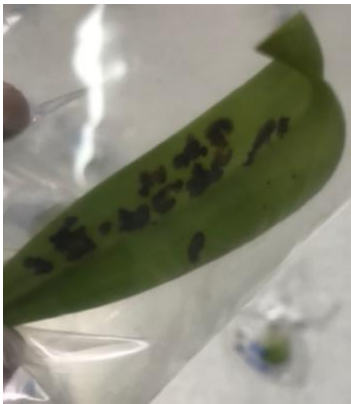

Figura 21. Electroforesis




Anexo 6. Morfotipos de lesiones en las hojas

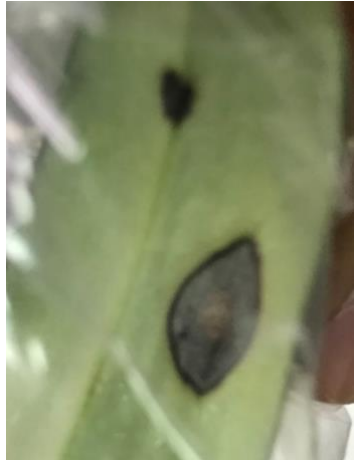


Morfotipo	Descripción morfológica de la lesión en la hoja	Hoja con lesión
1	Mancha negra en el borde de la hoja	
2	Mancha marrón negruzca con anillos y manchas blancas en la punta de la hoja	
3	Mancha negra en la punta de la hoja con puntos negros	




Morfotipo	Descripción morfológica de la lesión en la hoja	Hoja con lesión
4	Mancha en la punta de la hoja sin anillos y blanquecina	
5	Manchas negras con centro amarillo	
6	Mancha en la punta de la hoja con un solo anillo negro	




Morfotipo	Descripción morfológica de la lesión en la hoja	Hoja con lesión
7	Manchas negras en la punta	
8	Mancha negra en el envés	
9	Manchas marrones claras	

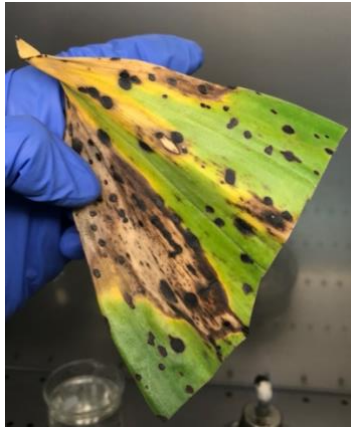


Morfotipo	Descripción morfológica de la lesión en la hoja	Hoja con lesión
10	Mancha redondeada en la punta del envés de la hoja con bordes amarillentos	
11	Manchas negras sin forma en el envés	
12	Puntos negros en el haz	




Morfotipo	Descripción morfológica de la lesión en la hoja	Hoja con lesión
13	Mancha negra opaca cerca del peciolo	
14	Manchas negras, amarillas y blancas en toda la hoja	
15	Mancha redondeada con interior blanco y borde negro	



Morfotipo	Descripción morfológica de la lesión en la hoja	Hoja con lesión
16	Mancha redondeada con interior amarillento y plumizo con borde negro	
17	Hoja seca con esporas	
18	Hoja esporada	

Morfotipo	Descripción morfológica de la lesión en la hoja	Hoja con lesión
19	Manchas blancas en toda la hoja	
20	Mancha negra única	
21	Mancha marrón única	

Morfotipo	Descripción morfológica de la lesión en la hoja	Hoja con lesión
22	Numerosas manchas negras dispersas por toda la hoja	
23	Mancha marrón con numerosos anillos	
24	Manchas negras redondeadas pequeñas	

Morfotipo	Descripción morfológica de la lesión en la hoja	Hoja con lesión
25	Manchas marrones, negras y amarillentas en toda la hoja	
26	Hoja con lesiones blancas y negras pequeñas	
27	Puntos negros sin borde definido en el envés	

Morfotipo	Descripción morfológica de la lesión en la hoja	Hoja con lesión
28	Mancha negra en el nervio central	
29	Mancha marrón con borde negro e interior blanco	
30	Mancha negra sin borde e interior blanco	

Morfotipo	Descripción morfológica de la lesión en la hoja	Hoja con lesión
31	Mancha marrón con borde amarillo y manchas negras	
32	Manchas marrones deformes en toda la hoja	
33	Mancha negra con interior naranja	