

## Descripción morfológica y caracterización molecular de los hongos asociados a la raíz de *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl.

## Morphological description and molecular characterization of fungi associated with the root of *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl.

Jairo Alberto Triana-Vallejos<sup>1\*</sup> ; Concepción Bailón-Aijón<sup>1</sup> ; Johan Manuel Cifuentes-Castellanos<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Bogotá D.C., Colombia; e-mail: jaitriana@udca.edu.co; cbailonaijon@gmail.com; johcifuentes@udca.edu.co

\*autor de correspondencia: jaitriana@udca.edu.co

**Cómo citar:** Triana-Vallejos, J.A.; Bailón-Aijón, C.; Cifuentes-Castellanos, J.M. 2022. Descripción morfológica y caracterización molecular de los hongos asociados a la raíz de *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 25(1):e2098. <http://doi.org/10.31910/rudca.v25.n1.2022.2098>

Artículo de acceso abierto publicado por Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, bajo una Licencia Creative Commons CC BY-NC 4.0

Publicación oficial de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, Institución de Educación Superior Acreditada de Alta Calidad por el Ministerio de Educación Nacional.

**Recibido:** septiembre 24 de 2021

**Aceptado:** mayo 26 de 2022

**Editado por:** Helber Adrián Arévalo Maldonado

### RESUMEN

*Masdevallia coccinea* es una orquídea llamativa, endémica de Colombia, empleada en la generación de híbridos ornamentales con más de una década, clasificada como una especie en peligro de extinción. Entre las técnicas usadas para la propagación *in vitro* y *ex situ* de especies de la familia Orchidaceae, se estudia la simbiosis micorrízica, debido a que esta familia micoheterótrofa depende de una correlación con estos hongos para subsistir en las primeras etapas de desarrollo en estado silvestre. Con el objetivo de caracterizar e identificar los hongos asociados a las raíces de *M. coccinea*, se realizó un estudio histológico en raíces y, a partir de micropreparados, se caracterizó morfológicamente micro, macroscópica y molecularmente diez aislamientos. Se identificó a *M. coccinea* como una orquídea que presenta diferentes patrones de colonización micorrízicos y con posibles efectos endófitos de los géneros *Aspergillus*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, *Ilyonectria* y del orden Xylariales en condiciones *ex situ*.

Palabras claves: Colonización de raíces; Hongos endófitos; Hongos orquídeas; Micorrizas; Orquídea.

### ABSTRACT

*Masdevallia coccinea* is a striking orchid, endemic to Colombia, used in the generation of ornamental hybrids, with more than a decade classified as an endangered species. Among the techniques used for *in vitro* and *ex situ* propagation of species of the Orchidaceae family, mycorrhizal symbiosis is studied, because this mycoheterotrophic family depends on a correlation with these fungi to survive in the early stages of development in the wild. In order to characterize and identify the fungi associated with the roots of *M. coccinea*, a histological study was carried out on roots and 10 isolates were morphologically, macroscopically and molecularly characterized from micropreparations. *M. coccinea* is identified as an orchid with different mycorrhizal colonization patterns and with possible endophytic effects of the genera *Aspergillus*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, *Ilyonectria* and the order Xylariales under *ex situ* conditions.

Keywords: Endophytic fungi; Mycorrhiza; Orchid; Orchid fungi; Root colonization.

## INTRODUCCIÓN

Las micorrizas orquidioides son organismos fúngicos que pueden colonizar las células del córtex, con la formación de haustorios dentro de las paredes celulares de la raíz, permitiendo, a su vez, el crecimiento de las hifas, a nivel intracelular, a través de la membrana celular; debido al desarrollo de pelotones, un complejo enrollamiento de hifas, a nivel intracelular, con una matriz de interfaz que permite el intercambio de carbono, nitratos y fósforo, este tipo de colonización se conoce como tolipofagia, que se caracteriza, además, porque los pelotones degradados brindan pectinas, celulosa y  $\beta$ -1,3-glucanos, para que, posteriormente, las células puedan ser recolonizadas (Singh & Varma, 2000; Peterson & Massicotte, 2004).

La relación simbiótica entre las orquídeas y los hongos formadores de micorrizas se creía una relación parasítica, debido a que

se consideraba que las micorrizas proporcionaban nutrientes, minerales y carbono a las semillas sin ninguna recompensa o, al menos, hasta que la planta fuera fotosintéticamente activa (Jacquemyn *et al.* 2015); sin embargo, Cameron *et al.* (2006) y Dearnaley & Cameron (2016) demostraron que las células embrionarias maduras de las semillas de orquídeas contienen un orgánulo de almacenamiento de proteínas, que podría producir amonio por medio de catálisis y que el amonio producido, a partir de los cuerpos proteicos, se puede usar para atraer hongos e iniciar la colonización, aunque la atracción también puede ser posible con nitrógeno orgánico, el ácido glutámico o la glutamina. En contacto los dos individuos, se inicia una señalización, que usa alrededor de 229 proteínas, que codifican la transducción de señales simbióticas, reacción de defensa, utilización de proteínas de almacenamiento y del metabolismo de nitrógeno, carbohidratos y lípidos (Chen *et al.* 2017).



Figura 1. *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl. Foto: Manuel Almanza. Miembro de la Asociación Bogotana de Orquideología, ABO.

Colonizada la semilla, la micorriza permite el ingreso del agua, iniciando la imbibición y la catálisis de reacciones metabólicas, formando pelotones que transfieren azúcares, fósforo y fuentes de nitrógeno, como el amonio y los aminoácidos esenciales para el crecimiento; por su parte, la semilla transloca lípidos a las hifas, donde se metabolizan como fuente de carbono y se usan para el crecimiento y el mantenimiento del hongo (Keymer *et al.* 2017; Yeh *et al.* 2019).

*M. coccinea* Linden ex Lindl. (Figura 1) es una orquídea de hábito terrestre o litofítico, endémica de Colombia, con distribución en la Cordillera Oriental, entre un rango de 2.500 a 3.400 metros de elevación, en áreas húmedas del bosque nuboso (Leathers, 2007). Morfológicamente es una orquídea cespitosa de hojas erectas, con tallos cortos, cubiertos de envolturas tubulares, que desarrollan una sola hoja apical lanceolada; no obstante, el tallo de la inflorescencia es más largo (hasta de 30 cm) y presenta una flor solitaria, con un sépalo dorsal reflexible y dos sépalos laterales, que forman un tubo más largo que ancho; pétalos con abundantes tricomas, un labelo inconspicuo, una columna paralela al labelo; una antera y un estigma ventral con dos polinios lateralmente aplanados; con respecto a su sistema radicular, sus raíces son flexuosas y delgadas (Cuervo Martínez *et al.* 2009).

*M. coccinea* es empleada en la generación de híbridos ornamentales, debido al aprecio de los agricultores y los coleccionistas aficionados; se clasifica como una especie **en peligro de extinción** y aunque presenta una distribución geográfica amplia, la alta degradación de su ambiente y su desmesurada recolección catalogan su vulnerabilidad (Calderón-Sáenz, 2006; Cuervo Martínez *et al.* 2013; Minambiente, 2017).

Esta investigación buscó identificar los hongos asociados a las raíces de *M. coccinea*, con el objetivo de conocer las dinámicas de interacción de un individuo en condiciones *ex situ* y estos microorganismos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Selección del material vegetal.** Cinco raíces de crecimiento terrestre de 4 a 5 cm de largo fueron colectadas de un individuo joven de *M. coccinea*, sembrado en pino patula. La planta se adquirió en el 2012, en un vivero comercial y, posteriormente, se conservó en la Unidad del orquidiario de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Esta Unidad, se encuentra en condiciones de intemperie, realiza actividades de deshierbe manual, podas sanitarias y no realiza manejos con agroquímicos. Las cinco raíces fueron analizadas en el laboratorio de Sanidad Vegetal.

### Colonización micorrízica.

**Fijación de muestras de raíces para examen microscópicos de la colonización micorrízica:** El procedimiento, se realizó de acuerdo con lo descrito por Nieto Melo & Bailón Aijón (2016), con las siguientes modificaciones: dos de las raíces extraídas fueron enjuagadas y sumergidas en 10 ml de formaldehído (CH<sub>2</sub>O), a

5 %; 10 ml de ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH), a 5 % y 180 ml de alcohol etílico (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), a 90 %, por 24 h. Tras este proceso, se lavaron con agua destilada y, posteriormente, se deshidrataron con 50 ml de alcohol etílico, en concentraciones crecientes de 70 % (2 h), 80 % (1 h), 90 % (1 h) y 100 % (1 h); seguido de un aclaramiento del tejido, con una mezcla de 25 ml de alcohol etílico, a 5 % + 25 ml de xilol (C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>), a 50 % (1 h) y 50 ml de xilol, a 100 % (1 h). Para finalizar, se ejecutó la inclusión en parafina (60 °C), con tres periodos de (1/2 h) sumergidos y 1 min de reposo entre cada inmersión y culminó este proceso, con la solidificación de los bloques a temperatura ambiente (20 °C).

De cada bloque parafinado, se realizaron cortes de 15 micrómetros de grosor, en un micrótopo manual Leica RM2125 RTS; cada lamina fue montada en portaobjetos y sumergidos en 50 ml de xilol, a 100 % (1/2 h), 50 ml de alcohol etílico, a 100 % (1/2 h), 50 ml de alcohol etílico, a 90 % (1/2 h) y 100 ml de agua destilada. Tras el proceso, se obtuvieron cuatro cortes longitudinales y un corte transversal; dos de los cortes longitudinales y el corte transversal, se tiñeron con 5 ml de azul de lactofenol, a 0,5 % y los otros dos cortes longitudinales, con 5 ml de safranina, a 0,5 %. Cada montaje fue observado en un microscopio NIKON ECLIPSE E200, un adaptador NIKON TV lents 0.55 x y fotografiado con una cámara digital NIKON DS-2Mv, con los objetivos 10x y 40x.

### Aislamientos fúngicos de raíces.

**Elaboración de micropreparados:** El procedimiento, se realizó de acuerdo con lo descrito por Nieto Melo & Bailón Aijón (2016), con las siguientes modificaciones: tres segmentos de las raíces fueron lavados en cámara de flujo laminar y desinfectados con 20 ml de Tween 20 (5 s); 20 ml de alcohol etílico (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), a 70 % (60 s); hipoclorito de sodio (NaClO), a 25 % (30 s); al finalizar, se realizaron tres repeticiones de enjuague con agua destilada y esterilizada (120 s). Cada raíz se dividió en las siguientes zonas: C (Zona de crecimiento), B (Zona basal), A (Meristemo apical) y fueron cortadas en cinco secciones de 0,5 cm y sembradas en una caja Petri, de 9 x 1,4 cm, con 20 ml de PDA, con un pH 5,0. Posteriormente, cada caja Petri fue depositada en una incubadora a 20 °C, en oscuridad por 8 días, para finalizar su crecimiento, en condiciones ambientales dentro del laboratorio de Sanidad Vegetal (7 días). Transcurrido el periodo de incubación, se purificaron las colonias observadas.

### Identificación de colonias fúngicas.

**Identificación macro y microscópica:** La identificación macroscópica fue realizada de cada colonia pura, registrando las siguientes variables: velocidad de crecimiento (cm<sup>2</sup>/24 h), forma de la colonia, altura y color de las hifas aéreas, color base y textura superficial (Chen *et al.* 2012). Las colonias fueron observadas en un estereoscopio Advance óptica modelo SE2200, con la luz blanca reflejada y se usó la cartilla Pantone, como sistema de estandarización de color (Pantone, 2017). Respecto a la identificación microscópica, se usó una cámara húmeda en caja Petri, obteniendo micelio en un cubreobjeto que, posteriormente, fue montado en dos

portaobjetos, para su visualización, en objetivos 40X y 100X; a cada portaobjeto, se le adicionó una gota de azul de lactofenol y una gota de safranina. Los hongos aislados, se identificaron de acuerdo con la clave dicotómica y descripción de géneros de hongos imperfectos de Barnett & Hunter (1998).

**Velocidad de crecimiento radial:** Un disco de micelio de 48 h de crecimiento fue sembrado por triplicado en cajas Petri, de 9 x 1,4 cm, con medio PDA, con 4,1 de pH, a 18 °C. El crecimiento se delimitó cada 24 h durante cuatro días; posteriormente, el área de crecimiento se determinó a través del programa imageJ. Tras la tabulación de los datos, se realizó un ajuste mediante una ecuación de regresión lineal, para calcular la pendiente de la curva de crecimiento, que corresponde a la velocidad media radial de cada especie fúngica. Los datos fueron evaluados en un análisis de varianza, para determinar si las medias eran iguales o no (Pereira *et al.* 2007). A partir de este resultado, se usó la prueba Tukey, para identificar la colonia o las colonias que fueran diferentes, tomando en cuenta un valor crítico de prueba 4,72; 11,39, como valor del cuadro del error medio y 4, como “n”, obteniendo de esta forma un HDS (Honestly-significant-difference) de 7,0.

#### Identificación molecular.

**Aislamiento y purificación del DNA:** Para este proceso, se usó el kit DNeasy PowerSoil (QIAGEN), que comprende un método de eliminación de inhibidores (IRT), obteniendo un ADN de un alto nivel de pureza, lo que permite una amplificación por PCR más exitosa de los organismos de la muestra.

**Amplificación del ADN:** La amplificación de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) del ADN ribosomal fúngico, se realizó con los iniciadores ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) e ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG), en reacciones de 25 µL, que contienen 12,5 µL de mezcla PCR-100-2X Corpogen, 1 µL de cada iniciador a 10 µM (Concentración final: 0,4 µM), 2 µL de ADN purificado y 8,5 µL de agua tipo PCR Corpogen.

La muestra, se amplificó usando un termociclador BIORAD C1000, (Denaturación inicial 95 °C, 5 min; 35 ciclos de denaturación, a 95 °C, 30 s; anillamiento 55 °C, 30 s; extensión 72 °C, 45 s; extensión final 72, °C 5 min); posteriormente, se purificó el producto mediante precipitación alcohólica.

**Secuenciación:** Se realizó mediante el método de Sanger del producto amplificado por PCR, con los iniciadores universales ITS4 e ITS5, utilizando el kit “ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing”, electroforesis capilar y un secuenciador ABI PRISM® 3730XL Analyzer (96 capillary type); posteriormente, se realizó limpieza y el ensamblaje de las secuencias, para obtener la secuencia problema, empleando el software Geneious.

**Análisis taxonómico:** El análisis, se realizó a través de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), del NCBI (National Center for Biotechnology Information), comparándolas contra las bases de datos: GenBank, EMBL (European Molecular Biology

Laboratory), DDBJ (DNA Data Bank of Japan), PDB (Protein Data Bank) y RefSeq. Adicionalmente, se comparó contra la base de datos de UNITE (<https://unite.ut.ee>) y la herramienta “Classifier”, alojada en el sitio Web de RDP (Ribosomal Data Project), obteniendo el 99 % de identidad en cada una de las muestras.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Colonización micorrízica en raíces.** El corte trasversal evidencia colonización fúngica dentro de la raíz de estudio; se observó que, en el velamen, el hongo se desarrolla de forma intracelular (hifas engrosadas con crecimiento rectilíneo); en la exodermis, la colonización no interactúa con todas las células, pero el desarrollo longitudinal de las hifas se extendió desde el velamen hasta la endodermis, de forma intercelular; dentro del parénquima cortical, las células presentaron discrepancia en su tamaño sin ningún patrón, pero evidencian hifas o pelotones degradados.

La vista del corte longitudinal de la raíz permitió evidenciar que el tejido teñido con safranina presenta la deformación celular, a causa del desarrollo del pelotón activo (Figura 2A); no obstante, también se identificó un patrón en la lisis de los pelotones en paralelo al sistema vascular de la raíz, presentándose de tamaño similar y de forma continua, indicando una zona fenológica activa. Respecto a la tinción con azul de lactofenol, se observó la presencia de pelotones activos y degradados sin ningún patrón; también se detalló que este organismo forma estructuras, tanto en el velamen como en la endodermis, simultáneamente (Figura 2B). La vista longitudinal, adicionalmente, demuestra colonización por ambos lados del cilindro vascular, que estaría acorde con el parámetro de recolección de las raíces, ya que la penetración de los hongos está en relación con el contacto directo del suelo en orquídeas terrestres y con la corteza en epífitas (Balachandar *et al.* 2019).

Los resultados anteriores sugieren que, en esta etapa vegetativa, *M. coccinea* está en un proceso de interacción micorrízica activa (Jiménez-Peña *et al.* 2018), por lo menos, con dos hongos formadores de micorrizas simultáneos, dado a las dos colonizaciones, anatómicamente distintas, procedentes de raíces diferentes (González-Chávez *et al.* 2018; Ventre Lespiaucq *et al.* 2021). La diferencia más notoria dentro de la colonización es el patrón en la formación de los pelotones (Figura 2A). En una de las raíces, se presentaron crecimientos longitudinales con un mismo periodo de desarrollo y un posible ciclo de colonización; esto se debe, a que las células que presentan lisis en los pelotones son más próximas al cilindro vascular y aquellas con pelotones activos están más cerca de la exodermis, lo cual, puede ser el resultado de una recolonización fúngica. La colonización teñida con azul de lactofenol, se caracteriza por la formación de estructuras, desde del velamen hasta la endodermis, de forma simultánea y sin ningún patrón, pero, principalmente, se detalla la interacción con el cilindro vascular (Figura 2B) (Pylro *et al.* 2013). Aunque las dos colonizaciones son diferentes, las dos interactúan de forma intercelular, conocida como tolipofagia, propia de las endomicorrizas de orquídeas (Ordóñez *et al.* 2015).

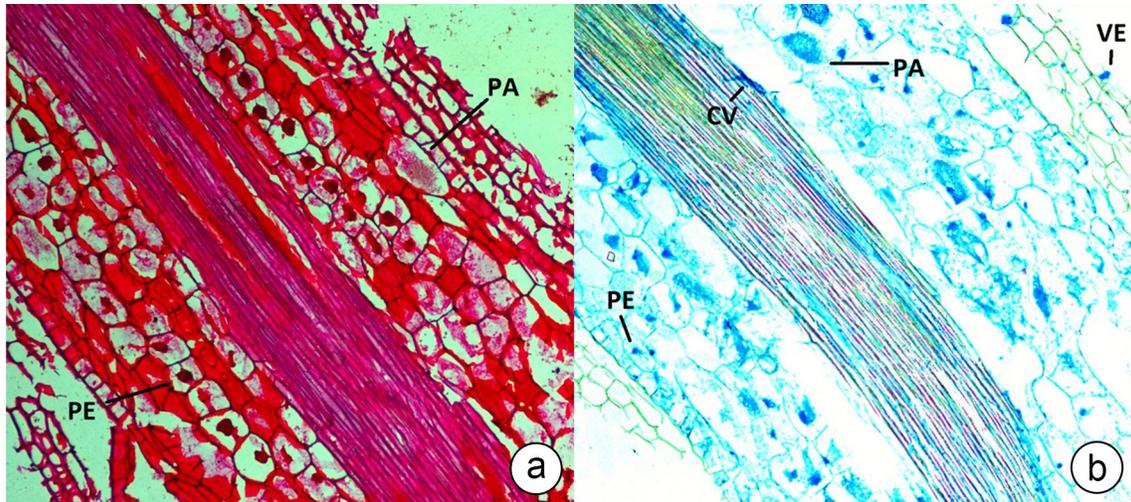


Figura 2. Colonización de micorrizas en vista de corte longitudinal. a) Tinción de safranina; b) tinción de lactofenol. PA: pelotón activo; PE: pelotón degradado; VE: estructura en el velamen; CV: penetración en el cilindro vascular.

Pese al gran papel que tienen los hongos en la simbiosis es la orquídea la que tiene mayor influencia. Dearnaley & Cameron (2016) determinaron que las orquídeas poseen la facultad de orientar el movimiento de los hongos en la raíz y pueden interferir a tal grado de alterar colonizaciones para que cumplan una función simbiótica (Sathiyadash *et al.* 2012; 2020). Esta característica de las orquídeas podría explicar las diferencias en la colonización de las dos raíces, indicando de que cada raíz puede interactuar con hongos micorrízicos de forma independiente.

**Aislamientos fúngicos de raíces.** Se obtuvieron 10 aislamientos de hongos puros; 30 combinaciones de hongos y bacterias y cinco asociados solo a bacterias; se seleccionaron solo las colonias fúngicas puras. La identificación de bacterias es inesperada, ya que se establecieron medidas para limitar la presencia de bacterias. Teixeira Da Silva *et al.* (2015) resaltan la presencia y el papel de las bacterias como simbioses en la correlación entre hongos micorrízicos y las raíces de las orquídeas, asociando, de esta manera, que las bacterias afines a las raíces de orquídeas tengan características adaptativas diferentes.

El mayor porcentaje de los aislamientos, se ubicaron en la sección C (40 %); en las secciones B y A, se distribuyó el 30 %, a cada una. El 60 % se aislaron de la raíz No. 1; el 30 %, en la raíz No. 2 y en la raíz No. 3, solo obtuvo el 10 %. Respecto a la correlación de la región radicular y el porcentaje de microorganismos hallados, se puede considerar que, la razón por la cual, un hongo se ubica en partes continuas de una sola raíz, puede estar relacionado con el crecimiento longitudinal, asociando, al tiempo que ha interactuado con el tejido vegetal, ya sea de forma exógena o endógena (nivel de micorrización) (Ordóñez *et al.* 2015).

Se identificó que algunas cepas tuvieron un crecimiento más rápido que otras, donde la velocidad media muestra tres rangos: primero, aquellas cepas con medias radiales de crecimiento menores de 2 cm<sup>2</sup>/24 h, seguido por cepas con velocidades entre 6 y 8 cm<sup>2</sup>/24 h y aquellas cepas con valores mayores de 8 cm<sup>2</sup>/24 h. La prueba Tukey

determinó que en la velocidad de crecimiento los aislamientos C14 y C12 presentan una diferencia significativa con respecto a A14, A15, B12 y B25, y A15 y B12, respectivamente. Este resultado puede estar relacionado con la naturaleza del microorganismo.

**Identificación de colonias fúngicas.** Todas las cepas pertenecen al filo Ascomycota, subdivisión que alberga hongos simbióticos asociados a orquídeas (Martos *et al.* 2012). La identificación molecular comprueba, en algunos aislamientos, los resultados de la caracterización microscópica, como es el caso de las cepas A31 y C11, pertenecen al género *Aspergillus*; B24 y C25, corresponden a *Scopulariopsis* y las cepas C12 y C14, integran la especie *Trichoderma viride*; sin embargo, las cepas A14, A15 y B12, que se identificaron como *Cylindrocarpon*, fueron agrupadas al género *Ilyonectria* y el aislamiento B25, se identificó como parte de familia teleomórfica Xylariaceae, perteneciente del orden Xylariales. El porcentaje de identidad genética no permitió una identificación a nivel de especie o de género de todas las muestras; esto se debe, a que muchas especies aún no están ingresadas en los bancos de datos, por lo cual, es útil resaltar que las secuencias que no se lograron identificar hasta especie o género, corresponden a organismos que no estaban registrados.

***Ilyonectria* sp.:** Las cepas A14, A15 y B12, que se identificaron microscópicamente como *Cylindrocarpon* y, posteriormente, al género *Ilyonectria*, un género que es filogenéticamente congénico con *Cylindrocarpon* (Chaverri *et al.* 2011). Microscópicamente, los aislamientos de *Ilyonectria* presentaron las características propias del género, desarrollando conidióforos simples y formando clamidosporas, ya sea entre micelio o de forma terminal, permitiendo la supervivencia en condiciones desfavorables. Posteriormente, también se observó la liberación de conidias; sin embargo, comparando las cepas obtenidas no se pudo determinar muchas similitudes con individuos ya categorizados de especies de este género (Cabral *et al.* 2012; Aiello *et al.* 2014). En condiciones *in vitro*, el carácter de conidios hialinos ovoides asociaría a los aislamientos A14, A15 y B12, con la especie *I. protearum*.

Morfológicamente, los aislamientos obtenidos en esta investigación de *Ilyonectria* tendieron a tener colores tierra y, a medida que pasaba el tiempo, el micelio se oscurecía, patrón acorde a este género. *Ilyonectria* es un género que, en los últimos años, se reconoce como simbiote de orquídeas en especies, como *Paphiopedilum spicerianum*, originaria de China y *Pleurothallis coriacardia*, nativa de los Andes (Maldonado *et al.* 2020).

*Trichoderma viride*: A nivel microscópico, se captaron conidióforos ramificados, compactos, con atenuación en un cuello largo, finalizando con conidios globosos; esta descripción comprende lo descrito por Saha & Rao (2006), de *T. viride*, aislado de la orquídea *Cymbidium*. Macroscópicamente, los aislamientos presentaron el color blanco del género y la especie, pero, adicionalmente, en su estado de colonización, presenta su crecimiento arbolario, clave en su identificación (Zi *et al.* 2014). En este estudio, se caracterizó el rápido crecimiento de estos aislamientos, parámetro que puede estar asociado a la eficiencia de este género, como competidor de espacio (Cano, 2011). *Trichoderma* es un género que desarrolló participación en términos de simbiosis, aunque, principalmente, no se le atribuye como micorriza; su papel relevante esta como degradador de celulosa, biocontrolador, inductor de resistencia, promotor de crecimiento y de tolerancia a estrés hídrico (Hernández-Melchor *et al.* 2019).

*Aspergillus* sp.: En el caso de *Aspergillus*, la observación microscópica identificó en los extremos de las hifas estípites con vesículas esféricas y con conidios globosos; en la caracterización macroscópica, una de las colonias que se encontró, se desarrolló formando una estera micelial de tonalidad pálida, seguido de un crecimiento oscuro y finalizando con un aro de color claro, que indica su inmadurez; sin embargo, la otra colonia presentó un estado más maduro, indicado por su tonalidad oscura. Referente a la velocidad de crecimiento, los aislamientos mostraron un valor moderado, que se enmarca con los observados por Luna *et al.* (2010). *Aspergillus* ha sido conocido por ser un hongo oportunista y patógeno; no obstante, cuando coexisten con orquídeas se les atribuye otras capacidades, por ejemplo, reportaron asociaciones cooperativas entre *A. fumigatus* y *Vanilla panifolia* (Khojraty *et al.* 2015), pero en las especies de *Laelia*, se demostró susceptibilidad al ataque de este género (Almanza-Álvarez *et al.* 2017); otro ejemplo lo reportan Sahoo & Gupta (2018), donde demostraron el papel de *A. fumigatus* y *A. niger* en la solubilidad de fósforo o como biocontroladores de plagas al liberar toxinas, como es el caso de *A. flavus* y *A. ochraceus* (Sudheep & Sridhar, 2012).

*Scopulariopsis* sp.: *Scopulariopsis*, se caracterizó por una textura aterciopelada, una coloración desde marrón a canela y microscópicamente las hifas fueron hialinas y septadas, que le dan paso a los conidióforos donde se forman conidios, los cuales, son globosos y, principalmente, se desarrollan con una base truncada; todos estos parámetros concuerdan con caracteres de identificación en un estudio de especies de este género, además, corrobora el crecimiento moderadamente rápido que los resultados demuestran (Sandoval-Denis *et al.* 2016). En este mismo sentido, *Scopulariopsis* fue descubierto en las raíces de *Dendrobium sagittatum*, un

especimen silvestre del pueblo de Turgo Village Pakem, Indonesia (Sugiyarto *et al.* 2016); asimismo, es un género reconocido como hongo endófito de plantas silvestres (Bolívar-Anillo *et al.* 2016).

*Xylariaceae*: El aislamiento B25, se identificó como un género anamórfico *Nodulosporium* de la familia teleomórfica Xylariaceae, perteneciente del orden Xylariales (Stadler *et al.* 2014; Wittstein *et al.* 2020). Las características relevantes macromorfológicas de este aislamiento son: crecimiento crateriforme, el color claro de sus hifas y estromas inmaduros, características que se han mencionado en especies de *Daldinia*; no obstante, su lento crecimiento puede estar relacionado con el pH bajo del medio y la temperatura ambiente donde se mantuvieron los aislamientos. Por otro lado, en el microscopio, se observaron las esporas de forma ovoide-elíptica y en el crecimiento, engrosamiento en las células formadoras de conidióforos, sin poder determinar caracteres para identificar especies de *Daldinia* (Pérez-Silva, 1973; Stadler *et al.* 2014). A nivel ecológico, la familia *Xylariaceae*, se ha asociado a las orquídeas como hongos endófitos descomponedores y entre los géneros reconocidos, se menciona a *Daldinia* (Sawmya *et al.* 2013); sin embargo, *Daldinia eschscholtzii*, un hongo asociado a orquídeas tailandesas, metaboliza una gama de policétidos aromáticos con actividad antimicrobial (Barnes *et al.* 2016) y *Daldinia cf. concéntrica* demostró que los compuestos orgánicos volátiles que sintetiza tiene actividad nematocida en huevos y en estados jóvenes de *Meloidogyne javanica* (Liarzi *et al.* 2016); por otro lado, *Hansfordia* es un género con muy poca información y sus reportes abarcan su capacidad de hiperparasitismo (Vivas *et al.* 2021), pero también se ubicó *Hansfordia granulosa* en las raíces de la orquídea *Loroglossum hircinum*; no obstante, no fue identificada su relación (Richardson & Currah, 1995). Además, se caracterizó la familia Xylariaceae como saprofito de madera, dando, en este aislamiento, contexto como hongo benéfico para la orquídea (Barnett & Hunter, 1998).

Las diferentes funciones que tienen los hongos mencionados permiten identificar su potencial como hongos endófitos de *M. coccinea*; sin embargo, es necesario continuar realizando estudios que evidencien su papel. Esta investigación evidencia la capacidad de una plántula de *M. coccinea* para interactuar con hongos en condiciones *ex situ*, pero no concluye, si los hongos aislados cumplen una función como hongos formadores de micorrizas o si los pelotones presentes en sus raíces fueron desarrollados en condiciones *ex situ*.

**Agradecimientos.** Al laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A.

**Conflicto de intereses:** El artículo fue preparado y revisado con la participación de todos los autores, quienes declaramos que no existe conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados. **Financiación:** Este estudio fue financiado por la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A.

## REFERENCIAS

1. AIELLO, D.; GUARNACCIA, V.; VITALE, A.; CIRVILLERI, G.; GRANATA, G.; EPIFANI, F.; PERRONE, G.; POLIZZI, G.; GROENEWALD, J.; CROUS, W. 2014. *Ilyonectria palmarum* sp. nov. causing dry basal stem rot of Arecaceae. *European Journal of Plant Pathology*. 138(2):347-359. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0334-0>
2. ALMANZA-ÁLVAREZ, J.; GARIBAY-ORIJEL, R.; SALGADO-GARCIGLIA, R.; FERNÁNDEZ-PAVÍA, S.P.; LAPPE-OLIVERAS, P.; ARELLANO-TORRES, E.; ÁVILA-DÍAZ, I. 2017. Identification and control of pathogenic fungi in neotropical valued orchids (*Laelia* spp.). *Tropical Plant Pathology*. 42:339-351. <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0171-3>
3. BALACHANDAR, M.; RAVI, R.K.; RANJITHAMANI, A.; MUTHUKUMAR, T. 2019. Comparative vegetative anatomy and mycorrhizal morphology of three South Indian *Luisia* species (Orchidaceae) with the note on their epiphytic adaptations. *Flora*. 251:39-61. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2018.12.001>
4. BARNES, E.C.; JUMPATHONG, J.; LUMYONG, S.; VOIGT, K.; HERTWECK, C. 2016. Daldionin, an unprecedented binaphthyl derivative, and diverse polyketide congeners from a fungal orchid endophyte. *Chemistry A European Journal*. 22(13):4551-4555. <https://doi.org/10.1002/chem.201504005>
5. BARNETT, H.; HUNTER, B. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th edition. American Phytopathological Society. 240p.
6. BOLÍVAR-ANILLO, H.J.; OROZCO-SANCHEZ, C.J.; DA SILVA LIMA, G.; DOS SANTOS, G.F. 2016. Endophytic microorganisms isolated of plants grown in Colombia: A short review. *Journal of Microbial Biochemical Technology*. 8(6):509-513. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000335>
7. CABRAL, A.; REGO, C.; NASCIMENTO, T.; OLIVEIRA, H.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. 2012. Multi-gene analysis and morphology reveal novel *Ilyonectria* species associated with black foot disease of grapevines. *Fungal Biology*. 116(1):62-80. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.09.010>
8. CALDERÓN-SÁENZ, E. 2006. Libro rojo de plantas de Colombia. Vol. 6. Orquídeas, primera parte. Ed. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (Colombia). 820p.
9. CAMERON, D.D.; LEAKE, J.R.; READ, D.J. 2006. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant–fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytologist*. 171(2):405-416. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01767.x>
10. CANO, M. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*. 14(2):15-31. <https://doi.org/10.31910/rudca.v14.n2.2011.771>
11. CHAVERRI, P.; SALGADO, C.; HIROOKA, Y.; ROSSMAN, A.Y.; SAMUELS, G.J. 2011. Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. *Studies in Mycology*. 68:57-78. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.68.03>
12. CHEN, J.; LIU, S.S.; KOHLER, A.; YAN, B.; LUO, H.M.; CHEN, X.M.; GUO, S.X. 2017. iTRAQ and RNA-Seq analyses provide new insights into regulation mechanism of symbiotic germination of *Dendrobium officinale* seeds (Orchidaceae). *Journal of Proteome Research*. 16(6):2174-2187. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00999>
13. CHEN, J.; WANG, H.; GUO, S.X. 2012. Isolation and identification of endophytic and mycorrhizal fungi from seeds and roots of *Dendrobium* (Orchidaceae). *Mycorrhiza*. 22:297-307. <https://doi.org/10.1007/s00572-011-0404-0>
14. CUERVO MARTÍNEZ, M.A.; BONILLA GÓMEZ, M.A.; BUSTOS SINGER, R. 2009. Morfología y morfometría de dos especies de banderitas (Orchidaceae: *Masdevallia*) en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*. 17(3):575-588.
15. CUERVO MARTÍNEZ, M.A.; BUSTOS SINGER, R.; GÓMEZ BONILLA, M.A. 2013. Reproductive biology of *Masdevallia coccinea* and *Masdevallia ignea* in Guasca (Cundinamarca: Colombia). *Lankesteriana*. 13(1-2):141. <https://doi.org/10.15517/lank.v0i0.11576>
16. DEARNALEY, J.D.W.; CAMERON, D.D. 2016. Nitrogen transport in the orchid mycorrhizal symbiosis—further evidence for a mutualistic association. *New Phytologist*. 213(1):10-12. <https://doi.org/10.1111/nph.14357>
17. GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M. DEL C.A.; TORRES-CRUZ, T.J.; SÁNCHEZ, S.A.; CARRILLO-GONZÁLEZ, R.; CARRILLO-LÓPEZ, L.M.; PORRAS-ALFARO, A. 2018. Microscopic characterization of orchid mycorrhizal fungi: *Scleroderma* as a putative novel orchid mycorrhizal fungus of *Vanilla* in different crop systems. *Mycorrhiza*. 28:147-157. <https://doi.org/10.1007/s00572-017-0808-6>

18. HERNÁNDEZ-MELCHOR, D.J.; FERRERA-CERRATO, R.; ALARCÓN, A. 2019. *Trichoderma*: importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences. 35(1):98-112. <https://doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>
19. JACQUEMYN, H.; BRYNS, R.; WAUD, M.; BUSSCHAE-RT, P.; LIEVENS, B. 2015. Mycorrhizal networks and coexistence in species-rich orchid communities. *New Phytologist*. 206(3):1127-1134. <https://doi.org/10.1111/nph.13281>
20. JIMÉNEZ-PEÑA, N.; SANDOVAL-VILLA, M.; VOLKE-HALLER, V.H.; PEDRAZA-SANTOS, M.E.; FERNÁNDEZ-HERRERA, E. 2018. Colonización micorrízica de *Laelia autumnalis* (La Llave & Lex.) Lindl. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 5(15):547-553. <https://doi.org/10.19136/era.a5n15.1756>
21. KEYMER, A.; PIMPRIKAR, P.; WEWER, V.; HUBER, C.; BRANDS, M.; BUCERIUS, S.L.; DELAUX, P.-M.; KLINGL, V.; VON RÖPENACK-LAHAYE, E.; WANG, T.L.; EISENREICH, W.; DÖRMANN, P.; PARNISKE, M.; GUTJARH, C. 2017. Lipid transfer from plants to arbuscular mycorrhiza fungi. *Elife*. 1-33. <https://doi.org/10.7554/eLife.29107>
22. KHOYRATTY, S.; DUPONT, J.; LACOSTE, S.; PALAMA, T.L.; CHOI, Y.H.; KIM, H.K.; PAYET, B.; GRISONI, M.; FOUILLAUD, M.; VERPOORTE, R.; KODJA, H. 2015. Fungal endophytes of *Vanilla planifolia* across Réunion Island: isolation, distribution and biotransformation. *BMC Plant Biology*. 15:142. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0522-5>
23. LEATHERS, J.J. 2007. *Masdevallia coccinea*. *Orchids Magazine*. 2007(10):752-755.
24. LIARZI, O.; BUCKI, P.; BRAUN MIYARA, S.; EZRA, D. 2016. Bioactive volatiles from an endophytic *Daldinia* cf. *concentrica* isolate affect the viability of the plant parasitic nematode *Meloidogyne javanica*. *PloS One*. 11(12):e0168437. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168437>
25. LUNA, M.; LOZADA, Y.; TRIGOS, Á. 2010. Aislamiento de cepas de *Aspergillus niger*, productoras de ocratoxina A, en café verde (*Coffea arabica*) almacenado. *Revista Mexicana de Micología*. 32:63-68.
26. MALDONADO, G.P.; YARZÁBAL, L.A.; CEVALLOS-CEVALLOS, J.M.; CHICA, E.J.; PEÑA, D.F. 2020. Root endophytic fungi promote *in vitro* seed germination in *Pleurothallis coriacardia* (Orchidaceae). *Lankesteriana*. 20(1):107-122. <http://dx.doi.org/10.15517/lank.v20i1.41472>
27. MARTOS, F.; MUNOZ, F.; PAILLER, T.; KOTTKE, I.; GONNEAU, C.; SELOSSE, M.-A. 2012. The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. *Molecular Ecology*. 21(20):5098-5109. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05692.x>
28. MINAMBIENTE. 2017. RESOLUCIÓN 1912 DEL 2017. Por la cual se establece el listado de las especies silvestres amenazadas de la diversidad biológica colombiana continental y marino costera que se encuentran en el territorio nacional y se dictan otras disposiciones. Disponible desde Internet en: <https://www.minambiente.gov.co/wp-content/uploads/2021/10/resolucion-1912-de-2017.pdf> (con acceso el 17/09/2022).
29. NIETO MELO, L.; BAILÓN AIJÓN, C. 2016. Evaluación de la germinación *in vitro* de *Epidendrum Oxypetalum* Hagsater & E. Santiago en presencia de hongos micorrízicos aislados de orquídeas de ecosistemas altoandinos. *Revista Ciencia: Desarrollo e Innovación*. 2(2):1-9.
30. ORDÓÑEZ, N.F.; OTERO OSPINA, J.T.; DÍAZ, L.A. 2015. Interacciones Micorrízicas de *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl. *Orquideología*. (Colombia). 31(2):123-135.
31. PANTONE. 2017. Carta de colores PANTONE CMYK. Ed. PANTONE CMYK (Estados Unidos). 12p.
32. PEREIRA, G.; HERRERA, J.; MACHUCA, A.; SÁNCHEZ, M. 2007. Efecto del pH sobre el crecimiento *in vitro* de hongos ectomicorrízicos recolectados de plantaciones de *Pinus radiata*. *Bosque (Chile)*. 28(3):215-219. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002007000300005>
33. PÉREZ-SILVA, E. 1973. El género *Daldinia* (Pyrenomycetes) en México. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*. 7:51-58.
34. PETERSON, R.L.; MASSICOTTE, H.B. 2004. Exploring structural definitions of mycorrhizas, with emphasis on nutrient-exchange interfaces. *Canadian Journal of Botany*. 82(8):1074-1088. <https://doi.org/10.1139/B04-071>
35. PYLRO, V.S.; NOGUEIRA, R.E.; DA SILVA LANNA, M.C. 2013. Anatomical characterisation of mycorrhizal fungi in neotropical orchids. *Advanced Studies in Biology*. 5:215-221. <https://doi.org/10.12988/asb.2013.326>
36. RICHARDSON, K.A.; CURRAH, R.S. 1995. The fungal community associated with the roots of some rainforest epiphytes of Costa Rica. *Selbyana*. 16(1):49-73
37. SAHA, D.; RAO, A.N. 2006. Studies on endophytic mycor-

- rhiza of some selected orchids of Arunachal Pradesh–1. Isolation and identification. Bulletin of Arunachal Forest Research. 22(1-2):9-16.
38. SAHOO, H.; GUPTA, N. 2018. Diversity of endophytic phosphate solubilising fungi associated with *Pomatocalpa decipiens* (Lindl.) J.J. Smith—an endangered orchid in Barbara forest of Odisha, India. Studies in Fungi. 3(1):84-99. <https://doi.org/10.5943/sif/3/1/11>
39. SANDOVAL-DENIS, M.; GENÉ, J.; SUTTON, D.A.; CANO-LIRA, J.F.; DE HOOG, G.S.; DECOCK, C.A.; WIEDERHOLD, N.P.; GUARRO, J. 2016. Redefining *Microascus*, *Scopulariopsis* and allied genera. Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi. 36(2):1-36. <https://doi.org/10.3767/003158516X688027>
40. SATHIYADASH, K.; MUTHUKUMAR, T.; KARTHIKEYAN, V.; RAJENDRAN, K. 2020. Orchid mycorrhizal fungi: Structure, function, and diversity. In: Khasim, S.; Hegde, S.; González-Arnao, M.; Thammasiri, K. (eds). Orchid biology: Recent trends & challenges. Springer (Singapore). p.239-208. [https://doi.org/10.1007/978-981-32-9456-1\\_13](https://doi.org/10.1007/978-981-32-9456-1_13)
41. SATHIYADASH, K.; MUTHUKUMAR, T.; UMA, E.; PANDEY, R.R. 2012. Mycorrhizal association and morphology in orchids. Journal of plant interactions. 7(3):238-247. <https://doi.org/10.1080/17429145.2012.699105>
42. SAWMYA, K.; VASUDEVAN, T.G.; MURALI, S.R. 2013. Fungal endophytes from two orchid species pointer towards organ specificity. Czech Mycology. 65(1):89-101.
43. SINGH, A.; VARMA, A. 2000. Orchidaceous mycorrhizal fungi. In: Mukerji, K.G.; Chamola, B.P.; Singh, J. (eds). Mycorrhizal Biology. Springer (Boston, E.E.U.U.). p.265-288. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4265-0\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4265-0_17)
44. STADLER, M.; LÆSSØE, T.; FOURNIER, J.; DECOCK, C.; SCHMIESCHEK, B.; TICHY, H.-V.; PERŠOH, D. 2014. A polyphasic taxonomy of *Daldinia* (Xylariaceae). Studies in mycology. 77:1-143. <https://doi.org/10.3114/sim0016>
45. SUDHEEP, N.M.; SRIDHAR, K.R. 2012. Non-mycorrhizal fungal endophytes in two orchids of Kaiga forest (Western Ghats), India. Journal of Forestry Research. 23(3):453-460. <https://doi.org/10.1007/s11676-012-0284-y>
46. SUGIYARTO, L.; UMNIYATIE, S.; HENUHILL, V. 2016. Keanekaragaman anggrek alam dan keberadaan mikoriza anggrek di Dusun Turgo Pakem, Sleman Yogyakarta. Jurnal Sains Dasar. 5(2):71-80.
47. TEIXEIRA DA SILVA, J.A.; TSAVKELOVA, E.A.; ZENG, S.; NG, T.B.; PARTHIBHAN, S.; DOBRÁNSZKI, J.; CARDOSO, J.C.; RAO, M.V. 2015. Symbiotic in vitro seed propagation of *Dendrobium*: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development. Planta. 242:1-22. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2301-9>
48. VENTRE LESPIAUCQ, A.; JACQUEMYN, H.; RASMUSSEN, H.N.; MÉNDEZ, M. 2021. Temporal turnover in mycorrhizal interactions: a proof of concept with orchids. New Phytologist. 230(5):1690-1699. <https://doi.org/10.1111/nph.17291>
49. VIVAS, J.M.S.; SILVEIRA, S.F.; MUSSI-DIAS, V.; SANTOS, P.H.D.; RAMOS, G.K.S.; SANTOS, P.R.; ALMEIDA, R.N. 2021. Sensitivity of hyperparasitic fungi to alternative products for use in the control of papaya black spot. Brazilian Journal of Biology. 81(1):27-36. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.214909>
50. WITTSTEIN, K.; CORDSMEIER, A.; LAMBERT, C.; WENDT, L.; SIR, E.; WEBER, J.; WURZLER, N.; PETRINI, L.; STADLER, M. 2020. Identification of *Rossellinia* species as producers of cyclodepsipeptide PF1022 A and resurrection of the genus *Dematophora* as inferred from polythetic taxonomy. Studies in Mycology. 96:1-16. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.01.001>
51. YEH, C.-M.; CHUNG, K.; LIANG, C.-K.; TSAI, W.-C. 2019. New Insights into the Symbiotic Relationship between Orchids and Fungi. Applied Sciences. 9(3):585-599. <https://doi.org/10.3390/app9030585>
52. ZI, X.-M.; SHENG, C.-L.; GOODALE, U.M.; SHAO, S.-C.; GAO, J.-Y. 2014. In situ seed baiting to isolate germination-enhancing fungi for an epiphytic orchid, *Dendrobium aphyllum* (Orchidaceae). Mycorrhiza. 24(7):487-499. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0565-8>