

Hongos endófitos de orquídeas y su efecto sobre el crecimiento en *Vanilla planifolia* Andrews

Orchid endophytes and their effect on growth in *Vanilla planifolia* Andrews

Nancy Fiorela Ordóñez C.^{1*}, J. Tupac Otero², y Maria Claudia Díez G.³

¹Maestría en Bosques y Conservación Ambiental, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. ²Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. ³Departamento de Ciencias Forestales, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

*Autor para correspondencia: fiorela.oc@gmail.com

Rec.: 01.12.11 Acept.: 10.09.12

Resumen

Los endófitos son microorganismos que crecen dentro de los tejidos vegetales sin causar síntomas de enfermedad. Aquellos asociados a las raíces tienen, entre otros posibles beneficios la defensa contra patógenos y un aumento en la disponibilidad de nutrientes. En el presente estudio se aislaron hongos endófitos de raíces de orquídeas del género *Vanilla* en estado silvestre, con el fin de determinar su efecto sobre el crecimiento de plantas de *V. planifolia* cuando se inocularon en el sustrato. Los resultados mostraron que variables como biomasa aérea, longitud de raíces y altura de la planta son afectadas por la inoculación de estos endófitos. La efectividad de estos hongos sobre la protección de plantas o la estimulación en el crecimiento contribuye a la generación de herramientas para el uso de bioinoculantes. De esta forma se reduce el uso de insumos químicos y se promueven prácticas amigables con el ambiente en sistemas de cultivo de vainilla.

Palabras clave: Ceratobasidium, crecimiento, hongos endófitos, inóculo, *Vanilla planifolia*, *Xylaria*.

Abstract

Endophytes are microorganisms that grow inside plant tissues without causing symptoms of disease. Those roots are associated with, among others, potential benefits in the defense against pathogens and increased nutrient availability. In the present study, endophytes from roots of orchids of the genus *Vanilla* in wild state were isolated, in order to determine their effect on plant growth of *V. planifolia* when inoculated into the substrate. The results showed that variables such as biomass, root length and height of the plant are affected by the inoculation of these endophytes. The effectiveness of these fungi on the plant protection or growth stimulation contributes to the generation of tools for the use of bio-inoculants. This will reduce the use of chemical inputs and promote environmentally friendly practices in farming systems of vanilla.

Key words: Ceratobasidium, fungal endophytes, growth, inoculum, *Vanilla planifolia*, *Xylaria*.

Introducción

La literatura sobre hongos endófitos y hongos formadores de micorrizas en orquídeas se encuentra muy ligada entre sí y a veces es imposible discutir estas asociaciones por separado. Los hongos endófitos son microorganismos que crecen dentro de los tejidos vegetales sin causar síntomas de enfermedad y, recientemente, han empezado a ganar reconocimiento (Bayman y Otero, 2006; Brundrett, 2006; Stone *et al.*, 2000). La asociación endofítica describe dónde vive un microorganismo (Brundrett, 2006; Stone *et al.*, 2000), sin asumir o excluir la posibilidad de beneficio para ambas partes. Por el contrario, el concepto de micorrizas es funcional y describe una relación comúnmente mutualista (Smith y Read, 1997; Rasmussen, 2002; Cameron *et al.*, 2006, 2007).

Estudios recientes (Bayman y Otero 2006; Chen *et al.*, 2011, 2012; Singh *et al.*, 2011; Xing *et al.*, 2011) demostraron la gran diversidad de hongos endófitos no formadores de micorriza asociados con las raíces y partes aéreas de orquídeas. Estos estudios resaltan el papel que cumplen estos microorganismos en la protección de la planta frente a ataques de patógenos, ya sea por la síntesis de metabolitos secundarios o por el mejoramiento en la nutrición a través de la disponibilidad de los nutrientes (Schulz, 2006). Igualmente mencionan, no sólo los beneficios generados para las plantas, sino también el potencial que poseen estos organismos endófitos y su batería de enzimas y metabolitos secundarios, por ejemplo, en la industria de los combustibles (Singh *et al.*, 2011) y como antibióticos (Xing *et al.*, 2011).

No obstante, estas investigaciones dejan al descubierto la carencia de conocimiento en las implicaciones que tienen estas asociaciones y ponen en discusión la necesidad de conocer más a fondo estas interacciones y la importancia del papel que cumple en la fisiología tanto de la planta hospedera como del endófito (Bayman *et al.*, 1997) y su significancia funcional. Por tanto un mejor entendimiento de las funciones de estos organismos en la naturaleza puede conducir a desarrollar tecnologías para aspectos como conservación de especies, cultivos competitivos y métodos

amigables con el ambiente (Yuan *et al.*, 2009). Bayman *et al.* (2011) y Schulz y Boyle (2006) proponen la posibilidad de que las micorrizas y los hongos endófitos puedan proteger las plantas hospedantes contra el ataque de patógenos o la generación de algún tipo de resistencia a factores generadores de estrés.

Algunas especies del género *Vanilla* tienen importancia económica siendo la segunda especie más costosa, después del azafrán, y el aromatizante más utilizado en la industria alimenticia (Havkin-Frenkel *et al.*, 2011; Bucellato, 2011). En Colombia se ha registrado la presencia de *V. planifolia* Andrews, especie de alta importancia económica en varios departamentos del país como Antioquia, Chocó, Valle del Cauca y Bolívar (Ledezma *et al.*, 2006; Misas, 2005; Ordóñez *et al.*, 2012); sin embargo, existe muy poco conocimiento sobre los requerimientos nutricionales y asociaciones que presenta esta especie con microorganismos endófitos. Por esta razón, en este estudio se plantearon como objetivos determinar las asociaciones de hongos endófitos presentes en *Vanilla* sp. y estudiar el potencial de estos en el crecimiento de plántulas de *V. planifolia* en condiciones de invernadero basados en la inoculación de hongos aislados de otras orquídeas y de vainilla silvestre.

Materiales y métodos

Las plantas de *Vanilla* sp. para el aislamiento de los hongos endófitos fueron recolectadas en la Costa Atlántica en sectores del golfo de Morrosquillo y Montes de María (Sucre), estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta (Magdalena), San Pedro de Urabá; San Luis; San Jerónimo y Porce (Antioquia); Yopal (Casanare); Serranía de la Macarena (Caquetá); Buenaventura y alrededores (Valle del Cauca) (Cuadro 1). En cada sitio se seleccionaron por lo menos tres plantas de vainilla con buen desarrollo, que no mostraban enfermedades ni síntomas visuales de deficiencias nutritivas. De cada una de ellas se tomaron muestras de raíces de aproximadamente 20 cm de longitud colocadas en 10 g de suelo adyacente a la raíz. Las raíces fueron descubiertas tratando de evitar su alteración, cortadas con tijeras podadoras, empacadas en bolsas plásticas

Cuadro 1. Sitios de recolección donde se registraron individuos de *Vanilla* sp. en estado silvestre, Colombia.

Sitio	Departamento
Porce	Antioquia
San Jerónimo	Antioquia
San Luis	Antioquia
San Pedro de Urabá	Antioquia
Yopal	Casanare
Serranía de la Macarena	Meta
Montes de María	Sucre
Golfo de Morrosquillo	Sucre
Buenaventura	Valle del Cauca
S. N. de Santa Marta	Magdalena

de cierre hermético, debidamente marcadas y trasladadas rápidamente a laboratorio en neveras de icopor, donde fueron lavadas con agua corriente, luego desinfectadas superficialmente con etanol a 70% por 1 min con hipoclorito de sodio a 3% por 30 s y, finalmente, enjuagadas tres veces con agua destilada estéril (Otero *et al.*, 2002). Para la siembra se realizaron cortes de 2 mm, aproximadamente, con cuchillas quirúrgicas estériles. En cajas de Petri se sembraron por triplicado ocho fragmentos de raíces. El medio que se utilizó para el aislamiento fue agar papa dextrosa (PDA), suplementado con 50 ug/ml de penicilina y sulfato de estreptomycin antes de incubarlas a 28 °C en oscuridad durante ocho días.

La identificación molecular se realizó a partir de las colonias obtenidas mediante las secuencias de las regiones ITS, según los protocolos usados en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín (datos no mostrados).

Elaboración de inóculos

A partir de las cajas de Petri, donde previamente se aislaron los hongos endófitos, se tomó un trozo de 0.5 x 0.5 cm de inóculo y se llevó a un Erlenmeyer que contenía medio de cultivo papa-dextrosa líquido. Luego se colocó en un agitador a 120 r.p.m. a temperatura ambiente en oscuridad. Después de ocho días de crecimiento, el hongo fue licuado hasta obtener partículas finas con una licuadora casera previamente desinfectada con alcohol al 70% por 1 hora e hipoclorito de sodio al 4% por 30 min. Se obtuvieron 250 ml de licuado

y se completó el volumen hasta 600 ml en un recipiente de plástico.

Para el proceso de inoculación, se tomaron por materia un total 500 cm³ de madera (chips) y vermicompost en relación 1:1, que fueron transferidos a un recipiente y sometidos a autoclave a 15 psi con una temperatura de 120 °C por 60 min. Estas materas posteriormente fueron llenadas con 500 cm³ del sustrato y se agregó 20 ml del inóculo sobre la parte superior. Finalmente, las materas fueron cubiertas con papel periódico estéril y dejadas a temperatura ambiente por siete días hasta que el hongo creciera en este sustrato.

Aplicación de inóculo en las plantas

Las plantas de *V. planifolia* fueron obtenidas a partir de esquejes en el vivero ubicado en San Pedro de Urabá (Antioquia) y propiedad de la empresa Bioandes C.I Ltda. Cada planta se escogió por lo menos con siete entrenudos (20 cm de longitud total aproximadamente), que fueron desinfectadas previamente de hongos patógenos y no patógenos preexistentes en la raíz y en la parte aérea. Este procedimiento se realizó mediante la fumigación de la parte aérea con el fungicida Antracol[®] 2% (Propined 700g/Kg) y Mertec[®] 1% (Tiabendazol 500g/l) una vez por semana durante 3 semanas.

Después de ocho días de la aplicación del inóculo el hongo ya había crecido, por tanto en cada materia se sembró un esqueje de planta colocando por lo menos un entrenudo dentro del sustrato. Las plantas fueron amarradas con cuerdas de fique al tutor artificial que consistió en trozos de madera de 70 x 4 x 1 cm. Finalmente, las materas fueron cubiertas con cuarzo picado hasta obtener una capa protectora contra la entrada de insectos y otros agentes. El proceso de inoculación se repitió dos veces: al comienzo del montaje y después de 45 días.

Se usaron seis hongos forma-género *Rhizoctonia* procedentes de plantas de orquídeas del Valle del Cauca, obtenidas por Valadares (Valadares, 2009): P-17, P-18, P-19 y P-20 de *Psigmorchis pusida* y I-1, I-2 de *Ionopsis utricularoides*; 12 hongos endófitos aislados de este estudio a partir de plantas de *Vanilla* spp. silvestre y un control donde el suelo era estéril pero sin inoculación (Cuadro 2). El

Cuadro 2. Listado de endófitos, hospedero y sitio de procedencia de hongos inoculados en experimento de crecimiento de plántulas de *Vanilla planifolia*.

Código	Hospedero	Localidad
I-1	<i>Ionopsis utricularoides</i>	Buenaventura (Valle del Cauca)
I-2	<i>Ionopsis utricularoides</i>	Buenaventura (Valle del Cauca)
V-3	<i>Vanilla</i> sp.	San Luis (Antioquia)
V-4	<i>Vanilla</i> sp.	San Pedro Urabá (Antioquia)
V-6	<i>Vanilla</i> sp.	Porce (Antioquia)
V-8	<i>Vanilla</i> sp.	Buenaventura (Valle del Cauca)
V-9	<i>Vanilla</i> sp.	Montes de María (Sucre)
V-10	<i>Vanilla</i> sp.	San Pedro Urabá (Antioquia)
V-11	<i>Vanilla</i> sp.	San Pedro Urabá (Antioquia)
V-12	<i>Vanilla</i> sp.	San Pedro Urabá (Antioquia)
V-13	<i>Vanilla</i> sp.	San Pedro Urabá (Antioquia)
V-14	<i>Vanilla</i> sp.	Golfo de Morrosquillo (Sucre)
V-15	<i>Vanilla</i> sp.	Montes de María (Sucre)
V-16	<i>Vanilla</i> sp.	Golfo de Morrosquillo (Sucre)
P-17	<i>Psygmorchis pusida</i>	Buenaventura (Valle del Cauca)
P-18	<i>Psygmorchis pusida</i>	Buenaventura (Valle del Cauca)
P-19	<i>Psygmorchis pusida</i>	Buenaventura (Valle del Cauca)
P-20	<i>Psygmorchis pusida</i>	Buenaventura (Valle del Cauca)
Control		

ensayo se estableció en el invernadero bajo techo sombra de la empresa Bioandes C.I Ltda. en el municipio de Sopetrán (Antioquia) con una temperatura aproximada de 25 °C y una luminosidad relativa de 9% - 11%.

Biomasa y crecimiento

Para medir la biomasa y el crecimiento total, se cosecharon cuatro plantas de seis meses de edad por cada tratamiento. La biomasa –masa aérea total (MA -g) y masa de raíces terrestre (MR -g)– se obtuvo mediante el pesaje del material vegetal secado en horno a 60 °C por cuatro días. La longitud de raíces (LR -cm) se determinó midiendo la raíz principal y todas la raíces secundarias y terciarias. Para determinar el área foliar (AF -cm²) se utilizó el medidor portátil LI-3000C, y para la altura total (AL -cm) se midió la longitud de la planta en el momento de la cosecha, desde la base hasta el ápice de crecimiento.

Diseño experimental

Los tratamientos se dispusieron en un arreglo completamente al azar con cuatro repeticiones. Las variables dependientes fueron eva-

luadas para el cumplimiento de los supuestos (Hoshmand, 2006) y los análisis fueron realizados con el programa SAS 9.2 para Windows.

Resultados

La información recopilada sobre los puntos de distribución de la *Vanilla* sp. silvestre en Colombia permitió identificar y visitar nueve sitios distribuidos en varios departamentos (Cuadro 2). Las raíces de las plantas recolectadas correspondieron a individuos silvestres que no presentaban señales visibles de enfermedad.

Mediante la secuenciación de las regiones ITS (datos no mostrados), realizada bajo los protocolos del Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad Nacional sede Medellín, fue posible identificar los hongos inoculados que correspondieron a géneros típicos endófitos de orquídeas y otras plantas (Foto 1). No fue posible la identificación de los aislados V-10 y V-13 por contaminaciones repetidas en el ADN.

En el Cuadro 3 se observan los valores netos para cada una de las variables de bio-



Foto 1. Morfología de colonias de algunos aislamientos inoculados en plantas de *Vanilla planifolia*.

Cuadro 3. Variables de biomasa medidas en plantas de *Vanilla planifolia* inoculadas con diferentes hongos.

Código	Endófito	MA (g)	AL (cm)	AF (cm ²)	LR (cm)	MR (g)
Ctrl		1.8902	15.5	160.5975	109.55	0.253
I-1	<i>Ceratobasidium</i>	1.6612	12.751	129.375	102.6	0.2642
I-2	<i>Ceratobasidium</i>	2.8325	34	194.61	161.3	0.456
V-3	<i>Phomopsis</i> sp.	2.3995	29.25	173.14	142.475	0.3972
V-4	Indet.	2.6255	24.75	199.275	138.65	0.4757
V-6	<i>Phomopsis</i> sp.	2.1345	30.5	170.715	133.275	0.3675
V-8	Indet	1.9145	23.5	130.245	155.9	0.4477
V-9	<i>Hypoxyylon</i> sp.	2.4005	30.25	173.7075	187.85	0.4907
V-10	Indet.	3.1382	32.5	210.3125	221.975	0.64
V-11	Xylariaceae	2.3477	34.75	181.495	106.875	0.3237
V-12	<i>Phoma</i> sp.	2.6252	25.25	171.685	210.375	0.648
V-13	Indet.	2.82	39.25	205.415	163.15	0.4652
V-14	<i>Phomopsis</i> sp.	2.1462	17.25	142.903	98.9	0.296
V-15	<i>Trichoderma</i> sp.	1.7465	15.75	252.1652	100.175	0.2742
V-16	<i>Bipolaris</i> sp.	1.9552	20.25	122.625	100.025	0.292
P-17	<i>Ceratobasidium</i>	2.0082	21.25	132.185	142.05	0.3707
P-18	<i>Ceratobasidium</i>	2.7707	34.25	169.1675	150.35	0.473
P-19	<i>Ceratobasidium</i>	2.0297	15.75	126.0325	77.925	0.2225
P-20	<i>Ceratobasidium</i>	2.268	20	145.4325	153.875	0.416
F<0.005		0.0431	0.0002	0.1148	0.0213	0.0173

Notaciones: MA(g) = masa aérea; AL(cm) = altura de la planta; AF(cm²) = área foliar; LR(cm) = longitud de raíces; MR(g) = masa de raíces.

masa. Después de validar los supuestos, los resultados indicaron la existencia de diferencias significativas, así: para las variables altura de la planta ($P = 0.0002$), longitud de raíces ($P = 0.0213$), masa de raíces ($P = 0.0173$) y masa aérea ($P = 0.0431$); mientras que para la variable área foliar no se presentaron diferencias ($P = 0.1148$).

Discusión

Además de los hongos formadores de micorriza, el grupo de hongos endófitos asociados a todos los órganos de las plantas ha ganado gran interés debido a sus múltiples funciones ecológicas (Brundrett 2006; Yuan *et al.*, 2009; Bayman y Otero, 2006). No obstante, la mayoría de los estudios se ha centrado más en la identificación de estos hongos que en sus posibles efectos sobre la nutrición de las orquídeas, la defensa contra patógenos, o los procesos adaptativos a factores generadores de estrés (Gamboa-Gaitán, 2006; Ordóñez, 2012).

Los hongos utilizados en este experimento (I-1, I-2, P-17, P-18, P-19 y P-20), obtenidos de Valadares (2009), pertenecen al grupo *Ceratobasidium* de la forma-género *Rhizoctonia* considerados como endófitos formadores de micorriza en orquídeas en Australia (Warcup y Talbot, 1967; Otero *et al.*, 2011), Escocia (Warcup y Talbot, 1967) Puerto Rico (Otero *et al.*, 2002, 2004, 2007; Porrás-Alfaro y Bayman, 2007), y Colombia (Mosquera-Espinosa, 2010). El aislamiento P-18, proporcionado por Valadares (2009), tuvo un efecto significativo en la variable longitud de planta; en contraste, el resto de los aislados no resultaron sobresalientes en las demás variables de biomasa. Esto indica que posiblemente para el resto de los hongos el aporte de nutrientes no es suficiente para aumentar las tasas de crecimiento o que para estas etapas de edad de la planta la asociación no es fundamental, como sí lo es en la germinación de semillas, y es facultativa para etapas donde ya la planta es fotosintéticamente activa (Porrás-Alfaro & Bayman 2007).

En variables de biomasa como longitud de planta y de raíces, y masa de raíces, los mejores tratamientos fueron V-13, V-11 y V-9, los dos últimos miembros de la familia Xylariaceae. Este grupo fue identificado por

Bayman *et al.* (1997); Chen *et al.* (2011, 2012); Xing *et al.* (2011); y Yuan *et al.* (2009) como endófito en orquídeas y aislado principalmente de hojas y raíces. Esta familia se caracteriza por poseer organismos comúnmente saprófitos y endófitos de orquídeas como *Lephantes*, *Dendrobium*, *Sobralia*, *Maxillaria*, *Psychilis* y *Epidendrum* (Bayman y Otero, 2006) al igual que de otras plantas como en *Guarea guidonia* Meliaceae (Gamboa-Gaitán y Bayman 2001), entre otras, (Davis *et al.*, 2003). Igualmente son habitantes comunes de la madera y de sustratos en descomposición (Whalley, 1996). Estudios in vitro demostraron que tanto *Xylaria* como especies del género *Hypoxilon* son capaces de producir enzimas como calasas, celulasas, celulobiohidrolasas y celulo-deshidrogenasas, involucradas en la degradación de celulosa y lignina, principales componentes de sustratos usado en el cultivo de orquídeas (Whalley 1996; Pointing *et al.*, 2003). De esta forma, la degradación de materiales leñosos como chips de madera y hojarasca, sustratos en los que crece la vainilla, contribuye a la solubilización y disponibilidad de nutrientes para la planta, mejorando la nutrición de los medios de crecimiento.

Son escasos los estudios en los que se muestra que especies de la familia Xylariaceae puedan proporcionar beneficios al vivir como endófitos. La aplicación de inóculos con endófitos del género *Xylaria* reduce de manera efectiva los daños causados por patógenos en *Theobroma cacao* (Yuan *et al.*, 2009). Los estudios de Davis *et al.* (2003) muestran y caracterizan metabolitos secundarios que incluyen antimicóticos y antibióticos controladores de patógenos de plantas y humanos. Whalley y Edward (1998) caracterizaron como metabolitos principales los siguientes: dihidroisocumarinas y derivados, ácido succínico y derivados, alcoholes sesquiterpenos, butirrolactonas, citocalasinas, derivados del naftaleno y ácidos grasos de cadenas largas.

Los grupos *Phomopsis* (V-3, V-6, y V-14), *Bipolaris* (V-16), *Phoma* sp. (V-12) y *Trichoderma* (V-15) no presentaron comportamiento sobresaliente en las variables evaluadas y corresponden a endófitos anteriormente reportados para orquídeas en los géneros *Den-*

drobium (Chen *et al.*, 2012), *Stelis*, *Lepanthes*, *Maxillaria*, *Epidendrum* (Bayman y Otero, 2006) y *Odontoglossum* (Singh *et al.*, 2011).

No obstante los hallazgos sobre la posibilidad de algunos hongos inoculados como potenciales patógenos, las plántulas de vainilla en este experimento no presentaron sintomatología de daños en sus órganos (raíces, tallo u hojas), probablemente porque en este caso los hongos inoculados funcionaron como agentes de descomposición del sustrato utilizado, chips de madera y vermicompost, típico en sitios donde se encuentran las raíces de vainilla. Así mismo, la inoculación de organismos de este grupo pueden no sólo favorecer a la planta en la disponibilidad de nutrientes en el sustrato sino también en la secreción de enzimas o metabolitos secundario que puedan evitar o biocontrolar patógenos (Ordóñez, 2012).

Mosquera-Espinosa (2010) demostraron por primera vez el uso de aislamientos de *Rhizoctonia* binucleada (*Ceratobasidium*) obtenidos a partir de orquídeas como un posible biocontrolador de *R. solani*, patógeno de arroz, y otros patógenos como *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp. y *Pythium* sp., alternativa promisoría en estrategias de biocontrol dentro de un programa de manejo integrado.

Por otra parte, los hongos endófitos pueden funcionar como agentes patógenos latentes durante largos periodos y constituir interacciones asintomáticas, por lo que los micro-organismos en tal situación se pueden considerar como endófitos temporales, tal como se ha observado en otras plantas (Schulz y Boyle, 2006; Gamboa-Gaitán, 2006). Sin embargo, por mutación, un cambio en el ambiente, el estado nutricional o la edad de la planta, un endófito latente puede convertirse en patógeno o viceversa (Ovando *et al.*, 2005; Lana *et al.*, 2011). Por esta razón, es importante reconocer los efectos fisiológicos de los hongos endófitos sobre las plantas y el potencial que puedan tener estos microorganismos en la protección o mejoramiento en la nutrición de las plantas.

Conclusiones

- En este estudio las tasas de crecimiento y desarrollo de las plantas de *V. planifolia*

fueron estimuladas por tres hongos endófitos aislados de plantas silvestres de vainilla y de otras orquídeas. Además, se observó la diversidad de hongos endófitos asociados con las raíces de vainilla, muchos de ellos reportados como patógenos y otros como benéficos.

Agradecimientos

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y la Universidad Nacional de Colombia por el apoyo financiero para la elaboración de este estudio a través del proyecto: Programa Cultivo e Industrialización de la Vainilla en Colombia 2008-2011. A la empresa Bioandes C.I Ltda. por el alquiler de sus instalaciones, personalmente a Rafael Valadares por el suministro de los hongos, a los pares evaluadores y especialmente a todo el equipo del proyecto vainilla.

Referencias

- Bayman, P. y Otero, J. T.. 2006. Microbial endophytes of orchid roots. En: B. Schulz, C. J. Boyle y T. N. Sieber. (eds.). Springer, Berlin, Heidelberg. Microbial Root Endophytes 9.153 – 178.
- Bayman, P.; Mosquera-Espinosa, A.T.; Porrás-Alfaro, A. 2011. Mycorrhizal relationships of vanilla and prospects for biocontrol of root rots. En: D. Havkin-Frenkeland F. Belanger (eds.). Handbook of vanilla science and technology. Blackwell Publishing, Reino Unido. p. 266 – 280.
- Bayman, P.; Lebrón, L. L.; Tremblay, R. L.; y Longe, D. J.. 1997. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). New Phytol. 135:143 - 149
- Brundrett, M. C. 2006. Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. En: B. Schulz, C. J. Boyle y T. N. Sieber. (eds.). Microbial root endophytes. Springer, Berlin, Heidelberg. 9:281 - 298
- Bucellato, F. 2011. Vanilla in perfumery and beverage. En: D. Havkin-Frenkeland f. belanger. (eds.). Handbook of vanilla science and technology. Blackwell Publ. Reino Unido. p. 235 - 240.
- Cameron, D. D.; Johnson, I.; Leake, J. R; y Read, D. J. 2007. Mycorrhizal Acquisition of Inorganic Phosphorus by the Green-leaved Terrestrial Orchid *Goodyera repens*. Annals of Botany 99: 831–834.
- Cameron D.D., I. Johnson., J.R. Leake, y D.L. Read. 2006. Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. Ann. Bot. 99:831 – 834.

- Chen, J.; Wang, H.; y Guo, S. X. 2012. Isolation and identification of endophytic and mycorrhizal fungi from seeds and roots of *Dendrobium* (Orchidaceae). *Mycorrhiza* 22(4):297 - 307
- Chen, J.; Hu, K. X.; Hou, X. Q.; y Guo, S. X. 2011. Endophytic fungi assemblages from 10 dendrobium medicinal plants (Orchidaceae). *World J. Microb. Biot.* 27:1009 - 1016.
- Davis, E.C.; Franklin, J. B.; Shaw, A. J.; y Vilgalys, R. 2003. Endophytic *Xylaria* (Xylariaceae) among liworts and angiosperms: phylogenetics, distribution, and symbiosis. *Am. J. Bot.* 90:1661 - 1667
- Gamboa-Gaitán, M. A y Bayman, P. 2001. Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea guidonia*). *Biotropica* 33:352 - 360.
- Gamboa-Gaitán, M. A. 2006. Hongos endófitos tropicales. Conocimiento actual y perspectivas. *Acta Biológica Colombiana* 11:3 - 20.
- Havkin-Frenkel, A.; Belanger, F. C.; Booth, D. Y.; Galasso, K. E.; Tangel, F. T.; y Hernández, C. J. 2011. A comprehensive study of composition and evaluation of vanilla extracts in us retail stores. En: D. Havkin-Frenkel y F. Belanger (eds.). *Handbook of vanilla science and technology*. Blackwell Publ., Reino Unido. p. 220 - 234.
- Hoshmand, A. R. 2006. Design of experiments for agriculture and the natural science. 2da edición Chapman y Hall/crc. Boca raton-Florida.
- Lana, T. G.; Azevedo, J. L.; Pomella, A. W.; Monteiro, R. T.; Silva, C. B.; y Araújo, W. L. 2011. Endophytic and pathogenic isolates of the cacao fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa* (Tricholomataceae) are indistinguishable based on genetic and physiological analysis. *Gen. Mol. Res.* 10:326 - 334
- Ledezma, E.; Ramírez, G.; y Pino-Benitez, N. 2006. Forest orchids of the Chocó region. *Lyonia* 10:17 - 31.
- Misas, G. 2005. Orquídeas de la Serranía del Baudó, ConCreto, Chocó- Colombia. 755 p.
- Mosquera-Espinosa, A. T. 2010. Evaluación del efecto biocontrolador de *Rhizoctonia* de orquídeas sobre *Rhizoctonia solani* Kühn patógeno del suelo en arroz (*Oryza sativa* L.). Tesis de maestría, Doctorado, Fac. Ciencias. Agropec. U.N, Palmira, Colombia. 140 p.
- Ordóñez, N. F. 2012. Efecto de hongos endófitos de orquídeas del grupo *Rhizoctonia* y otros endófitos anamorfos sobre el desarrollo de plantas de *Vanilla planifolia* Andrews. (Orchidaceae). Tesis de maestría, Fac. Ciencias Agrarias. U.N. Medellín, Colombia. 73 p.
- Ordóñez, N. F.; Osorio, A. I.; Calle, J. E.; Díez, M. C.; y Moreno, F. H. 2012. La vainilla en Colombia y el Mundo. En: Moreno F.H y Díez M. C. (eds.). *Cultivo de Vainilla, Contribuciones para el desarrollo de su cadena productiva en Colombia*. Medellín-Colombia. p. 11 - 23.
- Otero, J. T.; Ackerman, J. D.; y Bayman, P. 2002. Diversity and host specificity of mycorrhizal fungi from tropical orchids. *Am. J. Bot.* 89:1852 - 1858.
- Otero, J. T.; Ackerman, J. D.; y Bayman, P. 2004. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Mol. Ecol.* 13:2393 - 2404.
- Otero, J. T.; Flanagan, N. S.; Herre, E. A.; Ackerman, J. D.; y Bayman, P. 2007. Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid, *Ionopsis utricularioides*. *Am. J. Bot.* 94:1944 - 1950.
- Otero, J. T.; Thrall, P. H.; Clements, M.; Burdon, J. J.; y Miller, J. T. 2011. Codiversification of orchids (Pterostylidinae) and their associated mycorrhizal fungi. *Aust. J. Bot.* 59(5):480 - 497.
- Ovando, I.; Damon, A.; Bello, R.; Ambrosio, D.; Albores, V.; Adriano, L.; y Salvador, M. 2005. Isolation of endophytic fungi and their mycorrhizal potential for the tropical epiphytic orchids *Cattleya skinneri*, *C. aurantiaca* and *Brassavola nodosa*. *Asian J. Plant. Sci.* 4:309 - 315.
- Pointing, S. B.; Parungao, M. M.; y Hyde, K. D. 2003. Production of wood-decay enzymes, mass loss and lignin solubilization in wood by tropical Xylariaceae. *Mycol. Res.* 107:231 - 235.
- Porrás-Alfaro, A. y Bayman, P. 2007. Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *Mycol.* 99:510 - 525.
- Rasmussen, H. N. 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant Soil* 244:149 - 163.
- Schulz, B y Boyle, C. 2006. What are endophytes? En: B. Schulz, C. J. Boyle y T. N. Sieber. (eds.). *Microbial root endophytes*. Springer, Berlin, Heidelberg. 9.1 - 13
- Schulz, B. 2006. Mutualistic interactions with fungal root endophytes. En: B. Schulz, C. J. Boyle y T. N. Sieber. (eds.). *Microbial root endophytes*. Springer, Berlin, Heidelberg. 9:261 - 279.
- Singh, S. K.; Strobel, G. A.; Knighton, B.; Geary, B.; Sears, J.; y Ezra, D. 2011. An endophytic *Phomopsis* sp. possessing bioactivity and fuel potential with its volatile organic compounds. *Mol. Ecol.* 61:729 - 739.
- Smith, S. y Read, D. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. 2da edición. Academic Press. Cambridge.
- Stone, J. K.; Bacon, C. W.; y White, J. F. 2000. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. En: C. D Bacon y J. F. White. (eds.). *Microbial endophytes*. 3-29. Marcel Dekker, Inc Nueva York.

- Valadares, R. B. 2009. Diversidade micorrízica em *Coppensia doniana* (Orchidaceae) e filogenia de fungos micorrízicos asociados à subtribo oncidinae. Tesis de maestría. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba-Brasil. 98 p.
- Warcup, J. H. y Talbot, P. H. 1967. Perfect estates of rhizoctonias associated with orchids. *New Phytol* 66:631 – 641.
- Whalley, A. J. y Edwards, R. L. 1998. The Xylariaceae: a case study in biological and chemical diversity. *Pure Appl. Chem.* 70:2123 - 2133.
- Whalley, A. J. 1996. The xylariaceous way of life. *Mycol. Res.* 100:897 - 922.
- Xing, Y. M.; Chen, J.; Cui, J. L.; Chen, X. M.; y Guo, S. X. 2011. Antimicrobial activity and biodiversity of endophytic fungi in *Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thyrsiflorum* from Vietman. *Curr. Microbiol.* 62:1218 – 1224.
- Yuan, Z. L.; Chen, Y. C.; y Yang, Y. 2009. Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting an epiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*): estimation and characterization. *World J. Microb. Biot.* 25:295 - 303.