

UNIVERSIDAD ESTATAL DE CUENCA.
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA.



“ AISLAMIENTO DE MICORRIZAS Y EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN SIMBIÓTICA DE LAS SEMILLAS DE LAS ORQUÍDEAS EN EL ORQUÍDEARIO DE LA UNIVERSIDAD DE CUENCA.”

**TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO.**

DIRECTORA:

Dra. Raffaella Ansaloni.

TESISTAS:

Andrea Priscila Crespo Santander.

María Belén Ortega Guaricela.

Cuenca- Ecuador

2015



RESUMEN

La interacción orquídea-hongo es indispensable en la naturaleza para un eficiente crecimiento de las semillas de orquídea. En el presente estudio se aislaron dos hongos micorrízicos que fueron probados para la germinación simbiótica con semillas de cinco especies de orquídeas del Orquideario de la Universidad de Cuenca. Se utilizaron medios de cultivo nutritivos para la obtención y purificación de hongos micorrízicos: y un medio enriquecido con avena para la germinación simbiótica con las semillas. Se formuló el medio Murashige & Skoog enriquecido con coco para germinación del grupo control de semillas. Los géneros de los hongos micorrízicos aislados fueron caracterizados a nivel de género como *Tullasnella* sp. y *Cerratobasidium* sp. Estos hongos se emplearon para evaluar la germinación simbiótica con las semillas de orquídeas *Epidendrum*, *Oncidium*, *Cochlioda*, *Masdevallia* y *Sympyglossum*. Se compararon los períodos de crecimiento las semillas con el grupo control. Todas las semillas evaluadas microscópicamente llegaron al estadio cinco en un periodo de crecimiento mínimo de siete días. El análisis de resultados permite concluir el crecimiento de semillas de orquídeas es optimizado en asociación micorrízica con *Cerratobasidium* sp., y exposición a la luz.

Palabras Claves: Orquídea, micorriza, cerratobasidium



ABSTRACT

Orchid-fungus interaction is essential in nature for the efficient growth of orchid seeds. In this study two mycorrhizal fungi were tested for symbiotic seed germination of five species of orchids from the Orchid greenhouse the University of Cuenca. Nutritious culture media were used for mycorrhizal fungi isolation and purification. For symbiotic germination, and oat-based nutritious medium was used. The control group of orchids grown in Murashige-Skoog medium seeded with coconut. Mycorrhizal fungi isolates were morphologically determined as *Tullasnela* sp. and *Cerratobasidium* sp. Furthermore, the growth efficiency in symbiotic associations of the isolated mycorrhizae fungi with seeds of *Epidendrum*, *Oncidium*, *Sympyglossum*, *Cochlioda* and *Masdevallia* orchids was tested, comparing with a control group. All the seeds evaluated microscopically reached the stage 5 after a minimum period of growth of seven days. These results allowed us to conclude growth by means of mycorrhizae association with the fungus *Cerratobasidium* sp., and light exposure.

Key Words: Orchid mycorrhiza, cerratobasidium



ÍNDICE GENERAL

Contenido

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
ÍNDICE GENERAL.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE GRÁFICOS	7
ÍNDICE DE ANEXOS	8
.....	10
DEDICATORIA.....	14
AGRADECIMIENTO.....	15
INTRODUCCIÓN	16
OBJETIVO GENERAL:	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	17
CAPÍTULO I.	18
1. MARCO TEÓRICO.....	18
1.1 ORQUÍDEAS.....	18
1.1.1 Generalidades:.....	18
1.1.2 Descripción:	18
1.1.2.1 <i>Cochlioda</i> :.....	18
1.1.2.2 <i>Epidendrum</i> :	19
1.1.2.3 <i>Masdevallia</i> :.....	20
1.1.2.4 <i>Pleurothallis</i> :	21
1.1.2.5 <i>Oncidium</i> :	22
1.1.2.6 <i>Sympyglossum</i> :	23
1.1.3 Distribución de las Orquídeas endémicas del Ecuador:.....	24
1.2 MICORRIZAS.....	25
1.2.1 Generalidades	25
1.2.2 Distribución de micorrizas en la naturaleza	25
1.2.3 MICORRIZAS DE LAS ORQUÍDEAS	26
1.2.3.1 Relación micorriza-orquídea.....	26



UNIVERSIDAD DE CUENCA.

1.2.3.2 Géneros simbiontes orquidioides	27
1.3 DESARROLLO DE LAS SEMILLAS EN SIMBIÓSIS	30
CAPÍTULO II.	33
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
2.1 ÁREA DE ESTUDIO Y MUESTRO	33
2.2 MATERIALES Y REACTIVOS:	33
2.3 CULTIVOS IN VITRO PARA GERMINACIÓN DE ORQUÍDEAS:	33
2.3.1 MEDIOS DE CULTIVO	33
2.3.1.1 Medio Murashige y Skoog (MS) modificado Coco.....	33
2.3.1.2 MEDIO FIM (Fungi Isolation Medium):	34
2.3.1.3 MEDIO PDA (Agar Dextrosa-Papa):.....	34
2.3.1.4 MEDIO OMA (Agar Avena):.....	34
2.3.2 MÉTODOS.....	34
2.3.2.1 PREPARACIÓN Y SIEMBRA DE LA RAÍZ DE ORQUÍDEAS: ..	35
2.3.2.2 AISLAMIENTO DE MICORRIZAS EN PDA	37
2.3.2.3 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION MORFOLOGICA DEL HONGO:.....	38
2.3.2.4 PREPARACIÓN DE LAS SEMILLAS DE ORQUÍDEAS	39
2.3.2.5 SIEMBRA DE SEMILLAS DE ORQUÍDEAS Y SEMILLAS MAS MICORRIZA	40
CAPÍTULO III.	41
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
3.1 IDENTIFICACIÓN DEL HONGO.....	41
3.2 RESULTADOS DE CRECIMIENTO DE LAS SEMILLAS.....	42
3.3 ANÁLISIS DE CRECIMIENTO DE ORQUIDEAS EN FUNCIÓN DE LAS CONDICIONES APLICADAS EN LA INVESTIGACIÓN:	46
3.3.1 Comparación entre el porcentaje de crecimiento de cada especie de orquídeas en E5 sembradas en oscuridad en medio OMA.....	46
3.3.2 Comparación entre el porcentaje de crecimiento de cada especie de orquídeas en E5 sembradas en luz en medio OMA.	47
3.3.3 Comparación del tiempo de crecimiento de cada especie de orquídeas en E5 sembradas en oscuridad en medio OMA.....	48
3.3.4 Comparación del tiempo de crecimiento de cada especie de orquídeas en E5 sembradas en luz en medio OMA.	49



3.3.5 Comparación entre el porcentaje de crecimiento por especie en E5 oscuridad y luz. Medio OMA	50
3.3.6 Comparación entre el tiempo en días por especie en E5 oscuridad y luz. Medio OMA	51
CONCLUSIONES:.....	52
RECOMENDACIONES:	54
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:	55
ANEXOS	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Principales partes de la flor de orquídea.....	18
Figura 2 Cochlioda sp.	19
Figura 3 Epidendrum sp.	20
Figura 4 Masdevallia sp.	21
Figura 5 Pleurothallis sp.	22
Figura 6 Oncidium sp.	23
Figura 7 Sympyglossum sp.	24
Figura 8 Distribución de las Orquídeas Endémicas del Ecuador y Sistema de Áreas Protegidas.....	24
Figura 9 Características generales del género Rhizoctonia.A.- Género-forma Rhizoctonia a. Células largas y ramificadas en ángulo 45 ⁰ (b) y 90 ⁰ . C. Clamp. B.- Células moniloides.....	30
Figura 10 Etapas de crecimiento. E0: no hay germinación, E1: producción de uno o más rizoides, E2: ruptura de la testa, E3: formación de la hoja primordial, E4: aparición de la primera hoja verdadera, E5: elongación de la hoja verdadera y aparición de la raíz.	31
Figura 11 Esquema de división de la micorriza de Dendrobium sp. (D:nombre de la raíz de la orquídea), I: Inicio, M: Medio, P: Punta, A: Izquierda, B: Derecha.....	36



UNIVERSIDAD DE CUENCA.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Hongos aislados a partir de orquídeas (Andrea y Belén.)	41
Tabla 2 Porcentaje de crecimiento de semillas de orquídeas, siembra en oscuridad: medio OMA. (Andrea Crespo y Belén Ortega).....	42
Tabla 3 Porcentaje de crecimiento de semillas de orquídeas, siembra en oscuridad: Medio Ms modificado con coco. (Andrea Crespo y Belén Ortega).....	42
Tabla 4 Porcentaje de crecimiento de semillas de orquídeas, siembra en luz: medio OMA (Andrea Crespo y Belén Ortega)	44
:Tabla 5 Porcentaje de crecimiento de semillas de orquídeas, siembra en luz: Medio Ms modificado con adición de coco. (Andrea Crespo y Belén Ortega).....	44

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Grafico 1 Comparación entre el porcentaje de crecimiento de cada especie de orquídeas en E5. Siembra en Oscuridad. Medio OMA.....	46
Grafico 2 Comparación entre el porcentaje de crecimiento de cada especie de orquídeas en E5. Siembra en Luz. Medio OMA	47
Grafico 3 Comparación del tiempo de crecimiento en días para cada especie en E5. Siembra en Oscuridad. Medio OMA	48
Grafico 4 Comparación del tiempo de crecimiento para cada especie en E5. Siembra en Luz. Medio OMA	49
Grafico 5 Comparación entre Porcentaje de crecimiento por especie en E5 en luz y oscuridad. Medio OMA.....	50
Grafico 6 Comparación del tiempo en días de cada especie en E5 en luz y oscuridad. Medio OMA.....	51



ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.....	58
Anexo B FOTOS DE COLONIAS AISLADAS.....	60
Anexo C FOTOS DE CRECIMIENTO: SIEMBRA EN OSCURIDAD.....	63
Anexo D FOTOS DE CRECIMIENTO: SIEMBRA EN LUZ.....	76
Anexo A 1	58
Anexo A 2 Medio MS modificado coco.....	59
Anexo A 3 Medio FIM (Fungi Isolation Medium):.....	59
Anexo A 4 Medio PDA (Agar Papa Dextrosa):.....	59
Anexo A 5 Medio OMA(Agar Avena):.....	59
Anexo B 1 En las fotografías se puede observar pequeños pelotones de los hongos micorrízicos como indico Lawrence junto a Brian G KEEL Y Beth Kaplin.....	60
Anexo B 2 OSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE LAS COLONIAS EN MEDIO PDA.....	61
Anexo B 3 Colonias de Cerratobasidium sp.(Andrea Crespo y Belén Ortega.)	61
Anexo B 4 Hifas y estructuras del hongo del género Cerratobasidium vistas al microscopio, lente 40x. (Andrea Crespo y Belén Ortega)	62
Anexo C 1 Siembra en oscuridad de semillas de Epidendrum sp, vista al microscopio con lente de 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.).....	64
Anexo C 2 Siembra en oscuridad de semillas de Epidendrum sp. vista al microscopio con lente de 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.).....	66
Anexo C 3 Siembra en oscuridad de semillas de Cochlioda sp. vistas al microscopio con lente 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.).....	67
Anexo C 4 Siembra en oscuridad de semillas de Oncidium sp. vistas al microscopio con lente de 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.).....	68
Anexo C 5 Siembra en oscuridad de semillas de Masdevallia sp. vistas al microscopio con lente de 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.).....	69



Anexo C 6 Siembra en oscuridad de semillas de <i>Oncidium cucullatum</i> , vistas al microscopio con lente de 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.)	71
Anexo C 7 Siembra en oscuridad de semillas de <i>Oncidium nubigenum</i> , vistas al microscopio con lente de 10x. (Andrea Crespo y Belén Ortega.)	73
Anexo C 8 Siembra en oscuridad de semillas de <i>Sympyglossum sanguineum</i> . Vistas al microscopio con lente de 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.)	75
Anexo D 1 Siembra en luz de semillas de <i>Epidendrum sp.</i> vistas al microscopio con lente de 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.)	77
Anexo D 2 Siembra en luz de semillas de <i>Sympyglossum sp</i> , vistas al microscopio con lente de 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.)	79
Anexo D 3 Siembra en luz de semillas de <i>Oncidium cucullatum</i> , vistas al microscopio con lente de 10x. (Andrea Crespo y Belén Ortega.)	81
Anexo D 4 Siembra en luz de semillas de <i>Masdevallia falcata</i> , vistas al microscopio con lente de 10x. (Andrea Crespo y Belén Ortega.)	83
Anexo D 5 Siembra en luz de semillas de <i>Masdevallia dimorfotrica</i> , vistas al microscopio con lente de 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.)	85
Anexo D 6 Siembra en luz de semillas de <i>Oncidium cucullatum</i> , vistas al microscopio con lente de 10x. (Andrea Crespo y Belén Ortega.)	87
Anexo D 7 Siembra en luz de semillas de <i>Oncidium nubigenum</i> , vistas al microscopio con lente de 10x. (Andrea Crespo y Belén Ortega.)	89
Anexo D 8 Siembra en luz de semillas de <i>Sympyglossum sp.</i> vistas al microscopio con lente de 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.)	91
Anexo D 9 Siembra en luz de semillas de <i>Sympyglossum sanguineum</i> , vistas al microscopio con lente de 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.)	93
Anexo D 10 Siembra en luz de semillas de <i>Sympyglossum sp</i> , vistas al microscopio con lente de 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.)	95



María Belén Ortega Guaricela de la tesis "AISLAMIENTO DE MICORRIZAS Y EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN SIMBIÓTICA DE LAS SEMILLAS DE LAS ORQUÍDEAS EN EL ORQUIDEARIO DE LA UNIVERSIDAD DE CUENCA", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora

Cuenca 25 de Mayo, 2015

María Belén Ortega Guaricela

C.I: 0105184774



Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

Andrea Priscila Crespo Santander de la tesis "AISLAMIENTO DE MICORRIZAS Y EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN SIMBIÓTICA DE LAS SEMILLAS DE LAS ORQUÍDEAS EN EL ORQUÍDEARIO DE LA UNIVERSIDAD DE CUENCA", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora

Cuenca 25 de Mayo, 2015

Andrea Priscila Crespo Santander

C.I: 0302581657

UNIVERSIDAD DE CUENCA.



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

María Belén Ortega Guaricela , autora de la tesis "AISLAMIENTO DE MICORRIZAS Y EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN SIMBIÓTICA DE LAS SEMILLAS DE LAS ORQUÍDEAS EN EL ORQUIDEARIO DE LA UNIVERSIDAD DE CUENCA", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca 25 de Mayo, 2015

María Belén Ortega Guaricela

C.I: 0105184774

UNIVERSIDAD DE CUENCA.



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

Andrea Priscila Crespo Santander, autora de la tesis "AISLAMIENTO DE MICORRIZAS Y EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN SIMBIÓTICA DE LAS SEMILLAS DE LAS ORQUÍDEAS EN EL ORQUIDEARIO DE LA UNIVERSIDAD DE CUENCA", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca 25 de Mayo, 2015



Andrea Priscila Crespo Santander

C.I: 0302581657



DEDICATORIA

A Dios, por regalarme la vida, por la fuerza y sabiduría a lo largo de mi vida, por permitirme terminar mi carrera universitaria y por guiarme por el camino adecuado.

A mis padres Marcelo y Patricia, por el ejemplo de perseverancia y responsabilidad, por sus consejos, apoyo, por ser mi soporte día a día y por el amor incondicional que me han brindado, y que me han hecho ser la persona que soy hoy en día.

A mis abuelitas y a mi hermano por el gran apoyo, compañía y motivación en cada momento de mi vida.

Andrea

Esta tesis está dedicada a Dios por darme la fuerza y sabiduría para llegar a ser profesional y sobre todo a mis padres Hugo e Isabel quienes con su esfuerzo, sacrificio, fe y apoyo supieron estar conmigo en este largo camino soportando las adversidades y compartiendo mis logros; llegando a ser una parte indispensable en mi vida.

María Belén.



AGRADECIMIENTO

En nuestro trabajo de tesis agradecemos a Dios por bendecirnos a lo largo de este gran paso para nuestra vida profesional.

Un especial agradecimiento a nuestra Directora de tesis, Dra. Raffaella Ansaloni por el apoyo incondicional, por compartirnos todos sus conocimientos y experiencia, por su esfuerzo y dedicación para la culminación satisfactoria de nuestra investigación.

Gracias a nuestras queridas familias por el amor, apoyo y motivación para alcanzar nuestras metas a lo largo de nuestras vidas.

A la Dra. María Elena Cazar Phd y al Dr. Geovany Larriva por apoyo brindado en la disposición y prestación del laboratorio.

A la Bióloga María Elisa Durán por brindarnos sus conocimiento y experiencia y asesoramiento en la identificación del hongo.

A la Dra. Mónica Narváez por su apoyo incondicional y brindarnos sus conocimientos y experiencia en el Laboratorio del Orquideario.

A todos nuestros profesores, quienes nos han impartido todos los conocimientos a lo largo de nuestra carrera ya que son parte importante en nuestra formación académica.

A todos y cada uno de ustedes mil gracias Andrea y María Belén.



INTRODUCCIÓN

El estudio de micorrizas refleja una potencial ayuda para el desarrollo y conservación de la gran familia de Orquidáceas; ya que esta familia de plantas es una de las más numerosas contando que se han registrado 800 géneros en el mundo habiendo 219 en el Ecuador; por lo que es muy importante realizar el estudio de germinación y propagación de las mismas, debido a que las orquídeas dependen de las de micorrizas para su nutrición y germinación. (Endara, 2006).

Las semillas de orquídeas son plantas carentes de endospermo, es decir, no tienen fuentes nutricionales para su germinación; lo que constituye un problema para su desarrollo, así es necesario reproducir la simbiosis existente en la naturaleza para mejorar el desarrollo, supervivencia y conservación de las especies. (Rivas, 2008).

El aislamiento de hongos micorrízicos es de gran utilidad ya que permite un mejor desarrollo de la planta ayudando a una mejor propagación de cultivos de orquídeas. En la naturaleza la simbiosis hongo-planta permite brindar a la orquídea los nutrientes principales para germinar y desarrollarse, ya que sin esta asociación la planta no sobrevive; en la presente investigación se realizó esta simbiosis en laboratorio, es decir que se realizó la siembra de las semillas conjuntamente con el hongo aislado; ya que uno de los problemas en la propagación de orquídeas se debe a la escasa germinación de sus semillas, debido a la deficiente reserva nutritiva del embrión. (Zettler, 2013).

Existen muchos estudios realizados sobre aislamientos de micorrizas (Zettler, 2013) donde se encontraron hongos del género *Rhizoctonia*, que fueron aislados y luego sembrados in vitro en simbiosis con semillas de orquídeas, obteniendo buenos resultados para la propagación de diferentes especies de orquídeas.

En la presente investigación se aisló e identifico morfológicamente dos especies *Tulasnella* y *Cerratobasidium*, y fueron probados para la germinación simbiótica con 5 especies de orquídeas proporcionadas por el orquideario de



la Universidad de Cuenca; para su posterior análisis de desarrollo en las primeras etapas de germinación y mejorar la propagación de semillas en cultivos en el laboratorio del orquideario de la Universidad de Cuenca.

El presente estudio se basó en los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar la germinación producto de la simbiosis entre semillas de orquídea y las micorrizas aisladas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Aislar micorrizas a partir de muestras del campo.
- Determinar morfológicamente los hongos presentes en las micorrizas recolectadas.
- Adaptar las micorrizas en medios de cultivo nutritivo
- Sembrar en medios de cultivo la simbiosis hongo-planta
- Comparar la germinación de orquídeas con el hongo y sin él, en las fases tempranas de crecimiento.

CAPÍTULO I.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 ORQUÍDEAS.

1.1.1 Generalidades:

Las orquídeas constituyen la familia de plantas más larga del mundo, estimando más de 25.000 especies, son plantas de gran variabilidad debido a su distribución, prevaleciendo en climas cálidos. (Dearnaley, 2007). En el Ecuador una de cada cuatro especies es una orquídea y las podemos encontrar en los bosques tropicales y en los páramos helados frecuentemente sobre los árboles, también pueden hallarse sobre: lava volcánica, suelo, rocas, y cactus. (Salazar, 2005)

1.1.2 Descripción:

Se diferencia principalmente las siguientes estructuras:

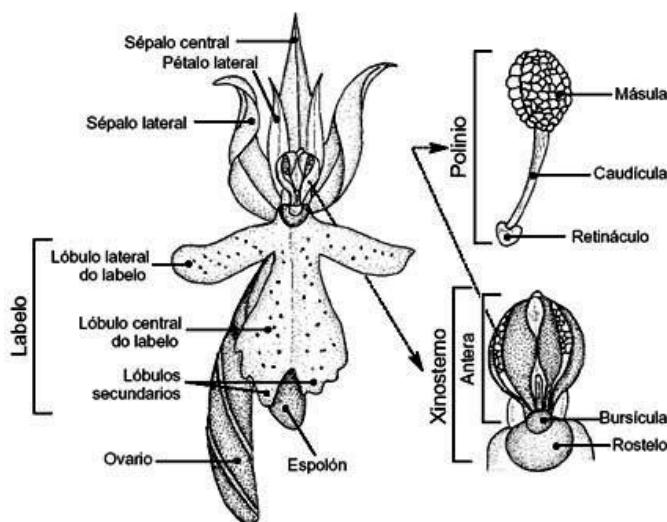


Figura 1 Principales partes de la flor de orquídea.

Fuente: C. Aedo y A. Herrero. 2005. Partes de la Flor de Orquídea

1.1.2.1 *Cochlioda*:

- **Etimología:** Del griego Kochliodes que significa caparazón de caracol, llamado así por la forma del callo labelar de la especie.



- **Descripción:** Se caracteriza por pseudolobulos de un solo entrenudo que pueden ser unifoliados o bifoliados, la inflorescencia nace de la axila de las vainas y las flores no tienen espolón. Son polinizados por el colibrí.
- **Distribución y Hábitat:** crecen en bosques nublados en alturas de 2000 a 3500 metros. Se encuentran distribuidos en Colombia, Perú, Bolivia y En el Ecuador se conocen dos especies. (Calaway, Escobar, 1998)



Figura 2 *Cochlioda* sp.

Fuente: Calaway, 1998.

1.1.2.2 *Epidendrum*:

- **Etimología:** del griego epi: sobre y dendrom: árbol, que hace referencia al hábitat usual de la mayoría de sus especies.
- **Descripción:** se caracterizan por tener cañas como tallos o pseudolobulos no superpuestos, sus hojas son planas y sus flores sin una articulación entre el ovario y el pedúnculo. Son polinizadas por las polillas, colibríes o mariposas.
- **Distribución y Hábitat:** crecen en los bosques forestales húmedos fríos de los Andes. Este género está constituido por más de 1000 especies distribuidos en América tropical a 3500

metros sobre el nivel del mar en el Ecuador se encuentran 442 especies de las cuales 324 se han identificado. (Calaway, 2000)



Figura 3 Epidendrum sp.
(Andrea Crespo y Belén Ortega)

1.1.2.3 Masdevallia:

- **Etimología:** llamada así en honor de José Masdevall botánico y médico en la corte de Carlos III de España.
- **Descripción:** se caracterizan por la falta de pseudolobulos, sus hojas son pecioladas o subpecioladas, la Inflorescencia emerge desde cerca de la base con un anillo, el ovario y el pedicelos se encuentran unidos. La polinización se da por moscas y por los colibríes.
- **Distribución y Hábitat:** este género se desarrolla en los bosques húmedos y fríos entre alturas de 600 a 3000 metros sobre el nivel del mar. Se encuentran desde México hasta Brasil y en Ecuador hay 226 especies que han sido reportados. (Calaway, 2002)



Figura 4 *Masdevallia* sp.
(Andrea Crespo y Belén Ortega)

1.1.2.4 Pleurothallis:

- **Etimología:** del griego pleuron: costilla y thallos: disparar; en referencia a los muchos tallos que se parecen a nervios además de su hoja sola que sale de cada vértice.
- **Descripción:** se caracteriza por la falta de pseudolobulos, los rizomas pueden ser cortos o largos, su hoja solitaria y la inflorescencia terminal, además hay una unión entre el pedicelo y los ovarios. La polinización se da por pequeñas moscas comúnmente del género *Lycoria*, *Bradesia* o *Drosophila*.
- **Distribución y Hábitat:** crecen generalmente en los bosques húmedos con niebla a una altura sobre el nivel del mar aproximada de 1000 a 2500 metros. En Ecuador se han reportado 472 especies de 1215. (Calaway, 2003)



Figura 5 Pleurothallis sp.

(Andrea Crespo y Belén Ortega)

1.1.2.5 *Oncidium*:

- **Etimología:** del griego onkos: tumor o hinchazón haciendo referencia al callo verrugoso del labio.
- **Descripción:** caracterizada por la presencia de pseudolobulos unifoliados o bifoliados, la inflorescencia es extremadamente variable y producida a partir de las axilas de las vainas, las flores no contienen espolón. Son generalmente polinizadas por abejas del género Centris.
- **Distribución y Hábitat:** generalmente se encuentran sobre los 4000 metros del nivel del mar. En el Ecuador han sido reportadas alrededor de 127 especies de las 435 que se encuentran distribuidas en América tropical. (Calaway, 2003)



Figura 6 *Oncidium* sp.
(Andrea Crespo y Belén Ortega)

1.1.2.6 *Sympyglossum*:

- **Etimología:** del griego glossos: lengua.
- **Descripción:** los pseudolobulos están comprimidos lateralmente y algo obtusos de los que salen hojas lineares agudas, la espiga floral es muy larga a veces más de un metro que en la primavera se puede llenar de flores.
- **Distribución y Hábitat:** se encuentran entre 1200 a 2600 metros sobre el nivel del mar, principalmente en Ecuador y Colombia.



**Figura 7 Symphyglossum sp.
(Andrea Crespo y Belén Ortega)**

1.1.3 Distribución de las Orquídeas endémicas del Ecuador:

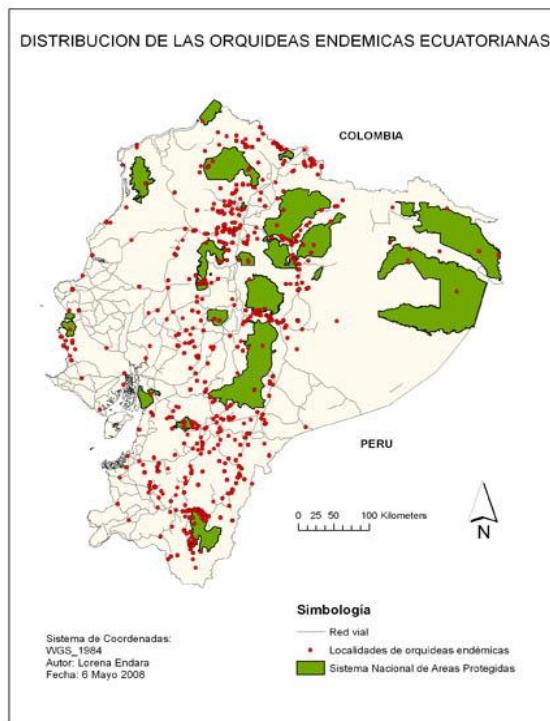


Figura 8 Distribución de las Orquídeas Endémicas del Ecuador y Sistema de Áreas Protegidas.

Fuente: Endara 2006



En la figura Nro. 8 se puede observar que a lo largo de nuestra red vial se han podido recolectar la mayoría de las especies endémicas, es decir propias de la zona; en una zona de 8 kilómetros a cada lado de la vía, además observamos que la mayoría de las orquídeas se encuentran en herbarios de la región de la sierra y nos orienta a pensar que ya que alrededor de los sistemas de áreas protegidas hay orquídeas lo mismo sucederá dentro de estos. Es necesario un estudio dentro de estas zonas para ampliar la conservación de cada una de las especies ya que nuestro país es mega-diverso. (Endara, 2006)

1.2 MICORRIZAS

1.2.1 Generalidades

Existen en la naturaleza organismos que se benefician mutuamente al vivir juntos. La asociación se denomina simbiosis, puede ocurrir entre especies de un mismo reino o diferentes reinos como el caso de las micorizas. Las micorizas son relaciones simbióticas que se establecen entre las raíces de las plantas y los hongos. De ahí su nombre: *mykos* que significa hongo y *rizha* que es raíz. (Rivas, 2008). En esta simbiosis la planta obtiene nutrientes como minerales, agua entre otros y el hongo obtiene hidratos de carbono y vitaminas, además las hifas pueden penetrar más a fondo en la tierra para obtener más nutrientes. (Travieso, 2012).

1.2.2 Distribución de micorizas en la naturaleza

La relación micorriza planta se cree que ocurren en el 90% de las familias de plantas superiores y es necesaria para su sobrevivencia ya que juegan un papel importante en su nutrición mineral. La distribución de ciertas plantas con flor parece estar controlada por la tolerancia fisiológica de sus hongos micorrízicos. Por ejemplo se ha encontrado que cuando algunas plantas que no pueden crecer en ciertas condiciones se debe principalmente a que sus hongos micorrízicos no toleran esa condición. Se cree que las micorizas tuvieron un papel importante en la colonización de la tierra firme por parte de las plantas, ya que en aquellos tiempos los suelos eran relativamente pobres y los hongos pudieron haber ayudado a convertir amonio en nitratos y facilitar la absorción de fósforo. (Zettler, 2013).



Las plantas que poseen micorrizas carecen de pelos absorbentes y la función de estos la asumen las hifas de los hongos micorrízicos. Algunos estudiosos consideran que los hongos son parte del sistema radical en lugar de habitantes independientes del suelo. Si una plántula se ha desarrollado a partir de una semilla cultivada en condiciones artificiales, con una solución rica en nutrientes y luego se trasplanta al campo, es muy probable que llegue a morir de desnutrición a pesar de que viva en un suelo rico en sustancias nutritivas. Si se añade una pequeña cantidad del suelo del bosque que contenga el hongo, las plantas crecerán rápido y de manera normal. La restauración del crecimiento normal es causada por el establecimiento de micorrizas. (Sharma, 2008).

Las plantas se benefician al aprovechar las sustancias absorbidas por los hongos a través de sus hifas, tales como agua y sales como el fósforo, el cual es de difícil absorción para las plantas aunque esté disponible en el suelo. En otros casos las células de la planta digieren el hongo que vive en su interior y aprovechan así otras substancias nutritivas que el hongo ha digerido, absorbido o producido para su beneficio. (Zettler, 2013).

En la interacción de la planta con el hongo, las hifas crecen enroscándose dentro de los tejidos de las orquídeas conocidas como pelotones entre las células corticales. En la mayoría de los casos, el hongo se beneficia con los productos de la fotosíntesis de la planta, principalmente carbohidratos como azúcares, aminoácidos y posiblemente otras sustancias orgánicas. (Dearnaley, 2007).

1.2.3 MICORRIZAS DE LAS ORQUÍDEAS

1.2.3.1 Relación micorriza-orquídea

Desde finales del siglo XIX se conoce de la existencia de micorrizas en las raíces de las orquídeas pero la importancia de esta observación se llegó a comprender cuando se entendió su papel en la nutrición y germinación de las semillas. Las semillas de las orquídeas son sumamente pequeñas, por lo tanto carecen de nutrientes; para suplir esta carencia de nutrientes se generó una dependencia con hongos que alimentan a los embriones de las semillas. Con el



tiempo, las semillas y las plántulas jóvenes se convirtieron en micrótrofos obligados. (Rivas, 2008)

La micorriza orquidioide se caracteriza porque la mayoría de los hongos que participan en esta asociación son miembros del género-forma *Rhizoctonia*. En las células corticales de las raíces el hongo origina una estructura denominada pelotón que es un enrollamiento hifal, el cual es degradado por la planta para obtener nutrientes. En muchos casos las orquídeas llegan a formar una relación tan dependiente del hongo que se considera que la planta parasita al hongo, sin embargo el costo energético de esta interacción puede ser poco importante para el hongo. (Mosquera, Espinoza, 2010).

Las orquídeas en su mayoría necesitan de un hongo simbionte en sus primeros estadios de crecimiento, ya que sirven como fuente de carbono. (Rasmussen, 2002)

1.2.3.2 Géneros simbiontes orquidioides.

El género-forma *Rhizoctonia* en su fase asexual (anamorfo) se caracteriza por presentar un micelio estéril incoloro, que se torna oscuro a medida que va madurando. Presenta células largas y ramificaciones en ángulo recto con respecto a la hifa principal; en ocasiones se estrecha ligeramente a nivel de la bifurcación y posee un septo cerca de ella. En ciertas condiciones, el hongo produce ramaletas de células cortas y anchas, de forma oval o triangular, denominadas células monilioides, de las cuales se pueden desarrollar pequeños esclerocios. (Mosquera, Espinoza, 2010)

La fase sexual (teleomorfo) que corresponde a *Rhizoctonia* incluye los géneros *Ceratobasidium*, *Tulasnella*, *Sebacina* y *Thanatephorus*, los cuales pueden diferenciarse por sus estructuras reproductivas conformadas por los basidiocarpos donde se producen las basidiosporas, pero es muy difícil conseguir estas estructuras reproductivas en condiciones de laboratorio haciendo de esta manera que su diferenciación se dificulte. (Mosquera, Espinoza, 2010)



Una característica de clasificación para el género-forma *Rhizoctonia* es el número de núcleos en células de hifas jóvenes, que pueden ser uní- bi o multinucleadas. Muchas de las rhizoctonias micorrízicas de orquídeas son binucleadas con su teleomorfo en *Ceratobasidium* y son menos frecuentes las multinucleadas, cuyo teleomorfo se expresa en el género *Thanatephorus*; otro grupo de *Rhizoctonia* binucleada corresponde al teleomorfo *Tulasnella*. (Mosquera, Espinoza, 2010)

La simbiosis es muy importante debido a que los micelios externos del hongo facilitan la asimilación de nutrientes como P, Ca, Mn, N, Mg, Zn por la planta, contribuyendo de esta manera al mejor desarrollo y funcionalidad fisiológica de las plantas, gracias a la fijación del nitrógeno atmosférico y transporte de nutrientes. La simbiosis permite un intercambio de nutrientes, ya que los hongos captan compuestos de carbono de algunos fotosintetatos de la planta, facilitando sus requerimientos nutricionales. (Alarcón y Ferrera 2000)

La simbiosis micorrízica reduce el estrés que puede producirse por falta de nutrientes, de agua, los cambios de suelo, del pH, metales tóxicos o patógenos, por lo tanto son de gran utilidad en la propagación de cultivos, ya que potencian la supervivencia y conservación de las plantas. (Otero y Bayman 2009).

La utilización de hongos micorrízicos tiene ventajas y beneficios: mejora la absorción de macro y micronutrientes como fosforo nitrógeno potasio y calcio del suelo, estos son transportados mediante vacuolas móviles del hongo con ayuda de enzimas presentes en el mismo. Además las hifas tienen la capacidad de penetrar mucho más el suelo absorbiendo más nutrientes, y se obtiene mayor resistencia a la colonización de hongos patógenos. (Otero y Bayman 2009).

La simbiosis no siempre funciona como beneficio para las plantas para eso tienen mecanismos de protección como quinasas y peroxidases que sirven



como un antimicrobiano potente. Además es probable que en la colonización micorrízica exista una alteración en la expresión genética tanto del hongo como de planta evitando que el hongo sea patógeno para la planta. (Hoyos y Rodríguez 2013)

Se considera a los hongos basidiomicetos como los principales hongos en las micorizas siendo los principales del género *Rhizoctonia*, forman un micelio y esclerocitos de coloración parda en medios sintéticos, su identificación morfológica se hace difícil debido a sus pocos caracteres fisiológicos y a que estos cambian de uno a otro. (Hoyos y Rodríguez 2013)

El género *Rhizoctonia* presenta un micelio incoloro estéril en su forma asexual (anamorfo), este se va tornando oscuro a medida q va madurando. Además presenta células largas y ramificaciones en ángulo de 45° y 90° en relación a la hifa principal, también posee una bifurcación y un septo cerca de ella. Las ramificaciones se van acortando y forman esclerocitos. (Hoyos y Rodríguez 2013)

Entre los géneros amorfos de *Rhizoctonia* están:

- *Cerathoriza*: presenta hifas alargadas y delgadas, gruesas de color café, con células binucleadas.
- *Rhizoctonia*: presenta hifas delgadas y alargadas, y gruesas con septos, formando ángulos de 45° y 90 °.
- *Epulorhiza*: presenta hifas gruesas y cortas con células de forma irregular denominadas monilioides.

Es muy difícil conseguir estructuras reproductivas en condiciones de laboratorio. (Hoyos y Rodríguez 2013)

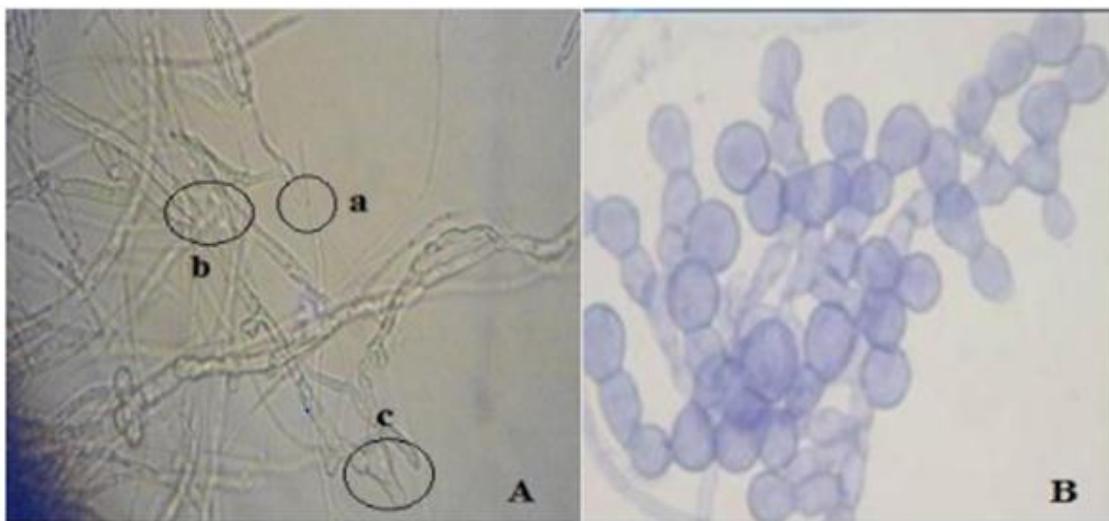


Figura 9 Características generales del género Rhizoctonia. A.- Género-forma Rhizoctonia a. Células largas y ramificadas en ángulo 45° (b) y 90 °. C. Clamp. B.- Células moniloides.

FUENTE: Hoyos y Rodríguez 2013

1.3 DESARROLLO DE LAS SEMILLAS EN SIMBIÓSIS

Las semillas de orquídeas carecen de endospermo y de esta manera no pueden aprovechar sus reservas alimenticias, forman una simbiosis micorrízica, la que les ayuda a la absorción de nutrientes; estas semillas presentan en la etapa de germinación cinco estadios o etapas de crecimiento que se diferencian: estadio 0 no hay germinación, estadio 1 se da la producción de uno o más rizoides, estadio 2 la cubierta de la semilla (testa) se rompe por el alargamiento de embrión, estadio 3 está caracterizado por la formación de la hoja primordial, estadio 4 aparición de la primera hoja verdadera y finalmente se da la elongación de la hoja verdadera y aparece la raíz en el estadio 5. (Zettler - McInnis, 1994)

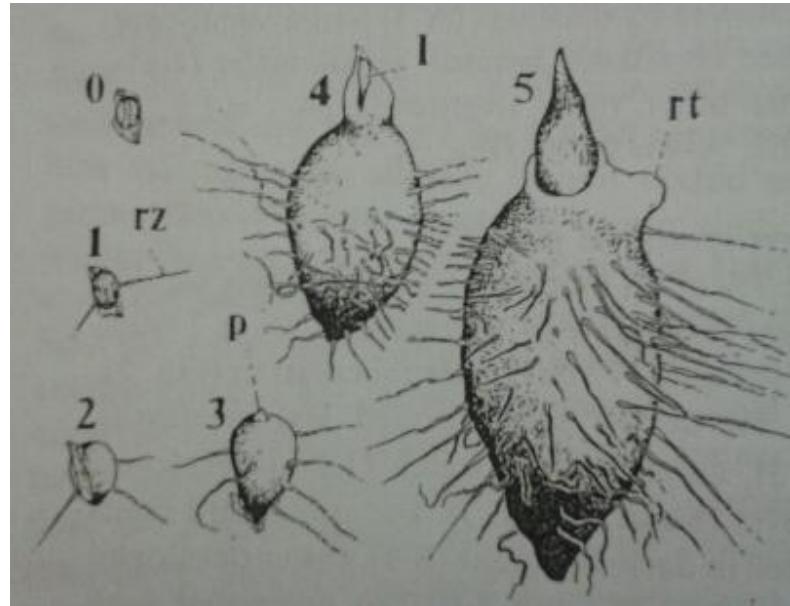


Figura 10 Etapas de crecimiento. E0: no hay germinación, E1: producción de uno o más rizoides, E2: ruptura de la testa, E3: formación de la hoja primordial, E4: aparición de la primera hoja verdadera, E5: elongación de la hoja verdadera y aparición de la raíz.

(Andrea Crespo y Belén Ortega.)

Fuente: (Zettler, 2007)

Para evaluar la viabilidad de las raíces estas deben ser: robustas, de color crema; para las semillas se debe realizar mediante la observación microscópica y solo aquellas que contengan núcleo serán viables, a estas semillas se las llama maduras y hay razones primordiales para escogerlas: a) Promueven la diversidad genética en especies con polinización cruzada, b) La cosecha inmadura de semillas a menudo resulta en transmisión de virus de padres infectados, las semillas maduras están libres de virus y por lo tanto dan plántulas libres de virus que son capaces de ser cultivadas sin ningún problema (Zettler, Poulter, McDonal, 2007).

Además se realiza una desinfección primaria de las semillas utilizando una solución de 5ml de Clorox más 5 ml de etanol al 95% en 90 ml de agua por un minuto con agitación vigorosa, al colocarlas en la caja con el medio respectivo se usan pipetas estériles y aproximadamente en cada caja se introduce por gota alrededor de 50-300 semillas, el medio de cultivo OMA se escogió ya que



muestra un mayor porcentaje de germinación (5%) que los observados en medios modificados. (Zettler, Poulter, McDonal, 2007)

Diversos estudios nos muestran que para las orquídeas terrestres al exponerlas inicialmente 7 días a la luz en condiciones de temperatura igual al de su hábitat ($21^{\circ}\text{C} \pm 1$) muestran un mayor porcentaje de germinación (del 40 al 70%) que otros tratamientos como mantenerlos solo en oscuridad, ya que la luz estimula la formación de la hoja primordial. (Zettler, 1994)



CAPÍTULO II.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDIO Y MUESTRO

El presente estudio es de tipo experimental. El área de estudio corresponde al Orquideario de la Universidad de Cuenca ubicado en Quinta Balzay. El tamaño de muestra corresponde a 10 réplicas de semillas de orquídeas y 10 réplicas de semillas sembradas conjuntamente con el hongo aislado, para cada replica de semillas se sembró por cuatro repeticiones en cada caso.

2.2 MATERIALES Y REACTIVOS:

El trabajo de aislamiento de hongos micorrízicos y pruebas de germinación se desarrolló en condiciones de esterilidad, con la ayuda de una cámara de flujo laminar. Los cultivos de hogos se realizaron con temperatura controlada de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, mediante una estufa de incubación. Los medios de cultivo fueron formulados a partir de componentes puros, homogeneizados, controlados en el pH con la ayuda de un potenciómetro de mesa y esterilizados en una autoclave vertical de 32 litros.

2.3 CULTIVOS IN VITRO PARA GERMINACIÓN DE ORQUÍDEAS:

A continuación se describirán los medios utilizados para la germinación de orquídeas, aislamiento y purificación de hongos micorrízicos. Los métodos y medios de cultivo fueron seleccionados en base a revisiones de estudios previos, en condiciones similares a las de este trabajo experimental y con resultados positivos. (Zettler, 2013).

2.3.1 MEDIOS DE CULTIVO

2.3.1.1 Medio Murashige y Skoog (MS) modificado Coco: este medio se usa comúnmente en el laboratorio para el crecimiento de las semillas de orquídeas ya que es rico en fuentes de energía como el carbón activado, azúcar y vitaminas que son aprovechados posteriormente por las semillas. Dado que la vitamina B1, utilizada en esta formulación, es termo-sensible, debe ser



adicionada luego de solubilizados los ingredientes para que no se pierda por acción del calor. (Rueda 2004)

2.3.1.2 MEDIO FIM (Fungi Isolation Medium): Este medio es usado para el aislamiento del hongo a partir de la raíz de la orquídea. (Rueda 2004)

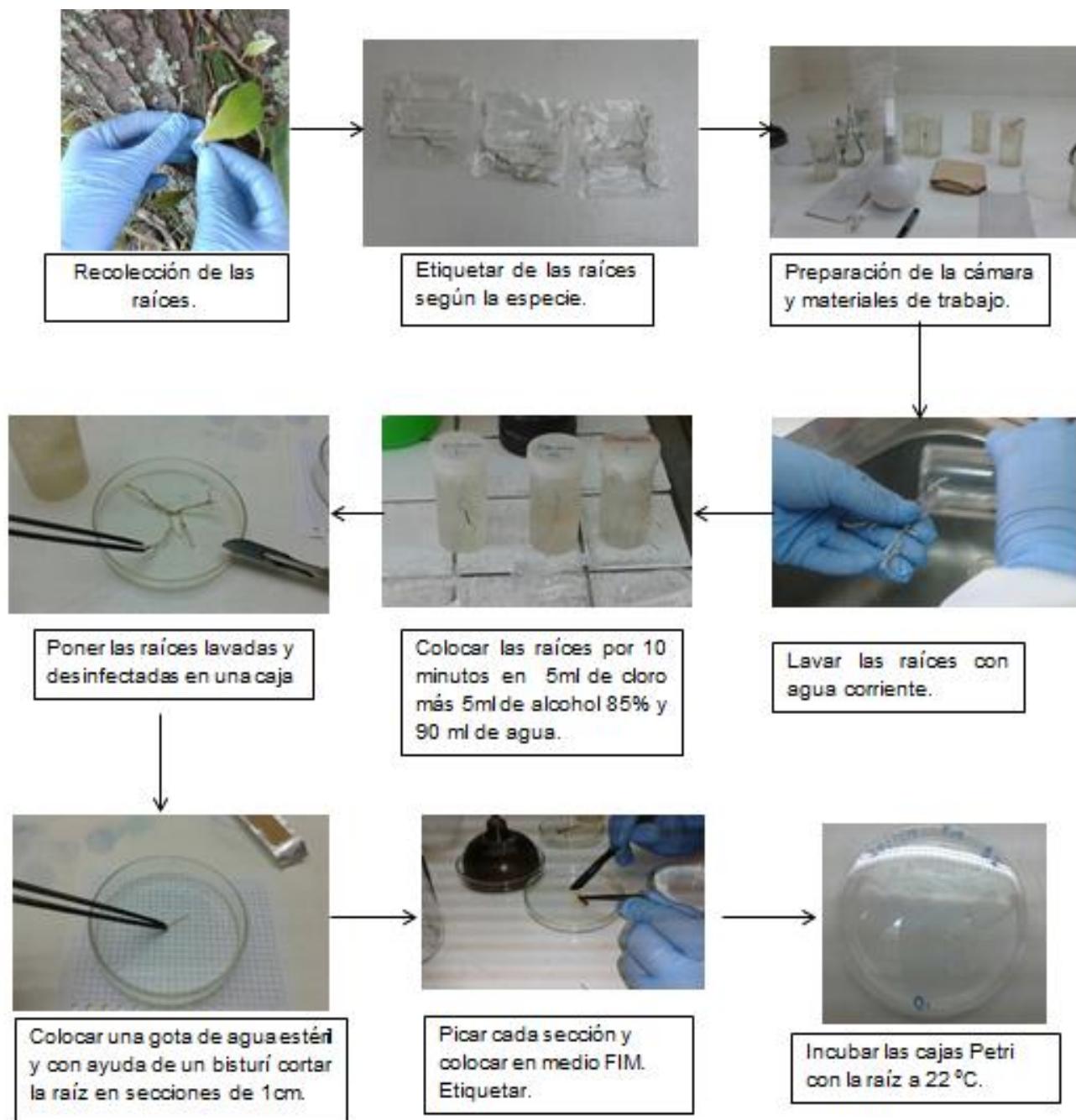
2.3.1.3 MEDIO PDA (Agar Dextrosa-Papa): Este medio es ampliamente utilizado para aislamiento, purificación y mantenimiento de hongos. Por su rica formulación favorece el crecimiento de los micelios, (Rueda 2004)

2.3.1.4 MEDIO OMA (Agar Avena): este medio se usa para cultivos conjuntos del hongo micorrízico. Su eficiencia es mayor que otros medios modificados (Zettler, 2007)

2.3.2 MÉTODOS.

Para la presente investigación se adaptaron métodos previamente aplicados en el Departamento de Biología, Illinois College, 1101 West College Avenue, Jacksonville, U.S.A (Zettler, 2013)

2.3.2.1 PREPARACIÓN Y SIEMBRA DE LA RAÍZ DE ORQUÍDEAS:



- **Ejemplo de esquema de división de la raíz de la orquídea:** Este proceso es necesario para conocer exactamente de qué parte se aisló el hongo ya al no tener tamaño ni divisiones similares, se trata de estandarizar el proceso y así sembrar en caja una porción conocida del hongo. La raíz se divide en tres zonas principales: inicio, medio a la cual

le corresponde numeración según los segmentos que contenga y finalmente la punta, cada segmento será de 1 cm, además se identificara el lado de la raíz como derecha=B e izquierda=A.

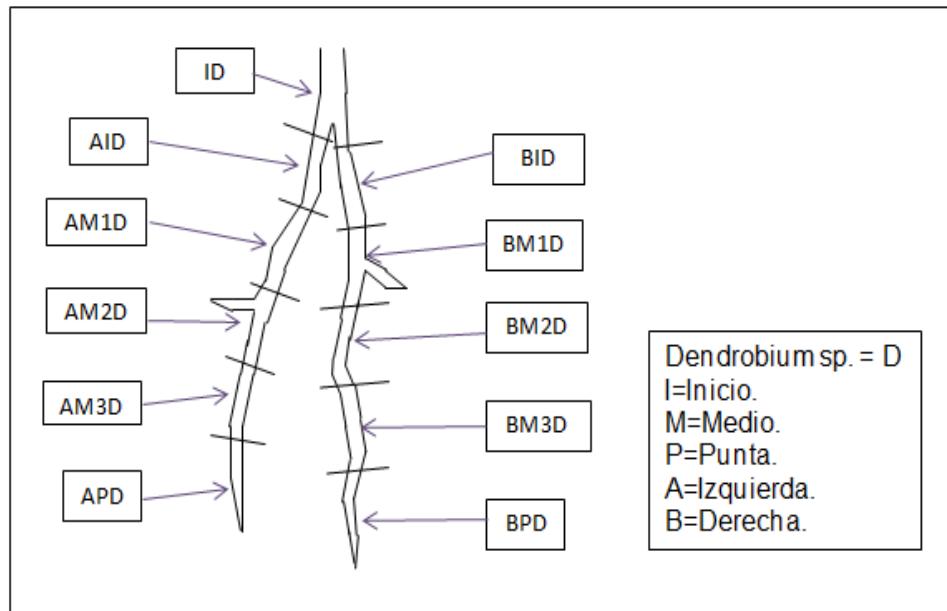


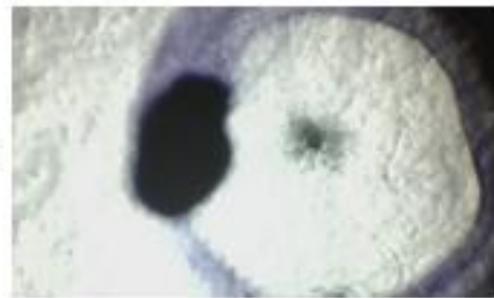
Figura 11 Esquema de división de la micorriza de *Dendrobium* sp. (D:nombre de la raíz de la orquídea), I: Inicio, M: Medio, P: Punta, A: Izquierda, B: Derecha.

(Andrea Crespo y María Belén Ortega)

2.3.2.2 AISLAMIENTO DE MICORRIZAS EN PDA



Observación macroscópica de crecimiento en medio FIM.



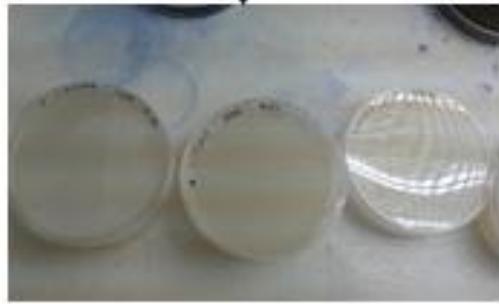
Señalar los pelotones aislados.



Colocarlos en medio PDA.



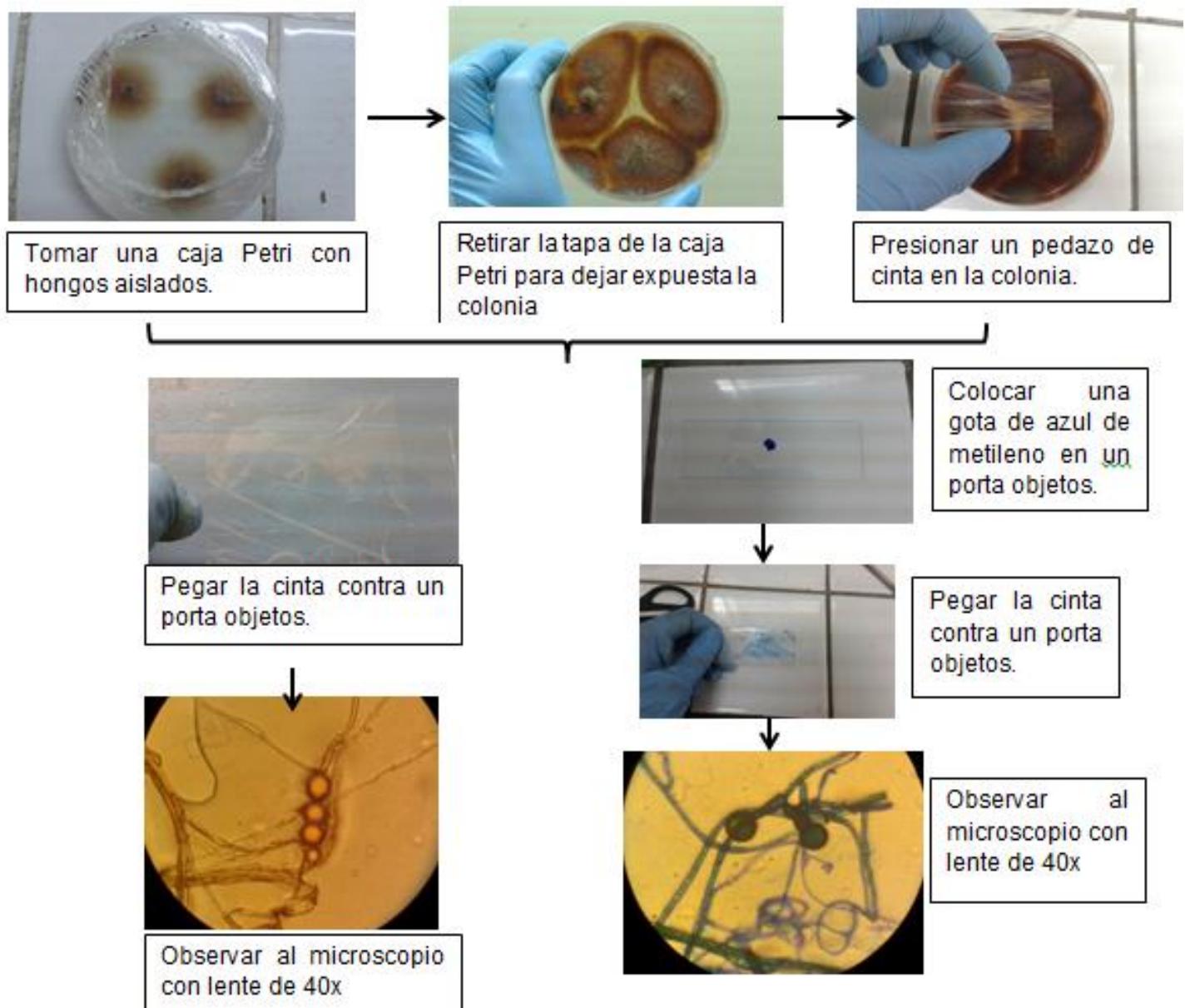
Tomar los pelotones con el asa de inoculación.



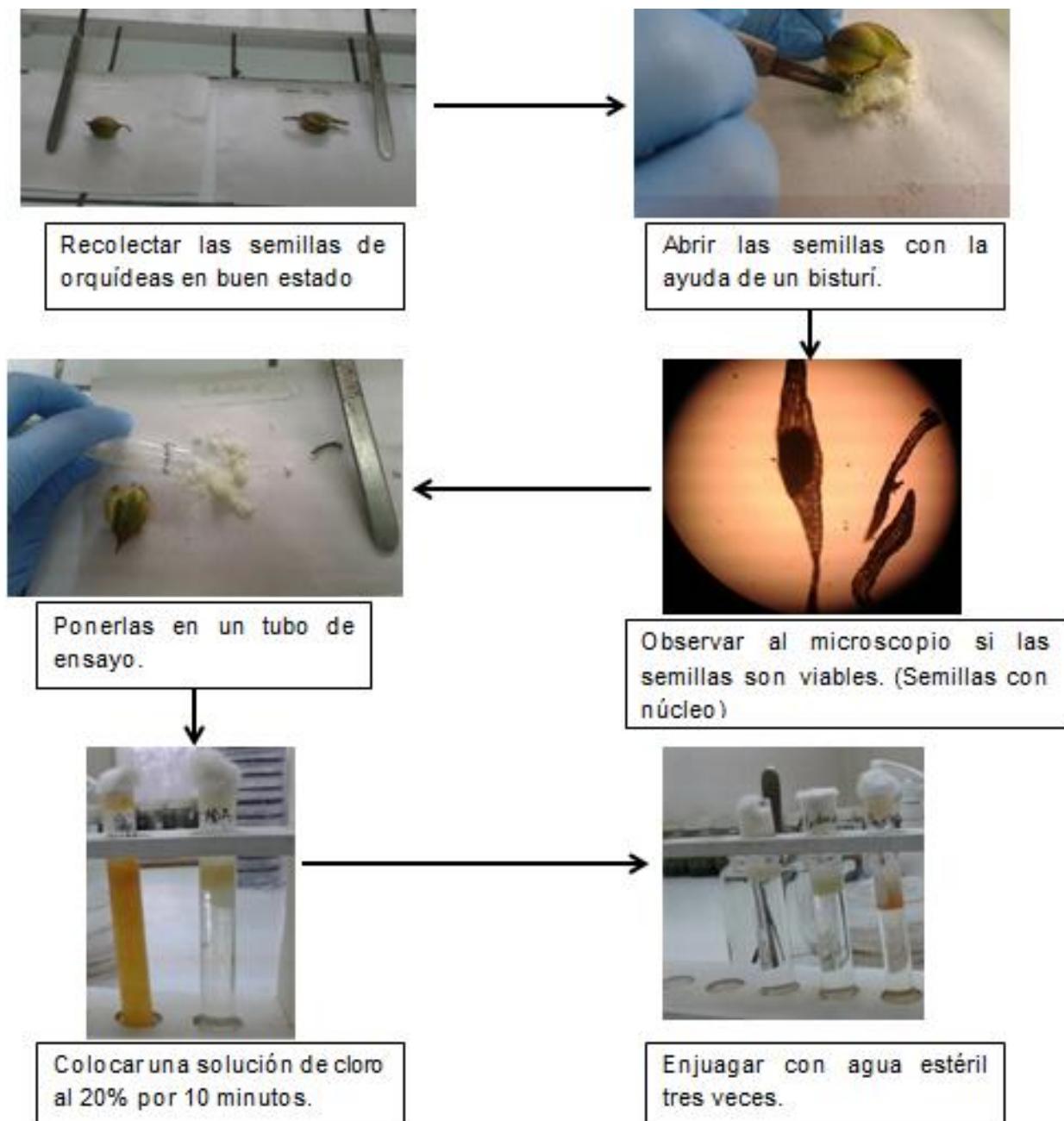
Etiquetar e Incubar a 25 ° C.

2.3.2.3 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION MORFOLOGICA DEL HONGO:

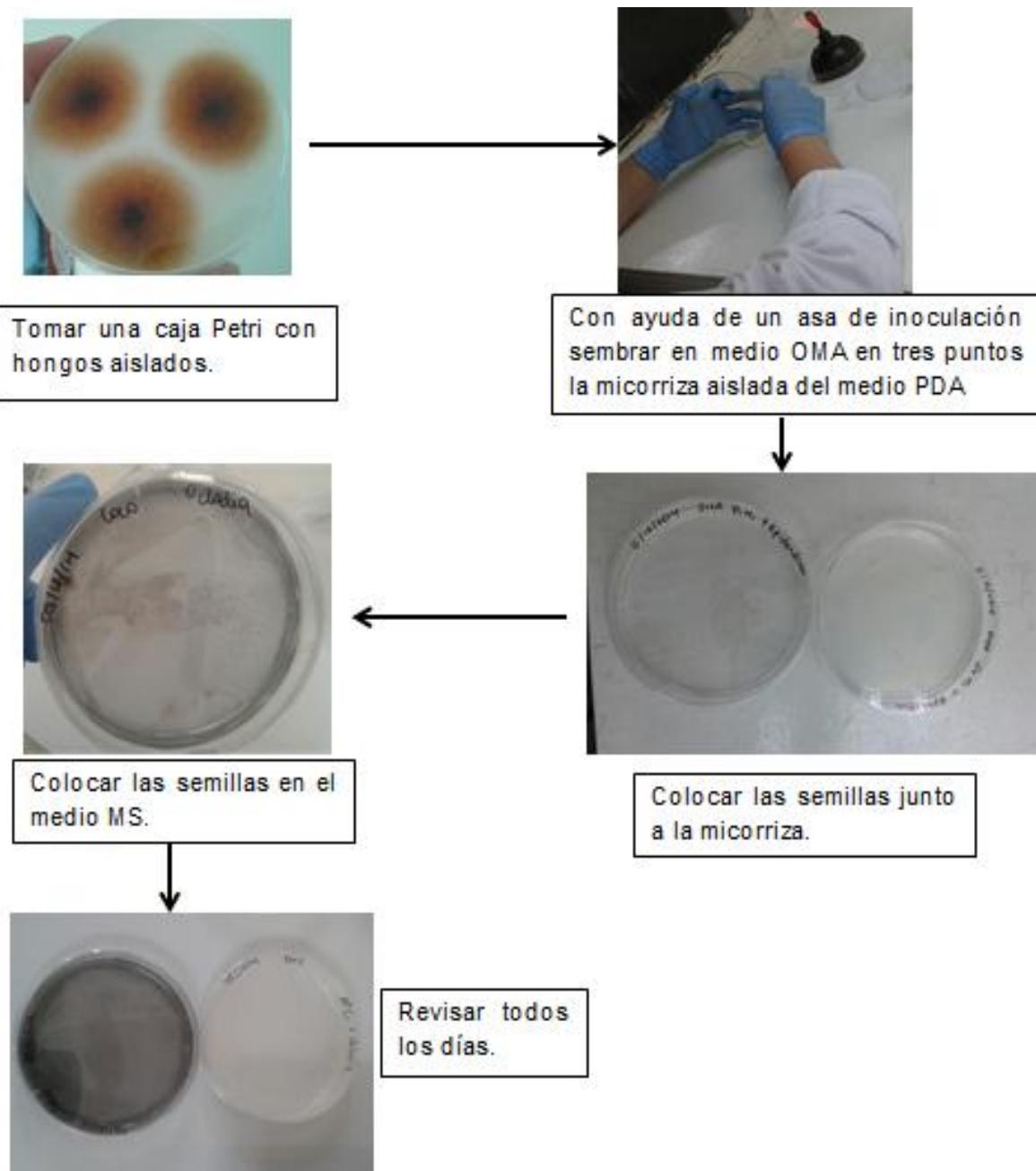
Esta parte del proceso se ha modificado ya que en las investigaciones citadas la identificación del hongos se hace por medio de técnicas moleculares (Identificación del ADN), en nuestro estudio se realiza una identificación más simple pero de validez para el estudio, se usó una identificación morfológica de los hongos.



2.3.2.4 PREPARACIÓN DE LAS SEMILLAS DE ORQUÍDEAS



2.3.2.5 SIEMBRA DE SEMILLAS DE ORQUÍDEAS Y SEMILLAS MAS MICORRIZA



**CAPÍTULO III.****3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

3.1 IDENTIFICACIÓN DEL HONGO: a continuación se muestra una tabla resumen sobre los hongos aislados en las raíces de las orquídeas, con su código respectivo el cual nos indica la parte exacta de la raíz del cual fueron aislados.

Especie de orquídea	Código	Hongo Aislado	Clasificación	Referencia
<i>Cyrtochilum macranthum</i>	M1C	<i>Tullasnela</i> sp	Simbionte	(Otero y Bayman 2009)
	M2C	<i>Tullasnela</i> sp	Simbionte	
<i>Dendrobium</i> sp.	M1D	<i>Cerratobasidum</i> sp	Simbionte	(Otero y Bayman 2009)
	M2D	<i>Cerratobasidum</i> sp	Simbionte	
<i>Epidendrum</i> sp.	P1E	<i>Cerratobasidum</i> sp	Simbionte	(Otero y Bayman 2009)
	P2E	<i>Cerratobasidum</i> sp	Simbionte	

Tabla 1 Hongos aislados a partir de orquídeas (Andrea y Belén.)

Las raíces de orquídeas ya sea terrestres o epifitas contienen hongo micorrízico (Folgueras, 2006), en el presente estudio se obtuvo hongo simbionte de *Epidendrum* sp, *Cyrtochilum macranthum* y de *Dendrobium* sp. Sin embargo cabe recalcar que el hongo aislado de *Dendrobium* sp. de la parte media 1 y 2 fue el único que dio buenos resultados ya que en la siembra con las semillas de orquídeas presentó un correcto desarrollo sin contaminación.



3.2 RESULTADOS DE CRECIMIENTO DE LAS SEMILLAS

a) PORCENTAJE DE CRECIMIENTO DE SEMILLAS DE ORQUÍDEAS SIEMBRA EN OSCURIDAD:

- MEDIO OMA:

ESPECIE DE ORQUÍDEA	DE	Fecha de siembra	Fecha de revisión	Tiempo de crecimiento	% E0	% E1	% E2	% E3	% E4	% E5
<i>Epidendrum sp</i>		05/12/2014	05/01/2015	32 días	90	1	2	1	2	4
<i>Epidendrum sp</i>		08/12/2014	05/01/2015	29 días	92	1	1	2	2	4
<i>Oncidium sp</i>		11/12/2014	05/01/2015	26 días	20	5	5	25	20	25
<i>Cochlioda sp</i>		11/12/2014	18/12/2014	7 días	50	5	5	10	10	20
<i>Masdevallia sp</i>		12/12/2014	02/01/2015	22 días	75	2	3	5	5	10
<i>Oncidium cucullatum</i>		17/12/2014	02/01/2015	17 días	45	3	2	15	15	20
<i>Oncidium nubigenum</i>		17/12/2014	02/01/2015	17 días	45	3	2	15	15	20
<i>Sympyglossum sanguineum</i>		17/12/2014	02/01/2015	17 días	45	2	3	10	10	30

Tabla 2 Porcentaje de crecimiento de semillas de orquídeas, siembra en oscuridad: medio OMA. (Andrea Crespo y Belén Ortega)

- MEDIO MS Modificado COCO:

ESPECIE DE ORQUÍDEA	DE	Fecha de siembra	Fecha de revisión	Tiempo de crecimiento	% E0	% E1	% E2	% E3	% E4	% E5
<i>Epidendrum sp</i>		05/12/2014	05/01/2015	32 días	95	1	4	0	0	0
<i>Epidendrum sp</i>		08/12/2014	05/01/2015	29 días	95	1	4	0	0	0
<i>Oncidium sp</i>		11/12/2014	05/01/2015	26 días	100	0	0	0	0	0
<i>Cochlioda sp</i>		11/12/2014	18/12/2014	7 días	100	0	0	0	0	0
<i>Masdevallia sp</i>		12/12/2014	02/01/2015	22 días	100	0	0	0	0	0
<i>Oncidium cucullatum</i>		17/12/2014	02/01/2015	17 días	100	0	0	0	0	0
<i>Oncidium nubigenum</i>		17/12/2014	02/01/2015	17 días	100	0	0	0	0	0
<i>Sympyglossum sanguineum</i>		17/12/2014	02/01/2015	17 días	100	0	0	0	0	0

Tabla 3 Porcentaje de crecimiento de semillas de orquídeas, siembra en oscuridad: Medio Ms modificado con coco. (Andrea Crespo y Belén Ortega)



En el primer estudio realizado en América del Norte (Marshall, 1999), donde se utilizó una técnica similar a la del presente estudio se observó que más del 99.6 % de las semillas de *Epidendrum tampensis* germinaron entre los 21 días después de inocular el hongo, luego de 13 semanas el desarrollo de las semillas llegaron una mitad al estadio 3 un 46.6% llegó a estadio 4 y 2.2% a un estadio 5. La examinación microscópica del crecimiento mostro semillas vascularizadas y pelotones restringidos a la parte basal de los semilleros. Este fue el primer reporte donde se usó la germinación simbiótica con hongos obteniendo éxito. Las semillas que no fueron inoculadas con el hongo no tuvieron desarrollo teniendo iguales resultados en el presente estudio. Sin embargo en otras especies esta simbiosis falló (*Epidendrum conopseum*), aún no está claro el porqué, pero tal vez pudo ser que se usaron semillas de cápsula sola (Marshall, 1999). En el presente estudio se obtuvo un mejor desarrollo de las semillas, siendo la especie *Epidendrum* sp con mayor tiempo de crecimiento que fue de 32 días en llegar a estadio 5, por lo que se demuestra la eficiencia del hongo aislado. Además se observa que la especie *Cochlioda* sp fue la más rápida en llegar al estadio 5 ya que solo le tomo 7 días para este desarrollo, esto implica una amplia variación entre las especies que es causado por las diferencias entre las características de las semillas y por cómo se asocian con el hongo.

**SIEMBRA EN CONDICIONES DE LUZ:**

- MEDIO OMA:

ESPECIE DE ORQUÍDEA	Fecha de siembra	Fecha de revisión	Tiempo de crecimiento	% E0	% E1	% E2	% E3	% E4	% E5
<i>Epidendrum sp</i>	19/12/2014	04/01/2015	17 días	5	23	3	46	21	2
<i>Sympyglossum sp</i>	17/12/2014	27/12/2014	11 días	25	5	10	3	40	17
<i>Oncidium cucullatum</i>	18/12/2014	27/12/2014	12 días	5	0	0	71	10	14
<i>Masdevallia falcata</i>	19/12/2014	28/12/2014	10 días	63	0	0	10	20	7
<i>Masdevallia dimorfotrica</i>	19/12/2014	30/12/2014	12 días	53	0	0	20	15	12
<i>Oncidium cucullatum</i>	07/01/2015	15/01/2015	9 días	30	3	15	35	11	6
<i>Oncidium nubigenum</i>	07/01/2015	15/01/2015	9 días	12	14	17	20	24	13
<i>Sympyglossum sp</i>	07/01/2015	15/01/2015	9 días	24	11	9	36	17	3
<i>Sympyglossum sanguineum</i>	09/01/2015	19/01/2015	11 días	28	2	19	12	33	6
<i>Sympyglossum sp</i>	09/01/2015	19/01/2015	11 días	4	27	24	18	22	5

Tabla 4 Porcentaje de crecimiento de semillas de orquídeas, siembra en luz:
medio OMA (Andrea Crespo y Belén Ortega)

ESPECIE DE ORQUÍDEA	Fecha de siembra	Fecha de revisión	Tiempo de crecimiento	% E0	% E1	% E2	% E3	% E4	% E5
<i>Epidendrum sp</i>	19/12/2014	04/01/2015	17 días	86	10	4	0	0	0
<i>Sympyglossum sp</i>	17/12/2014	27/12/2014	11 días	100	0	0	0	0	0
<i>Oncidium cucullatum</i>	18/12/2014	27/12/2014	12 días	100	0	0	0	0	0
<i>Masdevallia falcata</i>	19/12/2014	28/12/2014	10 días	100	0	0	0	0	0
<i>Masdevallia dimorfotrica</i>	19/12/2014	30/12/2014	12 días	100	0	0	0	0	0
<i>Oncidium cucullatum</i>	07/01/2015	15/01/2015	9 días	100	0	0	0	0	0
<i>Oncidium nubigenum</i>	07/01/2015	15/01/2015	9 días	100	0	0	0	0	0
<i>Sympyglossum sp</i>	07/01/2015	15/01/2015	9 días	100	0	0	0	0	0
<i>Sympyglossum sanguineum</i>	09/01/2015	19/01/2015	11 días	100	0	0	0	0	0
<i>Sympyglossum sp</i>	09/01/2015	19/01/2015	11 días	100	0	0	0	0	0

- Medio Ms Modificado con adición de coco:

Tabla 5 Porcentaje de crecimiento de semillas de orquídeas, siembra en luz:
Medio Ms modificado con adición de coco. (Andrea Crespo y Belén Ortega)



Un estudio realizado en semillas de *Plantanthera praecilara* indicó que las orquídeas terrestres confían en la micorriza para obtener energía a través de su ciclo de vida y la colonización de hongos es especialmente necesario para estimular la gluconeogénesis para movilizar las reservas y proporcionar apoyo nutricional a las plántulas no fotosintéticas. Aquí las placas fueron incubadas a 3°C por los primeros 60 días, luego fueron incubadas a 5°C por los siguientes 60 días, periodo en el que se observó el estadio 5. En cuanto al desarrollo de germinación al día 45 llegaron al estadio 2, se observaba diariamente y hasta los 60 días no llegó más allá de estadio 2. Al mismo tiempo se sembró *Plantanthera praecilara* más Cerratorriza y el desarrollo hasta los 60 días fueron mucho más altos, luego de los 50 días se observaron semillas en el estadio 5 se las incubó a iluminación para su posterior desarrollo. En comparación con este análisis las semillas se incubaron directamente en luz a una temperatura ambiente, siendo *Epidendrum* sp la especie que tardó más en crecer ya que demoró 17 días hasta llegar al estadio 5, de esta manera queda demostrado la efectividad de la unión entre el hongo y las semillas además de quedar claramente beneficiadas por el cambio de temperatura ya que las orquídeas crecen más rápido en climas templados. (Marshall, 2008).

3.3 ANÁLISIS DE CRECIMIENTO DE ORQUIDEAS EN FUNCIÓN DE LAS CONDICIONES APLICADAS EN LA INVESTIGACIÓN:

3.3.1 Comparación entre el porcentaje de crecimiento de cada especie de orquídeas en E5 sembradas en oscuridad en medio OMA.

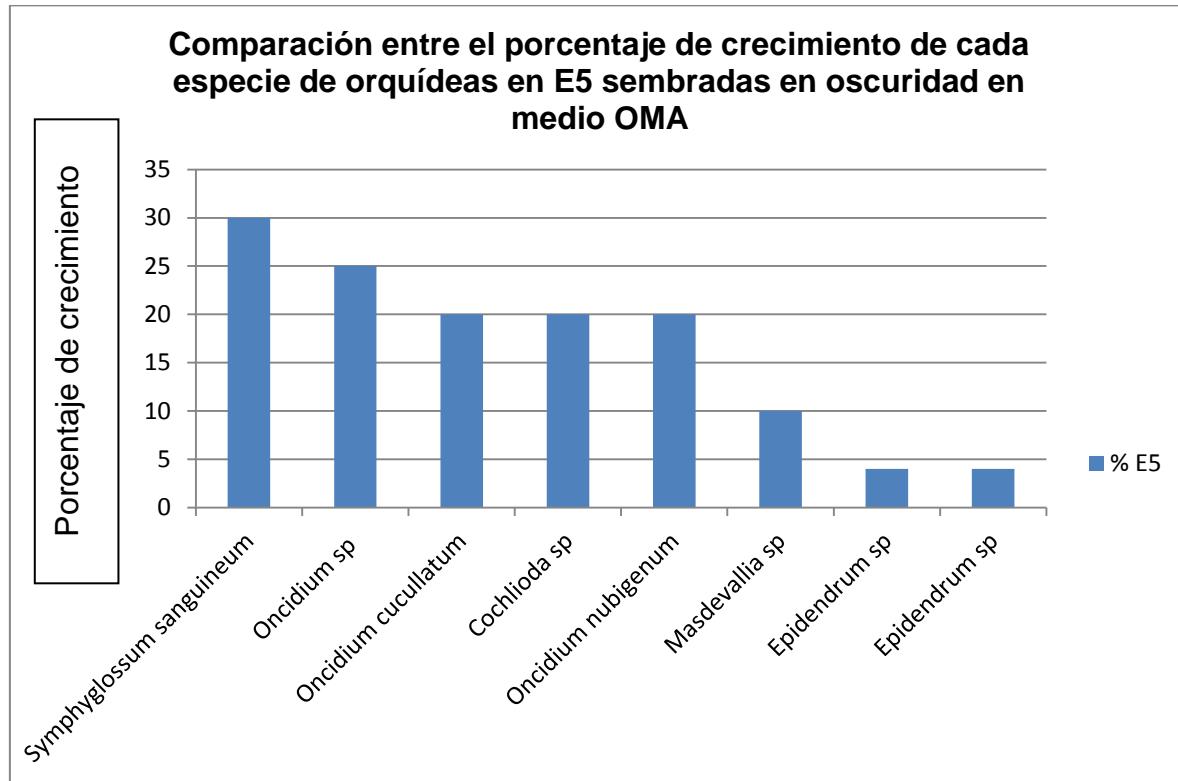
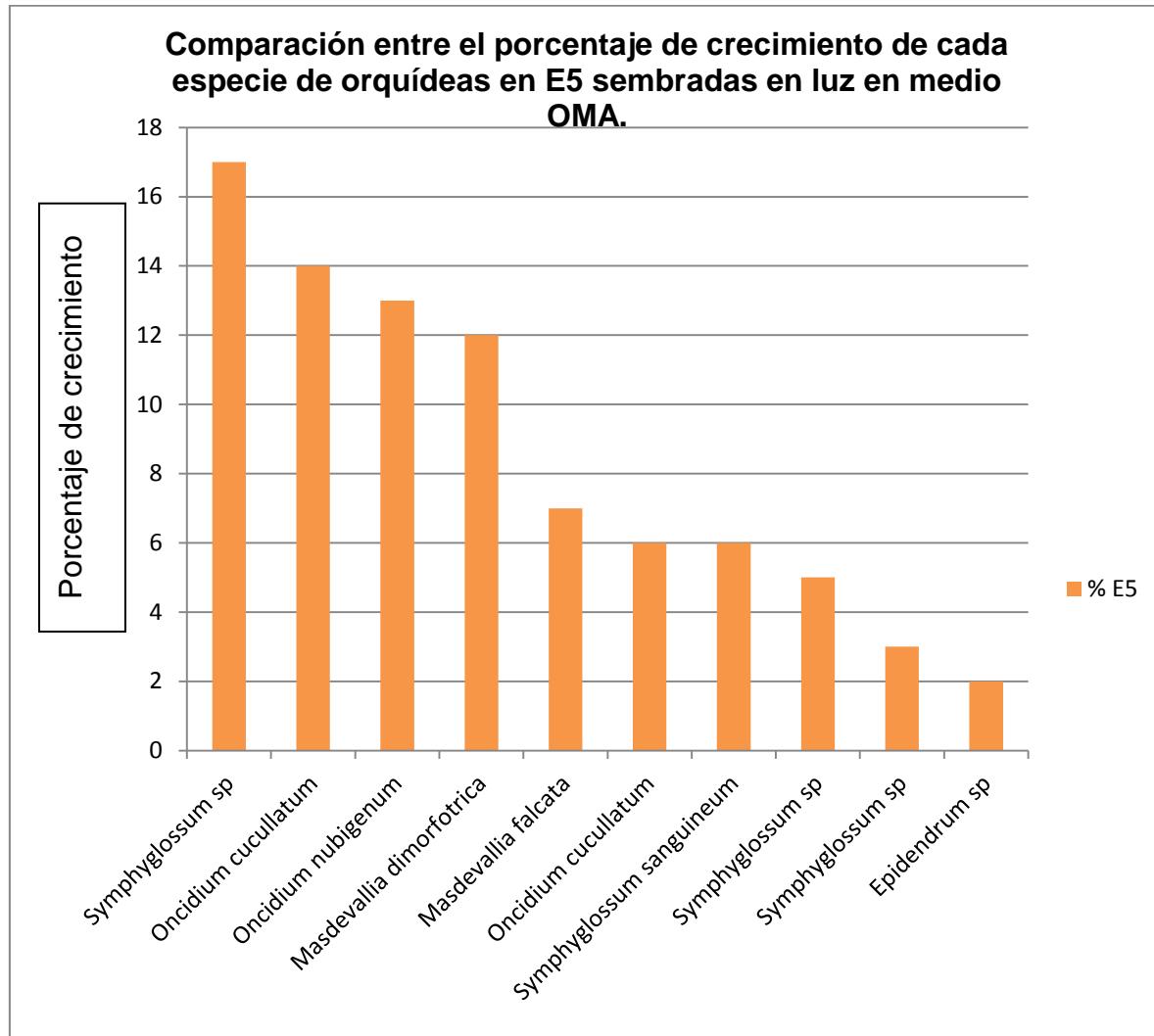


Grafico 1 Comparación entre el porcentaje de crecimiento de cada especie de orquídeas en E5. Siembra en Oscuridad. Medio OMA.
(Andrea Crespo y Belén Ortega)

Los hongos aislados de una especie de orquídea que se usan en la simbiosis con otra especie que no tengan relación funcionan bien (Corey, 2013); es lo que se puede observar en el grafico donde todas las especies sembradas en simbiosis con el hongo *Cerratobasidium* sp. aislado de *Dendrobium* sp. se observa que todas las semillas de diferentes especies llegaron a estadio 5, siendo *Sympyglossum sanguineum* la especie con mayor porcentaje de crecimiento llegando a un 30% y *Epidendrum* la menos desarrollada con un 4 %.

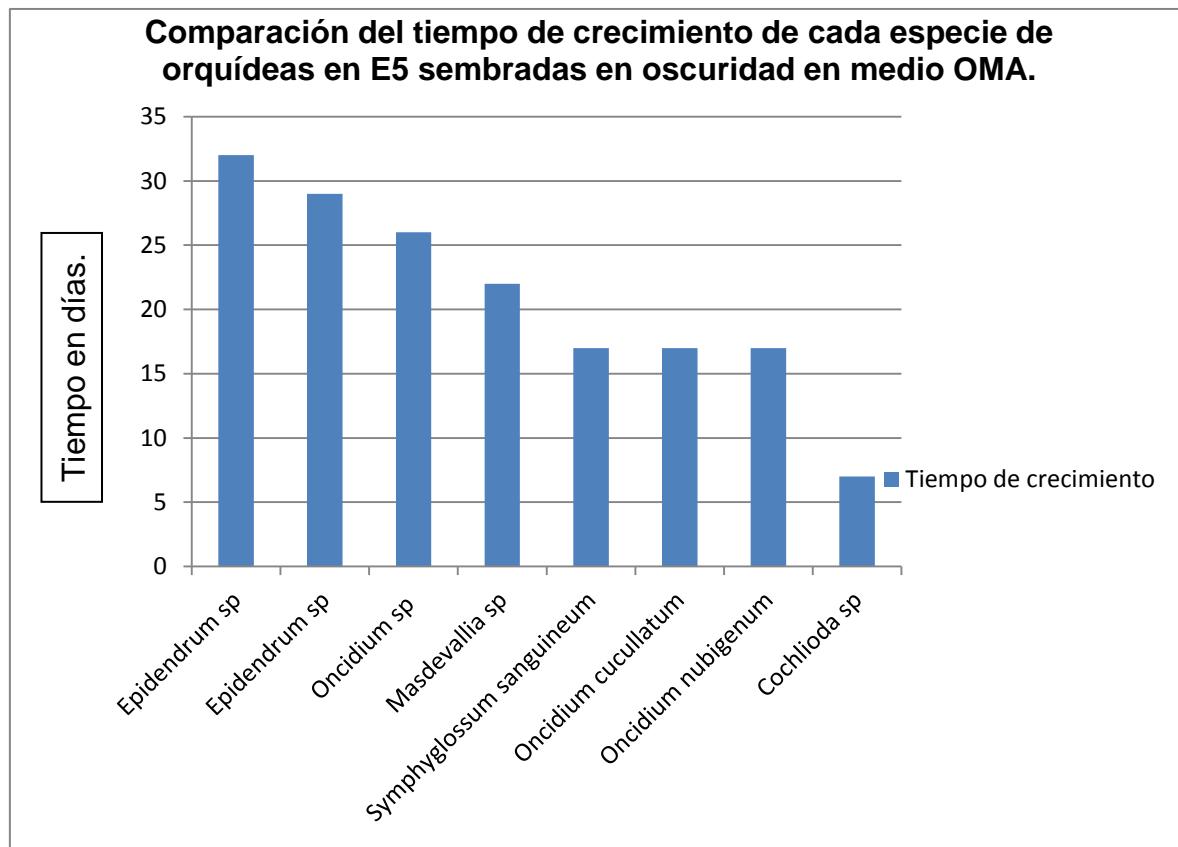
3.3.2 Comparación entre el porcentaje de crecimiento de cada especie de orquídeas en E5 sembradas en luz en medio OMA.



**Grafico 2 Comparación entre el porcentaje de crecimiento de cada especie de orquídeas en E5. Siembra en Luz. Medio OMA
(Andrea Crespo y Belén Ortega)**

En la siembra en luz se observa un mayor porcentaje de crecimiento de la especie *Sympyglossum* sp. del 17% y la menos desarrollada es *Epidendrum* sp. con un 2 % de crecimiento, aunque todas llegaron a E5.

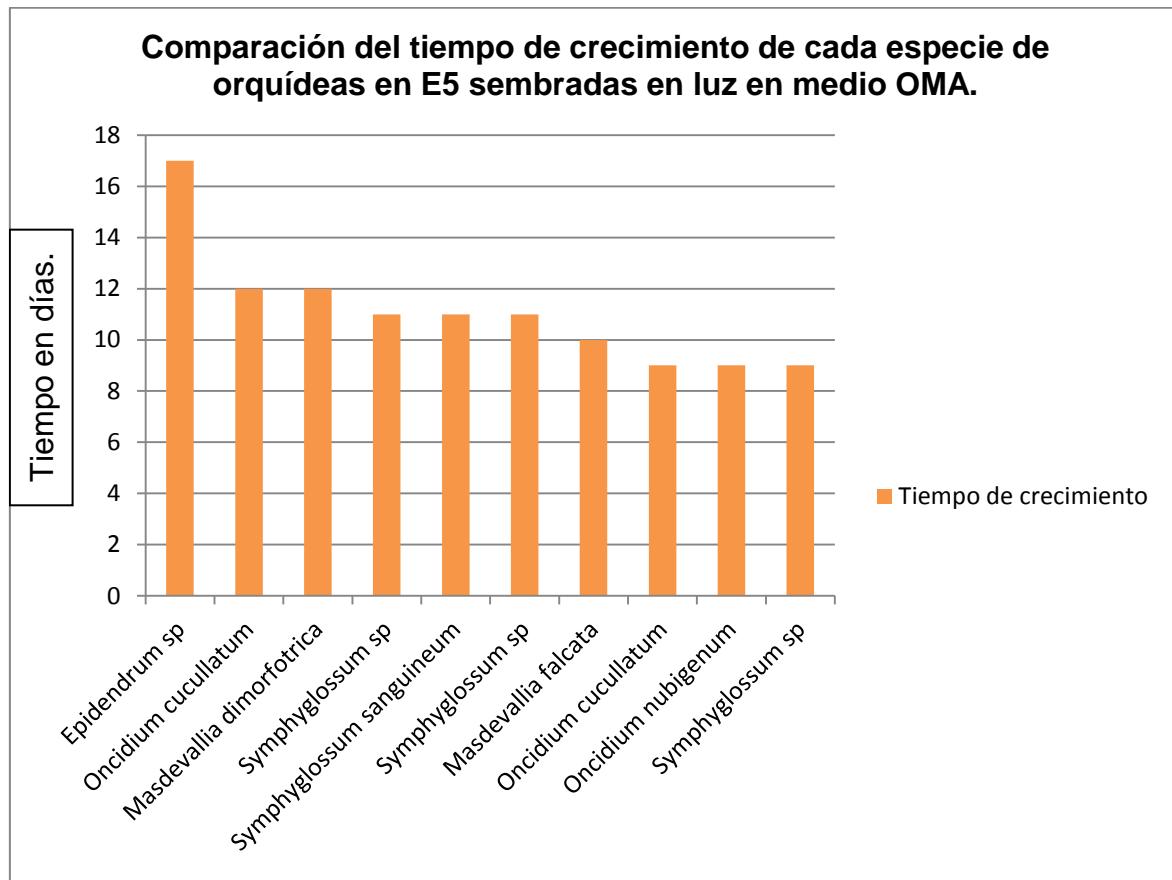
3.3.3 Comparación del tiempo de crecimiento de cada especie de orquídeas en E5 sembradas en oscuridad en medio OMA.



**Grafico 3 Comparación del tiempo de crecimiento en días para cada especie en E5. Siembra en Oscuridad. Medio OMA
(Andrea Crespo y Belén Ortega)**

El gráfico indica el tiempo al cual la germinación de las semillas colocadas en oscuridad llegaron a estadio 5, este nos muestra que la especie *Cochlioda* sp, llegó a estadio 5 en menor tiempo, siendo este de 7 días y la *Epidendrum* sp. la especie con mayor tiempo en llegar a estadio 5 con 32 días, esto se debe a las diferentes características de cada especie, sin embargo el hongo aislado y en simbiosis con las semillas da buenos resultados.

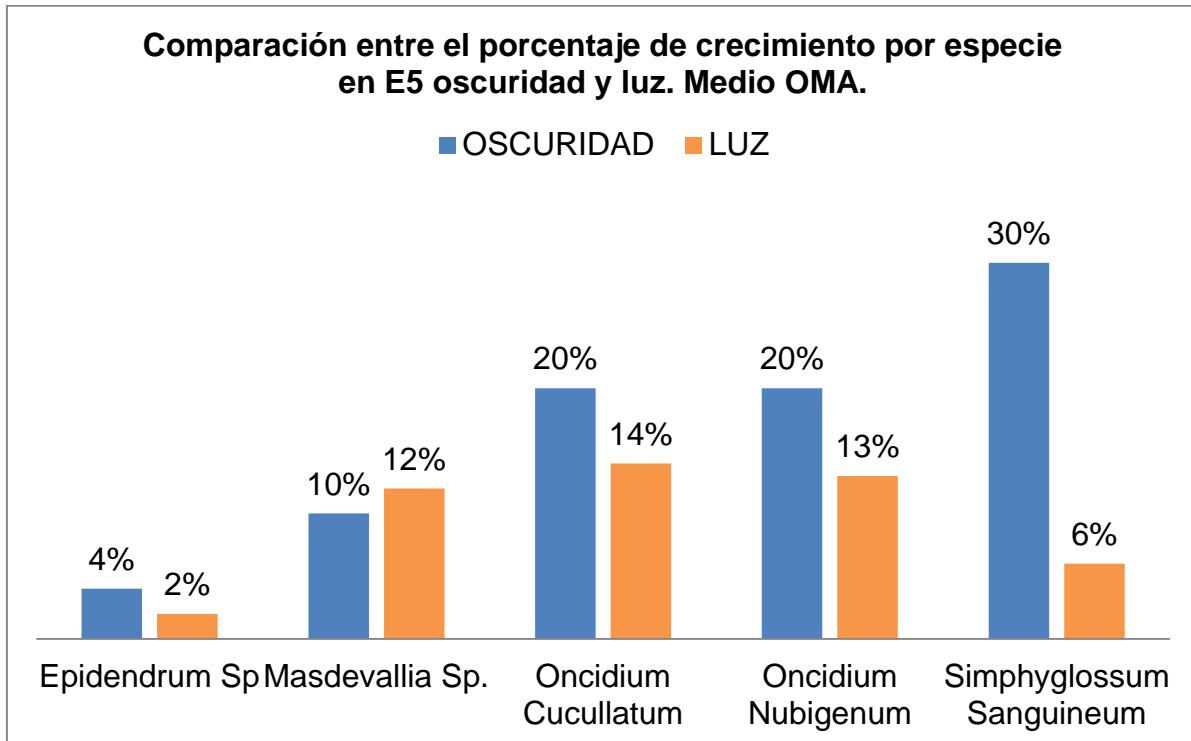
3.3.4 Comparación del tiempo de crecimiento de cada especie de orquídeas en E5 sembradas en luz en medio OMA.



**Grafico 4 Comparación del tiempo de crecimiento para cada especie en E5. Siembra en Luz. Medio OMA
(Andrea Crespo y Belén Ortega)**

Las semillas expuestas a luz mejores resultados en cuanto al tiempo de crecimiento ya que la hoja primordial se desarrolla en menor tiempo (Zettler, 1994), en este estudio se observó que *Epidendrum sp* se tardó 17 días en llegar a estadio 5 reduciendo así el tiempo de germinación lo mismo sucedió con las otras su tiempo de germinación fue menor como se puede observar en la gráfica.

3.3.5 Comparación entre el porcentaje de crecimiento por especie en E5 oscuridad y luz. Medio OMA.



**Grafico 5 Comparación entre Porcentaje de crecimiento por especie en E5 en luz y oscuridad. Medio OMA.
(Andrea Crespo y Belén Ortega)**

Este grafico muestra el porcentaje de crecimiento hasta estadio 5 de desarrollo de las semillas sembradas conjuntamente con el hongo en luz y oscuridad, se observa que en la mayor cantidad de especies sembradas en la oscuridad tienen un mayor porcentaje de crecimiento en E5.



3.3.6 Comparación entre el tiempo en días por especie en E5 oscuridad y luz. Medio OMA.

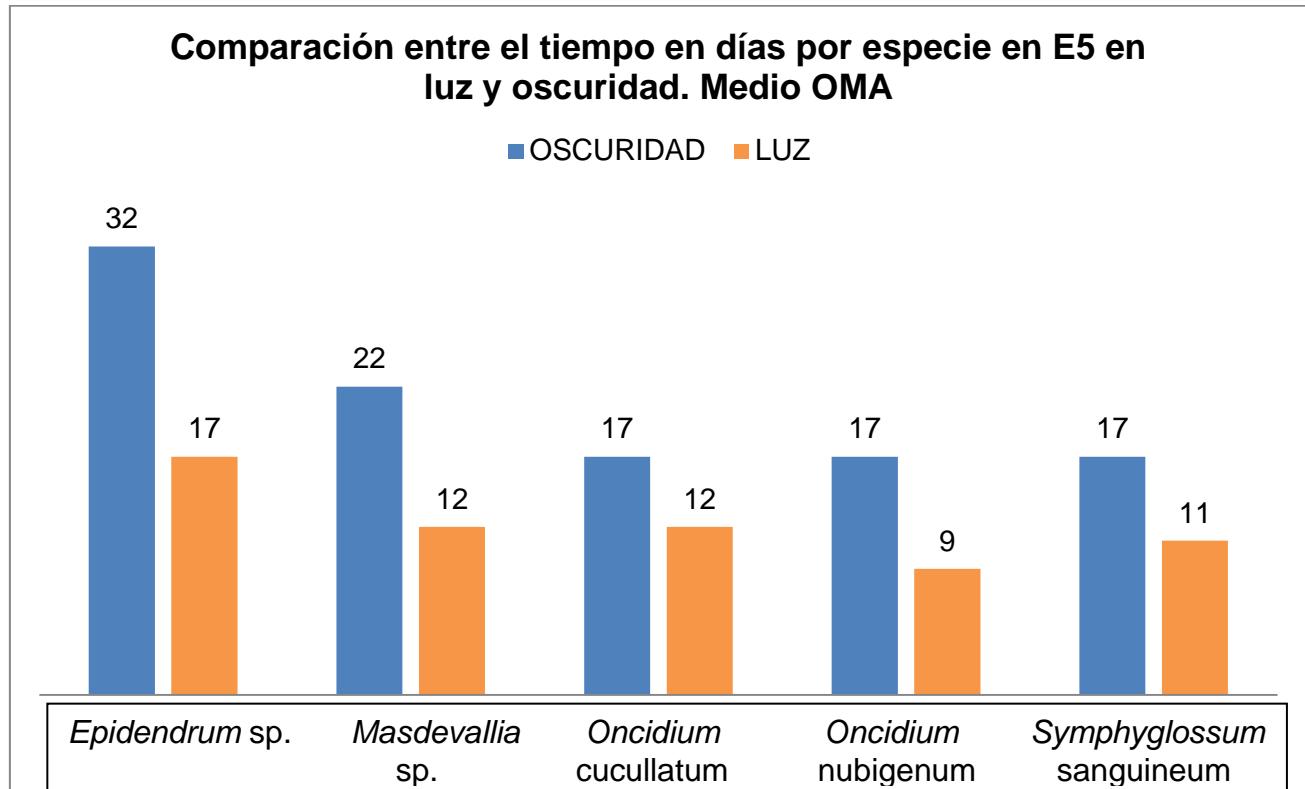


Grafico 6 Comparación del tiempo en días de cada especie en E5 en luz y oscuridad. Medio OMA . (Andrea Crespo y Belén Ortega)

En el gráfico se observa que las semillas expuestas a la luz llegan a estadio 5 de germinación mucho más rápido que las de oscuridad para todas las especies de orquídeas.



CONCLUSIONES:

- ✓ Se aisló micorizas de las raíces de orquídeas obteniendo mayor éxito en la raíz de *Dendrobium* sp. recolectada del Orquideario de la Universidad de Cuenca, donde se aisló y caracterizo morfológicamente *Cerratobasidum* sp, siendo este hongo simbionte indispensable para la germinación de semillas de orquídeas, debido a que en el presente estudio se pudo observar su presencia ayuda a la eficiencia de la germinación haciéndola mucho más rápida.
- ✓ La simbiosis- hongo planta se sembró en medio OMA (agar avena) siendo efectivo, debido a que los hongos esporulan bien sobre sustrato orgánico, esto es por la presencia de esterol en la avena que estimula el crecimiento micelial, y a su vez un buen desarrollo del hongo permite la simbiosis con la semilla, para que así le proporcione los nutrientes adecuados para su germinación.
- ✓ Es efectivo aislar micorizas para la germinación simbiótica debido a que el desarrollo es mucho más rápido en comparación con la germinación en el medio nutritivo habitual (medio MS modificado con la adición de coco), sin embargo es importante tomar en cuenta la viabilidad de la semilla, ya que si bien la germinación es muy rápida no es en un 100%, además se debe tener en cuenta otros factores como la luz y temperatura.
- ✓ En este estudio en la siembra hongo-planta realizado en la oscuridad, las semillas llegaron un estadio 5 en un porcentaje de 4% para *Epidendrum* sp, 25% para *Oncidium* sp, 20 % para *Cochlioda* sp, 10% para *Masdevallia* sp, 30% para *Sympyglossum sanguineum*, 20% para *Oncidium*. En cuanto a la siembra en medio MS enriquecido con coco es decir sin hongo solamente *Epidendrum* se desarrolló hasta estadio 2 en un 4% comprobando que es mucho más lenta.



- ✓ Al evaluar la germinación de semillas de cinco especies de orquídeas en asociación con hongos micorrízicos, quedo demostrado que la presencia de micorriza es fundamental para la germinación de orquídeas desarrollándose en mayor proporción en oscuridad pero en un menor tiempo en presencia de luz.



RECOMENDACIONES:

Para posteriores trabajos en este tema se debe llevar a cabo un estudio donde se identifique genéticamente el hongo aislado de las diferentes raíces de orquídeas además un estudio más detallado sobre los factores: temperatura, humedad, luz, debido a que influyen en la germinación. En cuanto a la viabilidad de la semilla se necesita un estudio sobre la manipulación y almacenamiento de las mismas. Finalmente debe implementarse en el laboratorio del Orquideario de la Universidad de Cuenca la siembra de semillas conjuntamente con el hongo.



UNIVERSIDAD DE CUENCA.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

CALAWAY Dodson, ESCOBAR Rodrigo, Orquídeas nativas del Ecuador, volumen 1, editorial Colina, Florida, 1998, ISBN 958-638-096-3.

CALAWAY Dodson, Native Ecuadorian Orchids, volumen 2, Dodson Trust, Florida, 2000, ISBN: 9978-41-923-3.

CALAWAY Dodson, Native Ecuadorian Orchids, volumen 3, Dodson Trust, Florida, 2002, ISBN: 9978-42-628-4.

CALAWAY Dodson, Native Ecuadorian Orchids, volumen 4, Dodson Trust, Florida, 2004, ISBN: 9978-42-943-3.

COREY Laura, JACKS Alishia, Zettler Lawrence, *Tulasnella Irregularis from Roots of Encyclia Tampensis in South Florida and Confirmation of Its mycorrhizal Significance Throgh Symbiotic seed Germination*, Department of Biology, USA, 2013.

ENDARA Lorena, Orquídeas endémicas del Ecuador y Sistema Nacional de Áreas protegidas (SNAP), University of Florida, Herbarium QCA, 2008. Disponible en: <http://www.flmnh.ufl.edu/ecuadororchids/SNAP.htm>

DEARNALEY, J.D. Further advances in orchid mycorrhizal research. Mycorizza, 2007, ISBN: 17(6),475-486. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00572-007-0138-1>

FISCHER, Cultivo de orquídeas, volumen 1. Buenos Aires, Argentina: Grupo Imaginador, 2007.

FOLGUERAS, HERRERA, Relación de hongos patógenos. Centro Agrícola, 2006, ISBN: 33(1)-21-25. Fischer, A. L. (2007). *Cultivo de orquídeas* (Vol. 1). Buenos Aires, Argentina: Grupo Imaginador.

Lawawrence W. Zettler, L. L. (11 de Abril de 2013). *Revistas Académicas, Universidad de Costa Rica*. Recuperado el 5 de Octubre de 2014, de <http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/lankesteriana>

Marta Rivas, J. W. (14 de Diciembre de 2008). *Scielo*. Recuperado el 5 de Octubre de 2014, de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-77442008000200004&script=sci_arttext



T. Mosquera-Espinosa, P. B. (20 de Julio de 2010). *Universidad Nacional de Colombia*.

Recuperado el 10 de Octubre de 2014, de

http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/17661

MARSHALL Jillian, BURKHEAD Juliette, Use of a Micorrhizal Fungus from *Epidendrum conopseum* to Germinate seed of *Encyclia tampensis* in vitro, Estados Unidos, 1999, ISBN 62650-2266.

MOSQUERA, BAYMAN, OTERO, *Cerratobasidium* como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, Colombia, 2010.

MOSQUERA ESPINOSA Ana, BAYMAN Paul, OTERO J. Tupác, *Cerratobasidium* como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia, Acata Agronómica, 316-326, 2010. Disponible en:
<http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v59n3/v59n3a07.pdf>

MOSQUERA ESPINOSA Ana, *Universidad Nacional de Colombia, Colombia, 2010.* Disponible en:
http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/17661.

OTERO, BAYMAN, Germinación Simbiótica en semillas de orquídeas epifitas. Redalyc, 270-271, 2009.

RASMUSSEN, H.N. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. Plant and soil, 202, ISBN: 244(1-2), 149-163. Disponible en:
<http://link.springer.com/article/10.1023/A:1020246715436#page-1>

RIVAS Marta, *Scielo*, 2008. Disponible en:
http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S00347442008000200004&script=sci_arttext.

RUEDA Daniel, Módulo Biotecnología Aplicada, Universidad XAMORANO, Carrera de Ciencia Y Producción Agropecuaria, Chile, 2004.

SALAZAR Alfredo, CHECA María Fernanda, Sapos mariposas y orquídeas en la línea equinoccial, Quito Ecuador, Trama Ediciones, 2005. ISBN 9978-300-25-2



SHARMA Jyotsna, SAMBEER Van, Symbiotic Seed Germination and Mycorrhizae of Federally Threatened *Platanthera praecox*, Estados, department of Horticulture, 2008, ISBN: 149.404-420.

ZETTLER Lawrence, MCINNIS M. Thomas, Light enhancement of symbiotic seed germination and development of an endangered terrestrial orchid *Platanthera integrilabia*, Elsevier, Estados Unidos, 1994.

ZETTLER W. Lawrence, POULTER Sarah, McDONAL Kris, Conservation – driven Propagation of an Epiphytic Orchid *Epidendrum nocturnum* with a mycorrhizal fungus, vol 42, Estados Unidos, 2007.

ZETTLER Lawrence W, *Revistas Académicas, Universidad de Costa Rica*, 2013. . Disponible en: <http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/lankesteriana>.



ANEXOS

Anexo A PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

Anexo A 1

Las soluciones madre deben ser preparadas de modo que no precipiten. Se utilizan en mg/l.

Solución A

- Nitrato de amonio.....1650
- Nitrato de potasio.....1900

Solución B

- Sulfato de magnesio.....370
- Sulfato de manganeso.....22.3
- Sulfato de zinc.....8.6
- Sulfato cúprico.....0.025

Solución C

- Cloruro de calcio.....440
- Yoduro de potasio.....0.83
- Cloruro de cobalto.....0.025

Solución D

- Fosfato de potasio.....170
- Ácido bórico.....6.2
- Molibdato de sodio.....0.25

Solución E

- Sulfato ferroso.....27.81
- Na Edta.....37.31

**Anexo A 2 Medio MS modificado coco**

- 1000 ml de agua más 10ml de sol. A, B, C, D y E
- Carbón activado..... 2gr
- Azúcar..... 200gr
- Agar..... 8,5 gr
- Agua de coco..... 150ml
- Vit B1..... 2ml
- Tween..... 5 gotas
- Calibrar pH a 5,6, hervir por un minuto y colocar la vitamina B1

Anexo A 3 Medio FIM (Fungi Isolation Medium):

- Nitrato de sodio..... 0,3 gr
- Cloruro de potasio..... 0,1 gr
- Fosfato acido de potasio..... 0,2 gr
- Sulfato de magnesio..... 0,1 gr
- Extracto de levadura..... 0,1 gr
- Azúcar..... 2,5 gr
- Agar..... 8 gr
- Estreptomicina..... 10ml
- Agua normal..... 1000ml
- Llevar a pH 6,8

Se prepara una solución madre de estreptomicina con 2, 67 gr de la misma en 200ml de agua.

Anexo A 4 Medio PDA (Agar Papa Dextrosa):

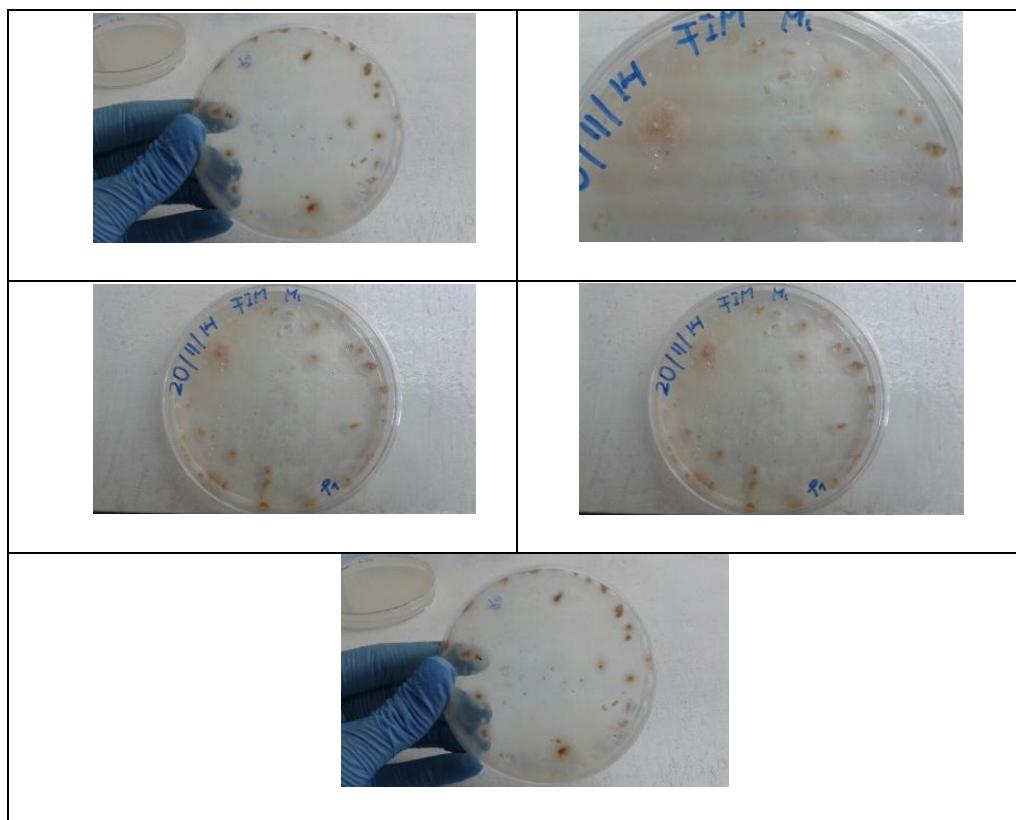
- Agar..... 20gr
- Puré de papa..... 5gr
- Glucosa..... 15gr
- Agua destilada..... 1000ml

Anexo A 5 Medio OMA(Agar Avena):

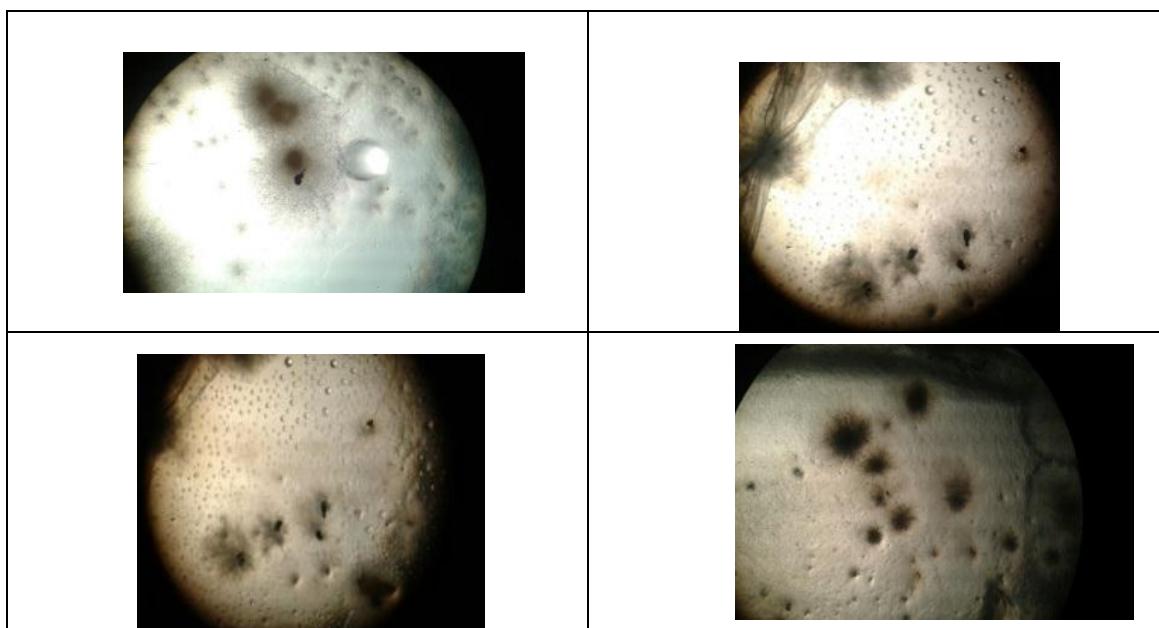
- Avena..... 2,5 gr
- Agar..... 7 gr
- Agua..... 1000ml

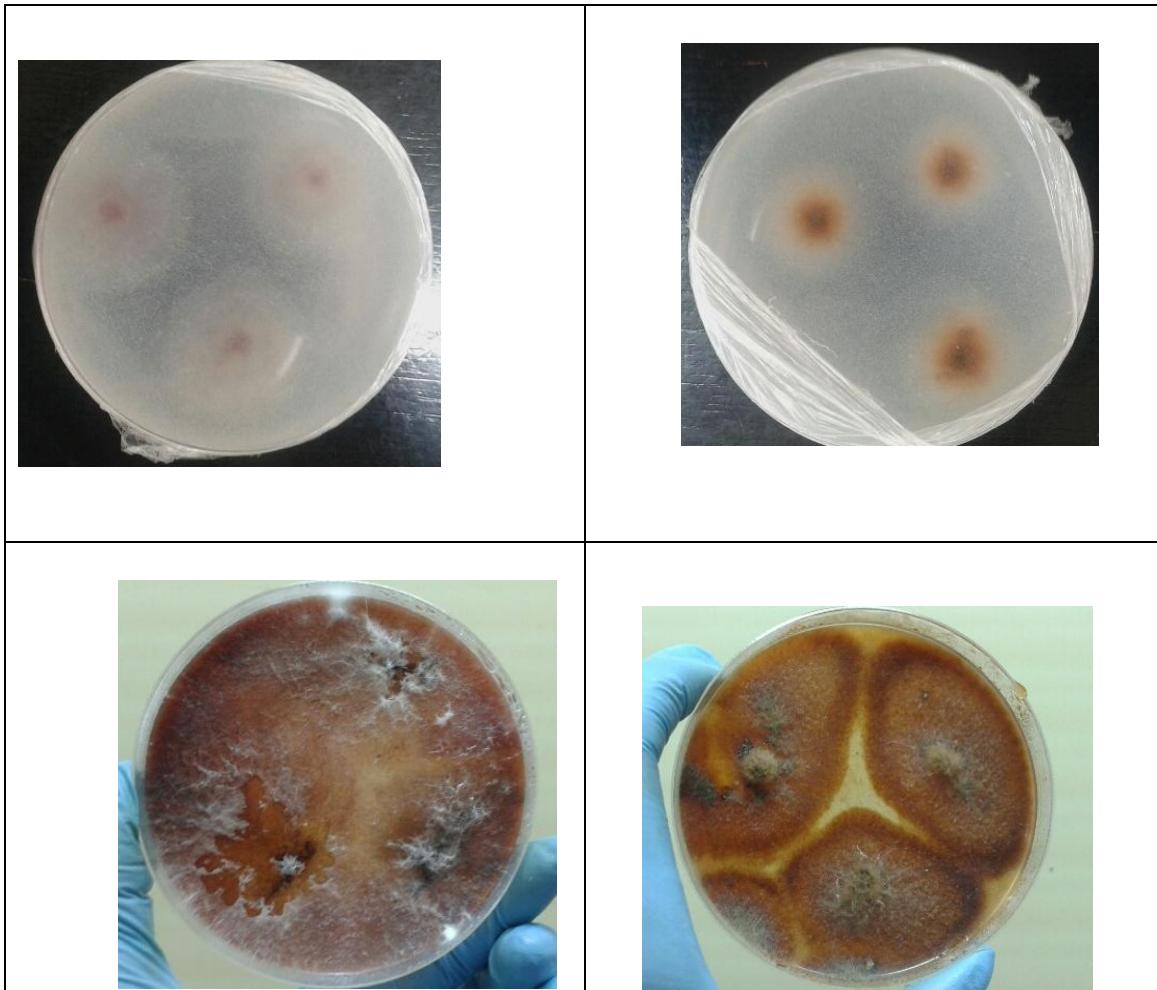
Anexo B FOTOS DE COLONIAS AISLADAS

1. RESULTADOS MEDIO FIM. OSERVACIÓN MACROSCÓPICA.



Anexo B 1 En las fotografías se puede observar pequeños pelotones de los hongos micorrízicos como indica Lawrence junto a Brian G KEEL Y Beth Kaplin.



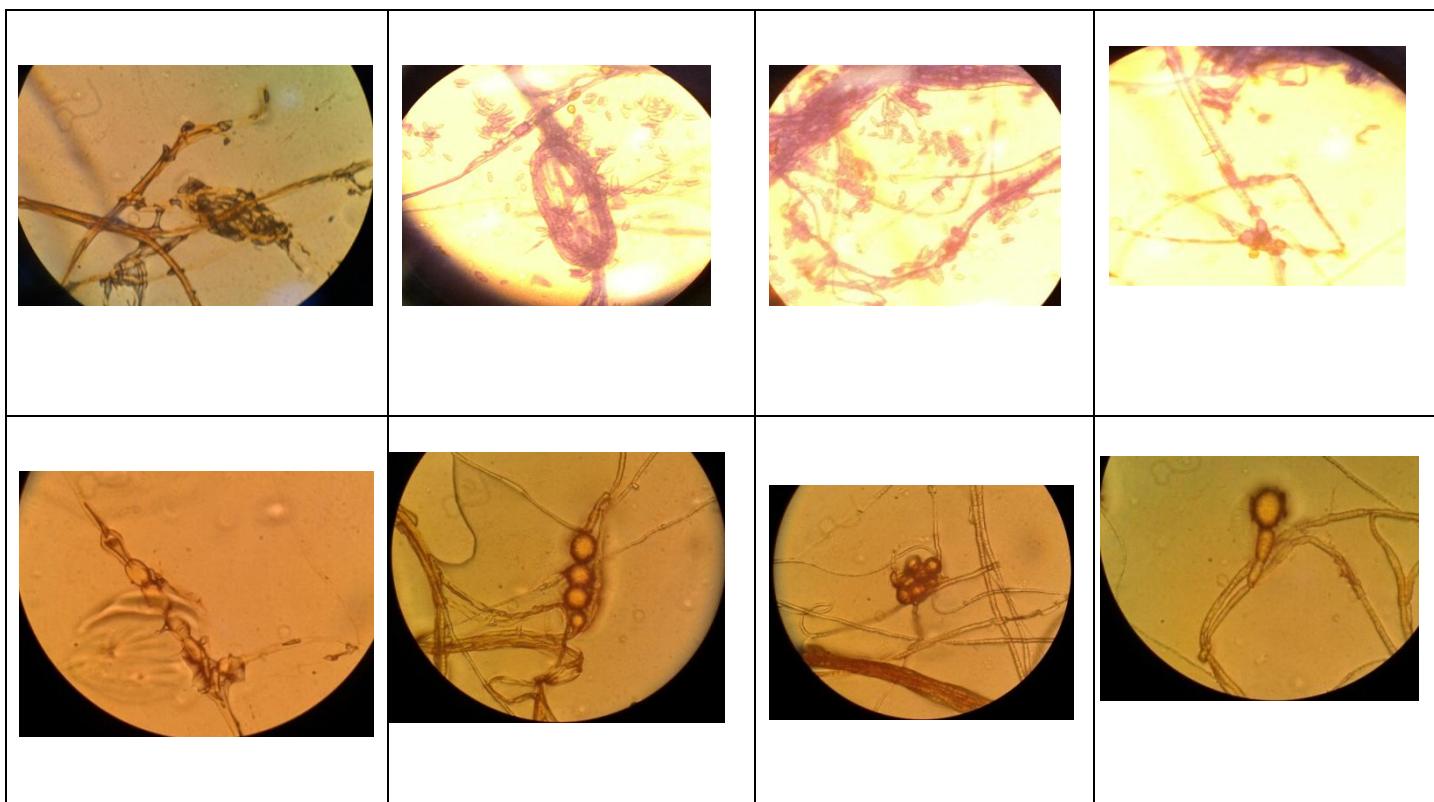
Anexo B 2 OSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE LAS COLONIAS EN MEDIO PDA.

Anexo B 3 Colonias de Cerratobasidium sp.(Andrea Crespo y Belén Ortega.)

Las fotografías muestran cultivos en medio PDA de colonias algodonosas de color café con crecimiento ramificado que corresponde a ceratorriza.

UNIVERSIDAD DE CUENCA.

2. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LAS COLONIAS EN MEDIO PDA.



Anexo B 4 Hifas y estructuras del hongo del género *Cerratobasidium*
vistas al microscopio, lente 40x. (Andrea Crespo y Belén Ortega)

Anexo C FOTOS DE CRECIMIENTO: SIEMBRA EN OSCURIDAD.
ESPECIE DE ORQUÍDEA: *Epidendrum sp.*
FECHA DE SIEMBRA: 05/12/2014.

FECHA DE REVISIÓN: 05/01/2015.

ESTADO DE CRECIMIENT O	MEDIO OMA	MEDIO COCO
E0		
E1		
E2		
E3		



E4	A dark, circular image showing the microscopic view of Epidendrum sp. seeds in darkness at 10x magnification.	
E5	A bright, circular image showing the microscopic view of Epidendrum sp. seeds in darkness at 10x magnification.	

Anexo C 1 Siembra en oscuridad de semillas de *Epidendrum* sp, vista al microscopio con lente de 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.)



ESPECIE DE ORQUÍDEA: *Epidendrum sp.*

FECHA DE SIEMBRA: 08/12/2014.

FECHA DE REVISIÓN: 05/01/2015.

ESTADO DE CRECIMIENTO	MEDIO OMA	MEDIO COCO
E0		
E1		
E2		
E3		
E4		



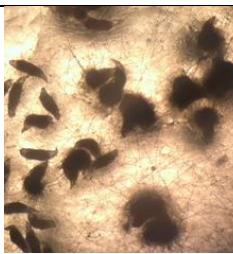
E5	A circular microscopic image showing a single seed of the genus Epidendrum. The seed has a dark, textured center surrounded by a lighter, yellowish-brown outer layer.	
----	--	--

Anexo C 2 Siembra en oscuridad de semillas de *Epidendrum* sp. vista al microscopio con lente de 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.)

ESPECIE DE ORQUÍDEA: *Cochlioda* sp.

FECHA DE SIEMBRA: 11/12/2014.

FECHA DE REVISIÓN: 18/12/2014.

ESTADO DE CRECIMIENTO	MEDIO OMA	MEDIO COCO
E0		
E1		
E2		
E3		
E4		
E5		

Anexo C 3 Siembra en oscuridad de semillas de *Cochlioda* sp. vistas al microscopio con lente 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.)

ESPECIE DE ORQUÍDEA: *Oncidium* sp.

FECHA DE SIEMBRA: 11/12/2014.

FECHA DE REVISIÓN: 02/01/2015.

ESTADO DE CRECIMIENTO	MEDIO OMA	MEDIO COCO
E0		
E1		
E2		
E3		
E4		
E5		

Anexo C 4 Siembra en oscuridad de semillas de *Oncidium* sp. vistas al microscopio con lente de 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.)



ESPECIE DE ORQUÍDEA: *Masdevallia* sp.

FECHA DE SIEMBRA: 11/12/2014.

FECHA DE REVISIÓN: 02/01/2015.

ESTADO DE CRECIMIENTO	MEDIO OMA	MEDIO COCO
E0		
E1		
E2		
E3		
E4		
E5		

Anexo C 5 Siembra en oscuridad de semillas de *Masdevallia* sp. vistas al microscopio con lente de 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.)

ESPECIE DE ORQUÍDEA: *Oncidium cucullatum*.

FECHA DE SIEMBRA: 17/12/2014.

FECHA DE REVISIÓN: 02/01/2015.

ESTADO DE CRECIMIENTO	MEDIO OMA	MEDIO COCO
E0		
E1		
E2		
E3		
E4		



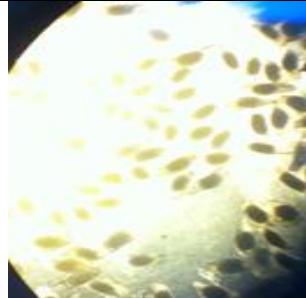
E5	A microscopic image showing several dark, irregularly shaped seed coats of Oncidium cucullatum against a light yellow background. The seeds appear to be covered in a fine, granular texture.	
----	---	--

Anexo C 6 Siembra en oscuridad de semillas de *Oncidium cucullatum*, vistas al microscopio con lente de 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.)

ESPECIE DE ORQUÍDEA: *Oncidium nubigenum*.

FECHA DE SIEMBRA: 17/12/2014.

FECHA DE REVISIÓN: 02/01/2015.

ESTADO DE CRECIMIENTO	MEDIO OMA	MEDIO COCO
E0		
E1		
E2		
E3		



		
E4		
E5		

**Anexo C 7 Siembra en oscuridad de semillas de *Oncidium nubigenum*,
vistas al microscopio con lente de 10x. (Andrea Crespo y Belén Ortega.)**



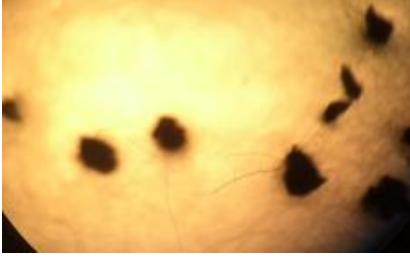
ESPECIE DE ORQUÍDEA: *Sympyglossum sanguineum*.

FECHA DE SIEMBRA: 17/12/2014.

FECHA DE REVISIÓN: 02/01/2015.

ESTADO DE CRECIMIENTO	MEDIO OMA	MEDIO COCO
E0		
E1		
E2		
E3		



E4	 A microscopic image showing several dark, irregularly shaped seedlings or young plants against a yellow-tinted background.	
E5		

Anexo C 8 Siembra en oscuridad de semillas de *Symphyglossum sanguineum*. Vistas al microscopio con lente de 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.)

Anexo D FOTOS DE CRECIMIENTO: SIEMBRA EN LUZ**ESPECIE DE ORQUÍDEA:** *Epidendrum sp.***FECHA DE SIEMBRA:** 19/12/2014.**FECHA DE REVISIÓN:** 04/01/2015.

ESTADO DE CRECIMIENTO	MEDIO OMA	MEDIO COCO
E0		
E1		
E2		



E3		
E4		
E5		

Anexo D 1 Siembra en luz de semillas de *Epidendrum* sp. vistas al microscopio con lente de 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.)



ESPECIE DE ORQUÍDEA: *Sympyglossum* sp.

FECHA DE SIEMBRA: 17/12/2014.

FECHA DE REVISIÓN: 27/12/2014.

ESTADO DE CRECIMIENTO	MEDIO OMA	MEDIO COCO
E0		
E1		
E2		
E3		



E4	A dark, elongated seed with two long, thin, hair-like appendages (embryos) visible at one end, viewed under a microscope at 10x magnification.	
E5	A dark, elongated seed with two long, thin, hair-like appendages (embryos) visible at one end, viewed under a microscope at 10x magnification.	

Anexo D 2 Siembra en luz de semillas de *Symphyglossum* sp, vistas al microscopio con lente de 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.)



ESPECIE DE ORQUÍDEA: *Oncidium cucullatum*.

FECHA DE SIEMBRA: 18/12/2014.

FECHA DE REVISIÓN: 27/12/2014.

ESTADO DE CRECIMIENTO	MEDIO OMA	MEDIO COCO
E0		
E1		
E2		
E3		
E4		



	A microscopic image showing several dark, oval-shaped seeds of Oncidium cucullatum. One seed is prominent in the center, surrounded by smaller, lighter-colored structures, likely pollen grains or other reproductive material.	
E5	A microscopic image showing several dark, oval-shaped seeds of Oncidium cucullatum. One seed is prominent in the center, surrounded by smaller, lighter-colored structures, likely pollen grains or other reproductive material.	

Anexo D 3 Siembra en luz de semillas de *Oncidium cucullatum*, vistas al microscopio con lente de 10x. (Andrea Crespo y Belén Ortega.)



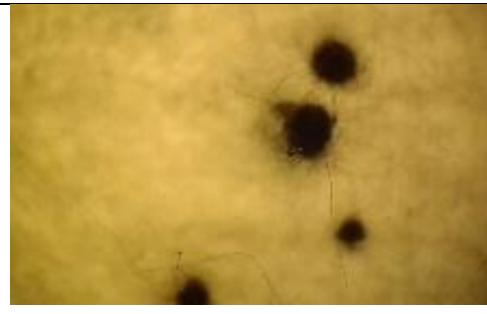
ESPECIE DE ORQUÍDEA: *Masdevallia falcata*.

FECHA DE SIEMBRA: 19/12/2014.

FECHA DE REVISIÓN: 28/12/2014.

ESTADO DE CRECIMIENTO	MEDIO OMA	MEDIO COCO
E0		
E1		
E2		
E3		



E4		
E5		

Anexo D 4 Siembra en luz de semillas de *Masdevallia falcata*, vistas al microscopio con lente de 10x. (Andrea Crespo y Belén Ortega.)



ESPECIE DE ORQUÍDEA: *Masdevallia dimorfotricha*.

FECHA DE SIEMBRA: 19/12/2014.

FECHA DE REVISIÓN: 30/12/2014.

ESTADO DE CRECIMIENTO	MEDIO OMA	MEDIO COCO
E0		
E1		
E2		
E3		
E4		



	A microscopic image showing a single seed of <i>Masdevallia dimorfotricha</i> . The seed is dark brown and has several long, thin, hair-like appendages (pilosity) extending from its surface.	
E5	A microscopic image showing a single seed of <i>Masdevallia dimorfotricha</i> . The seed is dark brown and has several long, thin, hair-like appendages (pilosity) extending from its surface.	

Anexo D 5 Siembra en luz de semillas de *Masdevallia dimorfotricha*, vistas al microscopio con lente de 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.)

ESPECIE DE ORQUÍDEA: *Oncidium cucullatum*.

FECHA DE SIEMBRA: 7/1/2015.

FECHA DE REVISIÓN: 15/01/2015.

ESTADO DE CRECIMIENTO	MEDIO OMA	MEDIO COCO
E0		
E1		
E2		
E3		



E4	
E5	

Anexo D 6 Siembra en luz de semillas de *Oncidium cucullatum*, vistas al microscopio con lente de 10x. (Andrea Crespo y Belén Ortega.)



ESPECIE DE ORQUÍDEA: *Oncidium nubigenum*.

FECHA DE SIEMBRA: 7/1/2015.

FECHA DE REVISIÓN: 15/01/2015.

ESTADO DE CRECIMIENTO	MEDIO OMA	MEDIO COCO
E0		
E1		
E2		
E3		



E4	A microscopic image showing a single seed of <i>Oncidium nubigenum</i> . The seed is dark brown with a distinct longitudinal groove running along its length. It is set against a light-colored, textured background, likely the surface of a petri dish.	
E5	A microscopic image showing a single seed of <i>Oncidium nubigenum</i> . The seed is dark brown with a distinct longitudinal groove running along its length. It is set against a light-colored, textured background, likely the surface of a petri dish.	

Anexo D 7 Siembra en luz de semillas de *Oncidium nubigenum*, vistas al microscopio con lente de 10x. (Andrea Crespo y Belén Ortega.)



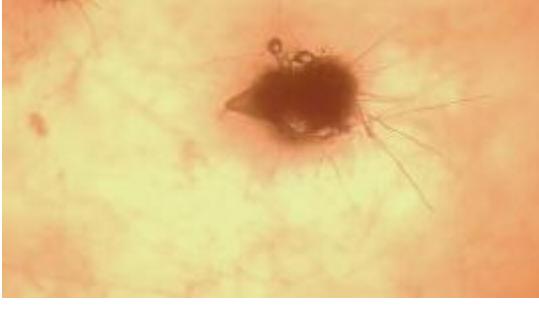
ESPECIE DE ORQUÍDEA: *Sympyglossum* sp.

FECHA DE SIEMBRA: 07/01/2015.

FECHA DE REVISIÓN: 15/01/2015.

ESTADO DE CRECIMIENTO	MEDIO OMA	MEDIO COCO
E0		
E1		
E2		
E3		
E4		



		
E5		

Anexo D 8 Siembra en luz de semillas de *Symphyglossum* sp. vistas al microscopio con lente de 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.)



ESPECIE DE ORQUÍDEA: *Sympyglossum sanguineum*.

FECHA DE SIEMBRA: 09/01/2015.

FECHA DE REVISIÓN: 10/01/2015.

ESTADO DE CRECIMIENTO	MEDIO OMA	MEDIO COCO
E0		
E1		
E2		
E3		



E4		
E5		

Anexo D 9 Siembra en luz de semillas de *Symphyglossum sanguineum*, vistas al microscopio con lente de 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.)

ESPECIE DE ORQUÍDEA: *Sympyglossum* sp.

FECHA DE SIEMBRA: 09/01/2015.

FECHA DE REVISIÓN: 19/01/2015.

ESTADO DE CRECIMIENTO	MEDIO OMA	MEDIO COCO
E0		
E1		
E2		
E3		
E4		
E5		



Anexo D 10 Siembra en luz de semillas de *Symphyglossum* sp, vistas al microscopio con lente de 10x (Andrea Crespo y Belén Ortega.)