

UNIVERSIDAD ESTATAL DE CUENCA.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Escuela de Bioquímica y Farmacia.



**“ AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE MICORRIZAS CON EVALUACIÓN
PRELIMINAR DE SU EFECTO EN LA GERMINACIÓN DE ORQUIDEAS
EN EL ORQUIDEARIO DE LA UNIVERSIDAD DE CUENCA.”**

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

DIRECTORA:

Dra. Raffaella Ansaloni.

TESISTAS:

ERIKA TATIANA LEÓN MOLINA.

ROXANA LUCIA MOLINA LÓPEZ.

Cuenca- Ecuador

2015.

RESUMEN

Las micorrizas se encuentran en las raíces de las orquídeas, formando una asociación simbiótica. De aquí que es posible aislar los hongos por medio de la siembra de las raíces de orquídeas. Para realizar este trabajo se sembraron distintos fragmentos de raíces de cuarenta y un especies de orquídeas, y de estas múltiples siembras se consiguió aislar diez diferentes cepas de hongos.

Como resultado cuatro de las diez cepas tuvieron un efecto positivo en la germinación simbiótica de algunas de las semillas empleadas, es decir, el efecto de los hongos hizo que las semillas germinen en menor tiempo que las que no estuvieron expuestas. En algunas de las otras cepas se observaron efectos patógenos.

Palabras claves: micorrizas, raíces, orquídeas, asociación simbiótica, hongos, semillas.

ABSTRACT

Mycorrhiza can be found in the roots of orchids forming a symbiotic association; hence, molds can be isolated by seeding the roots of Orchids. In order to accomplish the latter, different fragments of roots of forty-one orchid species were planted, and these multiple plantings were able to isolate ten different strains of molds.

As a result, four of the ten strains had a positive effect on the symbiotic germination of some seeds employed; the effect of molds did seeds to germinate in a shorter time than those not exposed. In some of the other strains, pathogenic effects were observed.

Key Words: Mycorrhiza, roots, orchids, symbiotic association, molds, seeds.

INDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INDICE	4
INDICE DE TABLAS	6
INDICE DE FIGURAS	7
INDICE DE GRÁFICOS	8
INDICE DE ANEXO	9
DEDICATORIA.....	10
AGRADECIMIENTO	15
INTRODUCCIÓN	16
OBJETIVOS.....	18
1. MARCO TEÓRICO	19
1.1 ORQUÍDEAS.....	19
1.1.1. Generalidades de las Orquídeas	19
1.1.2 Posición de las Orquídeas en el Reino Vegetal	19
1.1.3. Ciclo vegetativo.....	20
1.1.4. Estadios del desarrollo de protocormos de semillas de orquídeas .	21
1.1.5. Germinación.....	21
1.1.6. Distribución de Orquídeas en el Ecuador.....	24
1.1.7. Descripción de las especies de Orquídeas utilizadas en el proceso de germinación simbiótica en el presente trabajo.....	25
1.2. Micorrizas	34
1.2.1 Clases de micorrizas.....	34
1.2.2 Formación de una micorriza.....	34
1.2.3 Micorrizas en las Orquídeas	35
1.2.4 Identificación de <i>Rhizoctonia</i>	36
1.2.5 Morfología y citología de <i>Rhizoctonia</i>	38
2. MATERIALES Y MÉTODOS	41
2.1 ÁREA DE ESTUDIO Y MUESTREO	41
2.2 MATERIALES Y REACTIVOS:.....	41

2.3 MEDIOS DE CULTIVO	42
2.3.1 Medio FIM (Fungi Isolation Medium):.....	42
2.3.2 Medio PDA (Agar Dextrosa-Papa):	42
2.3.3 Medio OMA (Agar Avena)	42
2.3.4 Medio Murashige y Skoog (MS) modificado Coco:	43
2.4. SEMILLAS Y HONGOS EMPLEADOS.....	44
2.5 MÉTODOS	46
2.5.1 Aislamiento del hongo micorrícico	46
2.5.2 Siembra – germinación	51
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
3.1 IDENTIFICACIÓN DEL HONGO	54
3.1.1. Características morfológicas de los hongos aislados.....	54
3.1.2. Efecto de los hongos aislados sobre la germinación de semillas de diferentes especies de orquídeas.	65
3.1.3. Evaluación de relaciones interespecíficas.	79
DISCUSIÓN	84
CONCLUSIONES	89
RECOMENDACIONES	91
REFERENCIAS	92
ANEXOS	97

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Semillas y hongos empleados en el trabajo.....	44
Tabla 2. Características morfológicas de los hongos micorrílicos aislados.	55
Tabla 3. Efecto de los aislamientos micorrílicos sobre la germinación de las semillas de <i>Epidendrum ibaguense</i>	66
Tabla 4. Efecto de los aislamientos micorrílicos sobre la germinación de las semillas de <i>Epidendrum jamiesonis</i>	67
Tabla 5. Efecto de los aislamientos micorrílicos sobre la germinación de las semillas de <i>Masdevallia polystictae</i> , <i>Scaphocephalum tiaratum</i> y <i>Caucae rhodosticta</i>	70
Tabla 6. Efecto de los aislamientos micorrílicos sobre la germinación de las semillas de <i>Maxillaria lehmannii</i>	73
Tabla 7. Efecto de los aislamientos micorrílicos sobre la germinación de las semillas de <i>Oncidium aureum</i>	75
Tabla 8. Efecto de los aislamientos micorrílicos sobre la germinación de las semillas de <i>Cochlioda noezliana</i>	77
Tabla 9. Efecto de los aislamientos micorrílicos sobre la germinación de las semillas de <i>Pleurothallis truncata</i>	78
Tabla 10. Relaciones interespecíficas entre las orquídeas de prueba y los hongos analizados	82

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estadios de crecimiento de los protocormos en semilla de orquídea	21
Figura 2. Caucae rhodosticta	25
Figura 3. Cochlioda noezliana.....	26
Figura 4. <i>Epidendrum spp</i>	27
Figura 5. Masdevallia polystictae	29
Figura 6. Maxillaria lehmannii Rchb	30
Figura 7. Oncidium aureum.....	31
Figura 8. Pleurothallis truncata.....	32
Figura 9. Scaphosepalum tiaratum.....	33
Figura 10. Células monilioides uninucleadas y binucleadas	39
Figura 11. Género Rhizoctonia.....	40

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Germinación de <i>Epidendrum ibaguense</i> presencia de distintos hongos. Se presenta el porcentaje promedio de semillas en estadio 1 o superior.....	66
Gráfico 2. Germinación de <i>Epidendrum jamiesonis</i> presencia de distintos hongos. Se presenta el porcentaje promedio de semillas en estadio 1 o superior.....	68
Gráfico 3. Germinación de <i>Masdevallia polystictae</i> , <i>Scaphocephalum tieratum</i> y <i>Caucae rodhosticta</i> en presencia de distintos hongos. Se presenta el porcentaje promedio de semillas en estadio 1 o superior.....	72
Gráfico 4. Germinación de <i>Maxillaria lehmannii</i> presencia de distintos hongos. Se presenta el porcentaje promedio de semillas en estadio 1 o superior.....	74
Gráfico 5. Germinación de <i>Oncidium aureum</i> presencia de distintos hongos. Se presenta el porcentaje promedio de semillas en estadio 1 o superior.....	76
Gráfico 6. Germinación de <i>Cochlioda noezliana</i> presencia de distintos hongos. Se presenta el porcentaje promedio de semillas en estadio 1 o superior	77
Gráfico 7. Germinación de <i>Pleurothallis truncata</i> , presencia de distintos hongos. Se presenta el porcentaje promedio de semillas en estadio 1 o superior.....	79
Gráfico 8. Diferencia entre el porcentaje de germinación de las semillas en el medio con cada hongo y el control.....	80



INDICE DE ANEXO

ANEXO A. PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO	97
ANEXO B. RECOLECCION DE RAICES	100
ANEXO C. ESTADIOS DE LAS SEMILLAS EN LA EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA GERMINACIÓN SIMBIÓTICA.....	101
ANEXO D. ESTADIOS DE LAS SEMILLAS EN LA EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA	108



Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

Erika Tatiana León Molina, autora de la tesis "AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE MICORRIZAS CON EVALUACION PRELIMINAR DE SU EFECTO EN LA GERMINACION DE ORQUIDEAS EN EL ORQUIDIARIO 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 autor/a

Cuenca, 12 de Noviembre del 2015



Erika Tatiana León Molina

C.I: 0302302088



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

Erika Tatiana León Molina, autora de la tesis "AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE MICORRIZAS CON EVALUACIÓN PRELIMINAR DE SU EFECTO EN LA GERMINACIÓN DE 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, 12 de Noviembre del 2015

Erika Tatiana León Molina

C.I:0302302088



Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

Roxana Lucia Molina López, autora de la tesis "AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE MICORRIZAS CON EVALUACION PRELIMINAR DE SU EFECTO EN LA GERMINACION DE ORQUIDEAS EN EL ORQUIDIARIO 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, 12 de Noviembre del 2015

Roxana Lucia Molina López

C.I: 0104249115



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

Roxana Lucia Molina López, autora de la tesis "AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE MICORRIZAS CON EVALUACIÓN PRELIMINAR DE SU EFECTO EN LA GERMINACIÓN DE 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, 12 de Noviembre del 2015

Roxana Lucia Molina López

C.I:0104249115



DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a Dios por darme fuerza y sabiduría para salir adelante y poder llegar a cumplir uno de mis sueños.

A mis padres Franklin y Mariana por su ejemplo de perseverancia y responsabilidad; por el apoyo, comprensión, paciencia y sobre todo por el cariño brindado.

A mi esposo Edwin por toda la comprensión y apoyo, por ser mi soporte día a día y por el amor incondicional que me ha brindado llegando a ser una parte indispensable de mi vida.

Tatiana

Esta tesis está dedicada a mis ancestros, por la continuidad de la vida, a mis padres Xavier y María Rosa por todo su amor y apoyo, por su ejemplo de responsabilidad y rectitud.

A mi esposo Pablo, por su generoso corazón y su incondicional amor.

A mis hijos, porque son la luz de mi vida.

Roxana



AGRADECIMIENTO

Agradecemos a Dios por la bendición de la vida y por la luz que representa en nuestros caminos.

A nuestras queridas familias, por el amor y el apoyo incondicional.

Un especial agradecimiento a la Dra. Raffaella Ansaloni por su cariñosa acogida para la dirección de nuestra tesis, y por todo su apoyo y conocimientos compartidos.

A la Dra. María Elena Cazar Phd, al Dr. Geovany Larriva y a la Dra. Mónica Narváez por su cortesía, al ser facilitadores de nuestro trabajo.

Al Dr. Lawrence Zettler y a Shannon Skarha por su generosa apertura y conocimientos brindados.

A todos nuestros profesores.

Tatiana y Roxana

INTRODUCCIÓN

En la naturaleza existen organismos que se benefician mutuamente al vivir juntos, esta relación de colaboración se denomina simbiosis, y puede ocurrir entre especies de un mismo reino o diferentes reinos; así por ejemplo es el caso de las micorrizas, cuya relación es hongo – planta.

Se ha observado que algunas plantas se encuentran distribuidas en zonas en donde sus hongos micorrícos toleran las condiciones de dichos suelos, es decir de ellos depende la proliferación de estas plantas, por ello se plantea que las micorrizas tuvieron un papel importante en la colonización de la tierra firme por parte de las plantas, ya que estos ayudan a la conversión de amonio en nitrato y facilitan la absorción del fósforo necesario para el crecimiento de las plantas; en este grupo se encuentran las orquídeas. (Zettler, 2011)

Las orquídeas se caracterizan por su relación micorríca obligada ya que la estructura que posee su semilla es carente de endospermo, es decir sus fuentes nutricionales para desarrollar al embrión son muy escasas; de ahí que necesitan aprovechar las sustancias absorbidas por los hongos a través de sus hifas, tales como agua y fósforo, existen otros casos en donde el hongo es digerido en el interior de las células de la planta y todos estos nutrientes son aprovechados por la misma. Por otro lado el hongo se beneficia de la planta al utilizar los productos de la fotosíntesis tales como carbohidratos. (Mosquera, 2010)

El estudio de micorrizas constituye una herramienta importante para la conservación y propagación de las orquídeas, ya que en la reproducción por germinación simbiótica se presentan ventajas respecto a la asimbiótica puesto que la interacción entre la planta y el hongo micorriza facilita en la mayoría de los casos la obtención de plantas más viables y resistentes. (Zettler, 2013)

La mayoría de las orquídeas son plantas epifitas que habitan en zonas tropicales y subtropicales sin embargo, la mayoría de estudios realizados con respecto a la presencia de micorrizas las especies más investigadas han sido



particularmente terrestres nativas de Norteamérica, Europa, Asia y Australia, en las cuales se ha encontrado micorrizas de género *Rhizoctonia*.

En el Ecuador la investigación de micorrizas en orquídeas está siendo un tema de interés, constituyendo un campo todavía poco explorado.

En esta investigación se logró aislar diez cepas diferentes de hongos micorrílicos, cuyas características morfológicas pertenecen al género *Rhizoctonia*; posteriormente se realizó la germinación simbiótica in vitro con nueve semillas de diferentes especies de orquídeas (*Epidendrum ibaguense*, *Masdevallia polystictae*, *Scaphocephalum tiaratum*, *Caucae rhodosticta*, *Pleurothallis truncata*, *Epidendrum jamiesonis*, *Maxillaria lehmannii*, *Oncidium aureum*, *Cochlioda noezliana*), evaluando el efecto sobre la germinación de en cada una.

OBJETIVOS

El presente estudio se basó en los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto simbiótico entre semillas de orquídeas y hongos micorrílicos aislados de estas plantas, en el proceso de germinación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar los hongos formadores de micorrizas presentes en orquídeas silvestres.
- Determinar el efecto de la presencia de los hongos micorrílicos aislados e identificados sobre el proceso de germinación y crecimiento de semillas de orquídeas.
- Evaluar si existe relación interespecífica entre el proceso de germinación de las orquídeas investigadas y los hongos aislados.

CAPÍTULO I.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 ORQUÍDEAS.

1.1.1. Generalidades de las Orquídeas

La familia de las Orquidáceas es considerada una de las más extensas, atribuyéndole hasta 30000 especies, las mismas que se encuentran distribuidas en los cinco continentes, de manera especial en zonas tropicales, subtropicales, bosques húmedos o secos, localizados desde los 0 a los 4500 metros de altura sobre el nivel del mar.

Este grupo tan amplio presenta formas florales muy diversas, entre discretas y muy exóticas, las cuales han marcado un valor ornamental importante.(Calaway, 200).

Esta diversidad se debe a la morfología que presentan sus semillas, la misma que favorece la variabilidad de la expresión genética. (Warkup, 1973)

En la actualidad, las orquídeas han tomado posición en el mercado, convirtiéndose en parte significativa de la industria de plantas ornamentales, cultivándose sobre todo variedades híbridas de especies tropicales. (McInnis, 2007)

1.1.2 Posición de las Orquídeas en el Reino Vegetal

En la naturaleza existen plantas que producen semillas, las mismas que se dividen en dos grandes grupos: las gimnospermas, que presentan semillas desnudas y constituyen alrededor de 860 especies, y las angiospermas en donde las semillas se encuentran encerradas en una estructura conocida como carpelo, este grupo comprende 260000 especies y se subdivide en dos grupos claramente definidos: dicotiledóneas y monocotiledóneas.

Cuando se desarrolla la semilla de la planta angiosperma, puede desarrollar una o dos hojas embrionarias o cotiledones, cuya misión es proporcionar

sustancias nutritivas en las primeras etapas de desarrollo. De ahí que las monocotiledóneas presentan un solo cotiledón mientras que las dicotiledóneas desarrollan dos cotiledones. (Velasco, 2008)

La familia de las orquídeas pertenecen a las monocotiledóneas, poseen flores que son a la vez masculinas y femeninas; se habla en estos casos de flores hermafroditas; por lo generalmente la fecundación no se lleva a cabo entre los dos sexos de una misma flor, sino que las células sexuales masculinas son transportadas hasta los órganos femeninos de una flor distinta. Este transporte recibe el nombre de polinización. (Velasco, 2008)

1.1.3. Ciclo vegetativo

Las orquídeas tienen la capacidad de vivir varios años y florecer anualmente siempre que las condiciones sean favorables; esto se debe a que en su estructura presentan pseudotubérculos o rizomas que le permiten subsistir ante épocas desfavorables. (Zettler, 2013)

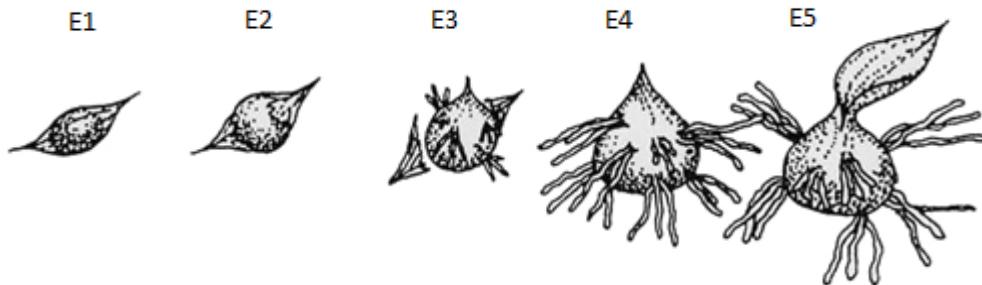
El proceso de crecimiento de las hojas y raíces se va dando simultáneamente, y se produce gracias a la asociación simbiótica con hongos que invaden la semilla; son hongos del género *Rhizoctonia*, que se encuentran en el suelo.

Al transcurrir el tiempo, alrededor de dos meses, las yemas van produciendo nuevas hojas, a su vez la yema produce una raíz que al poco tiempo atraviesa el catafilo; la raíz va engrosando para transformarse en un tubérculo radical en donde se almacenan sustancias constituyentes y energéticas que posteriormente servirán para abastecer en el periodo vegetativo siguiente de la planta; por otro lado en este tubérculo se encuentra la yema caulinar, la misma que dará lugar a las hojas y al tallo floral. (Zettler, 2013)

Las semillas de orquídeas son muy pequeñas, 1-2mm de largo y 0.5-1mm de ancho y se encuentran cubiertas por una testa gruesa que encierra al embrión la testa está formada por un tejido muerto, compuesto hasta en un 96% de aire,

de tal forma que cada semilla puede ser considerada como un auténtico globo; a su vez cada cápsula puede contener entre 1300 a 4000000 de semillas.

1.1.4. Estadios del desarrollo de protocormos de semillas de orquídeas



E1: producción de uno o más rizoides, E2: ruptura del 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.

Figura 1. Estadios de crecimiento de los protocormos en semilla de orquídea.
Fuente: (Herbarium, 2011).

1.1.5. Germinación

Durante muchos años los horticultores han reproducido estas plantas in vitro y con germinación asimbiótica usando medios nutritivos ya que las semillas de las orquídeas se consideran estériles al carecer de un tejido de nutrición llamado endospermo; las condiciones de humedad, calor, y aireación en este caso no resultan suficientes para la germinación, es por esta razón que la semilla necesita ser colonizada por hongos micorrílicos para su sustento nutricional y el aporte de nutrientes al embrión en desarrollo permitiendo la germinación de la planta en condiciones naturales.

Esta asociación tiene lugar con hongos del género *Rhizoctonia*, formando así una relación simbiótica que se denomina micorriza. (Velasco, 2008)

En estas circunstancias, las hifas del hongo aportan al embrión los azúcares necesarios para su crecimiento, funcionando como pequeñas raíces que absorben las sustancias nutritivas del medio. Es posible conseguir la germinación de las semillas de orquídeas en ausencia de hongos micorrílicos, si se siembran en un medio de cultivo con una elevada concentración de azúcares. (Zettler, 2013)

En 1920, el investigador Beau, realizó un experimento muy sencillo que confirmó el papel de los hongos en el desarrollo de las semillas, este experimento consistió en hacer crecer en un medio nutritivo el micelio de una especie de *Rhizoctonia*, por otro lado puso en la superficie un vidrio de reloj que contenía algunas semillas de orquídeas; al paso de algunos días las hifas que crecieron del hongo treparon el vidrio de reloj y se pusieron en contacto con las semillas colonizándolas, entonces se observó que empezaron a germinar normalmente, luego de esto se procedió a destruir las hifas en contacto y como resultado de ello el proceso de germinación quedó interrumpido.

El pionero en germinación simbiótica fue Bernard en 1909 y se fue desarrollando con los científicos Warcup y Clements (1971 – 1982); corroborando así el papel importante de los hongos para el crecimiento de algunas plantas como las orquídeas. (Clements, 1986)

El papel del hongo es actuar como un intermediario entre el embrión y las sustancias nutritivas del suelo.

Las micorrizas de las orquídeas no sólo nutren a los embriones en desarrollo, sino que en diversas especies enteramente heterótrofas, como *Limodorum trabutianum*, que no produce clorofila, la planta está permanentemente asistida por un hongo micorrílico. (McInnis, 2007) (Zettler, 2013)

En las orquídeas autótrofas, la planta es capaz de sintetizar suficiente cantidad de carbohidratos como para mantener una vida independiente de las

micorrizas, sin embargo, el hongo que invade el tejido embrionario a menudo queda asociado a la orquídea durante toda la vida de ésta.

Las micorrizas de las orquídeas son de tipo endótrofo, son endomicorrizas, es decir, las hifas del hongo viven en el interior de las células y no sólo en los espacios intercelulares.

Las hifas crecen formando una especie de ovillo en el citoplasma de las células, denominado pelotón. El hongo se comporta como parásito en las capas celulares externas de la corteza de las raíces, mientras que en las internas, la orquídea digiere los ovillos y aprovecha las sustancias nutritivas del hongo. De este modo, la relación se establece sobre la base de un equilibrio: el hongo no debe invadir completamente los tejidos de la orquídea ni ésta debe digerir todas las hifas del hongo. (Velasco, 2008)

Existe la hipótesis de que la relación simbiótica entre el hongo y las orquídeas se ha desarrollado evolutivamente muy temprano cuando no habían aparecido aún especies epifitas y todas ellas eran plantas terrestres. Es evidente el hecho de que en ningún caso se haya perdido la relación micorríca en las especies actuales, ya sean terrestres o epifitas. (Zettler, 2010)

En los recientes años la germinación simbiótica in vitro, ha ido tomando mayor importancia por la eficacia en el impacto de la conservación y desarrollo de orquídeas, así mismo ha ayudado a la conservación de especies en peligro.

Las relaciones micorrícas obligadas de las orquídeas siguen todavía siendo estudiadas. (Velasco, 2008)

La asociación simbiótica es necesaria para la gluconeogénesis, movilizando reservas y para proveer nutrientes a las semillas; es importante reconocer que las micorrizas aisladas deben provenir de orquídeas silvestres, ya que en un medio natural la colonización del hongo ocurre de manera apropiada. El aislamiento del hongo se puede realizar a partir de raíces de plantas maduras, pero en su preferencia de aquellas plántulas recién germinadas, es decir raíces

jóvenes en las que se sospecha existen pelotones activos, que en su defecto serán los más probables de ser aislados.

Es muy importante saber que la fase de recolección y selección de las raíces de orquídeas que van a ser sembradas para aislar los hongos micorrílicos constituye una etapa crucial, ya que de esto depende la eficacia del aislamiento. (Zettler, 2010)

1.1.6. Distribución de Orquídeas en el Ecuador

La familia de las Orquidaceas aporta con un tercio del total de especies fitoendémicas del Ecuador (1710 spp.). Dada la situación geográfica en nuestro país existen orquídeas en todos los pisos altitudinales comprendidos entre 0 y 4500m; la mayor cantidad de orquídeas endémicas se encuentran en los micro hábitats presentes en los sistemas montañosos entre los 1500-3000m, especialmente en los bosques montano bajos y de neblina montanos (Endara, 2008)

Más de la mitad de las especies de orquídeas endémicas (58%) se encuentran en una sola unidad de vegetación, el 26% se hallan en dos tipos de bosque, el 10% en tres tipos de bosque, y solamente el 6% se encuentra en cuatro o más unidades de vegetación. (Endara, 2008)

En el país se registran 219 géneros de orquídeas, 4.250 especies clasificadas y 1.301 especies endémicas en ambientes tropicales, subtropicales y en zonas conservadas, sean templadas o frías.

1.1.7. Descripción de las especies de Orquídeas utilizadas en el proceso de germinación simbiótica en el presente trabajo.

1.1.7.1. Caucae rhodostictum Kraenzl sinónimo: Oncidium rhodostictum

- Clase: *Equisetopsida C. Agardh*
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden: *Lilianae Takht.*
- Orden: *Asparagales Link*
- Familia: *Orchidaceae Juss.*
- Género: *Oncidium Sw*

(Tropicos, 2015) (Kraenzlin, 2001)

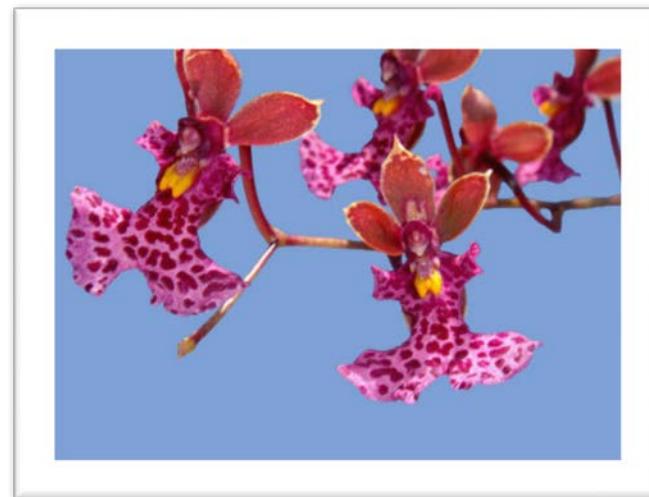


Figura 2. Caucae rhodosticta. **Fuente:** (Winsome, 2015)

Lleva el nombre del Departamento del Cauca, en el sur de Colombia, en donde se encontró la planta por primera vez.

Esta especie se caracteriza por presentar pseudobulbos de un solo nudo, las inflorescencias laterales con ausencia de espolón en la flor, el labelo no angulado con callo basal sólido, cuadrado y la columna con lóbulo carnoso aliforme a cada lado de su base. Son plantas epífitas andinas que crecen en

bosques nublados y fríos a una altura de entre 2500 a 2800 metros; es un género originario de Venezuela, Colombia y Ecuador. (Calaway, 1998)

1.1.7.2. *Cochlioda noezliana*.

- Clase: *Equisetopsida* C. Agardh
- Subclase: *Magnoliidae* Novák ex Takht.
- Superorden: *Lilianae* Takht.
- Orden: *Asparagales* Link
- Familia: *Orchidaceae* Juss.
- Género: *Cochlioda* Lindl.

(Tropicos, 2015)



Figura 3. *Cochlioda noezliana*. **Fuente:** (Southern California, 2014)

Etimológicamente proviene del griego Kochliodes que se refiere a la forma de concha del callo en el labelo.

Se caracteriza por la presencia de pseudobulbos unifoliados y bifoliados, sostenidos por vainas foliáceas dísticas. La inflorescencia basal de una longitud de 50 cm se produce desde el eje de las vainas y generan flores sin espolón. La floración es abundante y perfumada durando un mes. La columna no tiene pie. El diámetro de las flores de 5 a 7 cm.

Son epifitas o rupícolas de bosques nublados en alturas de 2000 a 3500 metros y se encuentra distribuida en zonas frías de los bosques de niebla de zonas montañosas en Los Andes de Perú, Bolivia, y Ecuador. (Yanes, 2006) (Calaway, 1998)

1.7.3 *Epidendrum L.*

- Clase: *Equisetopsida C. Agardh*
- Subclase: *Magnoliidae Novák ex Takht.*
- Superorden: *Lilianae Takht.*
- Orden: *Asparagales Link*
- Familia: *Orchidaceae Juss.*

(Tropicos, 2015)



Figura 4. *Epidendrum spp.* **Fuente:** (Tatiana León y Roxana Molina)

Esta especie fue descrita en 1763 por Linnaeus, incluyéndola en las especies conocidas de las regiones tropicales reportadas como epifitas. Etimológicamente proviene del griego *epi*: sobre y *dendrom*: árbol, debido a que estas especies crecen sobre los árboles.

Posee un perigonio con sus hojas exteriores patentes y las interiores iguales o más estrechas, rara vez más anchas, poseen un tallo falsamente bulboso en la base o en el ápice, alguna vez alargado; sus hojas se presentan carnosas y las flores espigadas, racimosas, terminales o laterales. Tallos secundarios comúnmente delgados o a modo de cañas, simples a muy ramificados, foliados o algunas veces engrosados en pseudobulbos cilíndricos que llevan 1–5 hojas apicales

Este género comprende unas 1000 especies de orquídeas en su mayoría de hábitos epifitas aunque también hay unas pocas especies terrestres. Se encuentran en la América tropical desde Florida, hasta el Norte de Argentina. (Rollke, 2010)(Calaway, 2010)

1.1.7.4. *Masdevallia polystictae* Rchb. F

- Clase: *Equisetopsida* C. Agardh
- Subclase: *Magnoliidae* Novák ex Takht.
- Superorden: *Lilianae* Takht.
- Orden: *Asparagales* Link
- Familia: *Orchidaceae* Juss.
- Género: *Masdevallia* Ruiz & Pav.

(Tropicos, 2015)



Figura 5. *Masdevallia polystictae*. (Tatiana León y Roxana Molina)

El nombre de “*Masdevallia*”, es en honor a José Masdevall Terrades Llobet y Berenguer, un médico y botánico en la corte de Carlos III de España.

Son plantas que no poseen pseudobulbos, tienen un tamaño pequeño y crecen formando una mata, sus flores son de color naranja, sus sépalos soldados por la base son muy grandes y resultan desproporcionados en relación con los pétalos y el labelo.

Estas plantas se encuentran desde México hasta el Sur de Brasil, pero la mayoría se encuentran en regiones de gran altitud (2,500 – 4,000 m) de los Andes de Ecuador y Colombia, Perú y Bolivia. Pueden ser epífitas, terrestres o desarrollarse como litófitas en las rocas desnudas. (Martija, 2012) (Calaway, 2002)

1.1.7.5. *Maxillaria Ruiz & Pavón.*

- Clase: *Equisetopsida C. Agardh*
- Subclase: *Magnoliidae Novák ex Takht.*
- Superorden: *Lilianae Takht.*
- Orden: *Asparagales Link*
- Familia: *Orchidaceae Juss.*
- Género: *Maxillaria Ruiz & Pav.*

(Tropicos, 2015)



Figura 6. *Maxillaria lehmannii* Rchb. F. (Tatiana León y Roxana Molina)

Su nombre proviene del latín maxilla que significa barbilla, y esto se debe a que su labelo es móvil y sus flores son muy versátiles. En su mayoría son epífitas y grandes. Puede poseer o no pseudobulbos, las hojas pueden variar en su forma, algunas planas no muy vascularizadas, los sépalos usualmente libres, y los laterales montados en la columna formando un mentón.

Se distribuyen en la selva desde el nivel del mar hasta los 3500 msnm, en las regiones tropicales y subtropicales de América. (Calaway, 2002)

1.1.7.6 *Oncidium aureum* Lndl.

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden: Lilianae Takht.
- Orden: Asparagales Link
- Familia: Orchidaceae Juss.
- Género: *Oncidium* Sw.

(Tropicos, 2015)



Figura 7. *Oncidium aureum*. (Tatiana León y Roxana Molina)

Su nombre proviene del griego onkos (tumor, hinchazón), haciendo referencia al callo que presenta en el labio superior.

Son orquídeas pequeñas y en su gran mayoría epífitas aunque algunas veces terrestres o litófitas. Poseen pseudobulbos unifoliales o bifoliales, de hojas lineales oblanceoladas, atenuadas al pecíolo caniculadas, carinada y veteada con estrechamiento abajo en la base aguda, peciolada. Florecen con una inflorescencia basal, erecta a arqueada, flexible.

Se encuentran distribuidas en Bolivia, Ecuador y Perú, en bosques nublados o en laderas entre los 2000 a 4.700 metros de altitud. (Calaway, 2002)

1.1.7.7 *Pleurothallis truncata* Lindl.

- Clase: *Equisetopsida* C. Agardh
- Subclase: *Magnoliidae* Novák ex Takht.
- Superorden: *Lilianae* Takht.
- Orden: *Asparagales* Link
- Familia: *Orchidaceae* Juss.
- Género: *Pleurothallis* R. Br.

(Tropicos, 2015)



Figura 8. *Pleurothallis truncata*. (Tatiana León y Roxana Molina)

Su nombre viene del griego ‘pleurothallos’, que significa “ramas parecidas a costillas”. Esto se refiere a la similitud de las costillas de los tallos de muchas de sus especies.

Pueden ser terrestres o epífitas, se caracterizan por carecer de pseudobulbos, algunas especies presentan hojas gruesas. Sus flores se encuentran entre las diversas y extrañas, utilizadas para su polinización insectos diminutos tales

como mosquitos o avispas; algunas pueden presentarse parecidas a cañas con una altura de un metro o más.

Se pueden encontrar en lugares secos o húmedos de clima tropical o templado entre los 1000 y 2500 metros. (Calaway, 2003)

1.1.7.8 *Scaphosepalum tiaratum* Luer:

- Clase: *Equisetopsida* C. Agardh
- Subclase: *Magnoliidae* Novák ex Takht.
- Superorden: *Lilianae* Takht.
- Orden: *Asparagales* Link
- Familia: *Orchidaceae* Juss.
- Género: *Scaphosepalum* Pfitzer

(Tropicos, 2015)



Figura 9. *Scaphosepalum tiaratum*. (Tatiana León y Roxana Molina)

Su nombre hace referencia a los sépalos fusionados que forman un saco. Son plantas epífitas de tamaño pequeño, cuyas flores son pequeñas con pétalos carnosos y se presentan en racimo que salen sucesivamente. Su morfología se

asemeja a *Masdevallia*, desde el cual muchas especies se han removido. La columna es alada y fuertemente curvada conteniendo dos polinias.

Se encuentran en los bosques nubosos desde Guatemala hasta Perú en alturas de 500 a 3000 m sobre el nivel del mar. (Calaway, 2002)

1.2. MICORRIZAS

Las micorrizas constituyen una asociación simbiótica entre algunos hongos del suelo y la raíz de la mayoría de las plantas. La unión entre estos hongos y las raíces tienen la particularidad de que ambos se benefician, esto es una simbiosis, ya que la raíz aprovecha los nutrientes que el hongo toma del suelo, y se los traslada a la planta y a su vez, el hongo toma de la planta el carbono necesario para su desarrollo. (Peñaloza, 2012)

1.2.1 Clases de micorrizas

Existen varias clases de micorrizas, por ejemplo las que se forman entre los árboles como cipreses, pinos y robles es denominan ectomicorrizas. Otro grupo lo forman las endomicorrizas, de las cuales las más comunes son las endomicorrizas arbusculares. Este tipo de micorriza es de interés de las plantas que se cultivan como frutales, hortalizas, café, maíz, leguminosas, plantas ornamentales (orquídeas), pasto, etc. (Peñaloza, 2012)

1.2.2 Formación de una micorriza

Para que se forme una micorriza, se requiere que en el suelo exista inóculo del hongo formador de esta asociación, el inóculo puede ser nativo, ya que el hongo es un habitante natural del suelo, o inóculo producido por el hombre, es decir que el hombre lo aplique al cultivo. Entre el hongo y la raíz de la planta se

dan una serie de cambios bioquímicos que permiten que el hongo entre a la raíz y así se forme esta asociación llamada micorriza. (Peñaloza, 2012)

El inóculo puede estar formado por esporas o micelio del hongo o por trozos de raíz previamente micorrizada.

Una vez dentro de la raíz, se forman unas estructuras llamadas vesículas y otras llamados arbusculos, estas tienen la función de traslocar a la planta los nutrientes que el hongo ha tomado del suelo, y también de pasarle al hongo el carbono que la planta libera por la raíz. (Peñaloza, 2012)

1.2.3 Micorrizas en las Orquídeas

La interacción micorriza-orquídea es un tema de estudio en el ámbito mundial, algunos autores como el doctor Lawrence W. Zettler, catedrático del departamento de Biología de Illinois College, USA, y su equipo, demostraron que algunas orquídeas, generalmente las epifitas, son específicas en su interacción micorrízica. La especificidad del hongo micorrízico en orquídeas epifitas tropicales puede ser variable. Se ha logrado observar que una orquídea puede presentar varias asociaciones con distintos hongos micorrízicos; este hecho determina la complejidad de aislar al hongo micorrízico y también identificar la especificidad con cada especie de orquídea. Algunas plantas conservan dicha relación hasta su estado adulto, principalmente aquellas que no son fotosintéticas, las cuales son micohererotróficas durante los primeros estadios de desarrollo y algunas podrían ser myxotróficas en estado adulto. (Zettler, 2007) (Mosquera, 2010)

Existen algunos estudios realizados con respecto a la germinación simbiótica, pero en su mayoría se enfocan en orquídeas terrestres, así por ejemplo investigaciones realizadas en Inglaterra en el año de 1985, a cargo de Royal Botanical Garden, con algunas especies de orquídeas terrestres, indicaron que las especies raras algunas en peligro de extinción, son más específicas que las especies de orquídeas comunes, en cuestión del hongo micorrízico que las

coloniza; es por esta razón que la germinación simbiótica constituye un pilar importante para la conservación de especies. Por otra parte se ha observado que algunas especies de orquídeas necesitan medios nutritivos muy complejos para conseguir su germinación y que por el contrario al realizar germinación simbiótica el crecimiento es incluso más rápido, generando plantas más viables. (Clements, 1986)

Por otra parte en Australia en el año de 1970 Hadley empezó a estudiar la germinación simbiótica con muchas orquídeas de diferentes zonas de la región sembrando sus semillas con 32 sepas diferentes de hongos de la familia *Rhizoctonia* aislados de orquídeas; notando con este estudio que existen hongos que pueden asociarse con más de una especie de orquídea, es decir hay plantas que no son específicas mientras que otras si lo son. (Warkup, 1973)

La determinación del nivel de especificidad micorrícica es un factor que debe ser tenido en cuenta para la conservación de orquídeas mediante la germinación simbiótica de las semillas.

Una especie de orquídea es considerada específica cuando interactúa de forma estrecha con un grupo de hongos filogenéticamente emparentados; por el contrario, se le considera generalista cuando sus hongos micorrícos incluyen una gran variedad de orígenes filogenéticos. (Chavez, 2014) (Otero, 2009)

Los hongos micorrícos en las orquídeas perteneces a la familia de *Rhizoctonia* y la diferenciación taxonómica está basada en la morfología de estructuras sexuales (teleomorfo), sin embargo es difícil inducir a estos hongos para que produzcan tales estructuras en el laboratorio. (Chavez, 2014)

1.2.4 Identificación de *Rhizoctonia*

Los hongos formadores de micorrizas en las orquídeas perteneces en su mayoría al género *Rhizoctonia*; este género se caracteriza por la producción de esclerocios en una textura uniforme con redes hifales que unen el micelio con

plantas. Esto ha provocado la clasificación de muchos hongos en el género *Rhizoctonia*. (Mosquera, 2010)

El género-forma *Rhizoctonia* en su fase asexual (anamorfo) se caracteriza por presentar un micelio estéril incoloro, sin embargo la fase sexual (teleomorfo) que corresponde a *Rhizoctonia* incluye los géneros *Ceratobasidium*, *Tulasnella*, *Sebacina* y *Thanatephorus*, los mismos que pueden diferenciarse por sus estructuras reproductivas conformadas por los basidiocarpos donde se producen las basidiosporas. (Mosquera, 2010)

Una característica de clasificación para el género-forma *Rhizoctonia* es el número de núcleos en células de hifas jóvenes, que pueden ser uni-, 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, 2010) (Otero, 2009)

Las diferentes especies de *Rhizoctonia* se diferencian por el color del micelio, el nº de núcleos por célula, y la morfología de los teleomorfos, sobreviven en el suelo en hifas melanizadas y esclerocios con restos vegetales, pueden ser patógenos o saprófitos, colonizando plantas y materia orgánica fresca. (Nodo, 2010)

Los hongos micorrízicos se aíslan de las raíces de las orquídeas o de otras plantas colonizadas por *Rhizoctonia* no patogénicos.

Existen factores externos que pueden influenciar en el desarrollo del hongo, sin embargo no se encuentran todavía bien identificados; entre estos se citan la humedad que alrededor de 40 a 60 % suele ser óptima para la fructificación de *Rhizoctonia*. (Nodo, 2010)

La aireación es necesaria para la esporulación de *Rhizoctonia*, así como para mover el CO₂ de la respiración. La Temperatura óptima se encuentra entre 20 a 30 grados Celsius. Por último la luz estimula la formación de himenios pero

inhibe la maduración de basidios. Unas condiciones óptimas son 12-16 h de luz. (Nodo, 2010)

1.2.5 Morfología y citología de *Rhizoctonia*

En un medio de cultivo las jóvenes ramificaciones de *Rhizoctonia spp* se dirigen en la dirección del crecimiento e invariablemente parecen constreñidas al punto de unión de la hifa principal. Se forma un septo en la zona cercana a la constricción. En hifas maduras se observan crecimientos en 90° de la hifa principal, también en 45°. Frecuentemente la mayoría de las células de la hifa principal se desarrollan en una nueva rama cerca del fin distal, así el septo de la hifa principal está cerca de la ramificación. Esto varía a veces. (Barnett, 1998) (Nodo, 2010)

1.2.5.1 Células monilioides

Muchos aislados de *R. solani* y *Rhizoctonia spp* binucleadas producen cadenas simples o ramificadas (células monilioides), cuya longitud con respecto al radio es 1-3:1. Estas células pueden ser hialinas o marrones y varían en su forma: lobadas, piriformes, irregulares y en forma de barril. Las células monilioides también se llaman células doliformes, células en forma de barril, células cortas, clamidiosporas y células escleróticas. La formación de nuevas células monilioides ocurre en diferentes partes de la hifa vegetativa. (Nodo, 2010)

Las cadenas de las células monilioides poseen varios lugares, principalmente por debajo de la superficie del hospedante y/o del sustrato, pero también pueden estar en los tejidos del hospedante.

Pueden ser escasas y dispersas, formando masas semicompactas de diversos tamaños, que se pueden agregar formando esclerocios. Los esclerocios se componen usualmente de masas compactas de células monilioides. (Barnett, 1998) (Nodo, 2010)

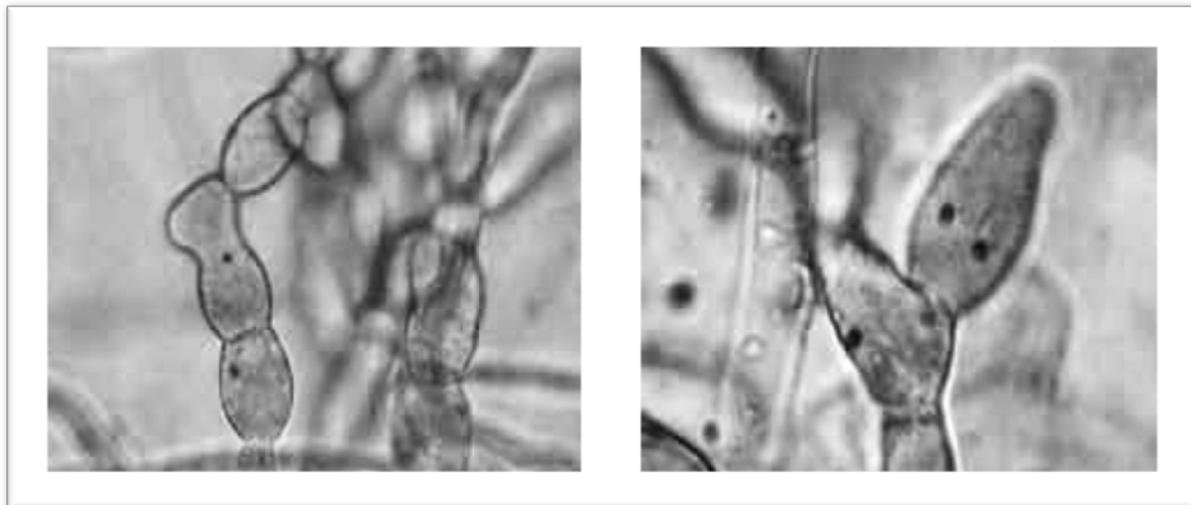


Figura 10. Células monilioides uninucleadas y binucleadas. **Fuente:** (Mosquera, 2010)

Tulasnella, que se ha descrito como un teleomorfo de *Rhizoctonia*, se encuentra ampliamente distribuida poseyendo un sin número de subespecies filogenéticas diferentes, es por ello que se han encontrado asociadas a muchas especies de orquídáceas en distintas regiones. Posee un protosterigma fuertemente hinchado y esporas subglobosas, elipsoides o piriformes. Al principio empiezan a elongarse apicalmente dentro de un soporte fusiforme o subfusiforme llamado espículo, interrumpido en la base desde el metabasidio por un septo adventicio a menudo decíduo. Presenta células de la hifa binucleadas que por lo general se bifurcan con un ángulo de 45°, y en cultivos aislados se observa la presencia de células monilioides.

Así también *Ceratbasidium* también es de amplia distribución encontrándose asociado a un sin número de especies. La característica morfológica de las hifas es bastante parecida a la de *Tulasnella*, sin embargo presenta una disposición de las mismas en 90°. (Barnett, 1998) (Zettler, 2007)

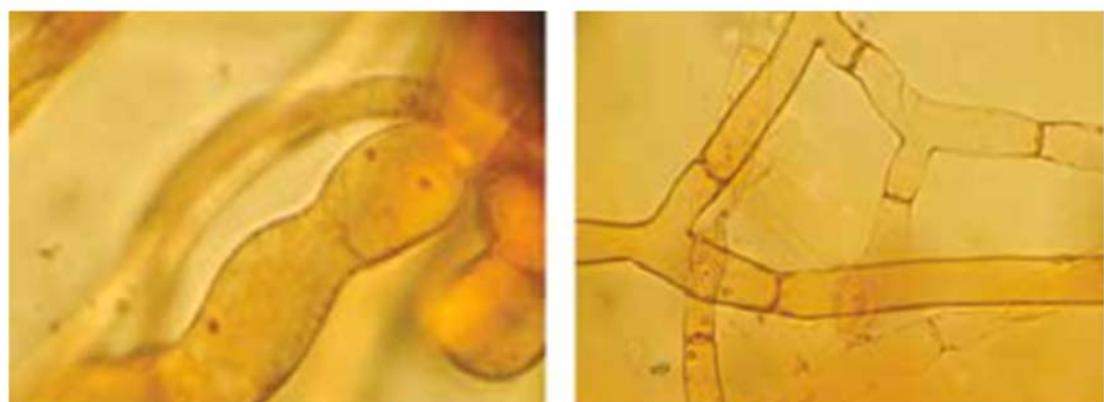


Figura 11. Género *Rhizoctonia*. **Fuente:** (Mosquera, 2010)

CAPÍTULO II.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDIO Y MUESTREO

El presente trabajo es de tipo experimental, cuya área de estudio se encuentra distribuida entre las zonas de la provincia del Azuay y Zamora, en donde se encuentran diferentes especies de orquídeas. Las muestras fueron tomadas en el bosque protegido de Tambillo ubicado en la provincia de Zamora, en la montaña del Plateado en el sector Challuabamba, en el vivero de Ecuaflor en Mayancela y en el Orquideario de la Universidad de Cuenca ubicado en la Quinta de Balzay.

El tamaño de la muestra corresponde a 41 fragmentos de raíces de especies diferentes de orquídeas tanto terrestres como epifitas, las mismas que se sembraron, y de las cuales se lograron aislar 10 cepas de hongos. Las especies de las cuales se aislaron estas cepas de hongos fueron: *Ondontoglossum sp.*, *Oncidium sp.*, *Caucae sp.*, *Sinphyglossum sp.*, *Dracula sp.*, *Fernandezia sp.*, *Stellis sp.*, *Pleurothallis sp.*

2.2 MATERIALES Y REACTIVOS:

Todo el trabajo realizado se llevó a cabo bajo condiciones de esterilidad, usando la cámara de flujo para cada uno de los procesos.

Para el cultivo de los hongos se utilizó una estufa de incubación a una temperatura controlada de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Los medios de cultivo fueron realizados con todos sus componentes puros y llevados a condiciones de pH específicos para el crecimiento idóneo de los hongos y para el desarrollo eficaz de la germinación, todo esto con el empleo de un potenciómetro calibrado; por otra

parte todos los medios fueron previamente esterilizados en una autoclave vertical de 32 litros.

2.3 MEDIOS DE CULTIVO

2.3.1 Medio FIM (Fungi Isolation Medium): Este medio es empleado para el aislamiento de hongos provenientes de la raíz de la planta; este contiene sales como nitrato de sodio, cloruro de potasio, fosfato ácido de potasio y sulfato de magnesio, sacarosa y levadura, suspendidos en Agar Sobouroud; todos estos ingredientes constituyen los nutrientes necesarios para que el hongo pueda crecer y ser aislado. El medio también contiene Estreptomicina para evitar la contaminación bacteriana; es muy importante llevar a un pH de 6,8, para que el crecimiento sea óptimo. (Narrea, 2006) (Rueda, 2004)

2.3.2 Medio PDA (Agar Dextrosa-Papa): Este medio es ampliamente utilizado para aislamiento, purificación y mantenimiento de hongos. Tiene la infusión de papa como fuente de almidones y la dextrosa que son la base para el crecimiento de hongos. El pH de 5,6 evita el crecimiento de las bacterias y es óptimo para el desarrollo de los hongos. (Narrea, 2006)

2.3.3 Medio OMA (Agar Avena): Este medio es utilizado para la germinación simbiótica con hongos micorrílicos, la eficiencia de este medio es mucho mayor que otros medios modificados, y ha sido probado en muchos estudios al respecto, obteniendo muy buenos resultados. Se encuentra constituido por avena y Agar, en este caso la avena al ser un cereal aporta al medio azúcares y vitaminas importantes para el desarrollo del hongo, y por ende la germinación de la semilla. (Zettler, 2007)

2.3.4 Medio Murashige y Skoog (MS) modificado Coco: este medio es rico en fuentes de energía como el carbón activado, azúcar y vitaminas los cuales son aprovechados por las semillas de las orquídeas. 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).



2.4. SEMILLAS Y HONGOS EMPLEADOS

Tabla 1. Semillas y hongos empleados en el trabajo

Código	Nombre	Fecha de Recolección	Lugar de Recolección	Estado de la cápsula	Hongo									
					R4 <i>Odontoglossum</i>	B <i>Oncidium</i>	Z4 <i>Caucae</i>	Z5 <i>Sinphyglossum</i>	Z7 <i>Dracula</i>	O3 <i>Odontoglossum</i>	O5 <i>Fernandezia</i>	O7 <i>Pleurothallis</i>	O14 <i>Stelis</i>	O15 <i>Pleurothallis</i>
S	<i>Epidendrum ibaguense</i>	31-05-15	Tambil lo – Zamora	Cápsula cerrada	X	X								
S1	<i>Masdevallia polystictae</i>	12-06-15	Mayanca – Ecuador	Cápsula cerrada	X	X	X	X	X	X		X		
S6	<i>Scaphocepelatum tiaratum</i>	12-06-15	Mayanca – Ecuador	Cápsula cerrada	X	X	X	X	X	X		X		
S7	<i>Caucae rhodosticta</i>	12-06-15	Mayanca – Ecuador	Cápsula cerrada	X	X	X	X	X	X		X		



			or	da										
S9	<i>Pleurothallis truncata</i>	12-06-15	Mayan cela – Ecuaflor	Cápsula cerrada	x	x	x							
S10	<i>Cochlioda noezliana</i>	12-06-15	Mayan cela – Ecuaflor	Cápsula cerrada						x		x	x	
S12	<i>Epidendrum jamiesonis</i>	12-08-15	Orq. Balzain	Cápsula abierta	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
S13	<i>Maxillaria lehmannii</i>	12-08-15	Orq. Balzain	Cápsula abierta	x	x	x		x	x	x	x	x	
S14	<i>Oncidium aureum</i>	12-08-15	Orq. Balzain	Cápsula abierta	x	x	x		x	x	x	x	x	

2.5 MÉTODOS

- Para la presente investigación se adaptaron métodos de recolección de raíces, siembra, y aislamiento de hongos, previamente aplicados en el Departamento de Biología, Illinois College, 1101 West College Avenue, Jacksonville, U.S.A. (Zettler, 2013).
- En cuanto al tratamiento de los datos obtenidos en el estudio se empleó un análisis descriptivo utilizando como herramienta de procesamiento a Excel 2013, para la realización de tablas y cálculos requeridos.

2.5.1 Aislamiento del hongo micorrícico

2.5.1.1 Preparación y siembra de la raíz de orquídea:

Para recolectar raíces en donde se presuman se encuentran la mayor cantidad de pelotones activos de los hongos micorrícicos, se debe seleccionar raíces jóvenes recién germinadas, que en el caso de las orquídeas epifitas se encuentran enrevesadas en el tronco del árbol que la sostiene; y para las orquídeas terrestres las raíces recolectadas fueron también las más jóvenes y verdes.

Para lograr exponer los pelotones al medio de cultivo, se debe cortar la raíz en fracciones muy pequeñas, haciendo un acto de picado con el bisturí.

Si bien es cierto, la mayoría de las probabilidades de encontrar pelotones activos está en la sección media de la raíz, en este proceso se toman fragmentos de todas las partes de la raíz ya sea de la parte media o final, ya que en algunos casos se presentan pelotones activos a lo largo de toda la raíz.

Posteriormente a este picado de raíz, se vierte el medio FIM, haciendo una siembra por inmersión.

Flujograma del proceso:



Recolección
de la raíz



Selección y
medición
de la raíz:
etiquetado



Lavado de
la raíz en
agua
corriente



Colocar la raíz por
10 min. en la
solución de lavado



Sacar la raíz y
llevarla a una caja
petri.



Con la ayuda de un
bisturí cortar la raíz
en segmentos de 1
cm y pasar cada
segmento a una
caja diferente.



Verter 1 cc de agua esteril destilada en el segmento de raíz y picar en minúsculos trozos

Verter directamente el medio FIM, sobre el picadillo de la raíz.

Incubar a 25°C, hasta la obtención de resultados.

2.5.1.2 Aislamiento del hongo en PDA:

Lo que se pretende obtener con este método es purificar las colonias previamente aisladas del medio FIM.

Flujograma del proceso:



Observación macroscópica de crecimiento en medio FIM



Señalar la colonia que va a ser aislada.



Con la ayuda de un bisturí cortar un cuadrado de 1 mm x 1mm de la colonia del hongo.



Llevar el pedacito al medio PDA, colocandolo en la mitad de la caja



Incubar la caja a 25°C, hasta obtener resultados

2.5.1.3. *Microcultivo*

El microcultivo es el procedimiento idóneo para la identificación de estructuras fúngicas, pues permite visualizar al microscopio el micelio en su conjunto. (EM-UIS, 2014)

Flujograma del proceso:



Seleccionar una colonia del medio PDA.



Con una pipeta Pasteur, colocar tres gotas de medio PDA en un porta objetos



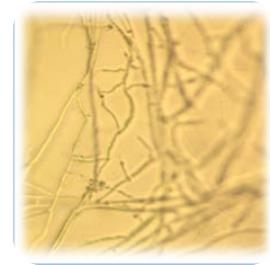
Con la ayuda de una asa, seleccionar al hongo, y sembrar en el porta objetos



Tapar con el cubre objetos y colocar en una caja petri .



Colocar un papel humedecido al fondo de la caja petri, incubar a 25°C.



Obtener resultados y observar al microscópio.

2.5.2 Siembra – germinación

2.5.2.1 Preparación de las semillas de orquídeas

Es importante conocer que las semillas deben estar maduras y en condiciones apropiadas de humedad, para que la siembra sea efectiva.

El lavado se realiza según el estado de la semilla, así por ejemplo si la cápsula se encuentra cerrada únicamente se debe introducir en una solución de cloro del 85% durante diez minutos y después lavarla con agua estéril.

Por otro lado si la cápsula está abierta el proceso es diferente. Primero se sumergen las semillas en una solución de cloro al 1% durante cinco minutos, posterior a esto, con una pipeta Pasteur se va retirando el líquido sobrenadante; luego de esto, repetir el mismo proceso con el agua estéril, haciendo de cinco a seis lavados. (Seaton, 2009)

Flujograma del proceso:



2.5.2.2 Siembra simbiótica: semillas de orquídeas con cada hongo previamente aislado en agar OMA.

En este procedimiento se siembran las semillas viables de la orquídea seleccionada conjuntamente con la sepa de hongo que se requiere probar su efecto micorrílico, dejándolo en condiciones de humedad, temperatura y luz ambientales.

Flujograma del proceso:



Seleccionar la colonia aislada cuya morfología corresponda al hongo micorrizante.

Con una bisturí, cortar una pedacito de la colonia y llavarlo al medio OMA.

Con una asa, esparcir las semillas al rededor del hongo sembrado.



Dejar a temperatura y humedad ambiente.

Evaluar el crecimiento simbiótico, con el cambio de los estadios de las semillas.

2.5.2.3 Sembra asimbiótica: semillas de orquídeas en agar MS

Las semillas son sembradas en este agar modificado con coco, para que se lleve a cabo la germinación asimbiótica; Este proceso nos permite evaluar el crecimiento de la semilla y contrastarlo con la germinación simbiótica.

Flujograma del proceso:



CAPÍTULO III.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 IDENTIFICACIÓN DEL HONGO

3.1.1. Características morfológicas de los hongos aislados.

En el presente estudio se aislaron 10 hongos procedentes de las raíces de ocho especies de orquídeas (*Ondontoglossum sp.*, *Oncidium sp.*, *Caucae sp.*, *Sinphyglossum sp.*, *Dracula sp.*, *Fernandezia sp.*, *Stellis sp.*, *Pleurothallis sp.*) El estudio microscópico y en los distintos medios de cultivo confirmaron características morfológicas propias del género *Rhizoctonia*. Los resultados se observan en la tabla 2.



Tabla 2. Características morfológicas de los hongos micorrílicos aislados.

Hongo/Especie de origen	Medio		
	FIM	PDA	MICROCULTIVO
R4/ <i>Ondontoglos sum sp.</i>	4 días: colonias pequeñas, algodonosas y blancas.	3 días: colonia grande, blanca ,algodonosa y con bordes definidos	3 días: hifas septadas, células monilioides, forma de salchichas, ángulo de 45º. Género probable: <i>Tulasnella</i> .

Hongo/Especie de origen	Medio		
	FIM	PDA	MICROCULTIVO
B /Oncidium sp.	6 días: colonias algodonosas, blancas y grandes.	5 días: colonia grande, blanca, semi algodonosas.	3 días: hifas septadas, células monilioides, forma de salchichas, ángulo de 45°, Género probable: <i>Tulasnella</i>



Hongo/Especie de origen	Medio		
	FIM	PDA	MICROCULTIVO
Z4 /Caucae sp.	4 días: colonia pequeña, algodonosa, blanca.	3 días: colonia grande, blanca, algodonosa, con bordes definidos.	3 días: hifas largas, septadas e indicios de células monilioides.

Hongo/Especie de origen	Medio		
	FIM	PDA	MICROCULTIVO
Z5 <i>/Sinphyglossum sp.</i>	4 días: colonia pequeña, algodonosa, blanca.	3 días: colonia grande, blanca parda, algodonosa, con bordes definidos.	3 días: hifas largas y septadas.

Hongo/Especie de origen	Medio		
	FIM	PDA	MICROCULTIVO
Z7 /Dracula sp.	4 días: colonia pequeña, amarilla, ligeramente algodonosa.	3 días: colonia grande, amarilla, con bordes definidos, ligeramente algodonosa.	3 días: hifas con células monilioides a 45º y estructuras alargadas.

Hongo/Especie de origen	Medio		
	FIM	PDA	MICROCULTIVO
O3 <i>/Odontoglossum sp.</i>	4 días: colonia pequeña, algodonosa, blanca.	3 días: colonia grande, blanca, semi algodonosa, con bordes definidos y presenta anillos.	3 días: hifas largas, 90° e indicios de células monilioides.

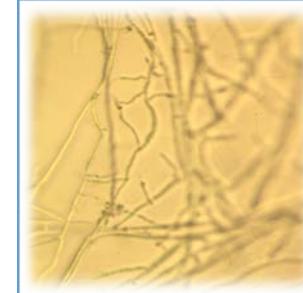


Hongo/Especie de origen	Medio		
	FIM	PDA	MICROCULTIVO
O7 /Pleurothallis sp.	3 días: colonia pequeña, algodonosa, blanca.	4 días: colonia grande, blanca, semi algodonosas con bordes definidos.	3 días: hifas septadas.



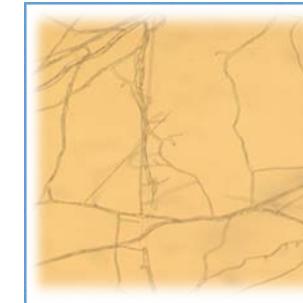
Hongo/Especie de origen	Medio		
	FIM	PDA	MICROCULTIVO
O5 /Fernandezia sp.	4 días: colonia blanca	3 días: colonia grande, blanca parda, ligeramente algodonosa.	3 días: hifas largas 45º e indicios de células monilioides.



Hongo/Especie de origen	Medio		
	FIM	PDA	MICROCULTIVO
O14 /Stellis sp.	3 días: colonia crema 	4 días: colonia grande, crema, con bordes definidos y la presencia de anillos. 	3 días: células monilioides a 90°. 



Hongo/Especie de origen	Medio		
	FIM	PDA	MICROCULTIVO
O15/ <i>Pleurothallis sp.</i>	3 días: colonia blanca marrón, grande.	4 días: colonia grande crema y marrón, con bordes definidos y la presencia de anillos.	3 días: hifas largas y septadas.



3.1.2. Efecto de los hongos aislados sobre la germinación de semillas de diferentes especies de orquídeas.

Los hongos aislados tuvieron un comportamiento diferente según la especie de orquídea con las que fueron ensayados. El tiempo de medición fue también diferente en cada especie (entre 3 y 11 semanas) dependiendo fundamentalmente de factores como la velocidad de crecimiento en el Agar Coco (control), así como la contaminación por otros microorganismos y sobre todo por el tiempo en el que se tuvo acceso a algunas semillas.

Asimismo, el número de réplicas se relacionó principalmente con la disponibilidad de semillas viables para realizar los ensayos. Es por ello que en la mayoría de los casos solo se realizaron dos réplicas por especie de orquídea investigada. A continuación se presentan por separado los resultados de los estadios que alcanzaron las semillas en el grupo experimental respecto al control de Agar Coco, en donde se ha realizado un análisis descriptivo.

La especie *Epidendrum ibaguense* solo pudo ensayarse con dos aislamientos de hongos: el R4 y el B. El primero de estos parece tener un efecto simbiótico sobre la germinación de la orquídea ensayada, donde 9 de cada 10 semillas alcanzaron un estadio 1 o superior respecto al control (7 de cada 10 semillas por campo) alcanzándose en ambos tratamientos un estadio máximo con formación de la hoja primordial. En el segundo, a pesar de que el porcentaje de semillas con estadio 1 o superior fue similar, en presencia del hongo se observó que un 7 % de las semillas alcanzó el estadio 4 a las 9 semanas de análisis.; o sea, aparición de la primera hoja verdadera (Tabla 3 y Gráfico 1).

Tabla 3. Efecto de los aislamientos micorrícos sobre la germinación de las semillas de *Epidendrum ibaguense*.

Hongo	Semanas	Réplicas	Medio	Estadio*						Total
				0	1	2	3	4	5	
R4	7	5	Avena	10	52	28	10	0	0	100
			Coco	30	40	20	10	0	0	100
B	9	3	Avena	10	33	30	20	7	0	100
			Coco	8	30	42	20	0	0	100

*: Los resultados se corresponden con la frecuencia observada en porcentaje.

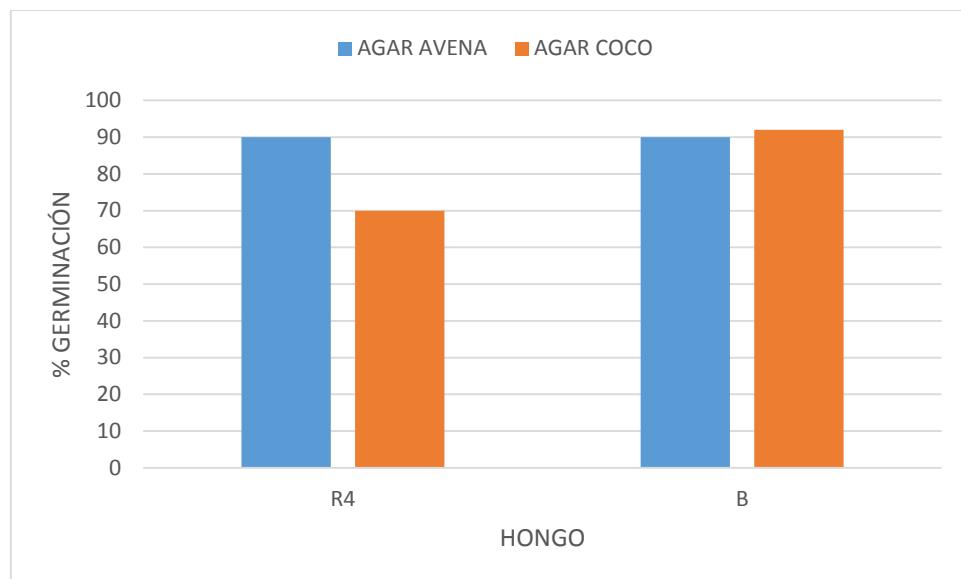


Gráfico 1 Germinación de *Epidendrum ibaguense* presencia de distintos hongos. Se presenta el porcentaje promedio de semillas en estadio 1 o superior.

Estos resultados contrastan con los obtenidos para la otra especie de *Epidendrum* investigada (*Epidendrum jamiesonis*). En dicho caso, el hongo R4 no tuvo ningún efecto micorrílico ya que no permitió a ninguna de las semillas ensayadas alcanzar el estadio 1, a pesar de que en el control la mayoría de ellas alcanzaron niveles del 2 al 5 en los estadios del desarrollo de protocormos. Asimismo para el aislamiento B se observó una disminución del porcentaje de semillas en los estadios 4 y 5, indicando un posible efecto inhibitorio de la germinación en esta especie. También se observó un efecto inhibitorio para todos los demás aislamientos micorrícos, mientras el O7 y O14 se comportaron como patógenos, lo que indica que estas semillas son altamente sensibles a la presencia de los hongos aislados (Tabla 4 y Gráfico 2.).

Tabla 4. Efecto de los aislamientos micorrícos sobre la germinación de las semillas de *Epidendrum jamiesonis*.

Hongo	Semanas	Réplicas	Medio	Estadio						TOTAL
				0	1	2	3	4	5	
R4	4	2	Avena	100	0	0	0	0	0	100
			Coco	15	35	15	15	10	10	100
B	4	2	Avena	25	30	20	15	5	5	100
			Coco	15	35	15	15	10	10	100
Z4	3	2	Avena	90	10	0	0	0	0	100
			Coco	40	40	10	10	0	0	100
Z5	3	2	Avena	90	10	0	0	0	0	100
			Coco	40	40	10	10	0	0	100
O7	4	2	Avena	45	55	0	0	0	0	100
			Coco	15	35	15	15	10	10	100
O3	4	2	Avena	30	45	15	10	0	0	100
			Coco	15	35	15	15	10	10	100
O7	4	2	Avena	100	0	0	0	0	0	100
			Coco	15	35	15	15	10	10	100

05	4	2	Avena	85	15	0	0	0	0	100
			Coco	15	35	15	15	10	10	100
014	4	2	Avena	100	0	0	0	0	0	100
			Coco	15	35	15	15	10	10	100
015	2	2	Avena	90	10	0	0	0	0	100
			Coco	50	40	10	0	0	0	100

*: Los resultados se corresponden con la frecuencia observada en porcentaje.

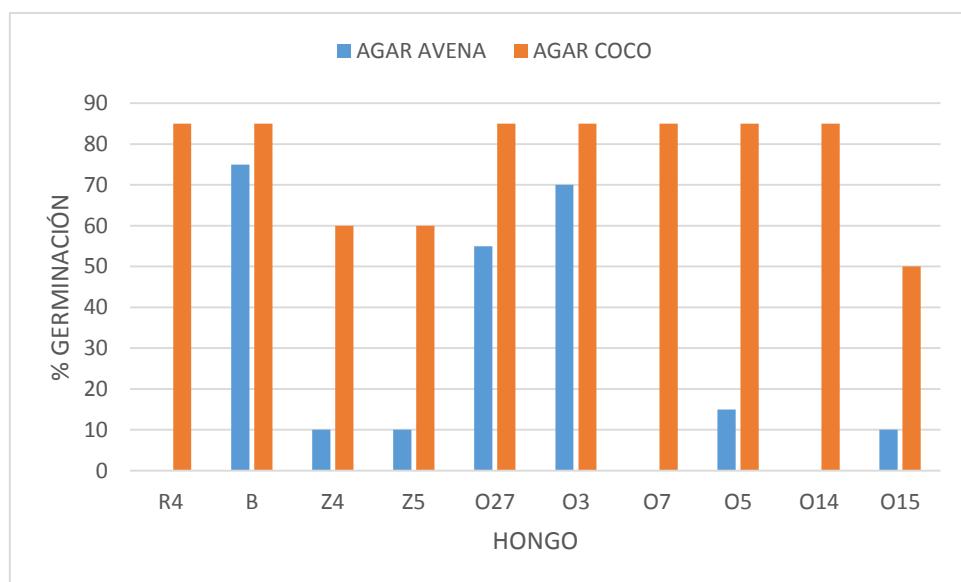


Gráfico 2. Germinación de *Epidendrum jamiesonii* presencia de distintos hongos. Se presenta el porcentaje promedio de semillas en estadio 1 o superior.

Por otro lado, las especies *Masdevallia polystictae*, *Scaphocephalum tiaratum* y *Caucae rhodosticta*, fueron ensayadas con siete de los diez aislamientos. Los hongos Z4 y O3 resultaron patógenos para *Scaphocephalum tiaratum*. Z5 por su parte promovió la germinación simbiótica en *M. polystictae*, mientras que los demás aislamientos resultaron inhibidores o no tuvieron un efecto significativo.

En estas especies se muestra también que el efecto inhibitorio del crecimiento se ejerce fundamentalmente cuando las semillas ya alcanzaron el estadio 1, reduciéndose el paso a los estadios superiores en comparación con el medio control de Agar Coco. En este último medio de cultivo se observa que a las 11 semanas de experimentación la gran mayoría de las semillas han pasado al estadio 1 o superior, lo que sugiere que este tiempo puede emplearse para futuros experimentos como un punto de corte para la recogida de datos. (Tabla 5 y Gráfico 3).

Tabla 5. Efecto de los aislamientos micorrícos sobre la germinación de las semillas de *Masdevallia polystictae*, *Scaphocephalum tiaratum* y *Caucae rhodosticta*.

Especie	Hongo	Semanas	Réplicas	Medio	Estadio*						Estadio 1 o superior
					0	1	2	3	4	5	
<i>Masdevallia polystictae</i>	R4	11	3	Avena	23	67	10	0	0	0	77
				Coco	10	40	40	10	0	0	90
	B	11	3	Avena	10	43	47	0	0	0	90
				Coco	10	40	40	10	0	0	90
	Z4	6	3	Avena	20	80	0	0	0	0	80
				Coco	20	80	0	0	0	0	80
	Z5	6	3	Avena	20	80	0	0	0	0	80
				Coco	50	40	10	0	0	0	50
	O3	5	3	Avena	93	7	0	0	0	0	7
				Coco	60	30	10	0	0	0	40
<i>Scaphocephalum tiaratum</i>	O27	11	3	Avena	23	60	17	0	0	0	77
				Coco	10	40	40	10	0	0	90
	O7	11	3	Avena	93	7	0	0	0	0	7
				Coco	60	30	10	0	0	0	40
	Z4	10	2	Avena	15	80	15	0	0	0	95
				Coco	0	30	30	20	10	10	100
<i>Caucae rhodosticta</i>	HB	11	2	Avena	30	70	0	0	0	0	70
				Coco	0	30	30	20	10	10	100
	Z5	6	2	Avena	100	0	0	0	0	0	0
				Coco	7	30	40	13	10	0	93

<i>Caucae rhodosticta</i>	H27	11	2	Avena	25	60	15	0	0	0	75
				Coco	0	30	30	20	10	10	100
	HO3	5	2	Avena	100	0	0	0	0	0	0
				Coco	60	30	10	0	0	0	40
	HO7	5	2	Avena	60	40	0	0	0	0	40
				Coco	60	30	10	0	0	0	40
	HR4	11	3	Avena	0	20	33	30	17	0	100
				Coco	0	20	30	20	20	10	100
	HB	11	3	Avena	10	40	40	10	0	0	90
				Coco	0	20	30	20	20	10	100
	Z4	4	2	Avena	75	25	0	0	0	0	25
				Coco	70	30	0	0	0	0	30
	Z5	4	2	Avena	75	25	0	0	0	0	25
				Coco	70	30	0	0	0	0	30
	H27	11	2	Avena	30	40	20	10	0	0	70
				Coco	0	20	30	20	20	10	100
	HO3	5	2	Avena	90	10	0	0	0	0	10
				Coco	40	40	10	10	0	0	60
	HO7	6	2	Avena	70	30	0	0	0	0	30
				Coco	30	40	20	10	0	0	70

*: Los resultados se corresponden con la frecuencia observada en porcentaje.

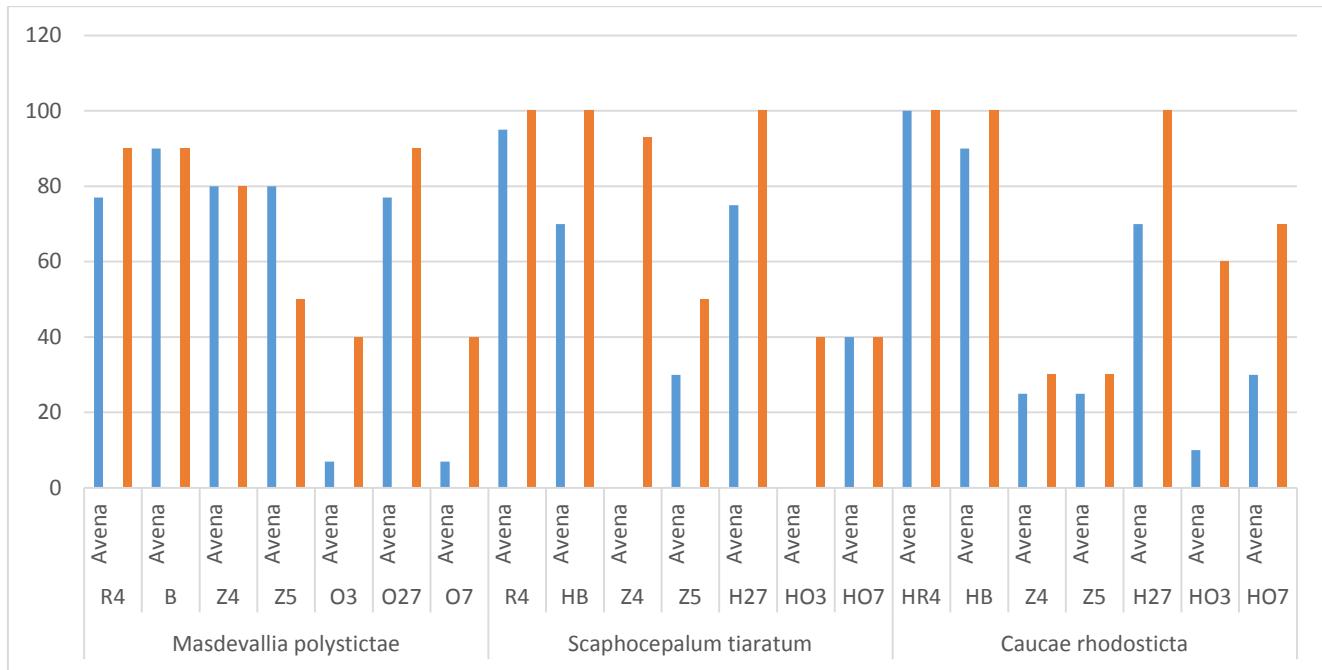


Gráfico 3. Germinación de *Masdevallia polystictae*, *Scaphocephalum tieratum* y *Caucae rhodosticta* en presencia de distintos hongos. Se presenta el porcentaje promedio de semillas en estadio 1 o superior.

El efecto de 9 de los 10 aislamientos también fue analizado en la especie *Maxillaria lehmannii*. Z4 y O3 tuvieron un efecto probablemente patogénico sobre la germinación de estas semillas, no obstante las escasas tres semanas de investigación aún se consideran insuficientes para aportar argumentos más sólidos al respecto. R4 y B no mostraron efecto alguno, mientras que los demás hongos inhibieron el proceso germinativo. A excepción de R4, ningún otro aislamiento se relacionó con semillas en un estadio 2 o superior, lo que puede asociarse al corto tiempo del experimento (Tabla 6 y Gráfico 4).

Tabla 6. Efecto de los aislamientos micorrícos sobre la germinación de las semillas de *Maxillaria lehmannii*

Hongo	Semanas	Réplicas	Medio	Estadio						Total
				0	1	2	3	4	5	
R4	3	2	Avena	40	50	10	0	0	0	100
			Coco	40	45	15	0	0	0	100
B	3	2	Avena	40	50	10	0	0	0	100
			Coco	40	45	15	0	0	0	100
Z4	2	2	Avena	100	0	0	0	0	0	100
			Coco	55	40	5	0	0	0	100
O7	3	2	Avena	50	50	0	0	0	0	100
			Coco	40	45	15	0	0	0	100
O3	3	2	Avena	100	0	0	0	0	0	100
			Coco	40	45	15	0	0	0	100
O7	3	2	Avena	80	20	0	0	0	0	100
			Coco	40	45	15	0	0	0	100
O5	3	2	Avena	80	20	0	0	0	0	100
			Coco	40	45	15	0	0	0	100
O14	3	2	Avena	65	35	0	0	0	0	100
			Coco	40	45	15	0	0	0	100
O15	3	2	Avena	45	55	0	0	0	0	100
			Coco	40	45	15	0	0	0	100

*: Los resultados se corresponden con la frecuencia observada en porcentaje.

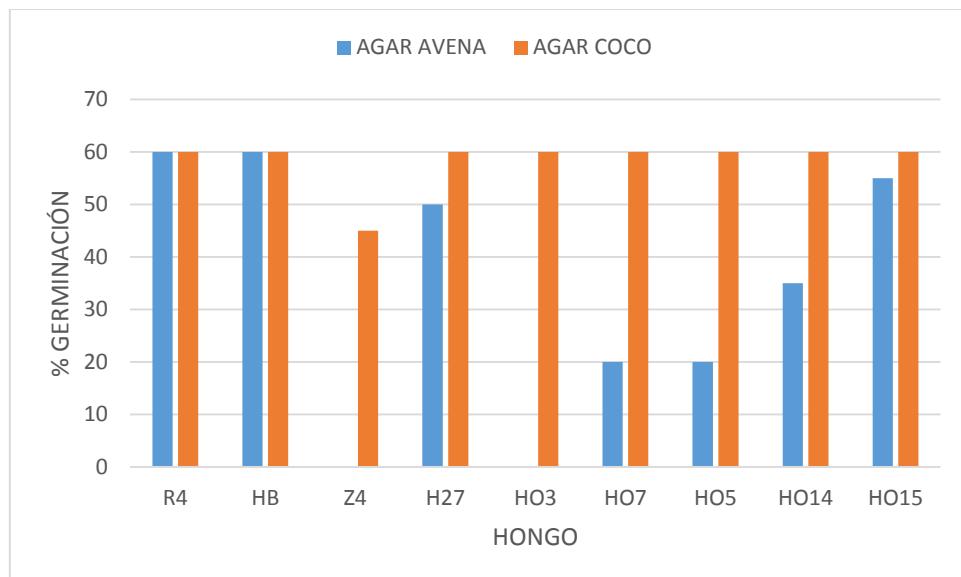


Gráfico 4. Germinación de *Maxillaria lehmannii* presencia de distintos hongos.
Se presenta el porcentaje promedio de semillas en estadio 1 o superior.

Oncidium aureum parece ser la orquídea más beneficiada por los aislamientos analizados. R4, B y O7 mostraron un efecto positivo sobre la germinación de las semillas de esta planta, mientras que solo se detectó una inhibición notable para O3 y O14. Se debe notar que en este caso la mayoría de las mediciones no superaron las tres semanas de estudio y además solo se realizaron dos réplicas para este tratamiento, lo que como se ha venido indicando, puede limitar significativamente el análisis global de los resultados; por ejemplo, en ninguno de los tratamientos con los aislamientos micorrícos o con el control superó el estadio 1, por lo que no se puede observar con certeza si el hongo estimula el desarrollo de los protocormos más allá de este nivel (Tabla 7 y Gráfico 5).

Tabla 7. Efecto de los aislamientos micorrícos sobre la germinación de las semillas de *Oncidium aureum*

Hongo	Semanas	Réplicas	Medio	Estadio						TOTAL
				0	1	2	3	4	5	
R4	3	2	Avena	45	55	0	0	0	0	100
			Coco	65	35	0	0	0	0	100
B	3	2	Avena	45	55	0	0	0	0	100
			Coco	65	35	0	0	0	0	100
Z4	2	2	Avena	100	0	0	0	0	0	100
			Coco	90	10	0	0	0	0	100
O3	3	2	Avena	90	10	0	0	0	0	100
			Coco	65	35	0	0	0	0	100
O7	3	2	Avena	50	50	0	0	0	0	100
			Coco	65	35	0	0	0	0	100
O14	3	2	Avena	90	10	0	0	0	0	100
			Coco	70	30	0	0	0	0	100
O15	3	2	Avena	80	20	0	0	0	0	100
			Coco	70	30	0	0	0	0	100

*: Los resultados se corresponden con la frecuencia observada en porcentaje.

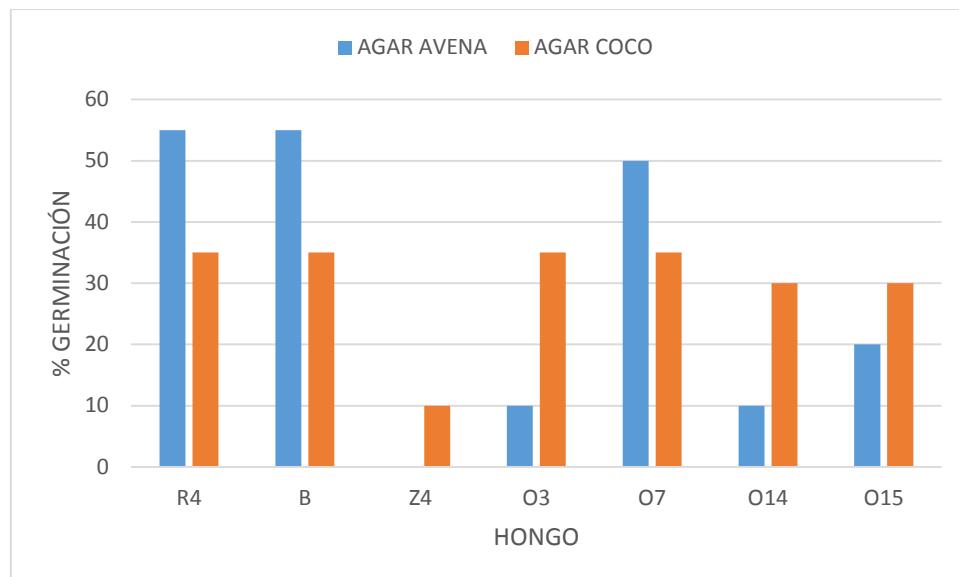


Gráfico 5. Germinación de *Oncidium aureum* presencia de distintos hongos. Se presenta el porcentaje promedio de semillas en estadio 1 o superior.

Por último, *Cochlioda noezliana* se ensayó solamente con los hongos O5, O14 y O15. El primero resultó patógeno para esta planta, mientras que los otros dos inhibieron el proceso germinativo, donde ninguna semilla superó el estadio 2 mientras que en el agar coco (control) un 20 % llegó a estadios de formación de la hoja primordial o aparición de la primera hoja verdadera (Tabla 8 y Gráfico 6).

Tabla 8. Efecto de los aislamientos micorrícos sobre la germinación de las semillas de *Cochlioda noezliana*.

Hongo	Semanas	Réplicas	Medio	Estadio						TOTAL
				0	1	2	3	4	5	
05	10	2	Avena	100	0	0	0	0	0	100
			Coco	10	30	40	10	10	0	100
014	10	2	Avena	25	70	5	0	0	0	100
			Coco	10	30	40	10	10	0	100
015	10	2	Avena	25	65	10	0	0	0	100
			Coco	10	30	40	10	10	0	100

*: Los resultados se corresponden con la frecuencia observada en porcentaje.

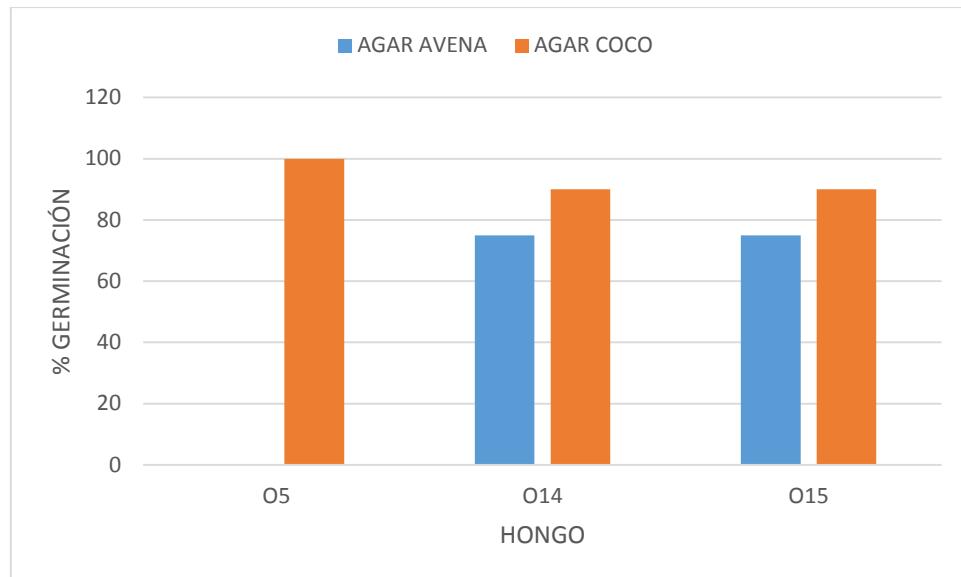


Gráfico 6. Germinación de *Cochlioda noezliana* presencia de distintos hongos. Se presenta el porcentaje promedio de semillas en estadio 1 o superior

Por último se analiza la semilla de *Pleurothallis truncata*, que según los datos obtenidos no tuvo mayor impacto con las siembras realizadas (Tabla 9 y Gráfico 7)

Tabla 9. Efecto de los aislamientos micorrícos sobre la germinación de las semillas de *Pleurothallis truncata*

Hongo	Semanas	Réplicas	Medio	Estadio						TOTAL
				0	1	2	3	4	5	
R4	10	2	Avena	90	10	0	0	0	0	100
			Coco	10	30	40	10	10	0	100
B	10	2	Avena	100	0	5	0	0	0	100
			Coco	10	30	40	10	10	0	100
Z4	10	2	Avena	90	100	0	0	0	0	100
			Coco	10	30	40	10	10	0	100

*: Los resultados se corresponden con la frecuencia observada en porcentaje.

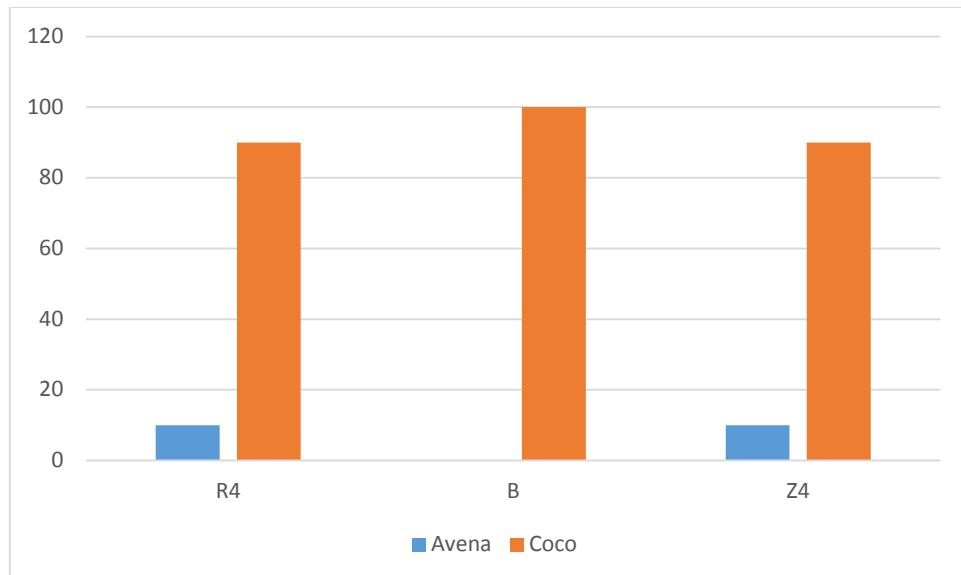


Gráfico 7. Germinación de *Pleurothallis truncata*, presencia de distintos hongos. Se presenta el porcentaje promedio de semillas en estadio 1 o superior.

3.1.3. Evaluación de relaciones interespecíficas.

En la mayoría de las semillas analizadas el tiempo de estudio consideramos fue limitado al igual que el número de réplicas. Es por ello la evaluación que se desprende de los datos obtenidos no puede estar más allá de un estudio preliminar, usando un análisis descriptivo de los datos; por esta razón hemos de comparar el porcentaje de germinación de las semillas que pasan a un estadio 1 o más en el Agar Avena sembrado con el correspondiente hongo con respecto a las semillas que pasan al estadio 1 o más en el Agar Coco (germinación asimbiótica).

Con esta comparación medimos la eficacia del hongo y su efecto en promover el crecimiento en un menor tiempo con respecto a la siembra en el medio nutritivo de Agar coco. (Gráfico 8)

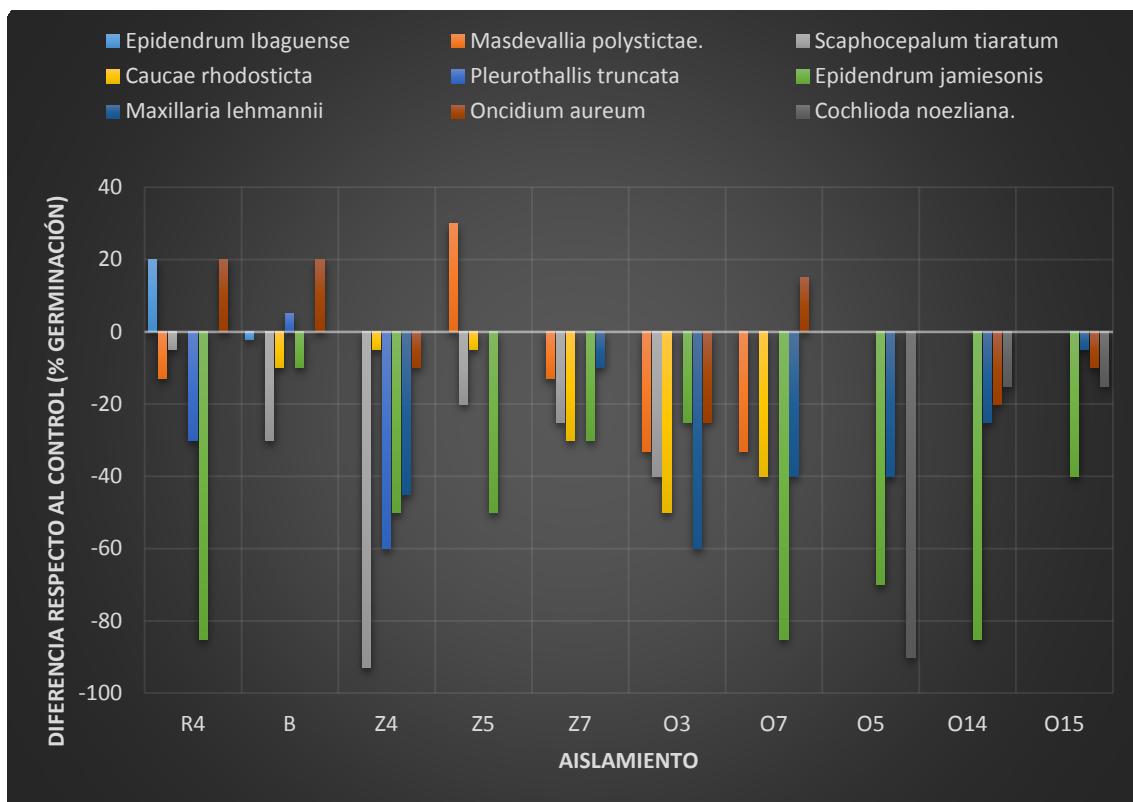


Gráfico 8. Diferencia entre el porcentaje de germinación de las semillas en el medio con cada hongo y el control.

Con la finalidad de obtener resultados más concretos, hemos realizado un análisis con respecto a la diferencia del crecimiento en Agar Avena (germinación simbiótica) y en el Agar coco (Germinación asimbiótica o control), y se refleja en el Gráfico 8, en donde aparecen por debajo del eje como resultado negativo a todos los siguientes casos: inhibición, efecto patógeno y germinación positiva pero cuya diferencia con el control no existe o es mínima.

Por el contrario en los casos que aparecen sobre el eje como efecto positivo sobre la germinación, son aquellos en los que a más de haber tenido semillas micorrizadas en estadios superiores presentan una diferencia en cuanto al control, es decir las semillas han crecido más rápido que el control.

En este sentido, los aislamientos R4, B, Z5 y O7 fueron los únicos que mostraron un efecto positivo sobre alguna de las especies de orquídeas

investigadas. El hongo R4 tuvo un efecto simbiótico sobre *Epidendrum ibaguense* y *Oncidium aureum*, mostrando 20% más de eficacia del crecimiento con respecto al control (Agar coco); el hongo B y el O7 sobre *Oncidium aureum*; Z5 sobre *Masdevallia polystictae*, la misma que presenta casi un 30% de mayor eficacia del crecimiento frente al control.

Por otro lado, los aislamientos O7, O14, Z4 y O5 muestran propiedades patogénicas: O7 y O14 para *Epidendrum jamiesonis*, Z4 para *Scaphocephalum tiaratum* y O5 para *Cochlioda noezliana*. El resumen de este análisis se observa en la tabla 10.



Tabla 10. Relaciones interespecíficas entre las orquídeas de prueba y los hongos analizados

Orquídea de prueba	R4	B	Z4	Z5	Z7	O3	O7	O5	O14	O15
	<i>Ondontoglossum</i> sp.	<i>Oncidium</i> sp.	<i>Caucae</i> sp.	<i>Sinphyglossum</i> sp.	<i>Dracula</i> sp.	<i>Odontoglossum</i> sp.	<i>Pleurothallis</i> sp.	<i>Fernandezia</i> sp.	<i>Stellis</i> sp.	<i>Pleurothallis</i> sp.
<i>Epidendrum ibaguense</i>	Efecto Positivo	No efecto								
<i>Masdevallia polystictae.</i>	Inhibición	No efecto	No efecto	Efecto Positivo	Inhibición	Inhibición	Inhibición			
<i>Scaphocephalum tiaratum</i>	No efecto	Inhibición	Patógeno	Inhibición	Inhibición	Inhibición	No efecto			
<i>Caucae rhodosticta</i>	No efecto	Inhibición	No efecto	No efecto	Inhibición	Inhibición	Inhibición			
<i>Pleurothallis truncata</i>	Inhibición	No efecto	Inhibición							
<i>Epidendrum jamiesonis</i>	No efecto	Inhibición	Inhibición	Inhibición	Inhibición	Inhibición	Patógeno	Inhibición	Patógeno	Inhibición
<i>Maxillaria lehmannii</i>	No efecto	No efecto	Inhibición		Inhibición	Inhibición	Inhibición	Inhibición	Inhibición	No efecto
<i>Oncidium aureum</i>	Efecto positivo	Efecto positivo	Inhibición		Inhibición	Efecto positivo			Inhibición	Inhibición
<i>Cochlioda noezliana.</i>						Patógeno	Inhibición	Inhibición		

Las semejanzas observadas en los patrones de comportamiento ya sea mostrando efectos positivos en la simbiosis, patogenicidad, inhibición y ningún efecto junto con las presentadas previamente en la morfología microscópica (tabla 4) sugieren que los aislamientos R4, B y O7 pudieran compartir características morfológicas similares representadas en una interacción relativamente similar con cada especie de orquídea analizada, lo que puede asociarse a que pertenezcan al mismo género aunque no a la misma especie. En este caso pudiera tratarse del teleomorfo *Tulasnella*.

DISCUSIÓN.

La propagación de orquídeas se ha realizado artificialmente durante casi todo el siglo pasado empleando combinaciones de nutrientes en condiciones estériles, especialmente en aquellas especies de zonas con un clima más tropical. No obstante, en los últimos años ha crecido el interés por las relaciones simbióticas que establecen estas plantas con hongos del género-forma *Rhizoctonia*, lo que a juzgar por algunos autores puede mejorar el éxito en la germinación de semillas de orquídeas epífitas tropicales con distintos fines (Otero, 2009), (Sharma, 2020), (Zettler, 2010), (Zettler, 2007)

En la presente investigación se aislaron 10 que según sus características morfológicas pertenecen al género-forma *Rhizoctonia*. A pesar de que en las raíces de las orquídeas se pueden encontrar muchos tipos diferentes de hongos. Aún dentro de una misma especie se pueden detectar distintas morfoespecies dependiendo de la región o zona geográfica en la que se encuentre la especie, indicando un importante papel del sustrato natural donde crece el hongo. En este sentido Otero Ospina y Bayman, (2009) encontraron en plantas adultas y juveniles de poblaciones puertorriqueñas de *Tolumnia variegata*, 21 morfoespecies de *Rhizoctonia* representando el 87,3 % de todas morfoespecies identificadas.

Por otra parte se debe considerar que no todos los miembros de una especie poseen asociación simbiótica continua con estos hongos. En este sentido Rivas, Warner y Bermúdez, (1998) detectaron en 24 especies de orquídeas de Costa Rica que de un total de 93 aislamientos, el 87,10 % poseía al momento del estudio asociación simbionte con hongos del género indicado. Esto apoya la hipótesis de que la infección de las raíces de orquídeas por hongos micorrílicos puede ser esporádica y de especial interés sobre todo en las etapas tempranas de su ciclo de vida; o sea, durante la germinación y estadios jóvenes, pueden ser micótrofas obligadas, pero durante la vida adulta algunas especies pueden ser micótrofas facultativas (Rivas, 1998) (Ospina, 2014).

Los teleomorfos presentes en el género-forma *Rhizoctonia* se corresponden generalmente con los géneros *Thanatephorus*, *Ceratobasidium*, *Sebacina* y

Tulasnella, (Otero, 2009) por eso no es de extrañar se presuma la presencia de éste último en los aislamientos de *Ondontoglossum sp.* y *Oncidium sp.* Se debe tener en cuenta que la identificación morfológica y la sistemática de estos géneros es un tanto difícil puesto que en el laboratorio se requiere inducir las formas sexuales de los mismos, lo que no es un procedimiento sencillo (Chávez, 2014). Sin embargo la identificación que se ha logrado realizar en este estudio ha sido con respecto a las características morfológicas de cada hongo, ya sea por el aspecto que presentan las colonia en el medio PDA de cultivo como también por las características de sus hifas al ser observadas al microscópico; mismas que en los 10 casos se asemejaban al género *Rhizoctonia*, por presentar hifas septadas y medianamente gruesas, con células monilioides, dispuestas en 45° o 90 °. Esta selección tuvo lugar después de realizarse el microcultivo para tener una mejor observación de las colonias.

Es importante recalcar que si bien las diez cepas de hongos se definieron como *Rhizoctonia*, no todos los hongos de esta especie son micorrizantes de orquídeas, es más muchos de ellos son patógenos. (Species Fungorum, 2015)

Los resultados de la presente investigación muestran de forma preliminar que algunos de los hongos micorrícos aislados pueden tener un comportamiento simbionte con especies de orquídeas aunque no fuesen aislados de estas. Esto es especialmente significativo si se considera que uno de los problemas para la propagación *in vitro* de las orquídeas con germinación simbiótica es la identificación de interacciones micorrícas beneficiosas. En tal caso, algunos autores sugieren un potencial económico y ecológico en la creación de un banco de cepas micorrícas donde se clasifiquen las posibles interacciones simbiontes con un uso comercial y en el rescate de especies en peligro de extinción (Otero, 2009; Zettler, 2013).

La simbiosis entre *Oncidium aureum* y el hongo B puede estar estrechamente ligada con el origen del aislamiento micorrílico, el cual procede de la raíz de una especie del mismo género que la orquídea tratada. Es por ello que en muchos ensayos de germinación simbionte de semillas de orquídeas se

emplean aislamientos de la misma especie o al menos del mismo género para asegurar el éxito en el procedimiento (Sharma., 2002; Zettler, 1998; Aggarwal & Zettler, 2010). Asimismo la simbiosis de *O. aureum* con el hongo R4 pudiera estar asociada a una relación filogenética entre R4 y B, puesto que ambos parecen pertenecer al género *Tulasnella*. Algo similar pudiera suceder con el aislamiento O7 proveniente de *Pleurothallis* sp.

En el presente estudio se analizaron también las especies de orquídeas del género *Epidendrum*: *E. ibaguense* y *E. jamiesonis*, las mismas que mostraron una respuesta diferente ante el mismo hongo R4. Si bien se conoce que algunos miembros de *Epidendrum* sp. pueden germinar con hongos aislados de otras especies (Zettler, 2007), con posterioridad el mismo autor investigó el efecto del hongo *Tulasnella irregularis* aislado de *Encyclia tampensis* sobre la germinación simbiótica de cuatro epífitas del género *Epidendrum*. En su estudio se demostró una respuesta diferente de las cuatro especies ante el mismo hongo, siendo en uno de ellos bastante baja: en el orden de un 3 % de estimulación de la germinación respecto al control (Zettler , 2013). En otra investigación similar a la actual, hongos del género *Tulasnella* no tuvieron un efecto significativo sobre la germinación de *Epidendrum* sp. (Crespo, 2015).

Tales resultados y los obtenidos en la investigación actual apoyan la hipótesis de que las orquídeas han evolucionado de tal modo que la selección natural influyó en la selección de genes que favorecen la interacción simbiótica entre unas especies de orquídeas y un grupo característico y específico de hongos filogenéticamente emparentados (Otero, 2005)

Por otro lado la especie *Masdevallia polystictae* también mostró un comportamiento simbiótico frente al aislamiento micorrílico Z5 de *Sinphyglossum* sp. Un reporte previo empleando una especie del mismo género en la Universidad de Cuenca mostró que *Masdevallia* sp. pueden responder satisfactoriamente a aislamientos del género *Rhizoctonia* de otras especies de orquídeas, por lo que el presente resultado no es de sorprender (Crespo Santander y Ortega Guaricela, 2015).

Este resultado es de especial interés si se considera que varias especies de *Masdevallia* se encuentran en el libro rojo de algunos países latinoamericanos. En tal caso se encuentra *Masdevallia coccinea* Linden Ex Lindl. oriunda de Colombia en la que se hacen esfuerzos por estudiar sus interacciones micorrícas (Ordoñez, 2014). Asimismo, en *Masdevallia europupurea* Reich del mismo país se prefiere el cultivo *in vitro* empleando medios artificiales por el pobre resultado de germinación y desarrollo en cultivos con hongos simbiontes (Pedrosa, 2007). Algo similar ocurre con *Masdevallia tovarensis*, de la que no se conocen sus interacciones simbióticas (de Clavijo, 2010). Demostrar en la presente investigación que *Masdevallia* sp. puede germinar satisfactoriamente en un medio con hongos simbiontes es un paso importante para el desarrollo de investigaciones posteriores con el objetivo de identificar y caracterizar más de estas interacciones favorables.

Se debe tener en cuenta también en el presente estudio que la mayoría de las interacciones entre las especies de orquídeas probadas y los hongos aislados resultaron en efectos negativos (inhibición de la germinación o patogenicidad) o sin un resultado positivo respecto al control. Esto apoya aún más los planteamientos realizados en párrafos anteriores de que las interacciones entre las orquídeas y las micorrizas pueden ser relativamente específicas y determinadas evolutivamente (Otero, 2009). Asimismo se debe considerar que los miembros del género *Rhizoctonia* son bien conocidos por su potencial patogénico para muchas especies de plantas (Otero, 2009).

Si bien los resultados obtenidos son prometedores respecto a la identificación de hongos micorrícos con un probable efecto simbiótico en la germinación de algunas especies de orquídeas, se debe considerar que existe una gran diferencia entre la especificidad detectada *in situ* (también llamada ecológica) y la especificidad potencial o detectada *in vitro* (Chávez, 2014). La segunda, al detectarse en un entorno controlado, no tiene en cuenta el cúmulo de variables que rigen en el entorno natural y que pueden favorecer una interacción sobre otra.



Es importante mencionar que en el Orquideario de la Universidad de Cuenca, hemos dejado como respaldo las cepas de hongos que se aislaron en este trabajo con el afán de que se pueda seguir indagando sus efectos micorrizantes en las orquídeas.

De igual manera se enviaron réplicas de las mismas cepas de hongos al (CBCM) Departamento de Biología Básica y Aplicada, área de Biología, centro de Biología Celular y Molecular de la Universidad Técnica Particular de Loja para realizar la secuenciación de ADN de cada cepa y así poderlos identificar y realizar estudios posteriores en base a resultados específicos.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se consiguió aislar 10 hongos que provinieron de ocho especies de orquídeas (*Ondontoglossum* sp., *Oncidium* sp., *Caucae* sp., *Sinphyglossum* sp., *Dracula* sp., *Fernandezia* sp., *Stellis* sp., *Pleurothallis* sp.). Según las características morfológicas que presentaron los hongos aislados, sugieren pertenecer a los teleomorfos presentes en el género-forma *Rhizoctonia* que se definen como micorrízico de orquídeas en la mayoría de los casos. A este género-forma corresponden generalmente los géneros *Thanatephorus*, *Ceratobasidium*, *Sebacina* y *Tulasnella*.

En el proceso de aislamiento se corrobora la eficacia de los medios utilizados, ya que los resultados fueron favorables; es decir los hongos lograron crecer y desarrollarse eficazmente, mostrando colonias definidas y microscópicamente haciéndose observables sus estructuras.

Cuando se procedió a la siembra de fragmentos de raíces cuyos hongos se deseaban aislar, se usaron en su gran mayoría raíces jóvenes recién germinadas, no obstante en algunos casos las raíces que se emplearon fueron maduras ya que como se conoce en ellas el hongo micorrízico también puede estar presente, al tratarse de orquídeas micrótrofas facultativas.

Un aspecto importante a tomar en cuenta en la evaluación del crecimiento es que se obtuvo en todos los casos de la siembra asimbiótica en el Agar coco, crecimiento favorable, mostrándonos que todas las semillas empleadas en el estudio fueron viables.

En los resultados obtenidos, según la evaluación preliminar del crecimiento se observan comportamientos de distinto orden, ya que cada hongo con cada especie de orquídea tuvo resultados diferentes. Sin embargo el criterio por el cual encaminamos la evaluación del crecimiento fue considerar que el hongo tiene un efecto positivo en la germinación si las semillas alcanzan un estadio 1, y por otra parte si al contrastar con la germinación asimbiótica, las semillas en simbiosis alcanzaron este estadio en menor tiempo que las que estuvieron en asimbiótica. Así por ejemplo los únicos hongos que mostraron un carácter

simbótico contundente fueron los hongos R4, B, O7 y Z5 con sus respectivas siembras; ya que como se conoce existen hongos que son específicos para cada especie de orquídea, y otros que pueden interactuar simbóticamente con varias especies.

Si bien no todos los hongos mostraron tener un efecto positivo en la germinación simbótica, es importante conocer que aunque el efecto no sea específicamente en la aceleración del crecimiento en contraste con la germinación asimbiótica, una planta que crezca micorrizada tiene una viabilidad mayor.



RECOMENDACIONES

Para posteriores estudios del tema, recomendamos tener en cuenta algunos aspectos importantes para efectivizar el proceso de la siembra simbiótica.

Es de vital importancia utilizar semillas maduras y viables, pero también que hayan tenido un proceso de conservación adecuado; que se resume en mantener a la semilla aislada de humedad, y mejor aún en bancos propicios para su conservación.

Para desarrollar una germinación simbiótica eficaz es transcendental la purificación de las cepas de los hongos empleados, al igual que la conservación de réplicas de las mismas en el laboratorio.

También es importante tener en cuenta la posibilidad de trabajar con la diferenciación genética de las cepas aisladas, para con certeza seguir indagando en la investigación de la germinación simbiótica.

REFERENCIAS

- Aggarwal, S. & Zettler, L. W. (2010). Reintroduction of an endangered terrestrial orchid, *Dactylorhiza hatagirea* (D.Don) Soo, assisted by symbiotic seed germination: first report from the Indian subcontinent. *Nature and Science*, 8(10):139-145.
- Barnett, H. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi* (cuarta ed.). Virginia, United States of America.
- Calaway, D. (1998). *Orquideas Nativas del Ecuador* (Vol. 1). Florida: Colina.
- Calaway, D. (2000). *Native Ecuatorian Orchids* (Vol. 2). Florida: Dotson Trust.
- Calaway, D. (2002). *Nativ Ecuatorian Orchids* (Vol. 3). Florida: Dotson Trust.
- Chavez, H. (2014, 09 13). *Propagación in vitro de semillas de Orquídeas mediante técnicas simbióticas y asimbióticas*. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v64n2/v64n2a4.pdf>
- Crespo Santander, A.P. y Ortega Guaricela, M.B. (2015). *Aislamiento de micorrizas y evaluación de la germinación simbiótica de las orquídeas en el orquidiario de la Universidad de Cuenca* (Tesis). Universidad de Cuenca: Ecuador.
- de Clavijo, C.M. (2010). Sexual micropropagation of the critically endangered Christmas orchid *Masdevallia tovarensis*, Aragua, Venezuela. *Conservation Evidence*, 7:87-90.
- Clements, H. (1986). A preliminary report on the symbiotic germination of European Terrestrial Orchids. *Australian National Botanic Gardens*, 41(2), 437. Retrieved from www.jstor.org/stable/4102957
- Dodson, C. (2002). *Native Ecuatorian Orchids* (Vol. 3). Quito, Ecuador: Imprenta Mariscal.
- Dodson, C. (2003). *Native Ecuatorian Orchids* (Vol. 4). Quito, Ecuador: Mariscal.



EM-UIS, P. d. (11 de 2014). *Universidad Industrial de Santander*. Obtenido de Microbiología General - Microcultivo de Hongos:
http://tic.uis.edu.co/ava/pluginfile.php/204661/mod_resource/content/2/Guia%207%20Micologia%20guia%20practica.pdf

Endara, L. (2008). *Orquideas endémicas del Ecuador*. Retrieved from Patrones generales de endemismo: <http://flmnh.ufl.edu/ecuadororchids/SNAP.htm>

Evol. Ecol. 19:29 - 43. Pedrosa Manrique, J.A. (2007). Efecto del medio básico, carbón activado, ácido giberélico y calidad de luz en la germinación in vitro de *Masdevallia europupurea* Reich. *Revista Científica*, 9:117-141. Disponible en: <http://revistas.udistrital.edu.co/ojs/index.php/revcie/article/view/354/534>

Herbarium, A. N. (2011, mayo 11). *Center Australia National Biodiversity Reserch*. Retrieved from <http://www.cpbr.gov.au/cpbr/summer-scholarship/2005-projects/brandner-susan-orchids/index.html>

Kraenzlin, F. (2001). *Tropicos*. Retrieved from Missoori Botanical Garden: <http://www.tropicos.org/home.aspx?langid=66>

Karol Chávez, H., Mosquera-Espinoza, A.T., y Otero Ospina, J.T. (2014). Propagación in vitro de semillas de la orquídea *Comparettia falcata* Poepp. & Endl. (Orchidaceae) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas. *Acta Agronómica*, 64 (2):125-133, doi: <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v64n2.42976>

Lawrence w. Zettler, S. p. (2007). Conservation - Driven propagation of an

Martija, M. (2012). *Descripción, cuidados y cultivos de Orquídeas*. Barcelona: Parkstone.

Massey, E.E. & Zettler, L.W. (2007). An expanded role for In vitro symbiotic seed germination as a conservation tool: two case studies in North America (*Platanthera leucophaea* and *Epidendrum nocturnum*). *Lankesteriana*, 7(1-2):303-308.

McInnis, T. (2007). Light enhancement of symbiotic seed germination and development of endanger terrestrial orchid. *Elsevier*.

Morón, E. (2007). *Poeppig y Edlichor*. Retrieved from http://sobralia.autrevie.com/Sobralia_rosea.html



Mosquera, A. (2010). *Ceratobacidium como hongo micorrícico de orquídeas en Colombia*. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v59n3/v59n3a07.pdf>

Narrea, M. (2006). *agar dextrosa papa*. Retrieved julio 16, 2015, from <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/entomologia/v45/pdf/a25v45.pdf>

Nodo. (2010, 01 14). *Identificación de Rhizoctonia*. Retrieved from www.nodo50.org/.../IDENTIFICACIÓN%20DE%20RHIZOCTONIA.pdf

Ordoñez, N.F., Tupac Otero, J. y Díaz, L. (2014). Interacciones micorrízicas de *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl. *Orquideología*, XXXI(2):123-135.

Otero J. T., Bayman P., Ackerman J. D., (2005). Variation in mycorrhizal performance in the epiphytic orchid *Tolumnia variegata* in vitro: The potential for natural selection. *Evol. Ecol.* 19:29 – 43.

Otero, J. (2009). Germinación simbólica y asimbiótica en semillas de orquídeas epifitas. *Portal de revistas UN Bdigital, Universidad de Nacional de Colombia*. Retrieved from http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/12519/13119

Peñaloza, J. (2012). *Micorrizas*. Bogotá, Colombia: Produmedios.

Rivas, M., Warner, J. y Bennúdez, M. (1998). Presencia de micorrizas en orquídeas de un jardín botánico neotropical. *Rev. Biol. Trop.*, 46(2): 211-216

Rolfe, R. (1981). *Tropicos*. Retrieved from Missouri Botanical Garden: <http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=cochludia+neislana&commonname=&langid=66>

Rollke, F. (2010). *Orquídeas. Jardín Práctico*. Barcelona: ISPANOEUROPEA.

Rueda, D. (2004). *Módulo Biotecnología aplicada, Universidad Xamorano, carrera de ciencia y producción Agropecuaria*. Chile.

Seaton, P. (2009). *Cultivo de Orquídeas por semillas*. Richmond, Surrey UK, UK: British Library Cataloging in Publication Data.

Sharma, J., Zettler, L.W., Van Sambeek, J.W., Ellersieck, M.R., Starbuck, C.J. (2002). Symbiotic seed germination and Mycorrhizae of federally threatened *Plantanthera praecula* (Orchidaceae). *Am. Mid. Nat.*, 149:204-120.



Southern California Orchids species society. (2014). Retrieved from American Orchids society:

<http://www.fascinationoforchids.com/species>ShowAndTell/April.html>

Species Fungorum. (20 de 09 de 2015). Obtenido de
<http://www.speciesfungorum.org/Names/Names.asp>

Tropicos. (2015, 09 24). Retrieved from Missouri Botanical Garden:
<http://www.tropicos.org/Name/23501504>

Velasco, L. (2008). *Orquideas de la Serrania de Grazalema.* Andalucia, Andalucia, España: Consejeria de Medio Ambiente.

Warkup, J. (1973). Symbiotic germination of some Australian Terrestrial Orchids. *Waite Agriculture Reserch Institute*, 387 - 392.

Winsome, O. (2015, 07 23). *Winsome Orchids.* Retrieved from
<http://www.winsomeorchids.com/gallery/miscellaneous/imagepage125.htm>

Yanes, L. H. (2006). *Orquídeas para aficionados.* Barcelona: GRAFOS.

Zettler, L. (2007). Conservation-driven Propagation of an Epiphytic Orchid. *Hort Science*, 135-139.

Zettler, L. (2010). Symbiotic seed germination and mycorhizae of Federally Threatened *Platanthera praecox*. *Departamento de Horticultura de la Universidad de Iowa State* .

Zettler, L. (2011). Mycorrhizal fungi from Protocorms, seedlings and Mature Plants of the eastern Fraire Fringed orchid. *Department of Biology. Saint Louis University*, 29-39.

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

Zettler, L.W., Delaney, T.W., & Sunley, J.A. (1998). Seed propagation of the epiphytic green-fly orchid, *Epidendrum conopseum* R. Brown, using its endophytic fungus. *Selyana*, 19(2):249-253.

Zettler, L.W., Corey, L.L., Jacks, A.L., Gruender, L.T., Lopez, A.M. (2013). *Tulasnella irregularis* (Basidiomycota: Tulasnellaceae) from roots of *Encyclia tampensis* in South Florida, and confirmation of its mycorrhizal significance through symbiotic seed germination. *Lankesteriana*, 13(1-2):199-128.



Zettler, L.W., Poulter, S.B., & McDonald, K.I. (2007). Conservation-driven propagation of an epiphytic orchid (*Epidendrum nocturnum*) with mycorrhizal fungus. *HortScience*, 42(1):135-139.

ANEXOS

ANEXO A. PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

Anexo A1. SOLUCIONES MADRE

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 A2. Medio MS modificado coco

- 1150 ml de agua más 10ml de sol. A, B, C, D y E
- Carbón activado..... 2gr
- Azúcar..... 20gr
- Agar..... 8,5 gr
- Agua de coco..... 150ml
- Vitamina B1..... 1ml
- Tween..... 2 gotas
- Calibrar pH a 5,6, hervir por un minuto y colocar la vitamina B1

Anexo A3. 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..... 0,5ml
- 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 A4. Medio PDA (Agar Papa Dextrosa):

- Agar.....20gr
- Puré de papa.....10gr
- Glucosa.....20gr
- Agua destilada.....1000ml
- Calibrar pH a 5,6 hervir por un minuto y pasar a los frascos y esterilizar

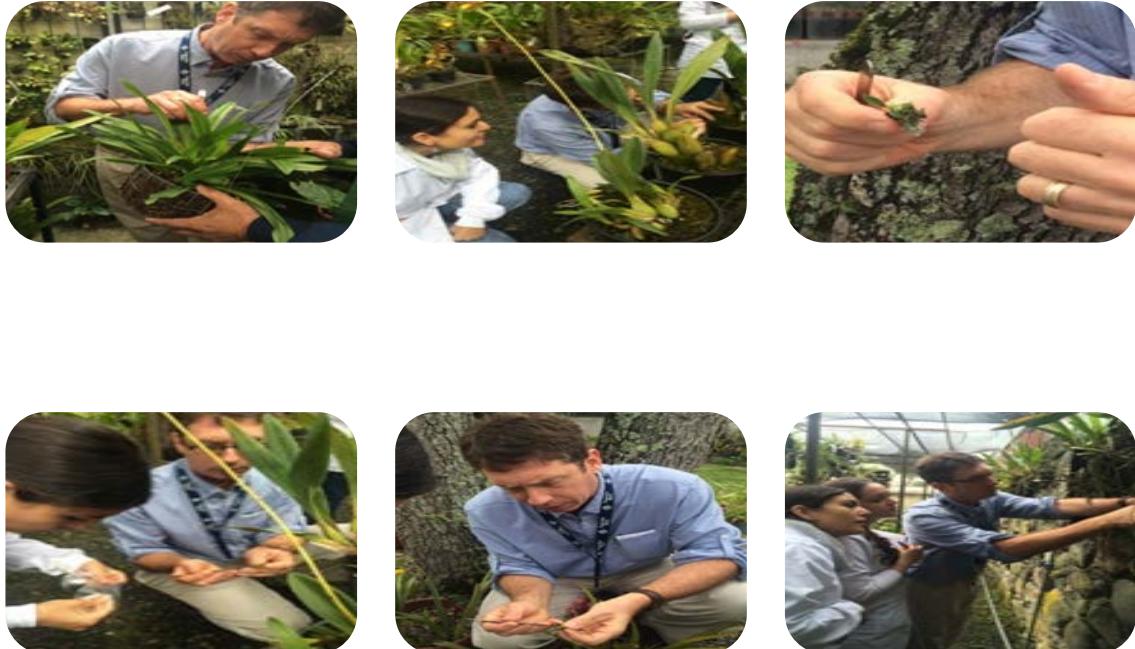
Anexo A5. Medio OMA (Agar Avena):

- Avena.....2,5 gr
- Agar.....7 gr
- Agua.....1000ml
- Calibrar pH a 5,6 hervir por un minuto y pasar a los frascos y esterilizar.

ANEXO B. RECOLECCION DE RAICES

B.1. RECOLECCIÓN DE RAÍCES EN EL ORQUIDEARIO DE BALZAIN DE LA UNIVERSIDAD DE CUENCA

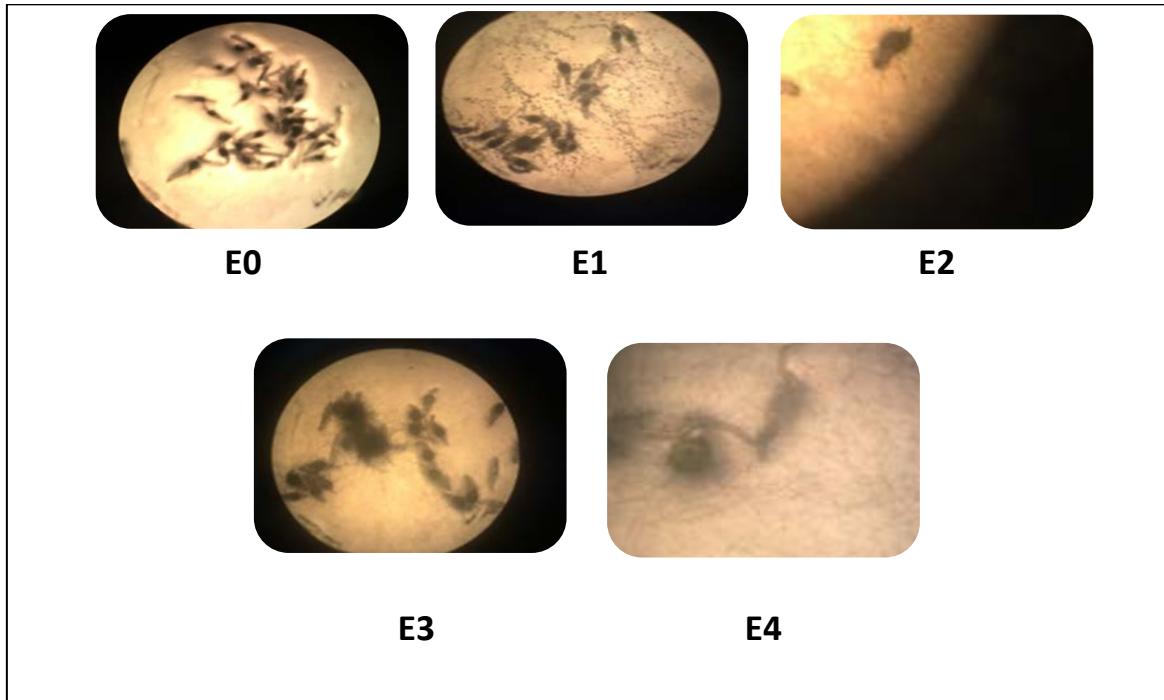
Recolección de raíces guiada por el *Dr. Lawrence W. Zettler*.



Anexo B1. Recolección de raíces (Tatiana León y Roxana Molina)

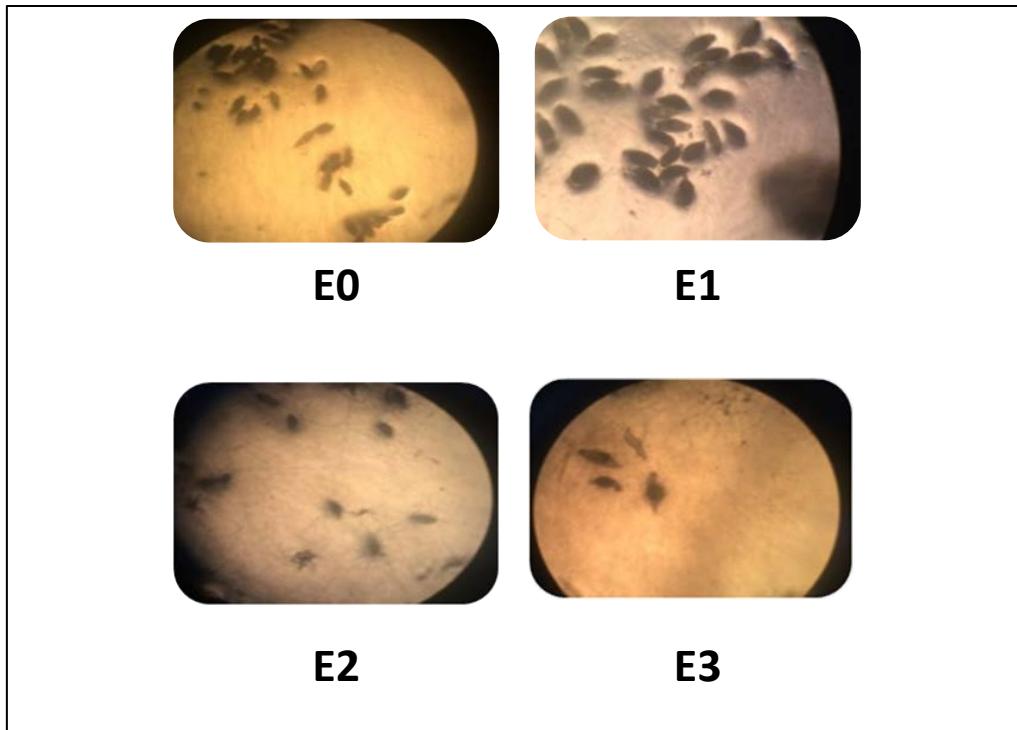
**ANEXO C. ESTADIOS DE LAS SEMILLAS EN LA EVALUACIÓN
PRELIMINAR DE LA GERMINACIÓN SIMBIÓTICA**

**FOTOS DE LOS ESTADIOS DE LAS SEMILLAS *Epidendrum ibaguense*
con germinación simbiótica**



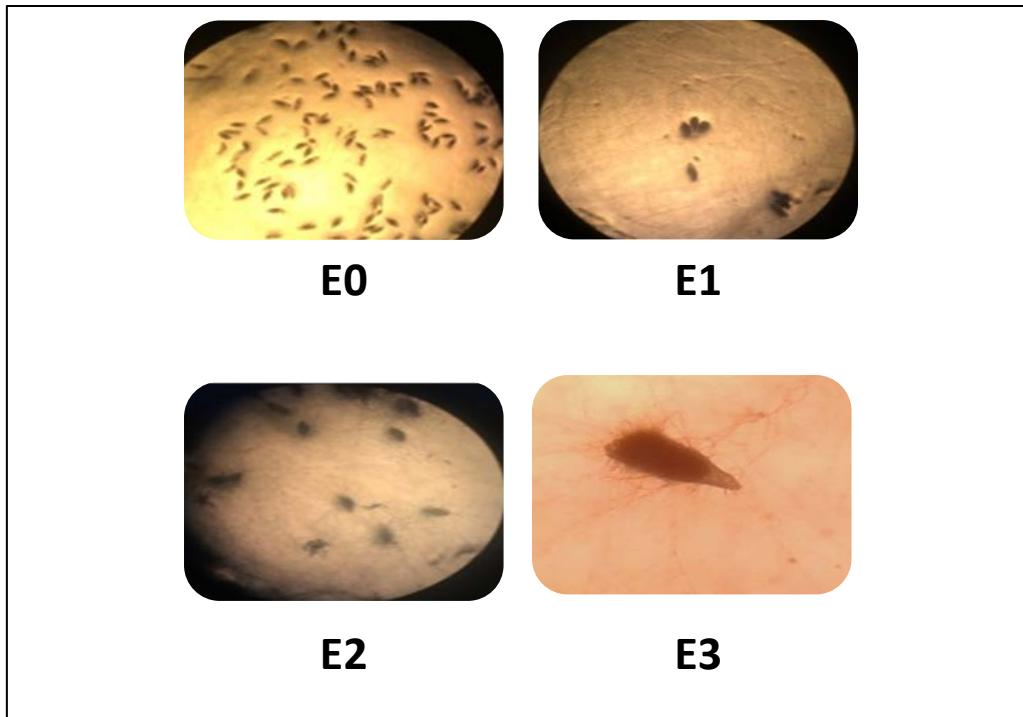
Anexo C1. Fotos de crecimiento de ***Epidendrum ibaguense*** en agar OMA
(Tatiana León y Roxana Molina)

**FOTOS DE LOS ESTADIOS DE LAS SEMILLAS DE *Masdevallia polystictae*
CON GERMINACIÓN SIMBIÓTICA**



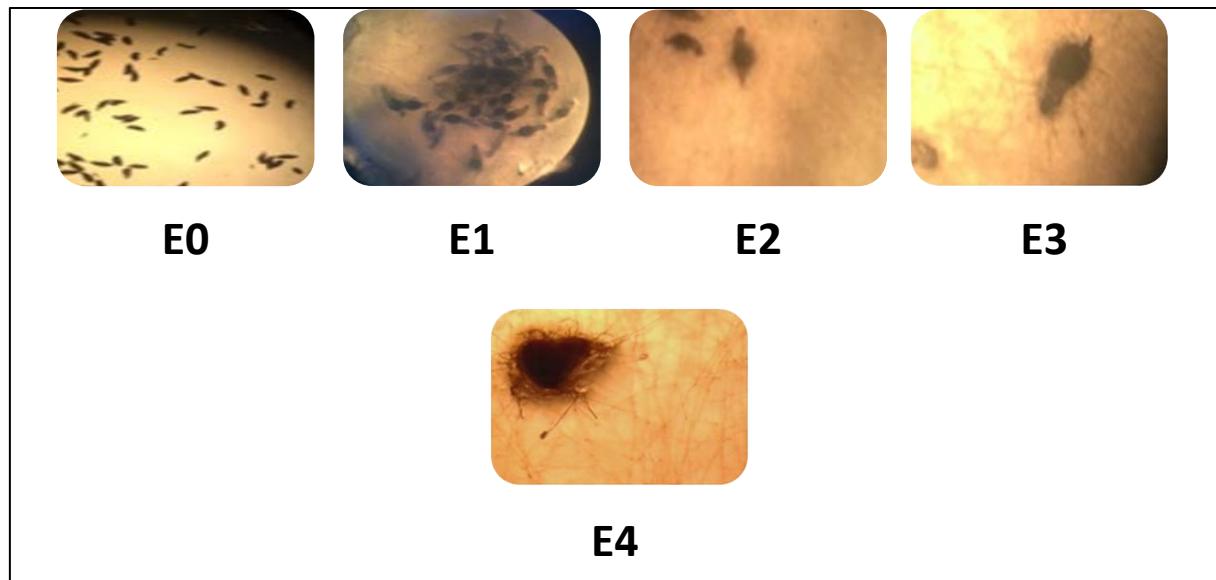
Anexo C2. Fotos de crecimiento de ***Masdevallia polystictae*** en agar OMA
(Tatiana León y Roxana Molina)

FOTOS DE LOS ESTADIOS DE LAS SEMILLAS DE *Scaphocephalum tiaratum* CON GERMINACIÓN SIMBIÓTICA



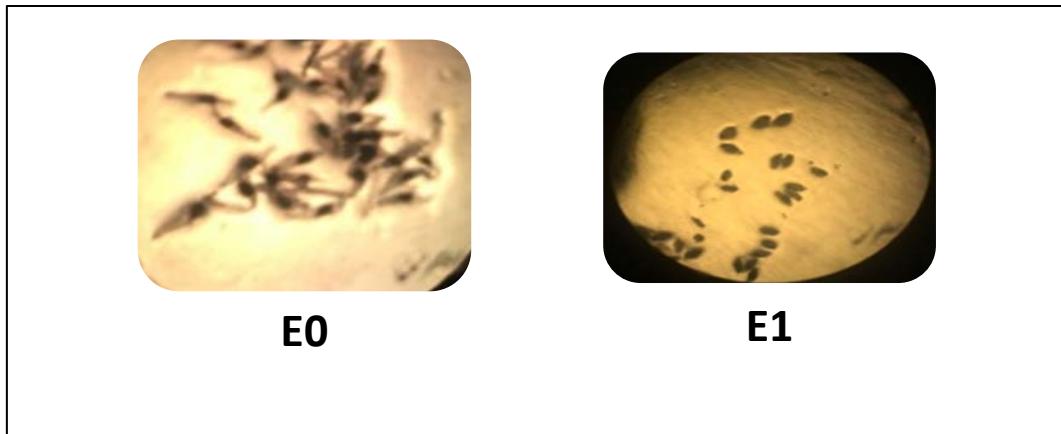
Anexo C3. Fotos de crecimiento de ***Scaphocephalum tiaratum*** en agar OMA
(Tatiana León y Roxana Molina)

**FOTOS DE LOS ESTADIOS DE LAS SEMILLAS DE *Caucae rhodosticta*
CON GERMINACIÓN SIMBIÓTICA**



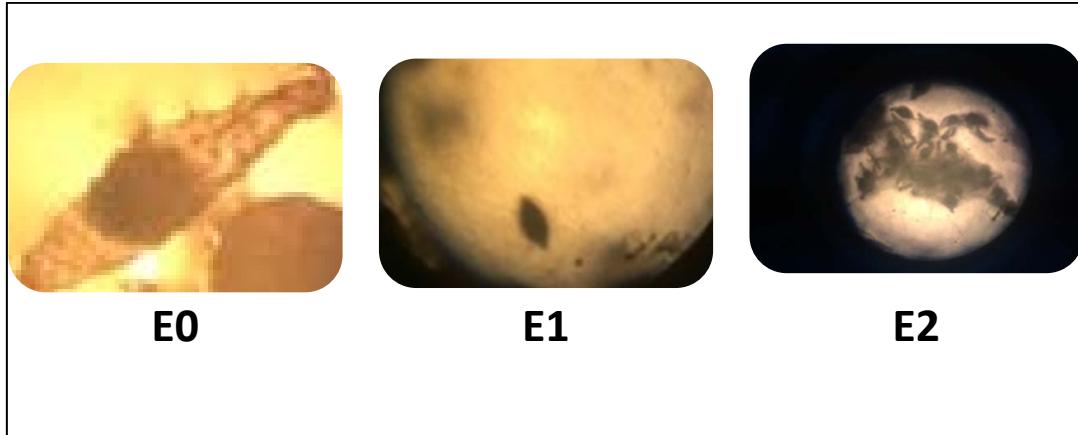
Anexo C4. Fotos de crecimiento de ***Caucae rhodosticta*** en agar OMA (Tatiana León y Roxana Molina)

FOTOS DE LOS ESTADIOS DE LAS SEMILLAS DE *Pleurothallis truncata* CON GERMINACIÓN SIMBIÓTICA



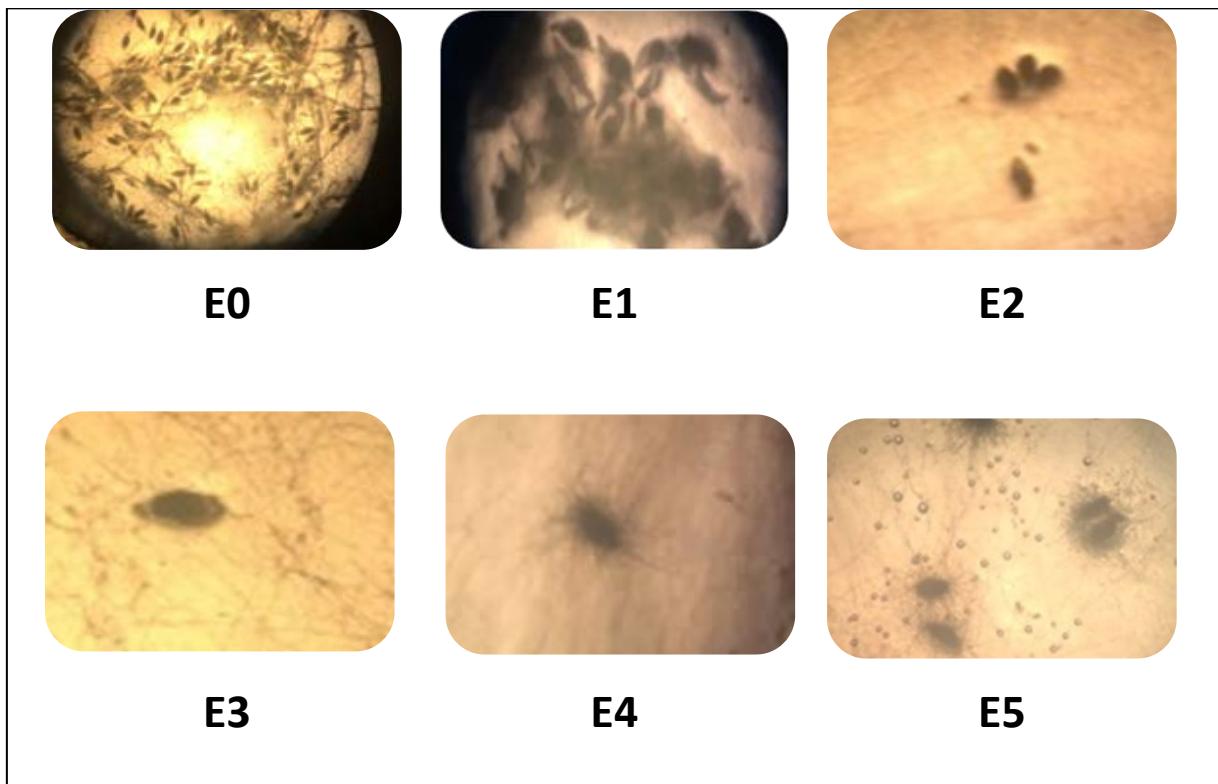
Anexo C5. Fotos de crecimiento de *Pleurothallis truncata* en agar OMA
(Tatiana León y Roxana Molina)

FOTOS DE LOS ESTADIOS DE LAS SEMILLAS DE *Cochlioda noezliana* CON GERMINACIÓN SIMBIÓTICA



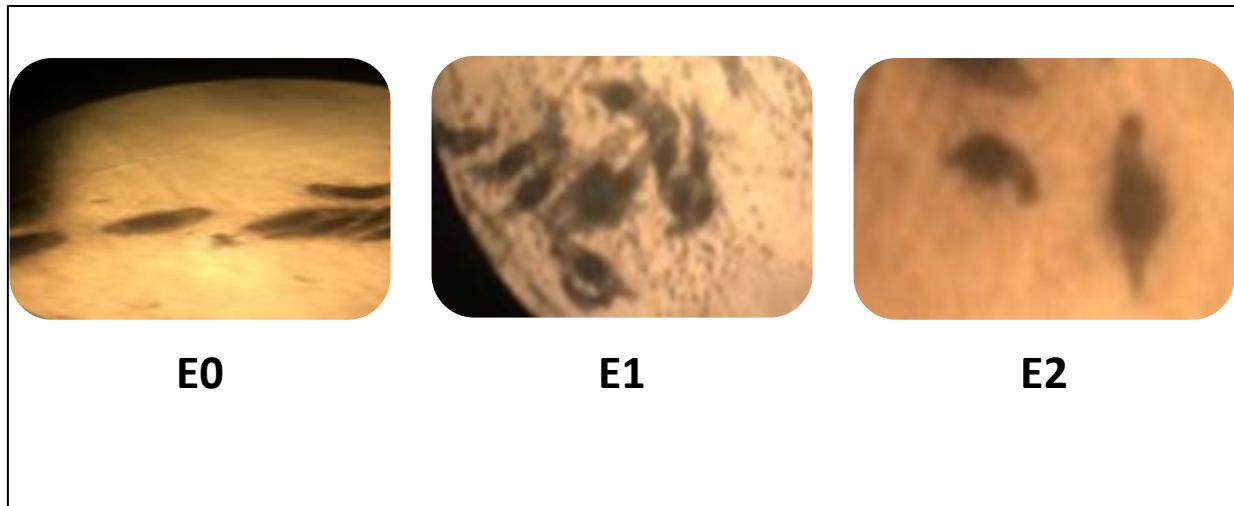
Anexo C6. Fotos de crecimiento de ***Cochlioda noezliana*** en agar OMA
(Tatiana León y Roxana Molina)

FOTOS DE LOS ESTADIOS DE LAS SEMILLAS DE *Epidendrum jamiesonis* CON GERMINACIÓN SIMBIÓTICA



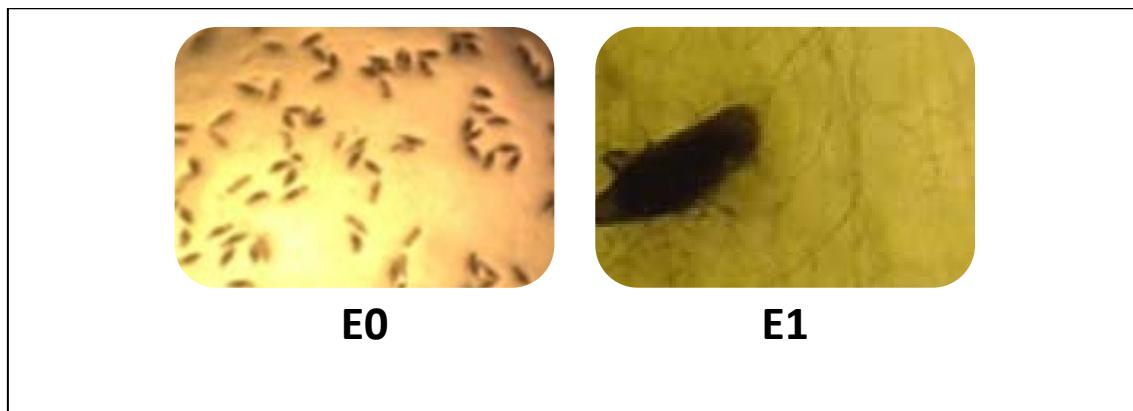
Anexo C7. Fotos de crecimiento de ***Epidendrum jamiesonis*** en agar OMA
(Tatiana León y Roxana Molina)

FOTOS DE LOS ESTADIOS DE LAS SEMILLAS DE *Maxillaria lehmannii* CON GERMINACIÓN SIMBIÓTICA



Anexo C8. Fotos de crecimiento de ***Maxillaria lehmannii*** en agar OMA
(Tatiana León y Roxana Molina)

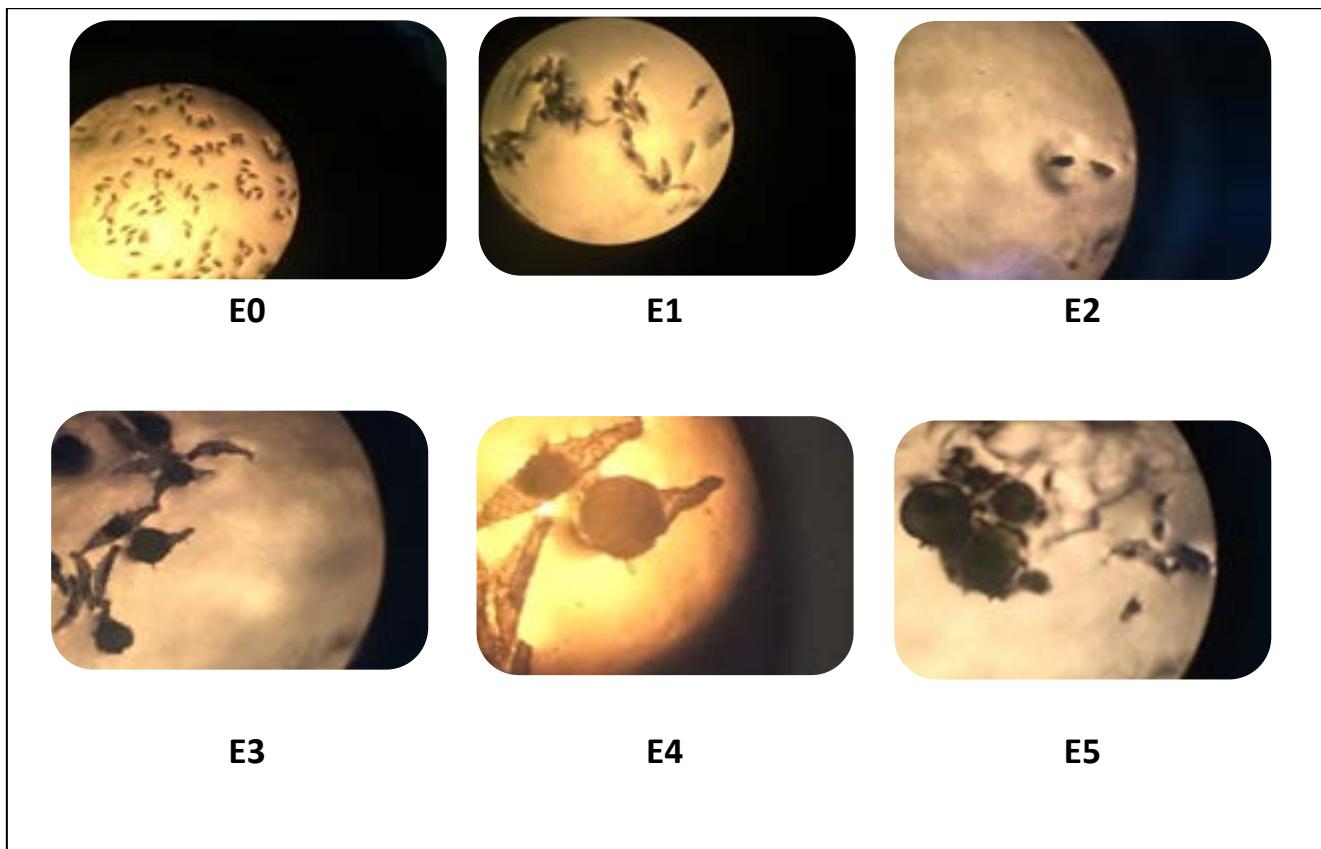
FOTOS DE LOS ESTADIOS DE LAS SEMILLAS DE *Oncidium aureum* CON GERMINACIÓN SIMBIÓTICA



Anexo C9. Fotos de crecimiento de ***Oncidium aureum*** en agar OMA (Tatiana León y Roxana Molina)

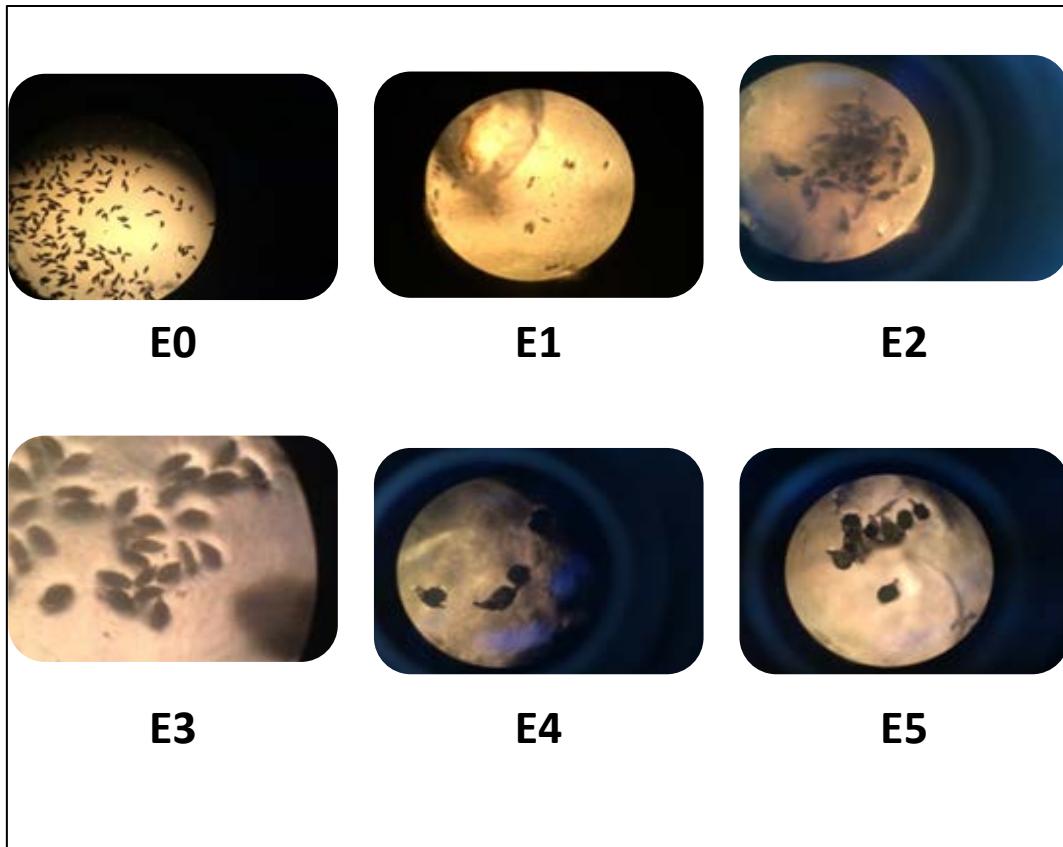
ANEXO D. ESTADIOS DE LAS SEMILLAS EN LA EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA

FOTOS DE LOS ESTADIOS DE LAS SEMILLAS *Epidendrum ibaguense* CON GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA



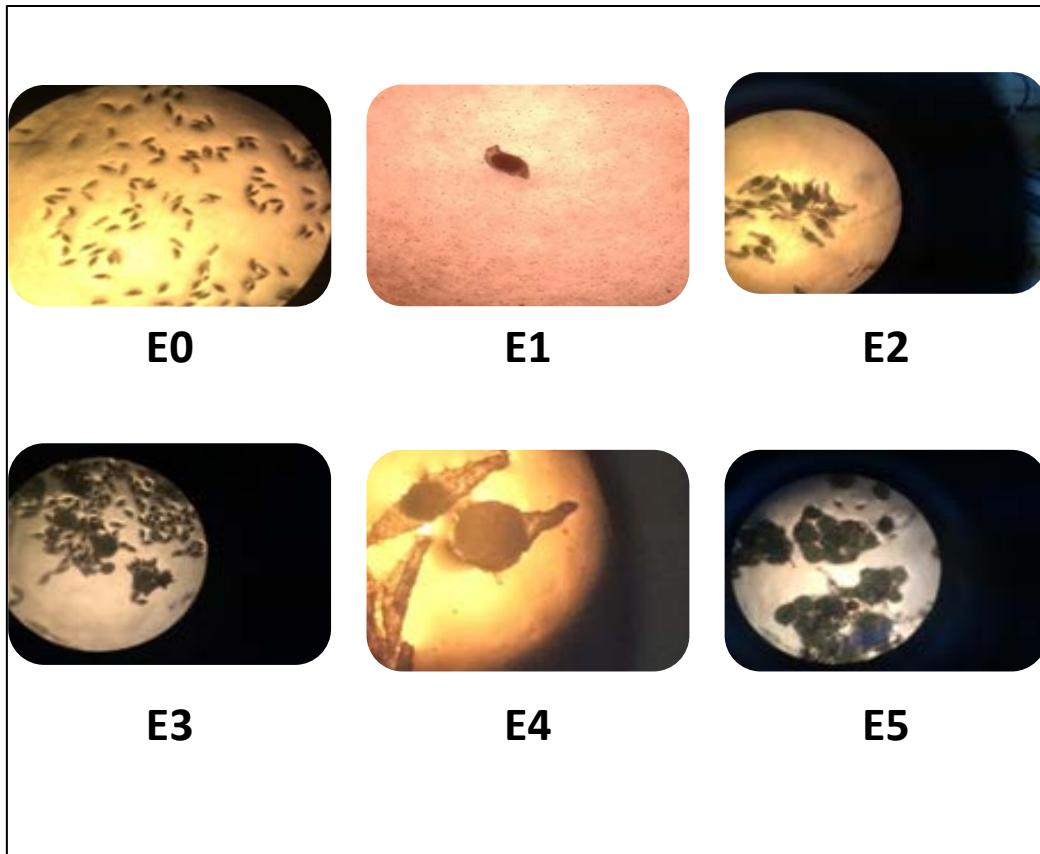
Anexo D1. Fotos de crecimiento de *Epidendrum ibaguense* en agar MS
(Tatiana León y Roxana Molina)

**FOTOS DE LOS ESTADIOS DE LAS SEMILLAS DE *Masdevallia polystictae*
CON GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA**



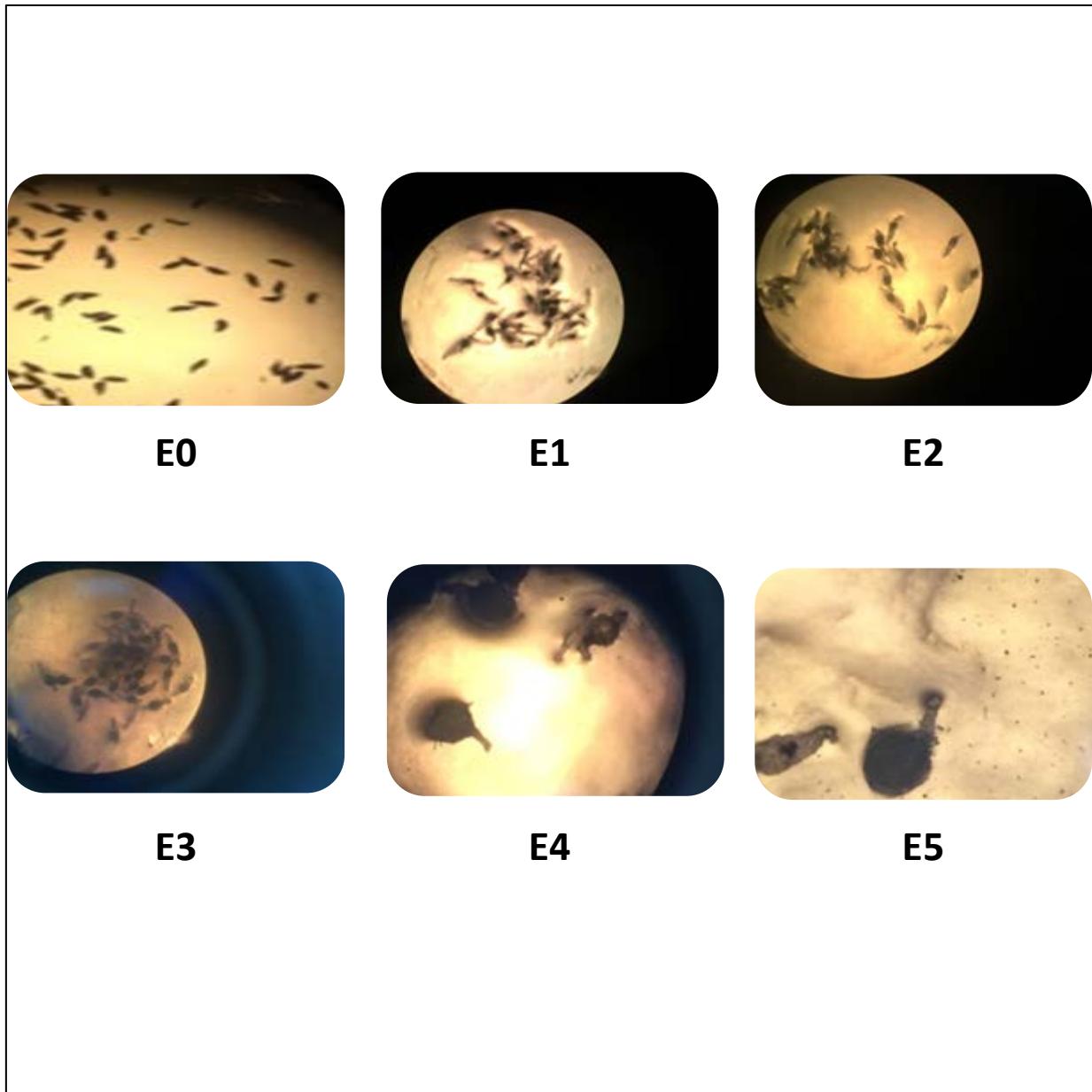
Anexo D2. Fotos de crecimiento de *Masdevallia polystictae* en agar MS
(Tatiana León y Roxana Molina)

FOTOS DE LOS ESTADIOS DE LAS SEMILLAS DE *Scaphocephalum tiaratum* CON GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA



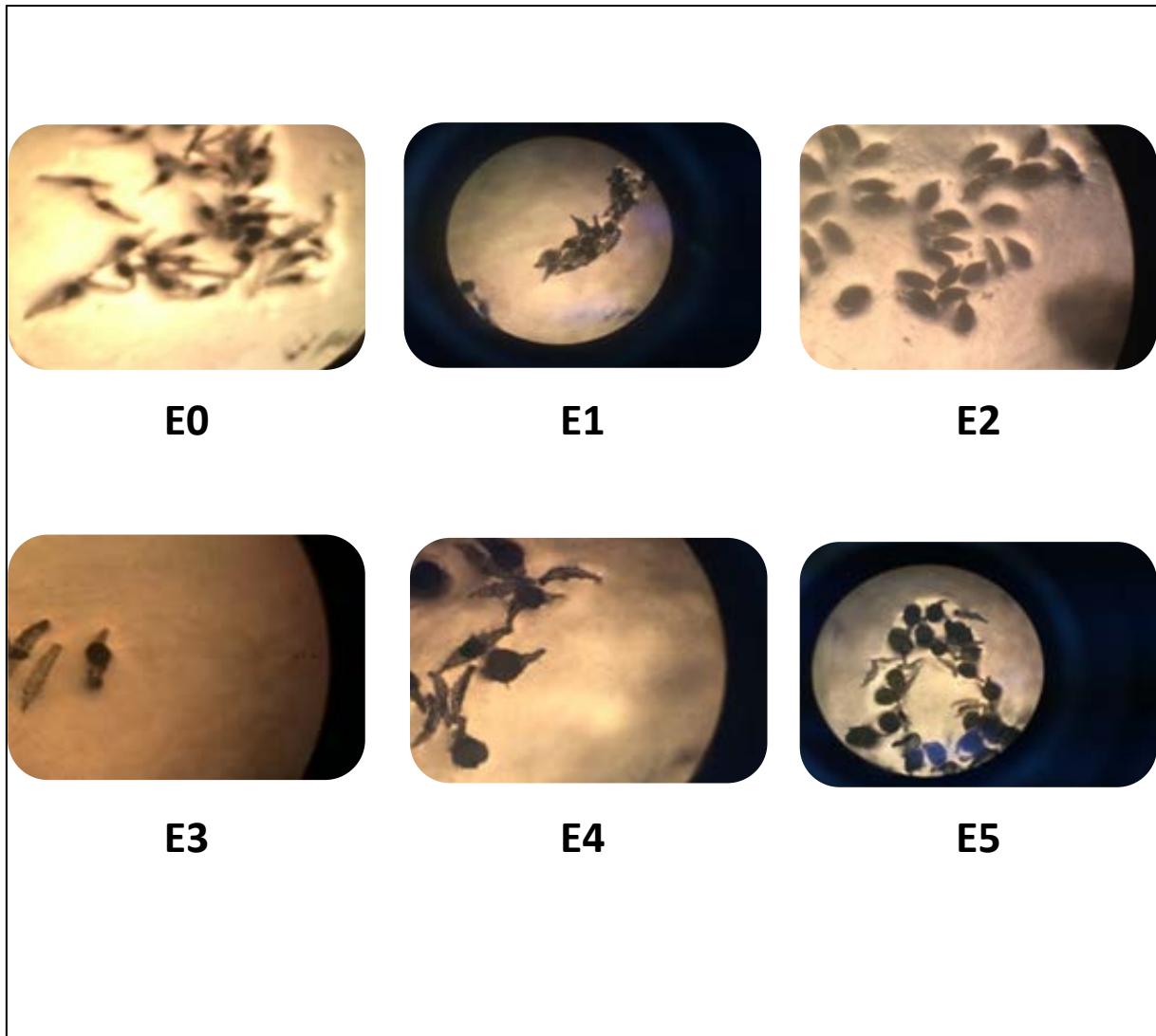
Anexo D3. Fotos de crecimiento de *Scaphocephalum tiaratum* en agar MS
(Tatiana León y Roxana Molina)

**FOTOS DE LOS ESTADIOS DE LAS SEMILLAS DE *Caucae rhodosticta*
CON GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA**



Anexo D4. Fotos de crecimiento de ***Caucae rhodosticta*** en agar MS (Tatiana León y Roxana Molina)

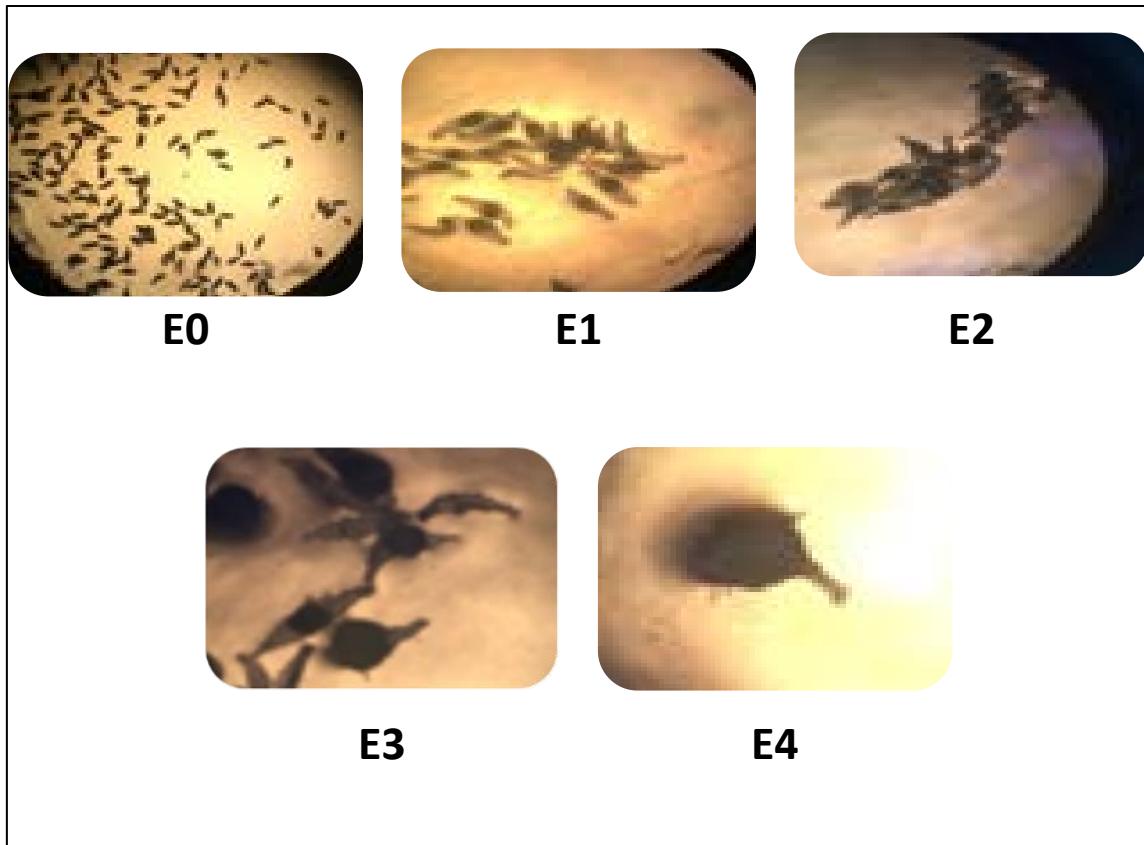
**FOTOS DE LOS ESTADIOS DE LAS SEMILLAS DE *Pleurothallis truncata*
CON GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA**



Anexo D5. Fotos de crecimiento de *Pleurothallis truncata* en agar MS

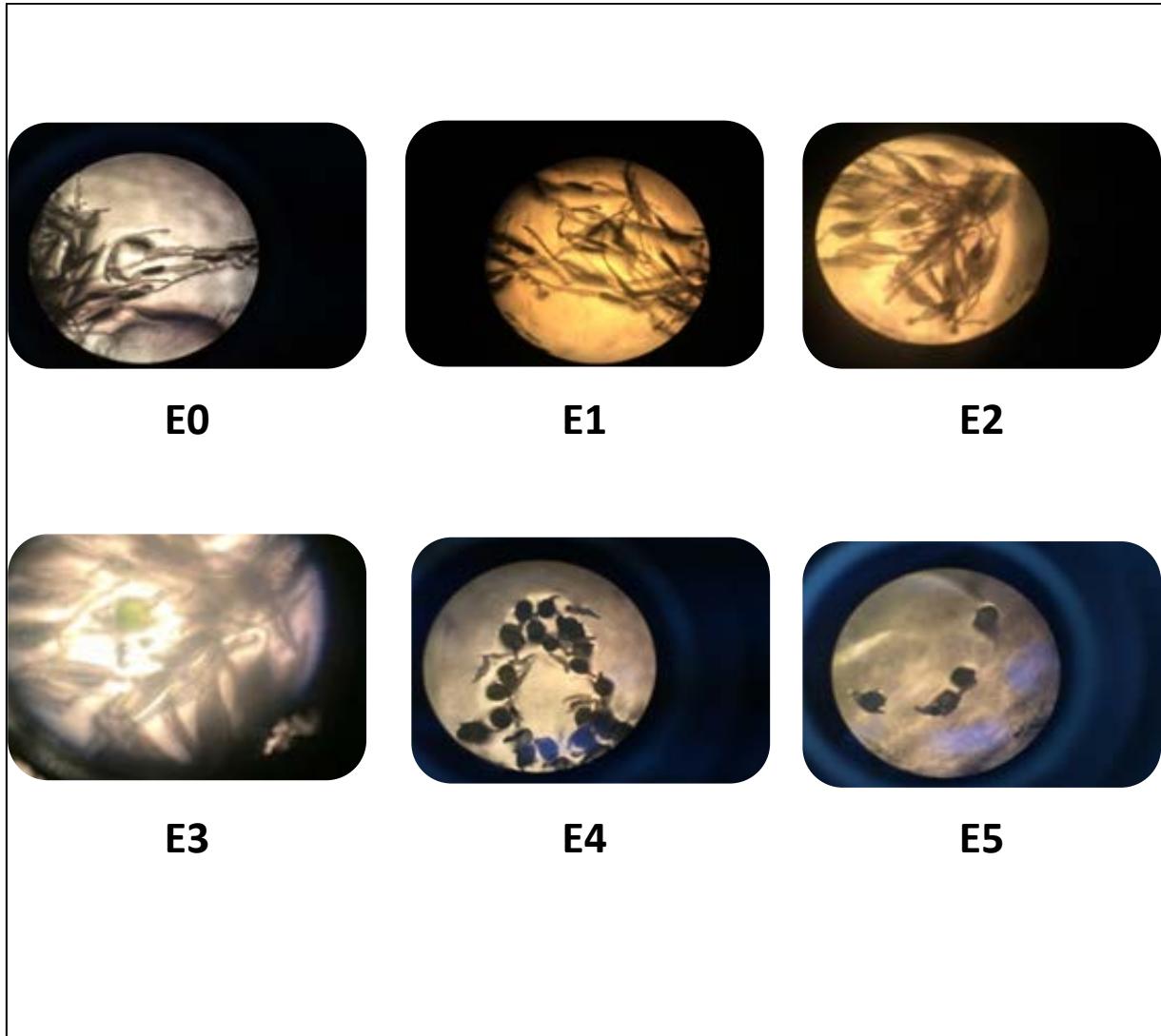
(Tatiana León y Roxana Molina)

FOTOS DE LOS ESTADIOS DE LAS SEMILLAS DE *Cochlioda noezliana* CON GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA



Anexo D6. Fotos de crecimiento de ***Cochlioda noezliana*** en agar MS (Tatiana León y Roxana Molina)

FOTOS DE LOS ESTADIOS DE LAS SEMILLAS DE *Epidendrum jamiesonis* CON GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA.



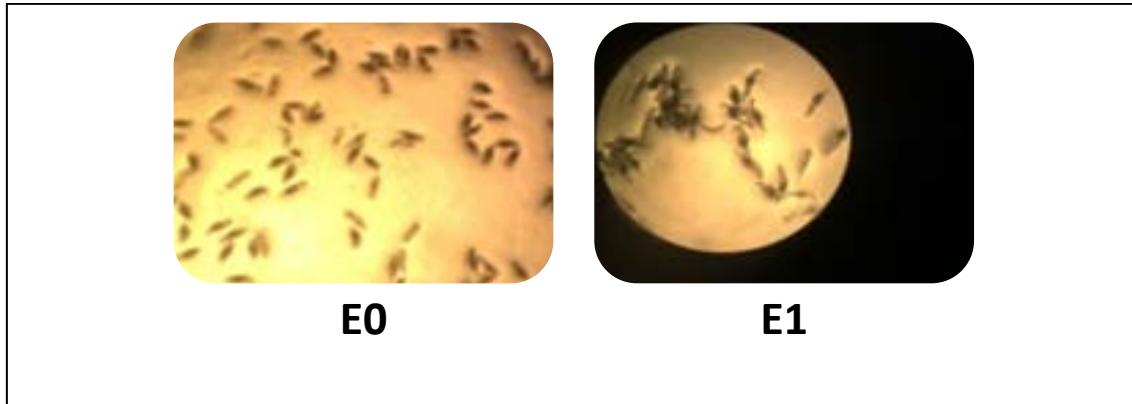
Anexo D7. Fotos de crecimiento de *Epidendrum jamiesonis* en agar MS
(Tatiana León y Roxana Molina)

**FOTOS DE LOS ESTADIOS DE LAS SEMILLAS DE *Maxillaria lehmannii*
CON GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA**



Anexo D8. Fotos de crecimiento de ***Maxillaria lehmannii*** en agar MS (Tatiana León y Roxana Molina)

FOTOS DE LOS ESTADIOS DE LAS SEMILLAS DE *Oncidium aureum* CON GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA



Anexo D9. Fotos de crecimiento de ***Oncidium aureum*** en agar MS (Tatiana León y Roxana Molina)