

UNIVERSIDAD DE CUENCA



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Evaluación de la actividad promotora de la germinación de cuatro cepas de hongos endófitos de raíces de *Epidendrum sp.* en la germinación de dos especies del mismo género.

*Tesis previa a la obtención del
título de Ingeniera Agrónoma*

AUTOR:

Yesenia Marisol Pomavilla Lema C.I 0107086076

DIRECTOR:

Blga. Denisse Fabiola Peña Tapia. C.I 0102501889

CUENCA - ECUADOR

2018



RESUMEN

Gran parte de las orquídeas, dependen de hongos micorrízicos para germinar y desarrollarse. Los hongos endófitos son de gran importancia en la etapa de germinación de la semilla ya que en su hábitat natural las semillas dependen obligadamente de los nutrientes suministrados por los hongos micorrízicos.

Ecuador, con más de 4000 especies de orquídeas, es uno de los países con mayor diversidad en el mundo de plantas de esta familia. Los principales problemas que afectan a estas especies son la extracción para actividades como el comercio y el turismo. A esto también se suma la destrucción masiva de hábitats. Esto ha puesto a algunas especies de orquídeas en estados de conservación amenazado o en peligro. Debido a esta amenaza, así como a las particulares dificultades naturales en su germinación, desarrollar protocolos de germinación para estas plantas aportan a su conservación y es sostenible.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de 4 cepas de hongos endófitos de orquídeas sobre la germinación de semillas del género *Epidendrum* como un aporte al conocimiento y la conservación de este género.

De cuatro hongos aislados, sólo uno demostró un efecto estimulante de la germinación (*Coprinellus* sp. 2) logrando desarrollarse hasta la tercera etapa (aparición de rizoides). Otros hongos (*Trametes* sp., *Coprinellus* sp. 1 y *Basidiomycete micorrízico*) solo estimularon germinación hasta la primera etapa (semillas hidratadas) y no superaron la germinación observada con el tratamiento control positivo (Phytamax). El aislamiento de *Coprinellus* sp. 2 fue caracterizado morfológicamente por ser el único aislamiento que mostró mayor efecto estimulante.

Los resultados obtenidos con *Coprinellus* sp. 2 sugieren que éste podría ser un hongo generalista en cuanto a su asociación con orquídeas de importancia para la germinación de semillas del género *Epidendrum* y con posibilidades de tener un efecto promotor en otras especies, ya que se ha reportado la presencia de hongos del grupo *Coprinellus* en muchas especies de orquídeas muestreadas en bosques andinos del Sur del Ecuador.

PALABRAS CLAVES:

EPIDENDRUM SP., MICORRIZAS, HONGOS MICORRÍZICOS, COPRINELLUS



ABSTRACT

Most orchids depend on association with mycorrhizal fungi to germinate and develop. As a consequence, endophytic fungi from which orchids can obtain nutrients are of key importance to allow orchid seeds to germinate in their natural habitats and sustain viable populations.

With almost 4000 species reported, Ecuador is a country that harbors one of the greatest diversity of orchids in the world. Unfortunately, many of these species are threatened by illegal extraction for commerce and the reduction of their natural habitats. These threats have already put many of these orchids in a threatened or at risk conservation status. Considering these threats and the natural difficulties to germinate orchid seeds, the development of improved germination protocols for these species could contribute to their conservation in nature and to develop potential sustainable use models. The objective of this project was to evaluate four endophytic fungi for their potential effect on germination of *Epidendrum* spp.

Of the four fungi evaluated, only one showed a germination-enhancing effect (*Coprinellus* sp2.) and caused seeds to develop up to stage 3 (rizoid emergence) whereas seeds germinated in the presence of other fungi (*Trametes* sp., *Coprinellus* sp1. and a mycorrhizal *Basidiomycete*) only reached germination stage 1 (complete imbibition). None of the fungi induced germination to the levels observed in the positive germination control (Phytamax). Since only *Coprinellus* sp2. induced increased germination in relation with other fungi and the negative control (oatmeal agar), this fungi was further characterized morphologically.

The results suggest that *Coprinellus* sp2 could be a generalist endophytic fungus since the effect was observed in both *Epidendrum* spp. evaluated which were different from the species from which the fungus was isolated. This generalist effect could even expand to other orchids outside *Epidendrum* since *Coprinellus* spp. have been isolated from roots of different orchid genera from Andean forest in southern Ecuador.

KEYWORDS:

EPIDENDRUM SP., MYCORRHIZAE, MYCORRHIZAL FUNGI, COPRINELLUS



INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	12
2. JUSTIFICACIÓN	14
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo general.	16
3.2. Objetivos específicos.....	16
4. HIPOTESIS	16
5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	17
5.1. La Familia Orchidaceae.....	17
5.2. <i>Epidendrum</i> sp.	17
5.3. Micorriza.....	17
5.4. Germinación de semillas de orquídeas epifitas	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1. Área de ejecución del proyecto	21
6.2. Selección de semillas	21
6.3. Prueba de viabilidad de la semilla	21
6.4. Preparación de medios de cultivo	21
6.5. Selección de cepas	22
6.6. Evaluación del porcentaje de germinación de semillas y toma de datos.....	24
6.7. Diseño experimental y análisis estadístico	25
6.8. Métodos del manejo del experimento.....	25
7. RESULTADOS Y DISCUSION.....	26
7.1. RESULTADOS	26
7.1.2. Porcentaje de viabilidad de las semillas.....	26
7.1.3. Etapas de crecimiento de las semillas de orquídeas.....	26
7.1.4. Caracterización morfológica del hongo con mayor efecto promotor.	29
7.2. DISCUSIÓN.....	31
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	33
8.1. Conclusiones	33



8.2. Recomendaciones	34
9. BIBLIOGRAFIA.....	35
10. ANEXOS.....	40



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 .- Sinopsis taxonómica del género- forma Rhizoctonia; géneros anamorfos y telemorfos.....	19
Tabla 2.- Composición Phytamax.....	22
Tabla 3.- Especies de orquídeas, cepas y controles	24
Tabla 4.- Germinación de las semillas por especies, hongos aplicados y controles.	28



INDICE DE IMÁGENES

Imagen 1.- Semillas teñidas por la prueba de tetrazolio	26
Imagen 2.- Semillas de <i>Epidendrum nocturnum</i> germinada en <i>Coprinellus</i> sp. 2 a las 16 semanas después de la siembra	26
Imagen 3.- Semillas de <i>Epidendrum nocturnum</i> germinada en Control positivo a las 16 semanas después de la siembra.	27
Imagen 4.- Semillas de <i>Epidendrum dalstroemii</i> germinada en <i>Coprinellus</i> sp. 2 a las 16 semanas después de la siembra	27
Imagen 5.- Semillas de <i>Epidendrum dalstroemii</i> germinada en Control positivo a las 16 semanas después de la siembra.	27
Imagen 6.- Crecimiento de <i>Coprinellus</i> a los 12 días después del repique.	30
Imagen 7.- Fotografía bajo microscopio del micelio de <i>Coprinellus</i> teñido con azul de metileno.	30



ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.- Prueba de viabilidad de las semillas en sales de tetrazolio al 1%.....	40
Anexo 2.- Selección de las cepas a inocularse	40
Anexo 3.- Procedimientos de la siembra e inoculación de la cepa.....	41
Anexo 4.- Semillas a las 16 semanas después de la inoculación de las cepas.....	43
Anexo 5.- Cepa con mayor efecto promotor.....	45
Anexo 6.- Resultados	47



Cláusula de Propiedad Intelectual

Yesenia Marisol Pomavilla Lema, autora del trabajo de titulación **“Evaluación de la actividad promotora de la germinación de cuatro cepas de hongos endófitos de raíces de Epidendrum sp. en la germinación de dos especies del mismo género.”**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, junio del 2018

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Yesenia Pomavilla Lema", written over a horizontal line.

Yesenia Marisol Pomavilla Lema

C.I: 0107086076



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yesenia Marisol Pomavilla Lema en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **“Evaluación de la actividad promotora de la germinación de cuatro cepas de hongos endófitos de raíces de Epidendrum sp. en la germinación de dos especies del mismo género.”**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, junio del 2018

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Yesenia Pomavilla", written over a horizontal line.

Yesenia Marisol Pomavilla Lema

C.I: 0107086076



Agradecimientos

A mi familia por ser mi apoyo y soporte durante mi formación académica.

A mi directora de tesis Blga. Denisse Peña por sus conocimientos compartidos y por haber dedicado su tiempo y apoyo en la elaboración del presente trabajo.

A Gabriela Maldonado por brindarme gran parte de su tiempo con sus excelentes consejos.

A mis queridos compañeros quienes estuvieron en todo momento brindando su amistad y compañía durante todo el periodo de estudio.



Dedicatoria

A:

Dios por haberme dado la oportunidad de vivir y llegar hasta este punto y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mi mamá Zoila quien siempre confió en mí y me apoyo para poder cumplir una meta, con ella siempre estaré agradecida infinitamente.

A mi tío Carlos quien se ha portado como un padre apoyándome a alentándome de que siempre se puede ser mejor sin importar los buenos o malos momentos.

A mi familia Christian y Camila quienes han sido mi fortaleza para seguir adelante.

A Vilma, Javier, Luis, Jonas y Carlos por demostrarme que los hermanos siempre deben estar juntos.

Marisol



1. INTRODUCCIÓN

La presencia y actividad de los microorganismos es una parte indispensable para la salud y buen funcionamiento de todos los ecosistemas (Olalde & Aguilera 1998). Los microorganismos influyen en el ciclo de algunos elementos naturales como el N, C, Fe, etc. y facilita la nutrición de las plantas, favoreciéndose de los exudados de las raíces en forma de ácidos orgánicos y otros compuestos de carbono (Martínez & Pugnaire 2009).

Los hongos endófitos son de gran importancia por crecer dentro de los tejidos vegetales sin causar síntomas de enfermedad y proveyendo efectos estimulantes, nutricionales o de defensa. Aquellos que se encuentran específicamente en las raíces proveen a la planta defensa contra patógenos, proporcionan agua, aumenta la disponibilidad de nutrientes que promueven la germinación y posterior desarrollo de la semilla. (Ordoñez et al. 2012 & Hoang et al. 2016). Muchos de estos son conocidos como micorrízicos y pertenecen en su mayoría al género- forma *Rhizoctonia* (Mosquera et al. 2010).

Un gran porcentaje de orquídeas dependen de los hongos micorrízicos para la germinación y crecimiento de las semillas durante las primeras etapas de desarrollo de la planta e incluso en la etapa adulta, ya que poseen semillas con embriones superficiales y escasas reservas nutritivas (Xiang et al. 2015). Las semillas de orquídeas se producen por millones, sin embargo, solo un 2-3% germinan en condiciones naturales (Luan 2006).

En nuestro país, las orquídeas son un grupo de plantas de gran interés por la gran diversidad de especies con las que contamos, por el endemismo de algunas de ellas (Jorgensen & Neill 1999), por las actividades comerciales como el turismo y comercio que a partir de ellas se desarrollan (Ministerio de turismo 2013) y por la obtención de productos secundarios como esencias y medicinas (Jaramillo 2013). Estas características han llevado a una extracción indiscriminada de plantas, actividad que, sumada a la pérdida de hábitat, ocasionada por el hombre a través de la deforestación y otros cambios de uso del suelo han puesto a algunas especies de orquídeas en categorías de conservación que se incluyen dentro del libro rojo de especies en peligro (Cerna et al. 2014).



Para la conservación de orquídeas se prefieren las semillas ya que estas conservan la diversidad genética que puede asegurar el éxito y la sostenibilidad de la población (Zi et al. 2014), sin embargo, éstas tendrían reducidas posibilidades de germinar en la naturaleza sin la presencia de hongos micorrízicos que apoyen este proceso.

En este trabajo evaluamos el efecto de cuatro cepas de hongos endófitos de orquídeas sobre la germinación de semillas de *Epidendrum nocturnum* y *Epidendrum dalstromii* como un aporte al conocimiento y la conservación de este género.



2. JUSTIFICACIÓN

Las orquídeas, dependen de hongos micorrízicos para germinar (Otero et al. 2002, 2004). Las relaciones micorrízicas pueden ser formadas por selección natural y puede afectar la distribución de las orquídeas e inclusive pueden determinar su diversificación (Otero et al. 2005, 2007) ya que muchas de las orquídeas requieren una asociación micorrízica para la germinación de sus semillas, principalmente con hongos basidiomicetos del grupo de *Rhizoctonia* (Rasmussen 2002).

Los hongos tipo *Rhizoctonia*, *Ceratobasidium*, *Sebacina* y *Tulasnella* son los cuatro géneros principales que forman micorrizas con especies de orquídeas (Hoan et al. 2016). En innumerables casos las orquídeas alcanzan a formar un vínculo tan estrecho con el hongo que se considera que la planta parasita el hongo (Mckendrick et al. 2000; Sanders 2003).

algunos hongos micorrízicos forman parte de los hongos conocidos como endófitos que forman una asociación específica con su hospedero para mutuo beneficio. Esta simbiosis confiere una considerable habilidad competitiva a las plantas y posibilita una expresión de su potencial genético produciendo altas tasas de germinación, una densidad destacada, mayor biomasa en los tejidos y una alta producción de semillas (Abello & Kelemu 2006). Las técnicas de germinación simbiótica utilizando hongos micorrízicos de orquídeas son una alternativa para la germinación de semillas de orquídeas epifitas tropicales (Otero & Bayman 2009).

La interacción micorriza-orquídeas es un tema de estudio a nivel mundial (Clements 1987). Algunos autores afirman que existen hongos generalistas (Curtis 1939; Hadley 1970; Masuhara et al. 1993) y otros, argumentan que las orquídeas son específicas en cuanto a su asociación con hongos endofitos (Clements 1987; Mckendrick et al. 2002; Taylor & Thomas 1997). Por otra parte, Otero et al. (2002; 2004; 2007) mencionan que la especificidad del hongo micorrízico en orquídeas epifitas tropicales puede ser variable.

En el caso de *Epidendrum nocturnum* Zettler et al. (2007) reportaron su germinación simbiótica con un hongo aislado de una orquídea diferente, sugiriendo este resultado que la especificidad de los hongos micorrízicos varía entre especies de orquídeas epifitas (Otero et al. 2002, 2004). Por otra parte, Otero et al. (2002) aislaron un único



clado fúngico de varias especies de orquídeas; pero debido al tamaño de la familia, es posible la ocurrencia de un amplio espectro de especificidad (Clements 1987).

El 40% de las especies de orquídeas registradas en Ecuador son endémicas (Jorgensen & Neill 1999), el 35% se encuentran en peligro crítico, 132 en peligro y 920 se consideran vulnerables. Los principales problemas que afectan a estas especies son la extracción selectiva para el comercio y la destrucción masiva de hábitats o deforestación, debido a factores como la extracción de madera, el pastoreo, agricultura migratoria, la quema, tala de bosques, entre otros (Sierra 2013).

En los últimos años ha aumentado el interés en estudiar las relaciones entre hongos micorrízicos de orquídeas epifitas tropicales (Otero & Bayman 2009; Suárez et al. 2006; Otero et al. 2002, 2004, 2005). En nuestro trabajo evaluamos el efecto de cuatro cepas de hongos endófitos aislados de raíces de orquídeas del género *Epidendrum* sp. en la germinación de dos especies del mismo género a fin de identificar cepas que muestren un efecto promotor de este proceso para caracterizarlas y almacenarlas como parte de un banco de hongos micorrízicos que apoyen los procesos de conservación y aprovechamiento de este género de orquídeas.



3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general.

Evaluar la actividad promotora de la germinación de cuatro cepas de hongos endófitos de raíces de *Epidendrum* sp. en la germinación de dos especies del mismo género.

3.2. Objetivos específicos.

- ✓ Evaluar la germinación simbiótica de semillas de *Epidendrum nocturnum* y *Epidendrum dalstromii* usando cepas de hongos endófitos aislados de raíces del mismo género de orquídea.
- ✓ Documentar la morfología de las cepas de hongos endófitos de raíces de *Epidendrum* sp. que exhiban efecto promotor de la germinación.

4. HIPOTESIS

De los hongos endófitos aislados de raíces de *Epidendrum* al menos uno tiene efecto estimulante en la germinación *in vitro* de semillas en al menos una de las especies evaluadas del mismo género.



5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

5.1. La Familia Orchidaceae

De todas las especies existentes de orquídeas un gran porcentaje se caracterizan por presentar distribuciones geográficas limitadas (Tremblay 1997). La mayor flora de orquídeas pertenece a las regiones de Centroamérica y Suramérica (IUCN/SSC Orchid Specialist Group 1996). Los Andes de Colombia y Ecuador presentan la mayor diversidad de orquídeas con al menos un cuarto de todas las especies conocidas allí (Dixon et al. 2003).

5.2. *Epidendrum* sp.

Epidendrum es un género que se caracteriza por tener más de 1000 especies que se distribuye desde el nivel del mar hasta los 3700m a lo largo de América tropical (Zelenko & Bermúdez 2009). En Ecuador se encuentran alrededor de 442 especies de *Epidendrum*, 324 han sido identificadas y 116 sin identificación, es un género que se localiza en casi todos los hábitats, pero la mayoría se encuentran como epifitas en el bosque nublado húmedo en las laderas de los Andes. (Dodson 2001)

5.3. Micorriza

La relación simbiótica que existe entre un hongo especializado y las raíces de una planta se denomina micorriza, formando parte de los hongos endófitos que son los que colonizan los tejidos internos de la planta (Abello & Kelemu 2006). Se clasifican dependiendo si forman o no un manto de hifas alrededor de la raíz de la planta que coloniza. Las que si forman mantos son: las micorrizas Ectomicorrizas, Arbutoide y Monotropoide., Y las que en lugar de formar mantos desarrollan estructuras fúngicas dentro de las células del córtex de la raíz, incluyen los de tipo Arbuscular, Ericoide y Orquidioide (Alomía 2014).

Autores como Gebauer & Meyer (2003) y Trudell et al. (2003) en sus estudios demuestran que existe una verdadera interacción mutualista. La germinación y desarrollo temprano de hongos simbióticos en las semillas de orquídeas es de vital



importancia ya que ayudan a suministrar agua y nutrientes importantes como el carbono (C), nitrógeno (N), azúcar, tiamina y ácido fólico, que promueven la germinación y el desarrollo protocórmico (Cameron et al. 2006 & Hoang et al. 2016).

En innumerables casos las orquídeas alcanzan a formar un vínculo tan estrecho con el hongo que se considera que la planta parasita el hongo, y el hongo no recibe nada a cambio (Mckendrick et al. 2000; Sanders 2003; Hadley 1969). Esta conexión es más evidente en la etapa de germinación de la semilla ya que en su hábitat natural ésta depende obligadamente de los nutrientes suministrados por los hongos micorrízicos (Bayman et al. 2003).

La relación hongo micorrízico-orquídea depende de la especie de orquídea, donde el proceso de introducción y repoblación comienza con el aumento de tamaño de una hifa antes de invadir la pared celular del huésped (Williamson & Hadley 1970). La introducción del hongo ocurre cuando la hifa encuentra el tricoma epidérmico de las células de las raíces (Rasmussen & Whigham 2002); una vez dentro, la hifa comienza el proceso de dispersión formando tabiques y ramificaciones. El modelo de tejido más dominante es el que se encuentra en la corteza de la raíz (tejido más colonizado), el hongo que entró en las células comenzará a formar pelotones (masas semiesféricas de hifas) y los nutrientes serán transferidos por la membrana celular (Alomía 2014).

Los pelotones bien desarrollados de hongos micorrízicos pueden ocupar casi todo el volumen celular proporcionando una amplia superficie de contacto entre los simbioses (Alomía 2014).

En gran parte los hongos que forman micorrizas pertenecen al género-forma *Rhizoctonia* (Mosquera et al. 2010). La fase sexual que corresponde a *Rhizoctonia* incluye los géneros *Ceratobasidium*, *Tulasnella*, *Sebacina* y *Thanatephorus*, los cuales pueden diferenciarse por sus estructuras conformadas por los basidiocarpos donde se producen las basidiosporas. Desafortunadamente es difícil conseguir estructuras reproductivas de *Rhizoctonia* en condiciones de laboratorio, lo que complica su diferenciación taxonómica (Mosquera et al. 2010).

González et al. (2006) proponen una clasificación que divide los hongos tipo *Rhizoctonia* en siete géneros anamórficos (Tabla 1).



Tabla 1 .- Sinopsis taxonómica del género- forma Rhizoctonia; géneros anamorfos y teleomorfos.

Anamorfo	Especie tipo	Basónimo	Teleomorfo	Especie tipo
<i>Ascorhizoctonia</i> Yang & Korft	<i>A. praecox</i> Yang & Kort	<i>A. praecox</i> Yang & Kort	<i>Tricharina</i> Eckblad	<i>T. gilva</i> Eckblad
<i>Ceratorhiza</i> R.T. Moore	<i>C. goodyerae-repentis</i> (Constantin) R.T. Moore	<i>Rhizoctonia goodyerae-repentis</i> Constantin	<i>Ceratobasidium</i> D.P. Rogers	<i>C. calosporum</i> D.P. Rogers
<i>Chrysorhiza</i> Andersen & Stalpers	<i>C. zae</i> (Voorhees) Andersen & Stalpers	<i>R. zae</i> Voorhees	<i>Waitea</i> Warcup & Talbot	<i>W. circiata</i> Warcup & Talbot
<i>Epulorhiza</i> R.T. Moore & Andersen	<i>E. repens</i> (Bernard) R.T. Moore	<i>R. repens</i> Bernard	<i>Tulasnella</i> Shoroeter	<i>T. violeta</i> (Qué) Bourd & Galzin
<i>Opadorhiza</i> Andersen y R.T. Moore	<i>O. globularis</i> (Saksena & Vartaja) Andersen y R.T. Moore	<i>R. globularis</i> Saksena & Vartaja	<i>Sebacina</i>	<i>S. vermifera</i> Oberwinkler
<i>Moniliopsis</i> Ruhland (Sin.=Rhizoctonia D.C.)	<i>M. aderholdii</i> Ruhland	<i>R. solani</i> J.G. Kühn	<i>Thanatephorus</i> Donk	<i>T. cucumeris</i> (Frank) Donk
<i>Tanatophytum</i> Nees	<i>T. croccorum</i> (Pers. Fr.) R.T. Moore	<i>Sclerotium croccorum</i> Pers.	<i>Helicobasidium</i> Pat.	<i>H. purpureum</i> Pat.

Fuente: (González et al. 2006).

5.4. Germinación de semillas de orquídeas epifitas

Otero et al. 2010, aseguran que muy poco se conoce tanto sobre las interacciones simbióticas de semillas de orquídeas terrestres como de semillas de orquídeas epifitas, por lo que recomiendan realizar estudios más profundos sobre la identificación de hongos que estimulen la germinación *in vitro* de semillas de orquídeas, ya que podrían dar resultados eficientes utilizando simbiontes naturales (Otero et al. 2013).

Las semillas de orquídeas se siembran junto con en el inóculo previamente aislados de las raíces de orquídeas, aquí ocurre la relación simbiótica, donde los nutrientes del hongo son transmitidos al protocormo de la semilla hasta que este obtenga sus primeras hojas y se haya convertido en una planta autotrófica (Alomía 2014).



Las plantas desarrolladas por el método simbiótico se caracterizan por ser mucho más fuertes y resistentes a infecciones, comparadas con plantas desarrolladas por el método asimbiótico (Otero & Bayman 2009).

La técnica de germinación simbiótica tiene las ventajas de que producen embriones más desarrollados y se establecen con facilidad gracias a que la inoculación de la semilla con el hongo micorrízico, le ayuda a que otros hongos patógenos no lo contaminen, comparado con la germinación asimbiótica donde los embriones son menos desarrollados y tardan meses en establecerse corriendo el riesgo de contaminación por otros hongos (Alomia 2014).

Se conoce como “especificidad ecológica” a la relación entre un hongo y orquídea adulta *in situ* (Alomia 2014). Una especie de orquídea logra establecer asociaciones micorrízicas con varios hongos y un hongo puede formar asociaciones con varias especies de orquídeas (Otero et al. 2004).

Las semillas de orquídeas también pueden estimularse no solo con hongos micorrízicos aislados de sus raíces sino también con otros hongos que no se encuentran asociados en condiciones naturales, conociéndose como Especificidad Potencial (Alomia 2014).



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Área de ejecución del proyecto

El experimento se desarrolló en el laboratorio de propagación *in-vitro* de plantas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.

6.2. Selección de semillas

Para este proyecto se usaron semillas de *Epidendrum nocturnum* (Cod. UC-EPI-1) y *Epidendrum dalstroemii* (Cod. UC-EPI-7) del banco de germoplasma del laboratorio de propagación *in-vitro* de plantas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.

6.3. Prueba de viabilidad de la semilla

Para evaluar la viabilidad de las semillas se realizó un pretratamiento que consiste en sumergir las semillas en una solución de 30 μ l de Tween 20 y 30 ml de cloro al 1% durante 15 minutos, transcurrido ese tiempo se lava y se deja reposar en agua por 48 horas en oscuridad, posteriormente las semillas deben ser escurridas para su inmersión en una solución de sales de tetrazolio al 1%. Incubadas por 24 horas a 30°C.

Las semillas fueron observadas usando un estéreo-microscopio. Se contabilizaron las semillas teñidas (viables) y no teñidas (no viables), para finalmente calcular el porcentaje de viabilidad.

6.4. Preparación de medios de cultivo

Para el establecimiento de los ensayos de germinación simbiótica se usó el medio Avena (2.5gr) y Agar (12gr) para un litro de solución.

También se preparó el medio Phytamax (Tabla 2) como un control positivo de la germinación, ya que contiene todos los nutrientes necesarios para el desarrollo de la semilla.


Tabla 2.- Composición Phytamax

	Reactivos	Peso (gr)	solución (ml)	Concentración (ml) para 1L	Concentración (gr) para 1L
1	NO ₃ (NH ₄)	8.25	100	10	
	NO ₃ K	9.5			
2	SO ₄ Mg	0.9	100	10	
	SO ₄ Mn	0.084			
	SO ₄ Zn	0.053			
	SO ₄ Cu	0.12			
3	IK	4.15	100	10	
	Cl ₂ Co	0.125			
	Cl ₂ Ca	1.66			
4	PO ₄ H ₂ K	0.85	100	10	
	BO ₃ H ₃	31			
	MoO ₄ Na ₂	1.25			
5	SO ₄ Fe	0.278	100	10	
	EDTA	0.372			
Vitaminas	Thiamina	0.001	100	10	
	Piridoxina	0.005			
	A. nicotínico	0.005			
	Inositol			10	
	Agar	0.7			7
	Azúcar	3			30

6.5. Selección de cepas

Las cepas que se usaron fueron tomadas del Banco de Germoplasma de Hongos Endófitos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. Estas cepas (*Coprinellus* sp. 1, *Coprinellus* sp. 2, *Trametes* sp. y *Basidiomycete micorrízico*) que fueron aisladas e identificadas previamente por Salazar (2017) a partir de raíces de orquídeas epifitas de bosques andinos del sur del Ecuador. Siembra de semillas e inoculación del hongo

Para la siembra de las semillas se realizaron los siguientes pasos:

- a) **Tratamientos.** - se prepararon dos medios de cultivos: Avena Agar para la siembra de semillas e inoculación del hongo; y PhytamaxTM 6668 (pH 5.6) para el control positivo.
- b) **Desinfección.** - se llevó a cabo dentro de la cámara de flujo laminar para evitar cualquier tipo de contaminación, como se describe a continuación:



- Debido a que las semillas son relativamente pequeñas se procedió a realizar su lavado dentro de una jeringa estéril taponando con un pedazo de algodón estéril la salida del líquido para evitar la pérdida de semillas.
- Posteriormente, se realizó la inmersión de las semillas en hipoclorito de sodio (NaCl) al 1% por un minuto.
- Finalmente se realizaron tres enjuagues sucesivos con agua destilada y estéril por un periodo de un minuto cada uno.

c) Siembra de semillas. - después del lavado de semillas de las dos especies y estas contenidas en su jeringa respectiva con agua estéril se ejecutó la siembra de la siguiente manera:

- En la superficie del medio de cultivo AA (Avena Agar) se agregó una suspensión de 0.5 ml de la solución que contenía las semillas desinfectadas, luego la caja se agito suavemente para su efectiva distribución.

d) Inoculación del hongo

- Una vez colocadas las semillas en cada caja, se procedió a depositar un fragmento de agar de 0.5 cm² que contenía cada hongo previamente aislado.
- Para el control negativo solamente se depositaron las semillas en las cajas de avena-agar sin ningún tipo de nutriente y para el control positivo las semillas fueron depositadas en las cajas que contenían el medio Phytamax.
- Las cajas se sellaron con parafilm para luego ser etiquetadas.
- Finalmente, las cajas se mantuvieron en el cuarto de cultivo a 20⁰C en oscuridad por diez semanas consecutivas para después ser expuestas a la luz.

Se realizó un total de 10 repeticiones por tratamiento, cada repetición consistió de una caja Petri para cada combinación de orquídea y hongo aislado con sus respectivos controles según se detalla en la siguiente tabla 3.

**Tabla 3.-** Especies de orquídeas, cepas y controles

Especies de orquídeas	Cepas y controles
<i>Epidendrum nocturnum</i>	<i>Coprinellus sp. 1</i>
	<i>Trametes sp.</i>
	<i>Basidiomycete micorrízico</i>
	<i>Coprinellus sp. 2</i>
	Control Negativo
	Control Positivo
<i>Epidendrum dalstroemii</i>	<i>Coprinellus sp. 1</i>
	<i>Trametes sp.</i>
	<i>Basidiomycete micorrízico</i>
	<i>Coprinellus sp. 2</i>
	Control Negativo
	Control Positivo

6.6. Evaluación del porcentaje de germinación de semillas y toma de datos

Obj esp 1.- la germinación y desarrollo de la semilla se evaluó cada 15 días usando una escala que muestra las etapas de crecimiento de 0 a 5 según la descripción de (Zettler & McInnis Jr, 1993)

- Estado 0= semillas hidratadas
- Estado 1= ruptura de la testa por alargamiento del embrión
- Estado 2= aparición de rizoides
- Estado 3= aparición de la hoja
- Estado 4= emergencia de la hoja
- Estado 5= elongación de la hoja.

Obj esp 2.- una vez obtenidos los resultados del ensayo experimental descrito para alcanzar el primer objetivo, la cepa que exhibió un efecto promotor en la germinación fue descrita considerando las siguientes características:

- Color de la cepa como: blanco, cremoso o amarillento
- Textura del micelio como: algodonoso, velloso o pulverulento
- Formas como: anillos, circulares, alargados
- Tasa de crecimiento en medio agarizado
- Morfología de las hifas.



Todos los datos se registraron fotográficamente a fin de que estos sean de utilidad para su posterior identificación y registro.

6.7. Diseño experimental y análisis estadístico

Para el experimento se utilizó un diseño completamente al azar en arreglo factorial de 2 x 6 (2 especies de orquídeas, 4 cepas, 1 control positivo y 1 control negativo), con 10 repeticiones, en tres etapas de crecimiento. Para contrastar los resultados se usaron pruebas no paramétricas como la prueba Kruskal Wallis con inclusión de pruebas pareadas usando el programa InfoStat al 5% de significancia.

6.8. Métodos del manejo del experimento

Una vez montado el ensayo, éste se mantuvo en oscuridad por diez semanas, siendo descubiertas solo para la toma de datos quincenal, pasado este periodo las cajas fueron descubiertas y expuestas a la luz hasta finalizar el experimento que fue a la semana dieciséis.

Los resultados fueron transformados a porcentajes ya que no todas las cajas contienen el mismo número de semillas y para el análisis estadístico solamente se tomaron en cuenta las tres primeras etapas de crecimiento.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1. RESULTADOS

7.1.2. Porcentaje de viabilidad de las semillas

- De acuerdo a los resultados obtenidos con la prueba de tetrazolio se obtuvo un porcentaje del 20% de viabilidad para la especie *E. nocturnum* y un 90% de semillas viables para *E. dalstroemii*.



Imagen 1.- Semillas teñidas por la prueba de tetrazolio
Fuente: Pomavilla. Y., 2017

7.1.3. Etapas de crecimiento de las semillas de orquídeas.



Imagen 2.- Semillas de *Epidendrum nocturnum* germinada en *Coprinellus* sp. 2 a las 16 semanas después de la siembra
Fuente: Pomavilla. Y., 2017



Imagen 3.- Semillas de *Epidendrum nocturnum* germinada en Control positivo a las 16 semanas después de la siembra.
Fuente: Pomavilla. Y., 2017

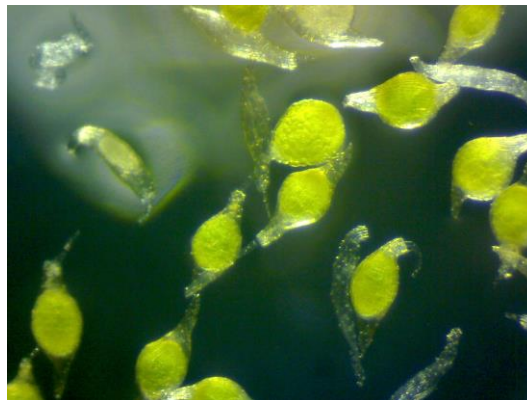


Imagen 4.- Semillas de *Epidendrum dalstroemii* germinada en *Coprinellus* sp. 2 a las 16 semanas después de la siembra
Fuente: Pomavilla. Y., 2017



Imagen 5.- Semillas de *Epidendrum dalstroemii* germinada en Control positivo a las 16 semanas después de la siembra.
Fuente: Pomavilla. Y., 2017



Tabla 4.- Germinación de las semillas por especies, hongos aplicados y controles.

Especies	Hongos y controles	Semillas	Estado original	(0) Hinchado	(1) Ruptura testa	(2) Aparición de rizoides	Total % Germinación	Media %	Desviación estándar %
<i>Epidendrum nocturnum</i>	<i>Coprinellus</i> sp. 1	263	197	65	1
	<i>Trametes</i> sp.	284	215	68	1
	<i>Basidiomycete</i> m	267	202	63	2
	<i>Coprinellus</i> sp. 2	342	260	34	38	10	2,9	3,7 ^b	1,2
	Control negativo	270	184	84	2
	Control positivo	356	271	10	49	26	7,3	7,1 ^b	2,1
<i>Epidendrum dalstroemii</i>	<i>Coprinellus</i> sp. 1	274	42	223	9
	<i>Trametes</i> sp.	302	49	248	5
	<i>Basidiomycete</i> m	342	71	261	10
	<i>Coprinellus</i> sp. 2	323	42	136	102	43	13,3	13,5 ^b	5,3
	Control negativo	311	59	252
	Control positivo	312	45	22	169	76	4,4	24,4 ^c	10,2

Letras diferentes (b,c) dentro de cada bloque de especie, indica significancia estadística ($P < 0,0001$) entre el grupo de hongos para los que han existido datos, según prueba de Kruskal-Wallis.



Con la prueba de Kruskal -Wallis los resultados fueron significativamente diferentes, el control positivo evidenció un mayor porcentaje de germinación que *Coprinellus* sp. 2 ($P < 0,0001$) (Anexo 6) en ambas especies de orquídeas. A pesar de que no existe una interacción significativa entre los factores especie y hongos ($P = 0,0001$), se encontró que el porcentaje de germinación entre el hongo *Coprinellus* sp. 2 y el control positivo fue estadísticamente diferente a los demás ($P < 0,0001$) dentro de la especie *Epidendrum dalstroemii*. En cambio, los porcentajes no difirieron estadísticamente ($P > 0,0001$) en la especie *Epidendrum nocturnum* ni para el hongo *Coprinellus* sp. 2 ni para el control positivo.

Las semillas de *Epidendrum nocturnum* lograron alcanzar las tres primeras etapas de crecimiento, alcanzando un 2,9% de germinación con *Coprinellus* sp. 2 y 7.3% con el control positivo, considerándose que se denomina semilla germinada desde que cumple la etapa (2) (aparición de rizoides) y las semillas de *Epidendrum dalstroemii* lograron alcanzar las tres primeras etapas de crecimiento, alcanzando un 13,3% de germinación con *Coprinellus* sp. 2 y 4,4% con el control positivo (Tabla 4).

7.1.4. Caracterización morfológica del hongo con mayor efecto promotor.

Apreciando macroscópicamente, la cepa del hongo *Coprinellus* 2 que presentó el mejor resultado en la germinación presentó micelio de color blanco, tiene un crecimiento casi circular avanzando 0,5cm cada 48 horas, con respecto a la altura de crecimiento permanece con 0,2cm y va disminuyendo conforme va madurando, después de completar el crecimiento en la caja permanece de color blanco con una textura algodonosa. Vista microscópicamente las hifas presentan ramificaciones casi en ángulo recto con respecto a la hifa principal, sus tabiques se observan claramente en algunas hifas, pero en otras no se presentan, no se observó la presencia de esporas. La cepa pertenece al género *Coprinellus*, la cual fue identificada por Salazar (2017).

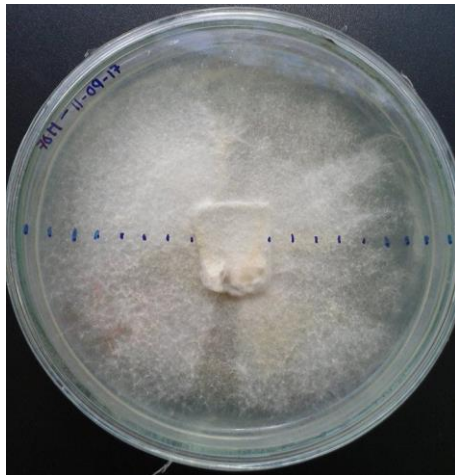


Imagen 6.- Crecimiento de *Coprinellus* a los 12 días después del repique.
Fuente: Pomavilla. Y., 2017

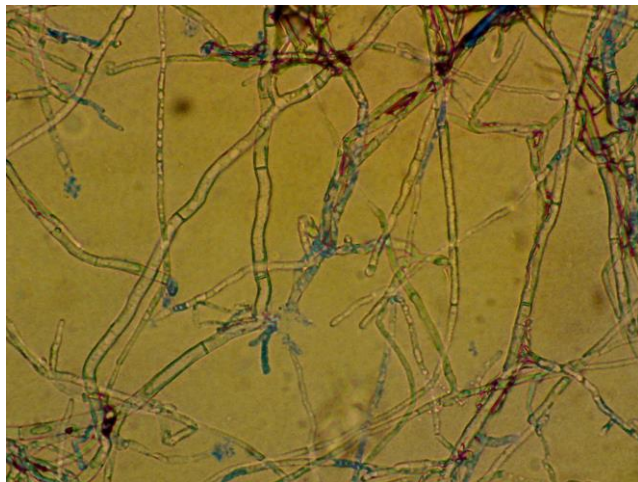


Imagen 7.- Fotografía bajo microscopio del micelio de *Coprinellus* teñido con azul de metileno.
Fuente: Pomavilla. Y., 2017



7.2. DISCUSIÓN

En el presente estudio se obtuvo un efecto estimulante de la germinación con el tratamiento *Coprinellus* sp. 2. y control positivo para ambas especies de orquídeas, en el caso de *E. nocturnum* con resultados de 2,9% con *Coprinellus* sp. 2 y 7,3% con el control positivo (phytamax), para *E. dalstroemii* con 13,3% en *Coprinellus* sp. 2 y 4,4% con el control positivo (phytamax). Mientras que en el control negativo (Avena-Agar) no se observó germinación, sugiriendo que *Coprinellus* sp.2 efectivamente actuó facilitando el acceso de los nutrientes a los embriones en el medio Avena-Agar.

Con el control positivo se afirma que las semillas sí estuvieron en buen estado y por lo mismo es que cumplieron las etapas de crecimiento, los resultados obtenidos con la cepa *Coprinellus* 2 sugieren que podría ser una cepa generalista para el género *Epidendrum* ya que se evidenció un efecto positivo en ambas especies, e incluso podrían tener un efecto positivo en la germinación u otro estado de desarrollo de otras especies de orquídeas, ya que según reporta Salazar (2017), el género *Coprinellus* es una cepa generalista debido a que se encontró en todas las raíces de orquídeas identificadas tanto en los bosques montanos de Mazan como en Llaviuco. En el reporte de Yamato et al (2005), también concuerdan con nuestro estudio confirmando una vez más que *Coprinellus* es una micorriza que favorece al desarrollo de las semillas por ser una cepa generalista.

Con las cepas *Trametes* sp. y *Basidiomycete micorrízico* no se obtuvieron resultados, estas cepas podrían ser específicas de otros grupos, como *Pleurotallis* (datos no publicados) u otros ya que no promovieron el desarrollo de las semillas evaluadas en este estudio. Además, en el estudio de Salazar (2017), se demuestra que *Trametes* sp. solo se encontró en una especie del género *Epidendrum* que no se ha identificado y el hongo *Basidiomycete micorrízico* se registra únicamente en plantas del género *Stelis* sp. Debido a que en este estudio las cepas mencionadas no promovieron el desarrollo de las semillas de *Epidendrum nocturnum* ni *Epidendrum dalstroemii* en ninguna de las etapas de crecimiento, sugerimos estudiar la posible especificidad de estos hongos con otros grupos de orquídeas. Cueva & de los Angeles (2014), afirman especificidad donde demuestra que *Trametes* sp. sólo se encontró en la especie *Cyrthochilum flexuosum* recolectado del Bosque montano del sur del Ecuador.



Epidendrum nocturnum mostró un menor porcentaje de germinación de semillas debido a que también hubo un bajo porcentaje de viabilidad que es un 20%. En el caso *Epidendrum dalstroemii* a pesar de que hubo un porcentaje del 90% de viabilidad no mostró un afecto mayor de germinación, esto puede ser consecuencia de que las semillas no tenían capacidad germinativa donde las semillas viables en dormancia no llegan a germinar, como lo demuestran (Cerna et al. 2014) en su estudio, que de las especies colectadas de *Epidendrum* sp. todas mostraron un porcentaje de viabilidad del 75% aproximadamente y un porcentaje menor de germinación debido a la capacidad no germinativa.



8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

8.1. Conclusiones

- *Coprinellus* sp.2 produjo un efecto estimulante de la germinación de semillas de las dos especies de *Epidendrum* evaluadas.
- El efecto estimulante de la germinación inducido por la presencia de *Coprinellus* sp.2 fue aproximadamente un 50% tan efectivo como la germinación en el control positivo (phytamax).
- Comparando las dos especies de semillas de orquídeas hubo un mayor porcentaje de germinación para la especie *E. dalstromii* con 24.35% y no así para la especie *E. nocturnum* con un 7.3% de germinación.
- Con las cepas *Trametes* sp, *Basidiomycete micorrízico* y control negativo (Avena-Agar) las semillas lograron cumplir con la etapa 1 (semillas hidratadas) después de diez semanas de haber sido incubadas y permanecieron así hasta el final del ensayo.
- Únicamente *Coprinellus* sp.2 demostró un efecto promotor en las semillas.



8.2. Recomendaciones

- Se debería extender el tiempo de monitoreo de las semillas debido a que muchas semillas tardan más tiempo en germinar.
- De acuerdo a las cepas disponibles en el banco de germoplasma se debería realizar más combinaciones con otras más especies de *Epidendrum* sp.
- Debido a que en las raíces de orquídeas *in situ* se encuentran una gran combinación de hongos, se debería optar por hacer combinación de hongos con una especie de semilla.
- Realizar ensayos con semillas de viabilidad homogénea.



9. BIBLIOGRAFIA

- Abello, J. F., & Kelemu, S. 2006. Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. *7(2)*, 55-57.
- Alomía Aguirre, Y. A. 2014. Hongos micorrízicos en *Vanilla* spp. (Orchidaceae) y su potencia para la germinación de semillas. 1-92.
- Arditti, J., & Ernst, R. 1992. Micropropagation of orchids. 682.
- Arditti, J., Ernst, R., Yam, T. W., & Glabe, C. 1990. The contribution of orchid micorrhizal fungi to seed germination: a speculative review. *Lindleyana*, *5(4)*, 249-255.
- Bayman, B. P., Otero, J. T., & Ackerman, J. D. 2003. Hidden Transactions The Curious Relationships Between Orchids and Fungi. *Orchids*, 536-537.
- Brundrett, M. 2007. Scientific approaches to Australian temperate terrestrial orchid conservation. *55(3)*, 293-307.
- Cameron, D. D., Leake, J. R., & Read, D. J. 2006. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New phytologist*, *171(2)*, 405-416.
- Cerna, M., Cárdenas, S., Cruz, A., & Jácome, I. 2014. Colección de germoplasma de especies de la familia Orchidaceae del cantón Santiago de Méndez- Morona Santiago, Ecuador. *20(2)*, 5-19.
- Clements, M. A. 1987. The symbiotic method of orchid seed germination progress on Australian epiphytes. In: Proceedings of the world Orchid Hiroshima Symposium, Nishiki Print Company. 65-68.
- Cueva Agila, Anabel de los Ángeles.(2014).Caracterización molecular de hongos micorrízicos aislados a partir de cuatro especies de orquídeas epífitas, en dos pisos altitudinales de bosque montano.(Trabajo de Fin de Titulación de Biólogo). UTPL, Loja.
- Curtis, J. T. 1939. The relation of specificity of orchid mycorrhizal fungi to the problem of symbiosis. *26(6)*, 390-399.
- Dixon, K.W., Kell, S.P., Barret, R.L. & Cribb P.J. (eds) 2003. *Orchid Conservation*. 1-24.
- Donson, C.H. 2001. Native Ecuadorian Orchids. Volumen II: Dresslerella- Lepanthes. Quito, Ecuador. 268-269.



- Gebauer, G., & Meyer, M. 2003. ^{15}N and ^{13}C natural abundance of autotrophic and mycoheterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New phytologist*, 160, 209-223.
- González García, V., Portal Onco, M. A., & Rubio Susan, V. 2006. Review. Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 4(1), 55-79.
- Hadley, B. G. 1969. Cellulose as a carbon source for orchid mycorrhiza. *New phytologist*, 68, 933-939.
- Hirtz A, T. I. 2004. Donde están las orquídeas. *Tierra incógnita*, 32.
- Hoang, N. H., Kane, M. E., Radcliffe, E. N., Zettler, L. W., & Richardson, L. W. 2016. Comparative seed germination and seedling development of the ghost orchid, *Dendrophylax lindenii* (Orchidaceae), and molecular identification of its mycorrhizal fungus from South Florida. *Annals of Botany*, 1-15.
- IUCN/SSC Orchid Specialist Group. 1996. Status and conservation action plan: orchids. *The world conservation union*.
- Jaramillo, T. 2013. Plantas nativas de la Hoya de Quito. *Jardín botánico de Quito*.
- Jijón, C., & Navarrete, H. 2009. Ecuador país de orquídeas, provincia de Pichincha y Santo Domingo de los Tsachilas.
- Jorgensen, P. M., & Neill, D. A.-Y. 1999. *Catálogo de plantas vasculares del Ecuador*. Recuperado el 2017, de <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/ecuador/historysp.shtml>
- Luan, V. T. 2006. In vitro germination capacity and plan recovery of some native and easy orchids. *20(21)*, 175-177.
- Martínez, L. B., & Pugnaire, F. I. 2009. Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. algunos ejemplos en los ecosistemas semiáridos. *Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente*, 18(2), 44-54.
- Masuhara, G., Katsuya, K., & Yamaguchi, K. 1993. Potential for symbiosis of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* with seeds of *Spiranthes sinensis* var. *amoena* in vitro. *97(6)*, 746-752.
- Mckendrick, S. L., Leake, J. R., Taylor, D. L., & Read, D. L. 2002. Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. *154(1)*, 233-247.



- Mckendrick, S. L., Leake, J. R., Taylor, D. L., & Read, D. J. 2000. Symbiotic germination and development of micro-heterotrophic plants in nature: ontogeny of *Corallorhiza trifida* and characterization of its mycorrhizal fungi. *145*, 523-537.
- Ministerio de turismo. 2013. Recuperado el 2017, de <http://www.turismo.gob.ec/oficialmente-ecuador-es-el-pais-de-las-orquideas/>
- Mosquera Espinosa , A. T., Bayman, P., & Otero, J. T. 2010. *Ceratobasidium* como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia. *59*(3), 316-326.
- Olalde Portugal, V., & Aguilera Gómez, L. I. 1998. Microorganismos y biodiversidad. *16*(3), 289-292.
- Ordoñez C, N. F., Otero, J. T., & Díez G, M. C. 2012. Orchid endophytes and their effect on growth in *Vanilla planiflora* Andrews. *61*(3), 282-290.
- Otero, J. T., & Bayman, P. 2009. Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epífitas. *58*(4), 270-276.
- Otero, J. T., Ackerman , J. D., & Bayman, P. 2002. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*- like fungi from tropical orchids. *89*(11), 1852-1858.
- Otero, J. T., Ackerman, J. D., & Bayman, P. 2004. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical. *13*(8), 2393- 2404.
- 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. *19*(1), 29-43.
- Otero, J. T., Flanagan , N. S., Herre, E. A., Ackerman, J. D., & Bayman, P. 2007. Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Lonopis utricularioides* (Orchidaceae). *94*(12), 1944-1950.
- Otero, J. T., Mosquera, A. T., & Flanagan, N. S. 2013. Tropical orchid mycorrhizae: potential applications in orchid conservation, commercialization, and beyond. In Fourth Scientific Conference on Andean Orchids. *Lankesteriana*, *13*(1-2), 57-63.
- Porras, A. A., & Bayman, P. 2007. Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *Mycol*, *99*(4), 510-525.
- Rasmussen, H. N., & Whigham, D. F. 2002. Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. *154*(3), 797-807.





- Reina-Rodríguez , G. A., Otero, T., Soriano, I., Ortiz, P., & Ospina-Calderón, N. H. 2011. Guía ilustrada de las orquídeas del valle Geográfico del río Cauca y Piedemonte Andino Bajo. *Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira*, 94.
- Salazar, J. 2017. Estudio comparativo de la riqueza de hongos endófitos asociados a la diversidad de orquídeas epífitas en los bosques de Mazán y la zona de influencia del Parque Nacional El Cajas.
- Sanders , I. R. 2003. Preference, specificity and cheating in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *8*(4), 143-145.
- Sierra, R. 2013. Patrones y factores de deforestación en el Ecuador continental, 1990-2010: y un acercamiento a los próximos 10 años.
- Stewart, S. L., & Zettler, L. W. 2002. Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinquiseta*, *H. macroceratitis*) from Florida. *Aquatic botany*, *72*(1), 25-35.
- Suárez, J. P., Weiss, M., Abele, A., Garnica, S., Oberwinkler, F., & Kottke, I. 2006. Diverse tulasnellid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *110*(11), 1257- 1270.
- Taylor, D. L., & Thomas, D. B. 1997. Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. *94*(9), 4510-4515.
- Tremblay, R. L. 1997. Distribution and Dispersion Patterns of Individuals in Nine Species of *Lepanthes* (Orchidaceae). *Biotropica*, *29*, 38-45.
- Trudell , S. A., Rygielwicz, P. T., & Edmonds, R. L. 2003. Nitrogen and carbon stable isotope abundances support the myco-heterotrophic nature and host-specificity of certain achlorophyllous plants. *New phytologist*, *160*, 391-401.
- Valencia, R., León-Yáñez, S., Pitman, N., Endara, L., Ulloa , C., & Navarrete, H. 2000. *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador* (segunda ed.). Quito.
- Williamson, B., & Hadley, G. 1970. .Penetration and infection of orchid protocorms by *Thanatephorus cucumeris* and other *Rhizoctonia* isolates. *Phytopathology*, *60*, 1092-1096.
- Xiang , X., Gai, X., Liu, Q., Hart, M. M., & Guo, S. 2015. Mycorrhizal fungal diversity and community composition in a lithophytic and epiphytic orchid. *25*, 289-296.
- Yamato, M., Iwase, K., Yagame, T., & Suzuki, A. 2005. Isolation and identification of mycorrhizal fungi associating with an achlorophyllous plant, *Epipogium roseum* (Orchidaceae). *46*(2), 73-77.




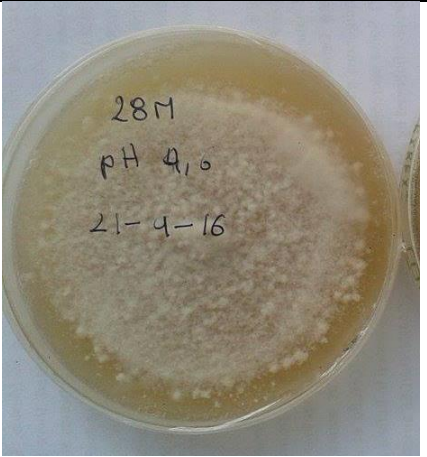
- Zettler, L. W., & McInnis Jr, T. M. (1993). Symbiotic seed germination and development of *Spiranthes cernua* and *Goodyera pubescens* (Orchidaceae: Spiranthoideae). *8*(3), 155-162.
- Zettler, L. W., Poulter, S. B., McDonald, K. I., & Stewart, S. L. 2007. Conservation-driven propagation of an epiphytic orchid (*Epidendrum nocturnum*) with a mycorrhizal fungus. *42*(1), 135-139.
- Zi, X. M., Sheng, C. L., Goodale, U. M., Shao, S. C., & Gao, J. Y. 2014. In situ seed baiting to isolate germination- enhancing fungi for an epiphytic orchid, *Dendrobium aphyllum* (Orchidaceae). *24*(7), 487- 499.
- Zelenko, H., Bermúdez, P. 2009. *Orchids Species of Peru*. 129

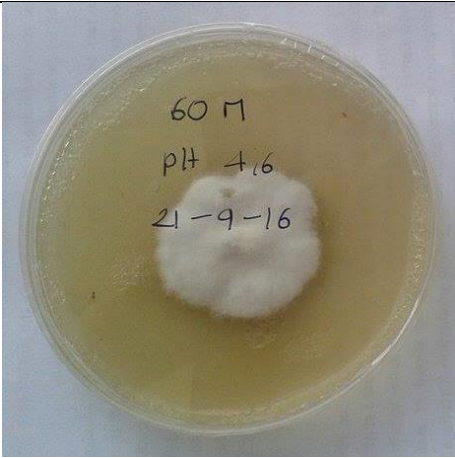
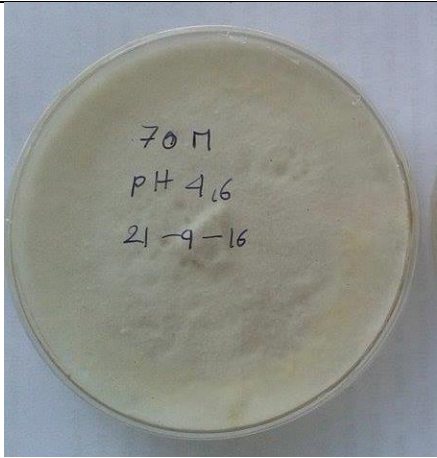
10. ANEXOS

Anexo 1.- Prueba de viabilidad de las semillas en sales de tetrazolio al 1%.



1.- Semillas en sales de tetrazolio	2.- Semillas teñidas
	

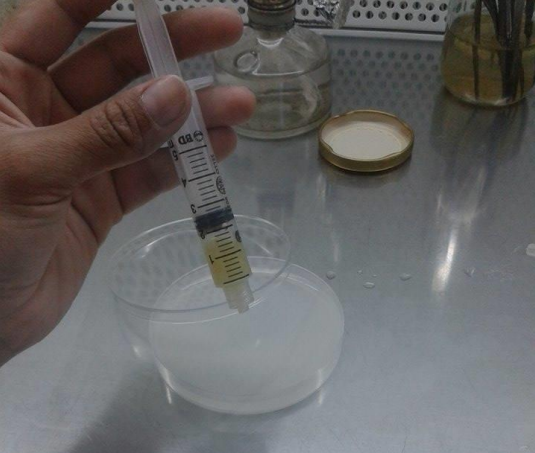
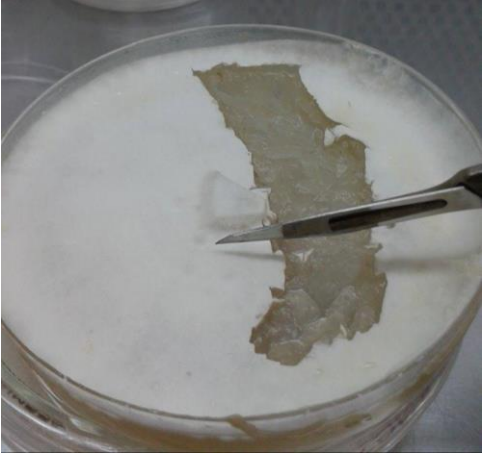


Anexo 2.- Selección de las cepas a inocularse

1.- <i>Coprinellus</i> sp. 1	2.- <i>Trametes</i> sp.
	

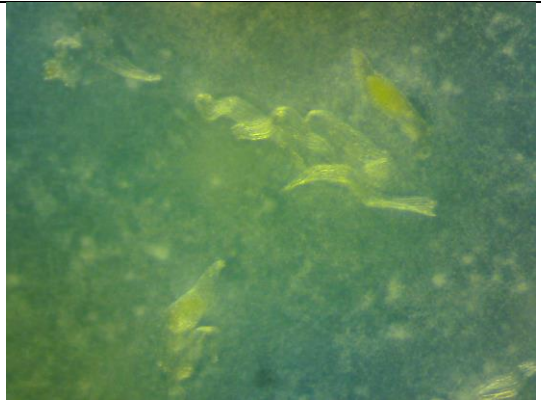



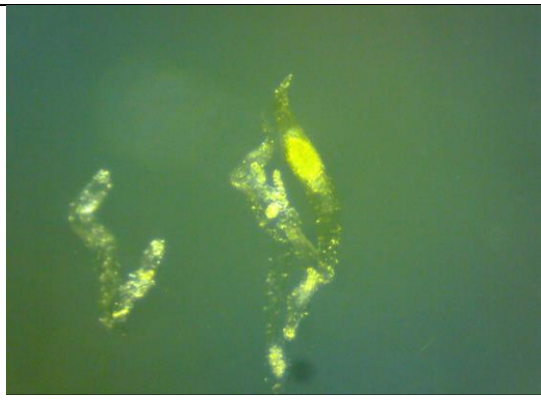
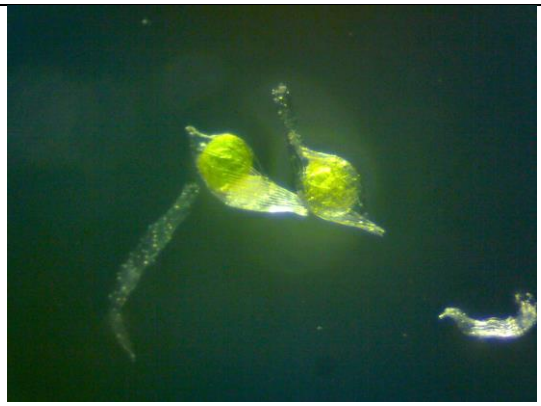
<p>3.- Basidiomycete micorrízico</p>	<p>4.- Coprinellus sp.2</p>
	


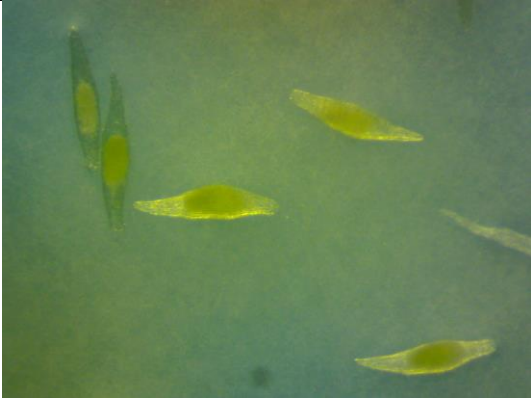

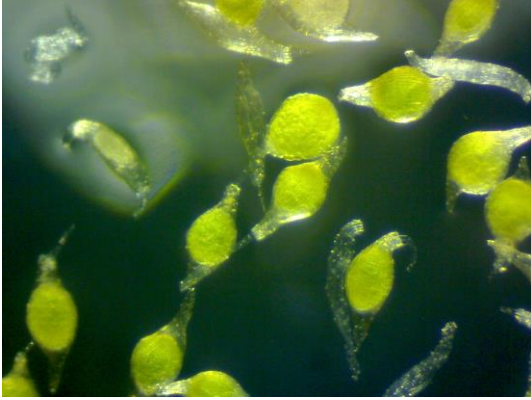
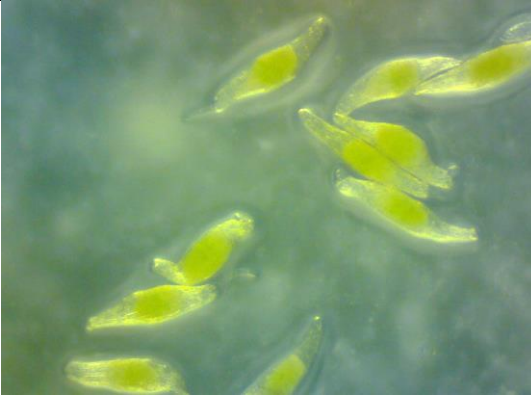

Anexo 3.- Procedimientos de la siembra e inoculación de la cepa

<p>inmersión de las semillas en hipoclorito de sodio (ClNa)</p>	<p>Enjuagues sucesivos de las semillas</p>
	
<p>Depósito de las semillas en el medio AA</p>	<p>Fragmento de la cepa</p>

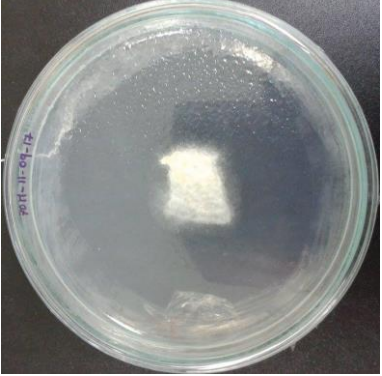
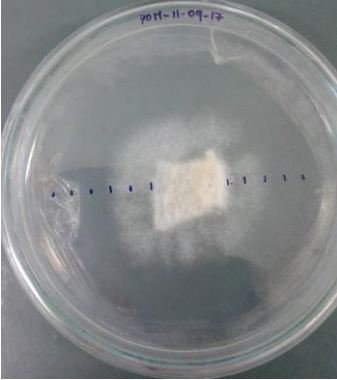
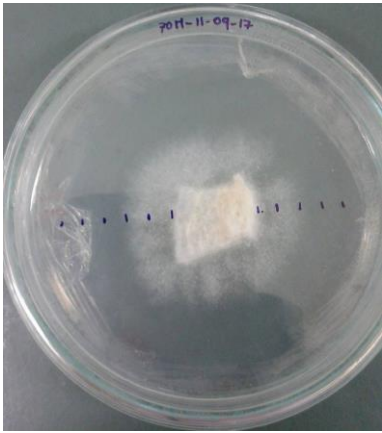
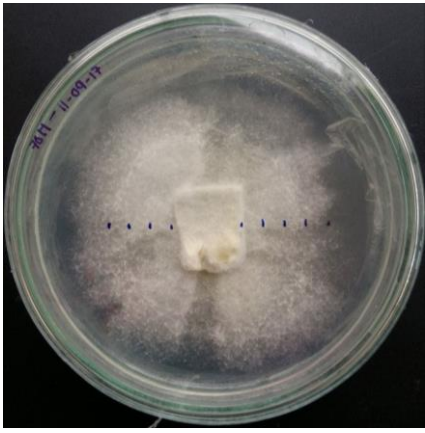
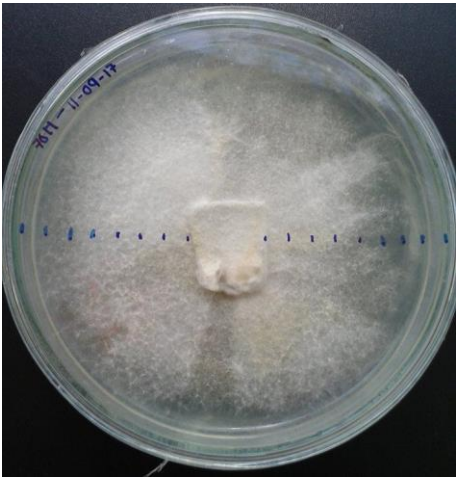
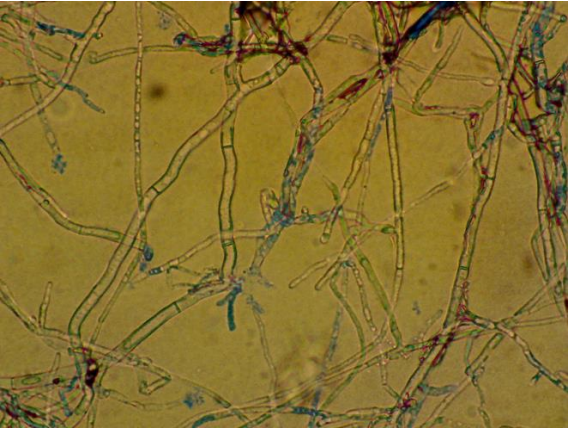
	
<p>Inoculación del hongo</p>	<p>Sellado y etiquetado de las cajas</p>
	

Anexo 4.- Semillas a las 16 semanas después de la inoculación de las cepas.

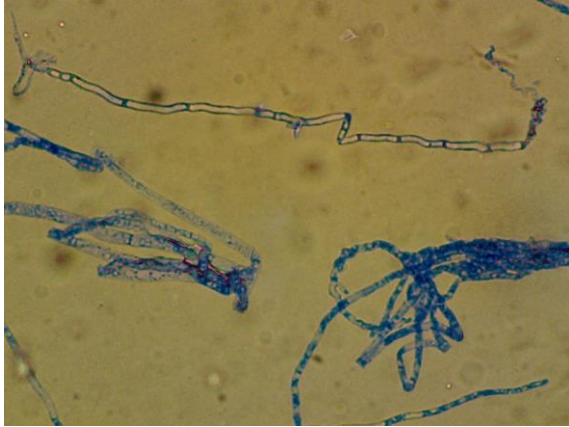
<i>Epidendrum nocturnum</i>	
1.- <i>Coprinellus</i> sp. 1	2.- <i>Trametes</i> sp.
	
3.- <i>Basidiomycete micorrízico</i>	4.- <i>Coprinellus</i> sp. 2
	
5.- Control negativo	6.- Control positivo
	

<i>Epidendrum dalstroemii</i>	
1.- <i>Coprinellus</i> sp. 1	2.- <i>Trametes</i> sp.
	
3.- Basidiomycete micorrízico	4.- <i>Coprinellus</i> sp. 2
	
5.- Control negativo	6.- Control positivo
	

Anexo 5.- Ceba con mayor efecto promotor.

<p><i>Coprinellus</i> sp. 2 a los 2 días después del repique.</p> 	<p><i>Coprinellus</i> sp. 2 a los 4 días después del repique.</p> 
<p><i>Coprinellus</i> sp. 2 a los 6 días después del repique.</p> 	<p><i>Coprinellus</i> sp. 2 a los 8 días después del repique.</p> 
<p><i>Coprinellus</i> sp. 2 a los 12 días después del repique.</p> 	<p>Fotografía bajo microscopio del micelio de <i>Coprinellus</i> sp. 2 teñido con azul de metileno.</p> 

Fotografía bajo microscopio del micelio de *Coprinellus* sp, 2 teñido con azul de metileno.





Anexo 6.- Resultados

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Hongos y controles	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
E. nocturnum	Coprinellus sp. 1	30	9.49	14.55	0.00	54.17	<0.0001
E. nocturnum	Trametes sp.	30	9.03	13.77	0.00		
E. nocturnum	Basidiomycete micorrízico	30	8.31	11.95	0.00		
E. nocturnum	Coprinellus sp. 2	30	9.05	5.05	9.30		
E. nocturnum	Control Negativo	30	11.46	16.27	0.00		
E. nocturnum	Control Positivo	30	8.52	6.27	7.20		
E. dalstroemii	Coprinellus sp. 1	30	28.19	38.62	3.35		
E. dalstroemii	Trametes sp.	30	28.17	39.62	0.00		
E. dalstroemii	Basidiomycete micorrízico	30	26.48	36.37	2.90		
E. dalstroemii	Coprinellus sp. 2	30	28.94	13.35	30.55		
E. dalstroemii	Control Negativo	30	26.96	38.95	0.00		
E. dalstroemii	Control Positivo	30	28.42	21.28	23.00		

Especie	Hongos y control	Ranks
E. nocturnum	Trametes sp.	139.62 A
E. nocturnum	Coprinellus sp. 1	139.92 A
E. nocturnum	Basidiomycete micorrízico	140.27 A
E. nocturnum	Control Negativo	146.87 A
E. dalstroemii	Control Negativo	160.85 A B
E. dalstroemii	Trametes sp.	174.83 A B
E. dalstroemii	Basidiomycete micorrízico	180.33 A B
E. dalstroemii	Coprinellus sp. 1	183.68 A B
E. nocturnum	Control Positivo	185.23 A B
E. nocturnum	Coprinellus sp. 2	193.65 A B
E. dalstroemii	Control Positivo	253.20 B C
E. dalstroemii	Coprinellus sp. 2	267.55 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)



Comparaciones por pares

Variable dependiente: perc_aprizoi_8

especie	(I)hongo	(J)hongo	Diferencias de medias (-J)	Error tip.	Sig. ^b	Intervalo de confianza al 95% para la diferencia ^b	
						Límite inferior	Límite superior
<i>E. nocturnum</i>	<i>Coprinellus</i> sp.2	Control positivo	´-,034	,027	,225	´-,089	,022
	Control positivo	<i>Coprinellus</i> sp.2	,034	,027	,225	´-,022	,089
<i>E. dalstroemii</i>	<i>Coprinellus</i> sp.2	Control positivo	´,109*	,027	,000	´-,163	´-,055
	Control positivo	<i>Coprinellus</i> sp.2	,109*	,027	,000	,055	,163

Basadas en las medias marginales estimadas.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel

b. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.