

UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA



Evaluación del efecto de cinco hongos aislados endófitos de raíces de *Pleurothallis coriacardia* en la germinación de *Epidendrum dalstromii*.

Tesis previa a la obtención del
título de Ingeniero Agrónomo

AUTORA:

Carla Herica Quishpe Guamán

CI: 0105994156

DIRECTORA:

Blga. MSc. Denisse Fabiola Peña Tapia

CI: 0102501889

CUENCA - ECUADOR

2018



RESUMEN

El estudio de hongos endófitos formadores de micorrizas juega un papel importante en la conservación y reintroducción de orquídeas, se considera que la relación que existe entre especies que comparten un hábitat es fundamental para la germinación y desarrollo de estas especies, pese a esto, se desconoce el efecto del hábitat en común y sus relaciones simbióticas con microorganismos como los hongos endófitos micorrízicos, ya que pueden ser igual o distintas entre las diferentes especies de hongos con distintas especies de orquídeas durante la germinación. En el presente estudio se evaluó el efecto de cinco hongos endófitos aislados de *Pleurothallis coriacardia* en la germinación *in vitro* de *Epidendrum dalstromii*. Para ello se estableció un ensayo de germinación simbiótica donde se evaluó cinco tratamientos con diferentes hongos endófitos extraídos de *Pleurothallis coriacardia* y dos controles, un positivo en Phytamax y un control negativo en Avena agar. Los resultados obtenidos evidenciaron una posible especificidad entre la especie de orquídea y los hongos endófitos utilizados, debido a que no hubo una diferencia significativa entre los hongos evaluados con los controles, puesto que, el control positivo (Phytamax) fue quien presentó mejores resultados; por lo tanto, los inóculos de los hongos aislados de *Pleurothallis coriacardia*, no fueron eficientes como promotores de la germinación de *Epidendrum dalstromii* pese a que estas dos especies comparten el mismo hábitat.

Palabras claves: *Epidendrum dalstromii*, ESPECIES ENDÉMICAS, MICORRIZAS, GERMINACIÓN, HONGOS ENDÓFITOS, ESPECIFICIDAD, HÁBITAT.



ABSTRACT

The study of endophytic mycorrhizal fungi plays an important role in the conservation and reintroduction of orchids, it is considered that the relationship that exists between species that share a habitat is fundamental for the germination and development of these species, despite this, it is unknown the effect of habitat in common and its symbiotic relationships with microorganisms such as mycorrhizal endophytic fungi, since they can be the same or different between different fungi species with different species of orchids during germination. In the present study, the effect of five endophytic fungi isolated from *Pleurothallis coriacardia* on the *in vitro* germination of *Epidendrum dalstromii* was evaluated. To this end, a symbiotic germination trial was established where five treatments were evaluated with different endophytic fungi extracted from *Pleurothallis coriacardia* and two controls, one positive in Phytamax and one negative in Avena agar. The results obtained showed a possible specificity between the species of orchid and the endophyte fungi used, because there was no significant difference between the fungi evaluated with the controls, since, the positive control (Phytamax) was the one that presented the best results; therefore, the inocula of the fungi isolated from *Pleurothallis coriacardia* were not efficient as promoters of the germination of *Epidendrum dalstromii* although these two species share the same habitat.

Key words: *Epidendrum dalstromii*, ENDEMIC SPECIES, MYCORRHIZAE, GERMINATION, ENDOPHYTE FUNGI, SPECIFICITY, HABITAT.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos para la elaboración del medio Phytamax	27
Tabla 2. Hongos endófitos utilizados.	29
Tabla 3. Desarrollo de las semillas de <i>Epidendrum dalstromii</i> en la oscuridad.	33
Tabla 4. Efecto de los tratamientos y controles en la germinación de <i>Epidendrum dalstromii</i>	34

INDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Parte de la flor de orquídea.....	18
Imagen 2. <i>Epidendrum dalstromii</i> (foto de Eric Hunt)	19
Imagen 3. Observación microscópica hongo <i>Coprinellus</i> 19M1.4.9	31
Imagen 4. Prueba de viabilidad en la semilla de <i>Epidendrum dalstromii</i>	32

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo de las semillas de <i>Epidendrum dalstromii</i> con el hongo 6M3.10	35
Figura 2. Desarrollo de las semillas de <i>Epidendrum dalstromii</i> con el hongo <i>Coprinellus</i> 19M1.4.9; a) Estado 0(Embrión no germinado), Estado 1(Imbibición); b) Estado 2 (ruptura de testa).	36
Figura 3. Desarrollo de las Semillas de <i>Epidendrum dalstromii</i> con el hongo <i>Coprinellus</i> 38; a) Estado 0 (Embrión no germinado), b) Estado 2 (Ruptura de la testa).	36
Figura 4. Desarrollo de las semillas de <i>Epidendrum dalstromii</i> en Medio Phytamax (Control positivo); a) Estado 3 (aparición de los rizoides), b) Estado 4 (Aparición de protocormos foliar y radicular).	36

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Prueba de Tetrazolio.....	45
Anexo 2. Hongos endófitos utilizados.	45
Anexo 3. Etapas de desinfección de la semilla y siembra de la semilla con el inóculo del hongo.	47
Anexo 4. Efecto de los hongos endófitos y controles.	48



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

HE: Hongo endófito

VAM: Micorrizas vesículo-arbusculares.

ECT: Ectomicorrizas.

PDA: Papa dextrosa agar.

Spp: Varias especies del mismo género.



INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INDICE DE TABLAS	4
INDICE DE IMÁGENES.....	4
INDICE DE FIGURAS	4
INDICE DE ANEXOS	4
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA	5
INDICE DE CONTENIDOS	6
AGRADECIMIENTOS	10
DEDICATORIA	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. JUSTIFICACIÓN.....	14
3. OBJETIVOS	15
3.1. OBJETIVO GENERAL:	15
3.2. OJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3.3. HIPOTESIS	15
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	16
4.1 GENERALIDADES DE LAS ORQUÍDEAS	16
4.2 IMPORTANCIA DE LAS ORQUÍDEAS.....	16
4.3 IMPORTANCIA DE LAS ORQUÍDEAS NATIVAS.....	17
4.4 DESCRIPCIÓN	18



4.5	CICLO VEGETATIVO DE LAS ORQUÍDEAS	19
4.6	MICORRIZAS	20
4.7	RELACIONES ENTRE PLANTAS	23
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1	Área de estudio	25
5.2	Área de ejecución del proyecto	25
5.3	Materiales y reactivos	25
5.4	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	27
5.7.1.	Siembra de la semilla de <i>Epidendrum dalstromii</i>	29
5.7.2.	Inoculación del hongo aislado.	30
5.7.3.	Toma de datos y análisis experimental	30
5.8	METODOLOGÍA DESCRIPTIVA DE ACUERDO AL SEGUNDO	
	OBJETIVO	30
5.8.1	Selección de los hongos endófitos aislados con efecto promotor en la germinación	31
6.	RESULTADOS	32
6.1	Análisis de viabilidad de la semilla	32
6.2.	Germinación de <i>Epidendrum dalstromii</i>	32
7.	DISCUSIÓN	37
8.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	40
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	41
10.	ANEXOS	45

Cláusula de Propiedad Intelectual

Carla Herica Quishpe Guamán, autora del trabajo de titulación “Evaluación del efecto de cinco hongos aislados endófitos de raíces de *Pleurothallis coriacardia* en la germinación de *Epidendrum dalstromii*”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, Noviembre de 2018



Carla Herica Quishpe Guamán

C.I: 0105994156

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Carla Herica Quishpe Guamán en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Evaluación del efecto de cinco hongos aislados endófitos de raíces de *Pleurothallis coriacardia* en la germinación de *Epidendrum dalstromii*”, 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, Noviembre del 2018.



Carla Herica Quishpe Guamán

C.I: 0105994156



AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de estar con vida y darme la salud para poder alcanzar mis metas.

A mis padres por su apoyo, por su comprensión y estar siempre a mi lado, por sus consejos y su paciencia en toda mi vida estudiantil.

Mis agradecimientos a la Universidad de Cuenca por abrirme sus puertas y dejarme ser parte de sus alumnos para crecer profesionalmente.

A mi Directora de Tesis Blga Denisse Peña por saber guiarme en mi trabajo de titulación, por su tiempo, paciencia, y compartir sus conocimientos para poder concluir con este trabajo.

A Ing. Paulina Villena MSc. por compartirme sus conocimientos y su tiempo durante el desarrollo de este trabajo.

A la Blga. Gabriela Maldonado MSc. por brindarme su apoyo, por compartir sus conocimientos y darme consejos para el desarrollo del proyecto que forma parte esta tesis.

Al Ing. PhD. Eduardo Chica por compartirme sus conocimientos y tiempo para realización de este ensayo.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Agropecuarias por brindarme sus consejos y conocimientos, por compartir experiencias que formaran parte de mi vida personal y profesional.

A mis amigos, por formar parte de mi vida por estar presente en los buenos y malos tiempos, por ser mi familia.

Carla Herica Quishpe Guamán



DEDICATORIA

A Dios por darme la oportunidad de concluir esta etapa de mi vida.

Para mis padres por darme la vida por estar a mi lado siempre por dedicarme su tiempo y ser mi gran impulso en la vida.

A mi hermano Freddy por darme consejos y apoyarme siempre en mis estudios y ser mi ejemplo a seguir, por acompañarme y ayudarme en mis tareas en especial de Inglés.

A mis abuelitas Teresa y Luz las estrellas más brillantes del cielo que me inculcaron el amor a la naturaleza y la pasión por la Agricultura y el valor que tiene nuestra madre tierra.

A mi esposo Christian por ser una pieza importante en mi vida y apoyarme día con día. A mi hija Camila por ser una niña preciosa y tranquila por acompañarme a todos lados y ser mi inspiración de todos los días y mi motivo para seguir.

Carla Herica Quishpe Guamán.



1. INTRODUCCIÓN

La familia de las orquídeas es una de las más diversas del mundo, ellas han trascendido desde épocas antiguas, siendo vistosas, apreciadas y conocidas en diferentes culturas (Freuler, 2008). Las orquídeas están distribuidas por todas las regiones del planeta con alrededor de 25 mil especies a nivel mundial, su mayor diversidad está concentrada en las regiones tropicales, México cuenta con alrededor de 1260 especies y 170 géneros (Salazar, 2013), Colombia posee alrededor de 4.010 especies agrupadas en 260 géneros (Mejía & Pino, 2009) y Ecuador cuenta con alrededor de 4.187 especies identificadas y se estima que sobrepasan las 5.000 especies, lo que representaría cerca del 60 % de las plantas identificadas en América Sur y un 40% de especies del continente Americano (Hirtz, 2004).

Ecuador, conocido como el “País de las Orquídeas”, posee el 43 % de endemismo en esta familia lo que significa que existe alrededor de 1714 orquídeas endémicas, sin incluir alrededor de 400 especies que se encuentran en procesos de descripción (Endara, León, & Williams, 2009); Además, considerando los 256.370 km² de extensión geográfica, nuestro país es el más diverso del mundo, y único al poseer la orquídea más pequeña con apenas 2.1 milímetros de dimensión (Endara, 2007; Ministerio de Turismo, 2013).

No obstante, algunas especies se encuentran en peligro de extinción, debido a factores ambientales y actividades antrópicas como la alteración ocasionada por incendios, la contaminación ambiental, la deforestación y la extracción de especies de su hábitat para el comercio (León & Romero, 2016).

Por otra parte, la reproducción, propagación y crecimiento de las orquídeas suele ser difícil en el medio silvestre (Massey & Zettler, 2007), por lo que algunas especies han sido incluidas en el libro rojo de las plantas Endémicas del Ecuador (León et al., 2011).



Lo hongos formadores de micorrizas se asocian con las orquídeas desde la emergencia de la semilla, crecimiento y desarrollo hasta cuando la planta puede ser autosuficiente (Swarts & Dixon, 2009). Según Massey & Zettler (2007). Las micorrizas son una herramienta importante para la propagación y conservación de orquídeas ex situ, y cualquier método para conservar orquídeas debe incluir el mantenimiento y conservación de los hongos asociados a determinadas especies ya que sin ellos el estudio sería poco exitoso (Zettler, Delaney, & Sunley, 1998) . Además, de tomar en cuenta las relaciones que existen entre especies en un hábitat en común, como es el caso de *Pleurothallis coriacardia* quien comparte hábitat con *Epidendrum dalstromii*, sin embargo, se desconoce si estas dos especies interactúan con los mismos hongos micorrízicos.

En Ecuador existen pocos estudios acerca de la identificación y conservación de hongos formadores de micorrizas en orquídeas, al igual de las relaciones entre microorganismos que comparten un hábitat en común, pese a que estos organismos son importantes para la propagación y conservación de estas plantas (León & Romero, 2016), siendo la simbiosis orquídeas-hongo decisiva para el mantenimiento de las orquídeas en el medio natural (Suárez et al., 2006).

El presente estudio forma parte del proyecto “**ESTABLECIMIENTO DE UN BANCO DE GERMOPLASMA DE ORQUÍDEAS NATIVAS DEL SUR DEL ECUADOR Y HONGOS MICORRIZICOS ASOCIADOS A ELLAS** “, el mismo que busca aislar y conservar hongos micorrízicos como aporte a la conservación de especies de orquídeas nativas como es el caso de *Epidendrum dalstromii*.



2. JUSTIFICACIÓN

Las orquídeas forman parte de las especies más abundantes de mundo (Acosta, 2015). Poseen una propagación difícil en la naturaleza, debido a varios factores como: tamaño de la semilla, poca reserva energética y baja viabilidad (Zettler, Sharma, & Rasmussen, 2003); por lo tanto, las técnicas de propagación *in vitro* mediante el uso de simbiontes como los hongos formadores de micorrizas son una herramienta importante para mejorar la germinación, crecimiento y desarrollo de las orquídeas (Otero, Tupac, & Bayman, 2009). Ordoñez, et al., (2012), mencionan que la presencia de hongos micorrízicos específicos para cada especie limita la aplicación aleatoria de hongos micorrízicos en diferentes especies. La identificación de hongos micorrízicos generalistas podría ser beneficiosa para estimular la germinación de diversas especies. Este trabajo buscó identificar hongos promotores de la germinación que presenten una reducida especificidad por ser aislados de una especie que comparte medio biótico (microorganismos simbióticos) y abiótico con otra especie como es el caso de *Pleurothallis coriacardia* que co-existe con *Epidendrum dalstromii*, para ello se evaluaron hongos endófitos extraídos de la especie *Pleurothallis coriacardia*, en la germinación simbiótica de semillas de *Epidendrum dalstromii*. La identificación de estos hongos fitoestimulantes permitirá aportar al banco de germoplasma de hongos promotores de la germinación de especies endémicas del Ecuador.



3. OBJETIVOS

3.1.OBJETIVO GENERAL:

Contribuir al conocimiento de las interacciones hongo orquídeas como un aporte a la conservación de estas especies

3.2.OJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de cinco hongos aislados endófitos de raíces de *Pleurothallis coriacardia* en la germinación de semillas de *Epidendrum dalstromii*.
- Documentar la morfología de los hongos aislados endófitos que exhiban un efecto promotor en la germinación de *Epidendrum dalstromii*.

3.3.HIPOTESIS

Ho: No existe diferencia entre los tratamientos en la germinación de *Epidendrum dalstromii* con la inoculación de los hongos endófitos, en comparación con el control sin inóculo de los hongos.

Ha: Existe diferencia entre los tratamientos en la germinación de *Epidendrum dalstromii* con la inoculación de los hongos endófitos, en comparación con el control sin inóculo de los hongos



4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 GENERALIDADES DE LAS ORQUÍDEAS

Las Familia Orchidaceae es conocida a lo largo de tiempo por sus flores exóticas y aromas inigualables, que le han dado una excelente acogida en diversas partes del mundo. Las orquídeas forman parte de las monocotiledóneas, y constituyen las plantas más numerosas del reino vegetal contando con alrededor de 25. 000 a 35. 000 especies y 800 géneros (Freuler, 2008). Las orquídeas tienen la capacidad de adaptarse a diversos hábitats, tenemos orquídeas que viven en troncos, ramas de árboles, rocas y tierra. Hay especies que pueden adaptarse a varios hábitos, sin embargo, podríamos considerar que en su totalidad 25 % son terrestres, y el 5 % crecen como epifitas o terrestres y el resto son exclusivamente epifitas (Dressler, 1993).

En Ecuador se estima que de cada cuatro especies al menos una es orquídea, distribuidas desde los bosques tropicales hasta las zonas altas como los páramos, frecuentemente sobre árboles y rocas (Hirtz, 2004).

4.2 IMPORTANCIA DE LAS ORQUÍDEAS.

Las orquídeas son consideradas entre las especies más desarrolladas y especializadas, con hábitos: terrestre, epifitos, y litófitos (Dressler, 1993). Este tipo de familia posee un gran número de especies distribuidas alrededor del mundo y gran parte de organismos polinizadores sobreviven gracias a estas especies, además las orquídeas son utilizadas como indicadores del ecosistema, y son capaces de vivir varios años (Hirtz, 2004).

Esta familia posee gran importancia a nivel económico ya que algunas especies son utilizadas en la industria, la vainilla gracias al fruto que posee, es utilizada como fragancia en la preparación de varios alimentos (Ordoñez et al., 2012) , además, existen otras especies que



por sus colores y tamaños son apreciadas como decorativas en la mayoría de eventos (Ministerio de Turismo, 2013).

4.3 IMPORTANCIA DE LAS ORQUÍDEAS NATIVAS.

Ecuador es reconocido como el país que posee la mayor cantidad de especies por área con un 40 % de especies endémicas, que junto con los helechos conforman el 70 % de la vegetación circundante del Ecuador (Endara, 2007; Hirtz, 2004). En Ecuador las 1710 especies de orquídeas endémicas están distribuidas entre los 1500 a 2500 m.s.n.m (Endara et al., 2009). *Pleurothallis coriacardia* y *Epidendrum dalstromii* forman parte de las especies endémicas del Ecuador, en un estudio anterior estas dos especies fueron encontradas en un mismo nicho ecológico como el Bosque de Mazan al igual que otras especies nativas son importantes para mantener el equilibrio ecológico de su hábitat natural (Salazar, 2017), por lo tanto, estas dos especies fueron tomadas como referencia en la presente investigación ya que se pensó que podían compartir microorganismos como los hongos endófitos y así aportar a su conservación. Pese a esto, varias especies endémicas, están actualmente en peligro de desaparecer (León et al., 2011). Se estima que de 1455 orquídeas endémicas del Ecuador un 2% están en peligro crítico, 11% en peligro y la mayoría se encuentra en estado vulnerable, esto se debe a que más del 13% de las orquídeas endémicas se encuentran fuera de las áreas protegidas (León et al., 2011), quedando expuestas a la depredación selectiva para el comercio ilegal, no obstante, este problema forma parte de otros factores de amenaza de estas especies como la deforestación, contaminación ambiental y expansión agrícola y ganadera; estas actividades afectan el hábitat causando daño a nuestro patrimonio (Rodríguez et al., 2016).

4.4 DESCRIPCIÓN

La morfología de las diferentes especies de orquídeas es lo que las distingue entre especies ya que son únicas en sus formas, colores y aromas (Freuler, 2008).

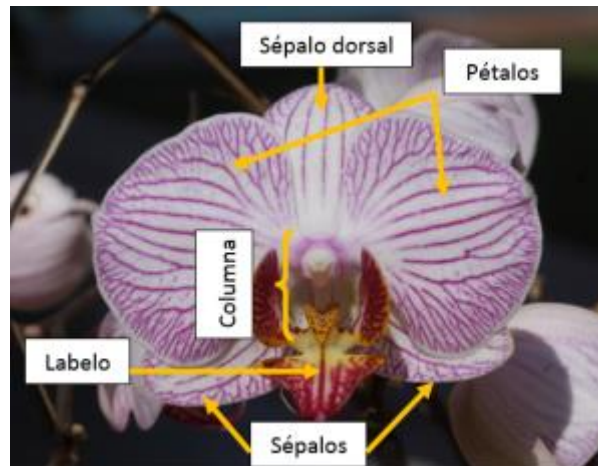


Imagen 1. Parte de la flor de orquídea
Fuente: (Acosta, 2015)

Epidendrum.

El género *Epidendrum* proviene del griego epi (en) y dendron (árbol) en referencia al hábito epifítico de la mayoría de las especies de este género, se caracterizan por tener tallos tipo caña o pseudobulbos, con hojas planas, su inflorescencia es terminal raramente lateral con vainas no rugosas, sus flores sin articulación en el ovario y el pedicelo; son polinizadas por polillas, colibríes o mariposas (Calaway, 2000).

Distribución y hábitat: Este género está constituido por más 1000 especies distribuidas en América tropical, a 3500 m.s.n.m. En Ecuador existen 442 especies de *Epidendrum* de las cuales 324 están identificadas y 116 están por de identificar (Calaway, 2000).

Epidendrum dalstromii.

Se encuentra en el sur del Ecuador en la vertiente oriental de los Andes, en bosques montanos húmedos con elevaciones de 1200 a 2600 m.s.n.m. Es una epífita de tamaño pequeño, con

tallos erectos delgados como caña, envueltos en vainas escariosas y con dos ápices, elípticas coriáceas, apicalmente obtusas, hojas basalmente agudas, inflorescencia racemosa envuelta basalmente por una vaina única expandida y escariosa, flores simultáneamente abiertas subtendidas por una bráctea triangular tamaño de la flor 3cm (Calaway, 1984).

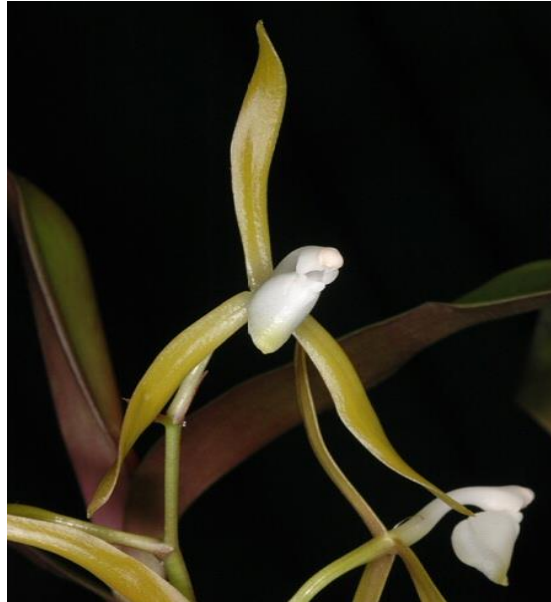


Imagen 2. Epidendrum dalstromii (foto de Eric Hunt)
Fuente:(Calaway, 1984)

4.5 CICLO VEGETATIVO DE LAS ORQUÍDEAS

Las orquídeas tienen la capacidad de vivir varios años, siempre y cuando encuentren las condiciones adecuadas, esto se debe a los pseudobulbos o rizomas que les permite perdurar ante épocas de escases, su crecimiento simultaneo de hojas y raíces se va dando gracias a la asociación simbiótica que poseen con otros organismos como los hongos que invaden la semilla y la ayudan a germinar, generalmente son hongos del genero *Rhizoctonia* (Zettler et al., 2003).

Cuando la semilla germina produce una masa indiferenciada de células llamada "protocormo" el crecimiento de este dependerá de la especie y puede variar entre meses o incluso años, cuando pasa el tiempo se forman yemas de donde se formarán hojas, de otras yemas saldrá la



raíz que durante un tiempo atravesara el catafilo (hojas reducidas que protegen las yemas), la raíz engrosara y se transformara en un tubérculo radical en donde se almacenaran sustancias nutritivas y agua, que con trascurrir del tiempo le servirá a la planta para cumplir su ciclo vegetativo (Zettler et al., 2003).

Las semillas en general son muy pequeñas se podría decir que de 1-2mm de largo por 0.5-1mm de ancho, la semilla está compuesta por un embrión que se encuentra protegido por una testa formada por tejido muerto y contiene alrededor de un 96 % de aire, cabe mencionar que en una capsula podríamos encontrar de 1300 a 400000 millones de semillas (Zettler et al., 2003).

4.6 MICORRIZAS

En la naturaleza el 90 % de las plantas vasculares forman una asociación simbiótica de tipo micorriza (Ordoñez et al., 2012), siendo esta asociación vital para la supervivencia de las orquídeas, incluso, estas asociaciones podrían influir en la distribución de las especie (Waud et al., 2016); se piensa que los hongos micorrízicos tuvieron un papel importante en la colonización de la tierra pues ayudaron a que los suelos pobres se convirtieran en suelos aptos para acoger a diversas especies (Newmann, 1988).

Las micorrizas ayudan a que plantas que no poseen los suficientes pelos absorbentes aumenten su zona radical, a través de ellos, por lo tanto, cuando se genera una asociación con un hongo la planta se verá favorecida en la capacidad de absorción de agua y nutrientes y en la transformación de sustancias complejas a sustancias simples y asimilables para la planta (Newmann, 1988).



Las micorrizas forman diferentes tipos de asociaciones como:

- Micorrizas vesículo – arbusculares(VAM): se clasifican como un tipo endomicorriza y son conocidas como “micorrizas arbusculares”, en este caso, los hongos colonizan raíces jóvenes penetrando sus hifas en el interior de las células en donde forman dos tipos de estructuras que son : 1) un arbusculo que se origina cerca de cilindro vascular mediante numerosas ramificaciones dicotómicas sucesivas de una hifa con la función de transmitir los nutrientes y 2) la vesícula que puede o no estar presente dependiendo del hongo, puede formarse entre o dentro de las células radicales y funciona como almacén de nutrientes, la asociación por ejemplo de hongos del filum Glomeromycota, tiene importancia en la agricultura y fruticultura promoviendo el desarrollo de los cultivos aumentando la producción, e incluso brindando protección contra patógenos (Andrade, 2010; Cueva, 2014).
- Ectomicorrizas (ECM): las hifas de un hongo penetran raíces secundarias para desarrollarse rodeando la corteza radical formando una red llamada red de Harting, que consiste en hifas laberínticas entre las células de las raíces, esta red es la zona principal de la transferencia de nutrientes en estas asociaciones los hongos más comunes son Basidiomicetes y Ascomicetes (Cueva, 2014). Este tipo de micorrizas tiene aprovechamiento forestal ya que muchos de los árboles necesitan este tipo de micorrizas en sus etapas de desarrollo especialmente los árboles maderables (Andrade, 2010).
- Micorrizas ericoides: clasificadas dentro de las endomicorrizas, penetran las células de las raíces, pero solo en plantas del género Ericales, aunque también se ven en algunas briofitas (musgos) los hongos pertenecientes a este grupo son Ascomycota
- Ectendomicorriza: es un tipo de micorriza especial que presenta características de ectomicorrizas, pero presenta características de penetración intercelular como las



endomycorrizas generalmente son hongos de los grupos Basidiomycota y Ascomycota, presentes en algunas plantas como las coníferas y en alguna angiospermas (Andrade, 2010).

MICORRIZAS DE ORQUÍDEAS

La interacción entre hongos micorrízicos y orquídeas es una interacción simbiótica donde el hongo ayuda a la orquídea desde su fase inicial de germinación de la semilla, ya que por medio del hongo micorrízico la semilla obtiene sus nutrientes y el carbono necesario para germinar pues al ser una semilla pequeña y carente de nutrientes y carbono no lo puede hacer sola, el aporte del hongo hacia la planta es hasta cierta etapa donde la planta se vuelve autosuficiente, aunque se desconoce exactamente hasta que etapa llega (Pereira et al., 2014). Los pelotones son estructuras característica de micorrizas de orquídeas ya que sus estructuras ocupan espacios intercelulares ubicadas en las células de las raíces, los pelotones tiene un tiempo limitado ya que por medio de la lisis (digestión) estos se debilitan pues al cumplir su función de colonización, lisis y transferencia de nutrientes las paredes de estos se adelgazan formándose una masa irregular (Ordoñez et al., 2012).

El género *Rhizoctonia* es uno de los más importantes en cuanto a hongos formadores de micorrizas en orquídeas, incluyendo a sus telomorfos: *Ceratobasidium*, *Tulansnella*, *Sebacina* y *Thanatephorus*, que pueden diferenciarse por sus estructuras reproductivas (Chávez, Mosquera, & Otero, 2014). La simbiosis es importante ya que tiene varios beneficios para la planta como: reducir el estrés de la planta debido a la ausencia de macro y micro nutrientes, agua, pH de suelo, patógenos, etc., por lo cual es importante el uso de hongos micorrízicos para la propagación y conservación de estas especies ya que los hongos micorrízicos garantizaran la supervivencia de las orquídeas en el medio natural (Massey & Zettler, 2007; Waud et al., 2016).



Los hongos micorrízicos son considerados como mutualistas clásicos donde el hongo y la planta obtienen beneficio en el intercambio recíproco de nutrientes (León & Romero, 2016). En algunos casos el asocio simbiótico con hongos afecta a la distribución de una especie, ayudando a la propagación, dispersión de la semilla y germinación (Waud et al., 2016). No obstante, algunos autores demuestran que esta asociación simbiótica es específica para cada especie (Otero, Ackerman, & Bayman, 2002). Se podría considerar que una orquídea es específica cuando interactúa de forma estrecha con un grupo de hongos filogenéticamente emparentados, por lo contrario, es generalista cuando interactúa con una variedad de hongos micorrízicos de diferente orígenes filogenéticos (Kottke et al., 2008) por lo tanto la especificidad es un factor que debe ser tenido en cuenta para la conservación de una especie de orquídea (Zettler et al., 2003).

4.7 RELACIONES ENTRE PLANTAS

En la naturaleza generalmente las plantas crecen juntas, pero normalmente están separada fisiológicamente, muchos hongos formadores de micorrizas tienen baja especificidad en cuanto al hospedero, es decir, pueden interactuar con muchas especies en el medio (Newmann, 1988); la red miceliar que posee un hongo puede comunicar con varias plantas, es decir, que al interactuar un hongo micorrízicos con varias plantas también se puede unir a las misma ya que están formando enlaces de hifas lo cual conlleva a diferentes posibilidades (Newmann, 1988):

- Las plantas pueden vincularse rápidamente por una red de hifas y beneficiarse.
- Una planta puede recibir materiales orgánicos de otra a través de los enlaces de hifas.
- Un nutriente puede ser regulado por la presencia de una red miceliar común ya que reducirá el dominio de una especie (Newmann, 1988).



El presente estudio evaluó el efecto de hongos endófitos cultivables extraídos de *Pleurothallis coriacardia* en la germinación de *Epidendrum dalstromii*, ya que al ser especies que comparten el mismo nicho ecológico, podrían compartir también los mismos microorganismos benéficos durante el proceso de germinación.



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Área de estudio

Se trabajó con semilla previamente recolectada y mantenida en el banco de germoplasma de orquídeas que mantiene el laboratorio de propagación *in vitro* de plantas de la Universidad de Cuenca, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias. Los hongos evaluados se obtuvieron de la colección de hongos endófitos que se mantiene en el mismo sitio y que fue generada como resultado de una investigación anterior, estos hongos fueron aislados de muestras de raíces de *Pleurothallis coriacardia*, colectadas en el bosque protector Mazan en la provincia del Azuay.

5.2 Área de ejecución del proyecto

El ensayo se realizó en el Laboratorio de propagación *in vitro* de plantas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca ubicado a 2590 m.s.n.m. con una temperatura de 20-30 °C y con una humedad relativa de 70-80%.

5.3 Materiales y reactivos

Medios de cultivo utilizados y preparación.

- **PDA (papa, dextrosa, agar):** medio de cultivo microbiológico utilizado principalmente para hongos el cual favorece el crecimiento micelial y la esporulación e inhibe el crecimiento de bacterias (Acumedia Manufacturers, 2015).

Se utilizó el medio comercial Dico™ Patato Dextrose Agar, el cual se preparó siguiendo las condiciones del fabricante. El medio se esterilizó a 121°C por 15 minutos y posteriormente, en cámara de flujo laminar, se dispensaron 30 ml en cada caja Petri; se utilizó este medio de cultivo por ser unos de los más utilizados y recomendados para la siembra y repique de hongos como lo antes mencionado.

- **Avena agar OMA:** medio utilizado en cultivos asociados, son eficientes para la observación del desarrollo de la simbiosis, es muy utilizados con orquídeas y hongos.



Este medio se elaboró con 3gr avena y 14gr de agar para un volumen de un litro de medio de cultivo, el cual se homogenizo y calentó hasta la ebullición para luego esterilizarlo a 121 °C por 15 minutos, para dispensarlo en cajas Petri; cada caja Petri contenían 30 ml de medio de cultivo avena agar. Se utilizó este medio para observar la simbiosis entre la semilla de *Epidendrum dalstromii* y los diferentes hongos evaluados, y al mismo tiempo se utilizó como un control negativo de este medio para observar diferencias en el desarrollo de la simbiosis ya que la avena como cereal aporta los azúcares y vitaminas importantes para el desarrollo del hongo y este a su vez favorece la germinación de la semilla (Zettler et al., 2007).

- **Phytamax:** medio utilizado en la germinación asimbiótica de orquídeas, es rico en vitaminas, nutrientes y aminoácidos necesarios para la germinación de determinadas especies de orquídeas (Ruíz et al., 2008).

Este medio se elaboró agregando 10 ml de cada uno de los 7 stocks previamente elaborados y descritos en la (Tabla 1). Se adicionaron también 7gr de agar y 30gr de sacarosa por cada litro de medio, esta mezcla se homogenizó y calentó hasta la ebullición para posteriormente ajustar el pH a 5.7. Finalmente, el medio se esterilizo en autoclave, por 15 minutos a 121°C y se dispense en un volumen final de 30 ml por cada caja Petri. Este medio fue utilizado como un control positivo ya que las semillas sembradas en este medio tuvieron la posibilidad de germinar en su totalidad ya que el medio le brindaba todo lo necesario para su desarrollo y así mantener un control de desarrollo del ensayo para cada tratamiento, además es uno de los medios más utilizados.

Tabla 1. Reactivos para la elaboración del medio Phytamax

Stock	Reactivo	Peso g	Volumen de Solución Stock	ml Stock/1000ml Medio
I	NO ₃ NH ₄	8,25g	100	10ml
	NO ₃ K	9,5g		
II	SO ₄ Mg	0,9g	100	10ml
	SO ₄ Mn	0,084g		
	SO ₄ Zn	0,053g		
	SO ₄ Cu	0,12mg		
III	IK	4,5mg	100	10ml
	Cl ₂ Co	1,125mg		
	Cl ₂ Ca	1,66g		
IV	PO ₄ H ₂ K	0,85g	100	10ml
	BO ₃ H ₃	31mg		
	MoO ₄ Na ₂	1,25mg		
V	SO ₄ Fe	0,273g	100	10ml
	EDTA	0,372g		
Vitaminas	Thiamina	0.1mg	100	10ml
	Glicina	0.2mg		
	Ácido Nítrico	0.1mg		
	Piridoxina	0.05mg		
	Ácido nicotínico	2cc		
	Inositol	100mg		10ml
	Agar	7gr		
	Sucrosa	30gr		

5.4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Metodología experimental de acuerdo al primer objetivo del ensayo: Evaluar el efecto de cinco hongos aislados endófitos de raíces de *Pleurothallis coriacardia* en la germinación de semillas de *Epidendrum dalstromii*.

- **Evaluación de la viabilidad de las semillas:**

Para evaluar la viabilidad de la semillas se utilizó el método tinción de tetrazolio según la metodología de (Lemay, et al., 2015) se tomaron 5 mg de semilla de *Epidendrum dalstromii*



y se colocaron en una jeringa de 5ml, mediante succión con la jeringa, la semilla se sumergió en una solución de cloro 1% más una gota de tween 20, por 15 minutos, transcurrido este tiempo, la semilla se lavó tres veces con agua destilada y se dejó reposar en agua por 24 horas posteriormente, dentro de la misma jeringa, esta se sumergió en una solución de tetrazolio al 1%, esta se mantuvo en obscuridad por 24 horas a una temperatura de 30°C. Finalmente, la semilla se lavó con agua y se observó la tinción usando un estero microscopio, donde se pudo evidenciar el porcentaje de viabilidad de la semilla mediante el conteo de la cantidad total de las semillas que fueron teñidas comparadas con las semillas que no fueron teñidas y valoradas en porcentaje. Esto se realizó con el objeto de evaluar la viabilidad de las semillas almacenadas y como control de calidad de la semilla antes de ser sometida a germinación con los diferentes tratamientos (Anexo 1).

- **Reactivación de los hongos aislados.**

Se reactivaron 5 hongos endófitos (códigos: 22M, 6M3.10, Coprinellus 38, Coprinellus 19 M1.4.9 y 9.2M2) aislados previamente de raíces de *Pleurothallis coriacardia* y conservados en el Laboratorio de Propagación *in vitro* de plantas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias. Para ello se transfirió una sección aproximadamente 1cm² de medio de cultivo PDA que contenía el cultivo del hongo, en un medio PDA fresco, las cajas se sellaron con parafilm para evitar contaminación externa y éstas se mantuvieron en obscuridad. Cada 15 días se refrescó el hongo endófito para mantenerlo fresco y evitar su contaminación, lo cual consistía en transferir una sección de cultivo de hongo endófito de aproximadamente 1 cm², en un medio PDA fresco previamente elaborado.

**Tabla 2.** Hongos endófitos utilizados.

Código	Hongo endófito
22M	Umbelopsis
6M3.10	Ilyonectria
9.2M2	Ascomycota
Coprinellus 19M1.4.9	Coprinellus
Coprinellus 38	Coprinellus

Los hongos endófitos utilizados fueron identificados y clasificados taxonómicamente en un estudio anterior que corresponde al mismo proyecto del presente estudio, estos hongos endófitos fueron secuenciados y evaluados mediante técnicas moleculares, para su respectiva caracterización.

- **Desinfección de la semilla de *Epidendrum dalstromii*.**

En cabina de flujo laminar se procedió a desinfectar la semilla de *Epidendrum dalstromii* que estuvo almacenada y conservada en el Laboratorio de Propagación in vitro de plantas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias. En una jeringa estéril de 5 ml se colocaron 5mg de semilla dentro de la jeringa y mediante succión se sumergió la semilla en una solución de hipoclorito de sodio al 1%, se mantuvo por 1 minuto en constante agitación y se lavó tres veces con agua destilada estéril. Luego del enjuague final la semilla se suspendió 1ml de agua destilada estéril para facilitar la siembra.

5.7.1. Siembra de la semilla de *Epidendrum dalstromii*

En cabina de flujo laminar, la suspensión de la semilla desinfectada se homogenizó mediante agitación. La siembra se realizó colocando 1ml de agua estéril que contenía las semillas en suspensión previamente desinfectadas, en cada caja Petri con 30ml de medio avena agar previamente elaborado. La caja se agitó suavemente para homogenizar la semilla sobre el medio. Este procedimiento se repitió para todos los tratamientos antes de ser inoculados con



los hongos endófitos, al igual que a los controles: positivo (Phytamax) y negativo (Avena agar) (Anexo 3.2).

5.7.2. Inoculación del hongo aislado.

Una vez realizada la siembra de la semilla de *Epidendrum dalstromii* se depositó una sección 1cm² de cultivo de hongo previamente reactivado en medio PDA en cada caja previamente sembrada la semilla, se cerró con parafilm, se etiquetó y se colocó en obscuridad durante 16 semanas a una temperatura de 20°C, este procedimiento se realizó con cada uno de los tratamientos y sus repeticiones. Para cada tratamiento (hongo aislado), se utilizó un control positivo que consistió en sembrar las semillas en medio Phytamax y un control negativo en medio avena agar sin hongo, se sembraron 10 repeticiones, obteniéndose 70 unidades experimentales (Anexo 3.3 y Anexo 3.4).

5.7.3. Toma de datos y análisis experimental

El registro del estado de desarrollo de las semillas se realizó cada 15 días después de la siembra por 16 semanas, en base a la siguiente escala: estado 0 = con embrión no germinado, estado 1= imbibición, el embrión aumenta de tamaño y se forman los rizoides, estado 2 = ruptura de testa , estado 3= aparición de protocormos y rizoides, estado 4= aparición de la primera hoja, estado 5= elongación de la primera hoja y desarrollo de raíz y otros órganos(Stewart & Zettler, 2002). Para el análisis experimental se utilizó estadística no paramétrica (Test de Kruskal Wallis).

5.8 METODOLOGÍA DESCRIPTIVA DE ACUERDO AL SEGUNDO OBJETIVO

Documentar la morfología de los hongos aislados endófitos que exhiban un efecto promotor en la germinación de *Epidendrum dalstromii*.

5.8.1 Selección de los hongos endófitos aislados con efecto promotor en la germinación.

En un portaobjetos se colocó una gota de azul de metileno, con una cinta adhesiva se tocó la parte superior del cultivo del hongo y se colocó sobre la gota del azul de metileno. Finalmente, las estructuras se observaron a través de un microscopio con aumentos de 10x, 40x y 60x.



Imagen 3. Observación microscópica hongo Coprinellus 19M1.4.9
Fuente:(Quishpe, 2018)

6. RESULTADOS

6.1 Análisis de viabilidad de la semilla.

Con la prueba de tinción de tetrazolio se registró un 50.80% de las semillas viables al momento del ensayo.

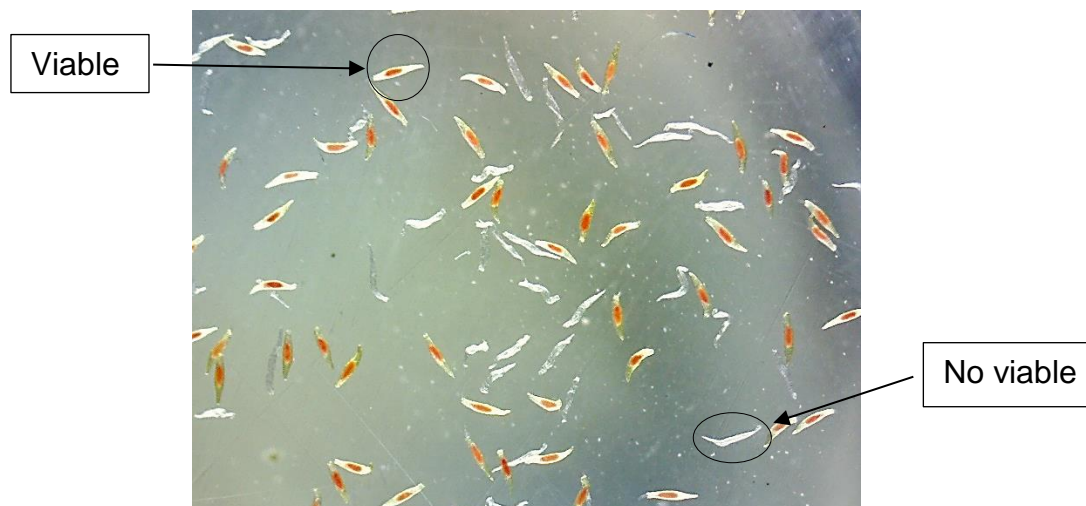


Imagen 4. Prueba de viabilidad en la semilla de *Epidendrum dalstromii*.

Fuente:(Quishpe, 2018)

6.2.Germinación de *Epidendrum dalstromii*

Luego de 16 semanas de la siembra cuando los tratamientos estaban en obscuridad se observaron semillas en estado de desarrollo 1 (embrión hinchado) en los tratamientos 6M3.10 (1.23%), Coprinellus 19M1.4.9 (8.70%) y Coprinellus 38 (2.23%) con el inoculo de los hongos endófitos, además se observó que en el control positivo (Phytamax) las semillas alcanzaron los estados de desarrollo 3 (2.02%) (aparición de rizoides y formación de protocormos) y 4 (1.80%) (aparición de la primera hoja). Los tratamientos 22M y 9.2M2 no superaron el estado de desarrollo 0 pues el número de individuos registrados es mínimo como lo evidencia la Tabla 3.



Tabla 3. Desarrollo de las semillas de *Epidendrum dalstromii* en la oscuridad.

Tratamiento	Total semillas	Viables	Estado0	Estado1	Estado2	Estado3	Estado4
22M	886	435	54	3			
6M3.10	939	394	92	11			
9.2M2	881	428	58	3			
COP19M1.4.9	925	364	152	82			
COP38	889	427	106	21			
Control P	888	297	113	31	19	18	16
Control N	908	456	55	5			

En la Tabla 3 se muestra el reporte de datos obtenidos en la primera etapa del ensayo cuando los tratamientos estuvieron en oscuridad durante 16 semanas, según la metodología descrita en el presente ensayo.

En el desarrollo posterior del ensayo, cuando los tratamientos se expusieron a la luz, se observó que un porcentaje importante de las semillas expuestas al tratamiento Coprinellus 19M1.4.9 desarrollo hasta la etapa 1 alcanzando resultados similares a los observados en el control positivo (Phytamax), sin embargo, solo 2 semillas llegaron a estado de desarrollo 3 (aparición de rizoides) (Tabla 4).

Las semillas expuestas a tratamientos con los hongos 22M y 9.2M2 no superaron el estado de desarrollo 1 imbibición (el embrión aumenta de tamaño) (Anexo 4.1 y Anexo 4.5) mientras que en el control negativo si se observaron un desarrollo posterior (Anexo 4.7). Los bajos porcentajes de germinación obtenidos con los tratamientos fúngicos 22M (0%), 6M3.10 (0.32%), 9.2M2(0%), Coprinellus 19M1.4.9 (0.18%), Coprinellus 38 (0.10%) no difieren entre ellos, pero si se diferencian del control positivo(Phytamax) tratamiento en el cual el 18.87% de las semillas alcanzaron el estado de desarrollo 4 (Tabla 3). Los hongos evaluados, aislados de *Pleurothallis coriacardia* no evidenciaron un efecto promotor de la germinación en semillas de *E. dalstromii*.



Tabla 4. Efecto de los tratamientos y controles en la germinación de *Epidendrum dalstromii*.

Tratamiento	Total semillas	Viables	Estado 0	Estado 1	Estado 2	Estado 3	Estado 4	% Germinación	Significancia
22M	886	435	104	21				0	
6M3.10	939	394	160	41	7	3		0.32	0.32 ^{a*}
9.2M2	881	428	109	15				0	
COP19M1.4.9	925	364	152	82	4	2		0.18	0.18 ^{a*}
COP38	889	427	106	21	2	1		0.1	0.10 ^{a*}
Control P	888	297	102	81	63	111	59	0.1877	18.81 ^{b**}
Control N	908	456	109	24	2	1		0.11	0.14 ^{a*}

En la tabla 4 se expresa los valores obtenidos en cada tratamiento para los diferentes estados de desarrollo de la semilla de *Epidendrum dalstromii*, con su respectivo porcentaje de germinación y significancia estadística, durante el análisis de 8 meses.

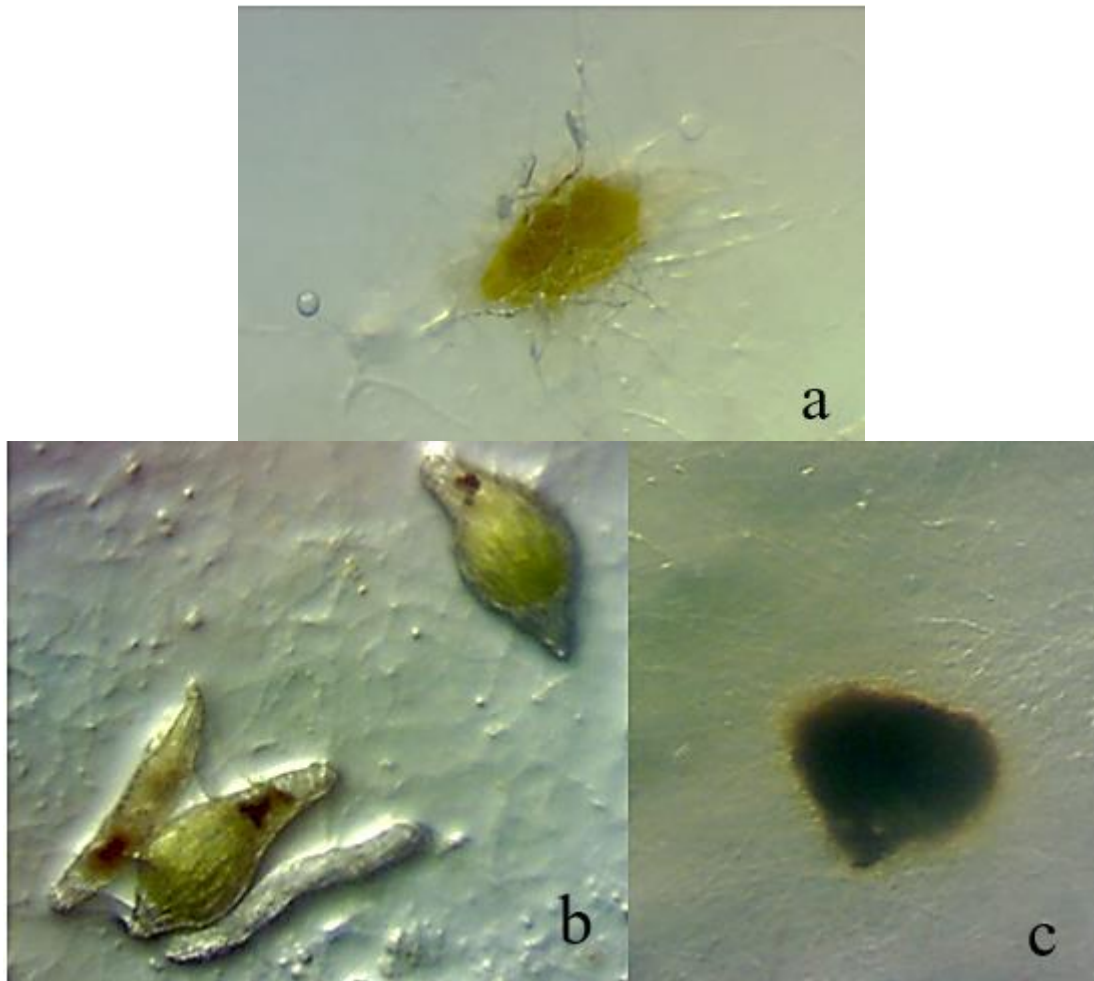


Figura 1. Desarrollo de las semillas de *Epidendrum dalstromii* con el hongo 6M3.10
a) Estado 0 (Embrión no germinado), b) Estado 1 (Imbibición), c) Estado 3 (aparición de los rizoides)

Fuente: (Quishpe, 2018)

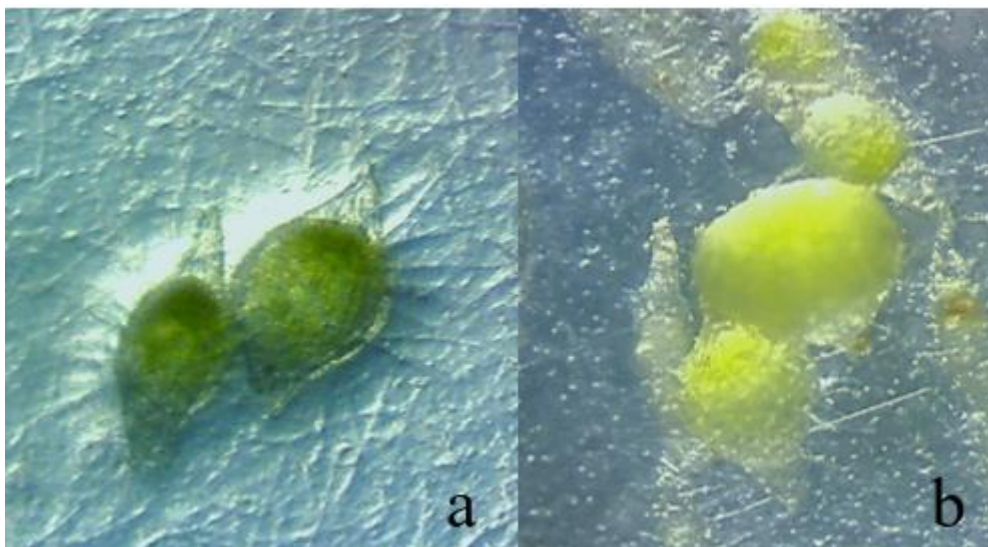


Figura 2. Desarrollo de las semillas de *Epidendrum dalstromii* con el hongo Coprinellus 19M1.4.9; a) Estado 0(Embrión no germinado), Estado 1(Imbibición); b) Estado 2 (ruptura de testa).

Fuente: (Quishpe, 2018)

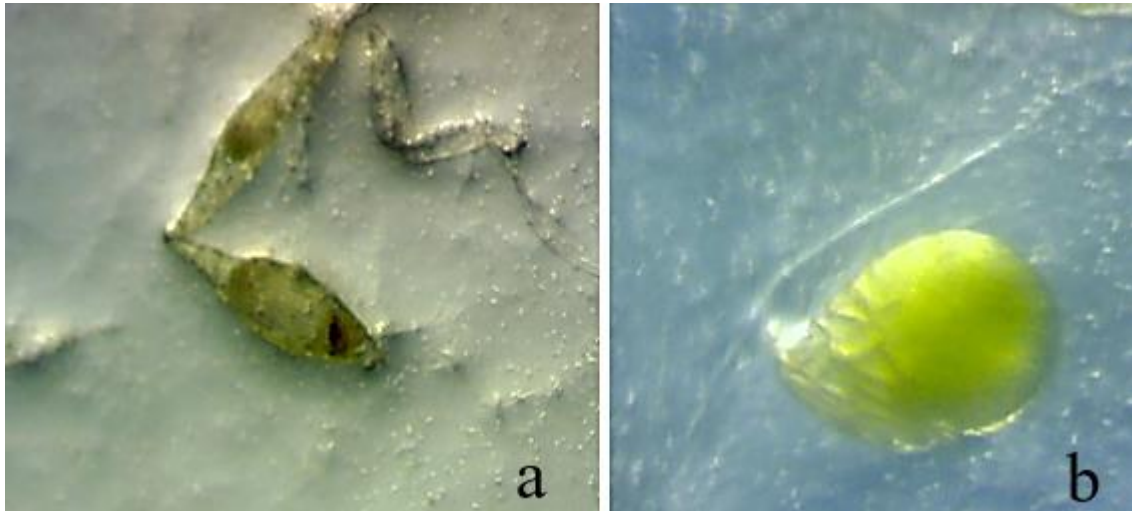


Figura 3. Desarrollo de las Semillas de *Epidendrum dalstromii* con el hongo Coprinellus 38; a) Estado 0 (Embrión no germinado), b) Estado 2 (Ruptura de la testa).

Fuente:(Quishpe, 2018)

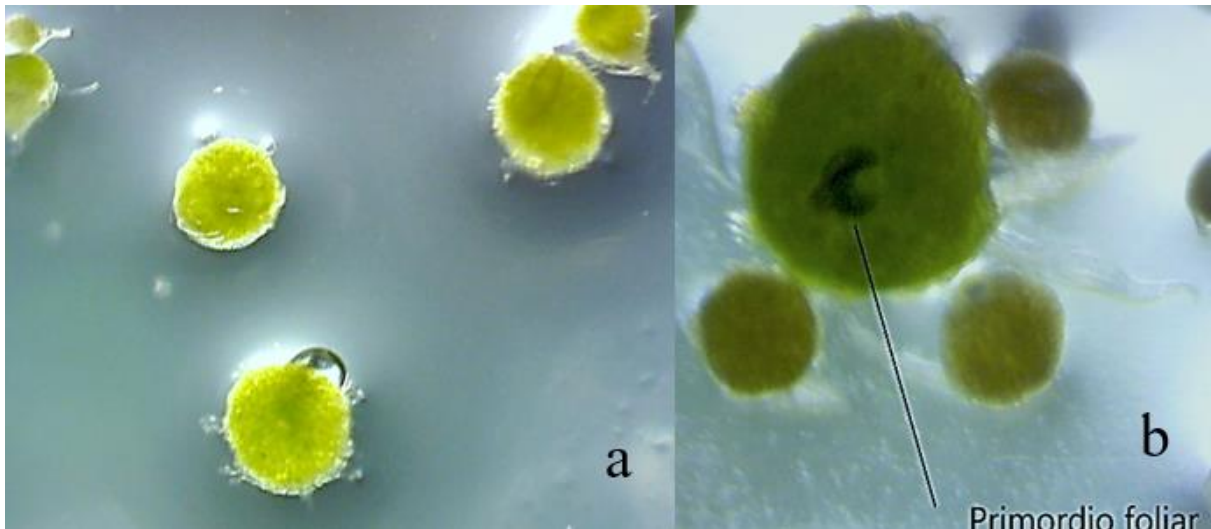


Figura 4. Desarrollo de las semillas de *Epidendrum dalstromii* en Medio Phytamax (Control positivo); a) Estado 3 (aparición de los rizoides), b) Estado 4 (Aparición de protocormos foliar y radicular).

Fuente:(Quishpe, 2018).

Ya que los hongos evaluados no mostraron efectos estimulantes en la germinación *Epidendrum dalstromii* debido a la presencia de especificidad por parte de *Epidendrum dalstromii* hacia los hongos endófitos utilizados, por lo tanto, la morfología de estos no fue documentada, como se planificó en el segundo objetivo específico.



7. DISCUSIÓN

Los resultados del ensayo revelan que los hongos evaluados no tuvieron un efecto promotor de la germinación en *Epidendrum dalstromii*, siendo el control positivo en Phytamax, el tratamiento que presentó los mejores resultados. El hongo Coprinellus 19M1.4.9 presentó un efecto positivo en la germinación únicamente en la primera etapa de desarrollo 1 (Imbibición), con resultados similares al control positivo, sin embargo, su presencia no permitió el desarrollo posterior de la semilla hasta otras etapas de desarrollo, pues la estructura y frecuencia de los hongos presentes en la raíz de una especie pueden cambiar con la distancia, por lo tanto las orquídeas pueden ser específicas en su relación con los hongos micorrízicos asociados como lo reportan Otero et al. (2009) quienes evaluaron hongos endófitos extraídos de *Tolumnia variegata* en especies de *Epidendrum ramosum*, *Lepanthes rupestris* y *Phychilis monensis*, y encontraron que los hongos no mostraron un efecto un efecto positivo en la germinación de estas especies. Estos resultados sugieren que especies que co-existen en un mismo hábitat difieren en su interacción con los hongos ya que puede existir una variación en cuanto al efecto de los hongos de una especie y otra como lo mencionan Waud et al. (2016).

Los resultados obtenidos con el control positivo demuestran que es un medio apropiado para la germinación asimbiótica de las orquídeas como lo mencionan (Ruíz et al., 2008) ya que evaluaron la germinación *in vitro* de la orquídea *Encyclia adenocaula* con la utilización de este medio de cultivo obteniendo un porcentaje de germinación del 68.84% , cabe recalcar que este es un medio muy enriquecido y favorece al crecimiento de hongos y bacterias que contaminan con facilidad, por lo tanto se debe manejarlo con toda la asepsia posible. Mientras que en el control negativo avena agar se obtuvo un porcentaje bajo en la germinación debido a que este medio posee una cantidad baja de hidratos de carbono y la semilla tiende a germinar con lentitud ya que este medio es más utilizado para cultivo en asociación como son orquídea



y hongo como lo mencionan (Zettler et al., 2007) además, mencionan que este medio de cultivo es usado para la observación de la simbiosis hongo-orquídea y como control de los tratamientos, de esta manera en el presente estudio se lo uso como control negativo.

Los resultados de este trabajo apoyan la teoría de la especificidad de las especies de orquídeas por los hongos como lo menciona Zettler et al. (2014) quienes evaluaron la germinación de *Epidendrum conopseum* con el hongo *Epulorhiza sp* extraído de su misma raíz, obteniendo resultados 71 días con la aparición de las protocormos (Estado4) con un 4.8% de las semillas inoculadas que luego a los 119 días las semillas alcanzaron un estado de desarrollo 6(plántulas con pigmentación) con un 2.0% adicional de semillas inoculadas, sin embargo, cuando se indujo la germinación con hongos extraídos de especies como *Platanthera ciliaris* (cepa UAMH 7633) , *Platanthera obtusa* (*Ceratorhiza good-yera-repentis* cepa UAHM 6440) y *Coeloglossum viride* L. Hartm. (cepa UAMH 6451) no se obtuvo germinación, cabe mencionar que los porcentajes obtenidos con el hongo *Epulorhiza sp*, fueron bajos debido a la baja viabilidad que presento las semillas utilizadas, no obstante, se pudo observar una adecuada simbiosis con hongos específicos para *Epidendrum conopseum*. Los hongos endófitos extraídos de *Pleurothallis coriacardia*, usados en el presente ensayo, se evaluaron previamente en la germinación de la misma especie del cual fueron extraídos (*Pleurothallis coriacardia*) obteniéndose un efecto promotor de la germinación, sin embargo, al igual que en el presente trabajo, no permitieron el desarrollo posterior de la semilla, en el caso del presente estudio la baja viabilidad (50.80%) puede ser uno de los factores importantes para determinar una germinación adecuada como lo mencionan (Zettler et al., 2014) pues la viabilidad de la semilla juega un papel importante en la germinación al igual que el uso de hongos endófitos adecuados pues los dos factores determinan la supervivencia de una especie, cabe recalcar que la especie *Epidendrum dalstromii* utilizada presento especificidad por los hongos utilizados y las semillas no prosiguieron con su desarrollo.



Se conoce que *Coprinellus* es un hongo micorrízico que podría inferir en la regeneración natural de las orquídeas, pudiendo ser indispensable su asociación con orquídeas para la permanencia de estas especies (Xioya et al., 2015). Salazar (2017) reporta en su estudio la presencia de *Coprinellus radians* en la mayoría de orquídeas epifitas estudiadas entre ellas *Epidendrum spp*, *Epidendrum geminiflorum*, *Fronitaria caulescens*, *Stelis sp*, *Odontoglossum sp*, *Pleurothallis coriacardia*, *Lepanthes sp*, por lo que a este hongo endófito se le podría considerar un hongo generalista. El género *Coprinellus* se ha identificado en orquídeas adultas. En la orquídea *Epipogon roseum* que es una especie de orquídea terrestre Yamato et al. (2005), demostraron que hongos del mismo género pueden colonizar diferentes especies pero con diferentes morfotipos ya que existen varios factores que influyen en la colonización micorrízica de las raíces de orquídeas, por lo tanto, los resultados obtenidos señalan que la especificidad de las orquídeas por los hongos es un factor limitante para inducir la germinación de *Epidendrum dalstromii*, como lo mencionan Chen et al. (2013) en su estudio con *Dendrobium spp*. reportando que plantas de la misma especie tenían los mismos hongos endófitos en comparación con otras especies que compartían el mismo hábitat, pues éstas exhiben preferencias y selectividad por sus hongos. En la presente investigación los hongos fueron extraídos de plantas adultas y posiblemente *Epidendrum dalstromii* requiere de otros hongos para la etapa de germinación, ya que diferentes hongos podrían actuar en diferentes etapas de desarrollo de la planta (Oja et al., 2014).



8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los hongos aislados de *Pleurothallis coriacardia* no presentaron ningún efecto promotor en la germinación de *Epidendrum dalstromii*, obteniendo mejores resultados de germinación en el control positivo (Phytamax). Por lo antes mencionado, se recomienda realizar ensayos de germinación simbiótica con hongos endófitos extraídos de raíces de *Epidendrum dalstromii*.



9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acosta, A. (2015). Orquideas: Colores y formas diferentes para todos los gustos. Retrieved from <https://allyouneedisbiology.wordpress.com/2015/02/14/orquideas-colores-y-formas-diferentes-para-todos-los-gustos/>
- Acumedia Manufacturers, I. (2015). Agar Papa Dextrosa – Potato Dextrose Agar (7149), (7149), 3–5. Retrieved from http://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7149_sp_pi.pdf
- Andrade, A. (2010). MICORRIZAS: antigua interacción entre plantas y hongos. *Ciencia*, 84–86. Retrieved from https://www.academia.edu/653234/Micorrizas_Antigua_interacción_entre_plantas_y_hongos
- Calaway, D. (1984). *Icones Planetarum Tropicarum* plate 919. <https://doi.org/http://www.orchidspecies.com/epicoxianum.htm>
- Calaway, D. (2000). *Native Orchids Ecuadorian* (Soluciones). Quito Ecuador: Dosdon.
- Chávez, H. K., Mosquera-Espinosa, A. T., & Otero Ospina, J. T. (2014). Propagación in vitro de semillas de la orquídea *Comparettia falcata* Poepp. & Endl. (Orchidaceae) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas. *Acta Agronomica*, 64(2), 125–133. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.42976>
- Cueva, A. (2014). *Caracterización molecular de hongos micorrízicos aislados a partir de cuatro especies de orquídeas epífitas, en dos pisos altitudinales de bosque montano*. Loja, Ecuador. Retrieved from http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/10242/1/Cueva_Agila_Anabel_de_los_Angeles.pdf
- Dressler, R. (1993). *Phylogeny and Classification of the Orchid Family*. Dioscorides. Retrieved from https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=4_xL5qOVa-sC&oi=fnd&pg=PA7&dq=dressler,+r+1994+phylogeny+and+classification+of+the+orchids+family&ots=pi7YwO57ny&sig=AtY6iY9PKZG-xjrBSGK8pnnIauY#v=onepage&q&f=false
- Endara, L. (2007). Orchid conservation panorama in the Andean region: A case study of the orchids of Ecuador. Retrieved from https://www.floridamuseum.ufl.edu/ecuadororchids/Cores_Brasil.pdf
- Endara, L., León, S., & Williams, N. (2009). PATRONES DE ENDEMISMO DE



- ORQUÍDEAS ENDÉMICAS ECUATORIANAS: PERSPECTIVAS Y PRIORIDADES PARA LA CONSERVACIÓN. *Proceedings of the Second Scientific Conference on Andean Orchids*, (January), 63–70. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/319040057_PATRONES_DE_ENDEMISMO_DE_ORQUIDEAS_ENDEMICAS_ECUATORIANAS_PERSPECTIVAS_Y_PRIORIDADES_PARA_LA_CONSERVACION
- Freuler, M. J. (2008). *Orquideas* (Editorial). Retrieved from https://books.google.es/books?id=SjFbL4qd9-MC&hl=es&source=gbs_navlinks_s
- Hirtz, A. (2004). ¿Donde estan las Orquideas? *Tierra Incognita*, 31, 32. Retrieved from http://www.terraecuador.net/revista_31/31_donde_estan_orquideas.htm
- Kottke, I., Haug, I., Setaro, S., Suárez, J. P., Weiß, M., Preußing, M., ... Oberwinkler, F. (2008). Guilds of mycorrhizal fungi and their relation to trees, ericads, orchids and liverworts in a neotropical mountain rain forest. *Basic and Applied Ecology*, 9(1), 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2007.03.007>
- Lemay, M. A., De Vriendt, L., Pellerin, S., & Poulin, M. (2015). Ex situ germination as a method for seed viability assessment in a peatland orchid, *Platanthera blephariglottis*. *American Journal of Botany*, 102(3), 390–395. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400441>
- León, B., & Romero, S. (2016). *Aislamiento De Hongos Potencialmente Micorrízicos Presentes En Seis Especies De Orquídeas Nativas Del Sector San Pedro De Yumate, Molleturo, Azuay, Ecuador. Tesis* (Vol. I).
- León, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa, C., & Navarrete, H. (2011). *Libro rojo de plantas endémicas del Ecuador*. (S. León, R. Valencia, N. Pitman, L. Endara, C. Ulloa, & H. Navarrete, Eds.) (2nd ed.). Retrieved from https://ddrn.dk/wp-content/uploads/2018/01/LIBRO_ROJO_de_las_plantas_endemicas_del-1.pdf
- Massey, E., & Zettler, L. (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, 303–308.
- Mejía Rosero, H., & Pino Benítez, N. (2009). Diversidad De Orquídeas Epífitas En Un Bosque Húmedo Tropical (Bh-T) Del Departamento Del Chocó. *Acta Biológica Colombiana*, 15(2), 37–45. Retrieved from www.redalyc.org/articulo.oa?id=319027885003
- Ministerio de Turismo. (2013). Ecuador, el primer “ País de las Orquideas” del mundo. Retrieved from <http://www.turismo.gob.ec/ecuador-el-primer-pais-de-las-orquideas-del->



mundo/

- Newmann, E. I. (1988). Mycorrhizal links between plants-their functioning and ecological significance. *Advances in Ecological Research*, 1, 243–270.
- Oja, J., Kohout, P., Tedersoo, L., Kull, T., & Urmas, K. (2014). Temporal patterns of orchid mycorrhizal fungi in meadows and forests as revealed by 454 pyrosequencing. *New Phytologist*, 1608–1618.
- Ordoñez, N., Diez, M., & Otero, T. J. (2012). La vainilla y los hongos formadores de micorrizas. *Orquideología*, 29(63), 56–69.
- Otero, J. T., Ackerman, J. D., & Bayman, P. (2002). Diversity and host specificity of endophytic Rhizoctonia-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*, 89(11), 1852–1858. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.11.1852>
- Otero, O., Tupac, J., & Bayman, P. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epifitas. *Acta Agronómica*, 58(4), 270–276.
- Pereira, M., Da Silva Coelho, I., Da Silva Valadares, R. B., Oliveira, S. F., Bocayuva, M., Pereira, O. L., ... Megumi, M. C. (2014). Morphological and molecular characterization of *Tulasnella* spp. fungi isolated from the roots of *Epidendrum secundum*, a widespread Brazilian orchid. *Symbiosis*, 62(2), 111–121. <https://doi.org/10.1007/s13199-014-0276-0>
- Quishpe, C. (2018). *Evaluación del efecto de cinco hongos aislados endófitos de raíces de Pleurothallis coriacardia en la germinación de Epidendrum dalstromii*.
- Rodríguez, G. A., Rubiano, J. E., Castro Llanos, F. A., & Otero, J. T. (2016). Spatial distribution of dry forest orchids in the Cauca River Valley and Dagua Canyon: Towards a conservation strategy to climate change. *Journal for Nature Conservation*, 30, 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2016.01.004>
- Ruíz, B., Laguna, C., Iglesias, A., Damon, A., Marín, H., Azpíroz, R., & Moreno, M. (2008). Germinación in vitro de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex .) Schltr (Orchidaceae), 77(0031-9457), 2003–2015. Retrieved from <http://www.scielo.org.ar/pdf/phyton/v77/v77a17.pdf>
- Salazar, G. (2013). Orquídeas. *Diversidad Biológica e Inventarios*, 3(12), 1–18. Retrieved from http://www.ibiologia.unam.mx/pdf/directorio/s/salazar/orquideas_pedregal.pdf
- 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.
- Stewart, S. L., & Zettler, L. W. (2002). Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinquiseta*, *H. macroceratitis*) from Florida. *Aquatic*



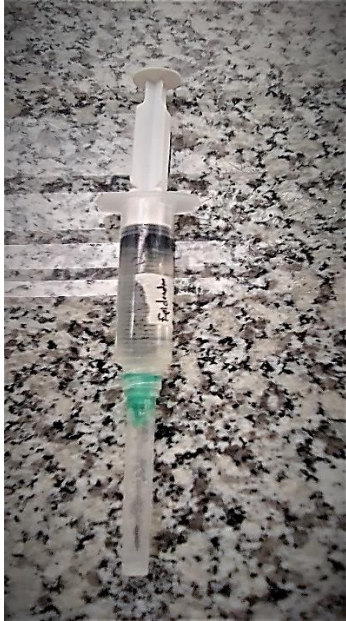
Botany, 72(1), 25–35. [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(01\)00214-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(01)00214-5)

- Suárez, J. P., Weiß, M., Abele, A., Garnica, S., Oberwinkler, F., & Kottke, I. (2006). Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycological Research*, 110(11), 1257–1270. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.08.004>
- Swarts, N. D., & Dixon, K. W. (2009). Perspectives on orchid conservation in botanic gardens. *Trends in Plant Science*, 14(11), 590–598. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.07.008>
- Waud, M., Busschaert, P., Lievens, B., & Jacquemyn, H. (2016). Specificity and localised distribution of mycorrhizal fungi in the soil may contribute to co-existence of orchid species. *Fungal Ecology*, 20, 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.12.008>
- Xioya, M., Kang, J., Nontachaiyapoom, S., Wen, T., & Hyde, K. (2015). Non-mycorrhizal endophytic fungi from orchids, 108. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/281653882_Non-mycorrhizal_endophytic_fungi_from_orchids
- Yamato, M., Yagame, T., Suzuki, A., & Iwase, K. (2005). Isolation and identification of mycorrhizal fungi associating with an achlorophyllous plant, *Epipogium roseum* (Orchidaceae). *Mycoscience*, 46(2), 73–77. <https://doi.org/10.1007/S10267-004-0218-4>
- Zettler, L. W., Delaney, T. W., & Sunley, J. A. (1998). SEED PROPAGATION OF EPIPHYTIC GREEN-FLY ORCHID, EPIDENDRUM CONOPSEUM R. BROWN, USING ITS ENDOPHYTIC FUNGUS. *Selbyana*, 19, 249–253.
- Zettler, L. W., Delaney, T. W., & Sunley, J. A. (2014). Marie Selby Botanical Gardens, Inc, 19(2), 249–253. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/41759996>.
- 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. *HortScience*, 42(1), 135–139.
- Zettler, L. W., Sharma, J., & Rasmussen, F. N. (2003). Mycorrhizal diversity. *Natural History Publications*, 205–226.

10. ANEXOS

Anexo 1. Prueba de Tetrazolio

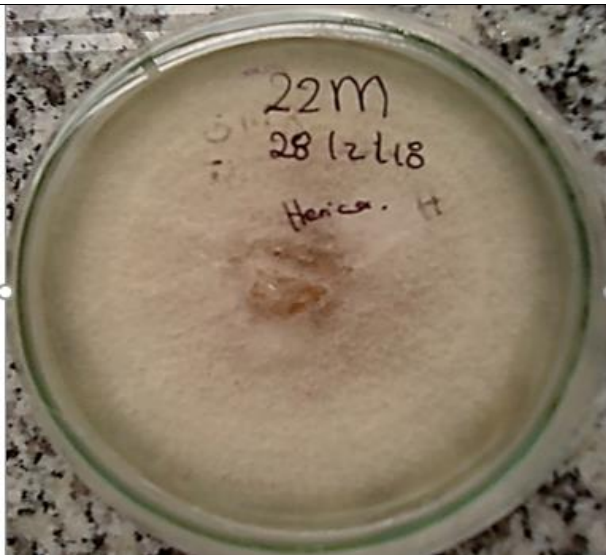
1) Semillas con solución de cloruro de tetrazolio en la prueba de viabilidad.



2) Semillas teñidas con cloruro de tetrazolio al 1%.



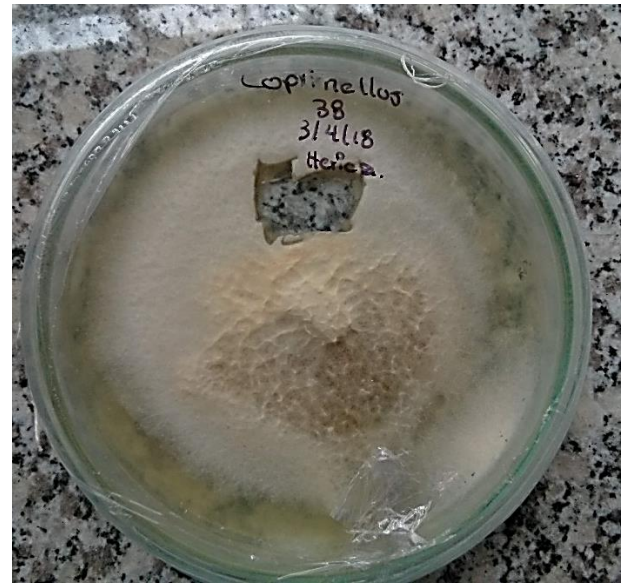
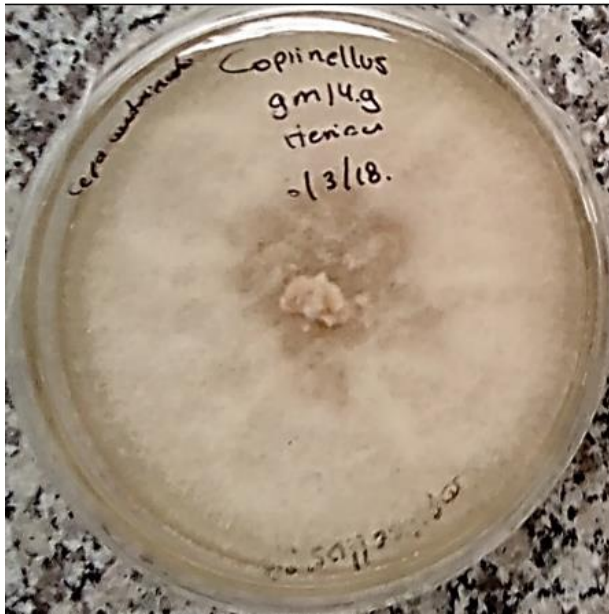
Anexo 2. Hongos endófitos utilizados.



A. Hongo endófito *Umbelopsis* cód:22M



B. Hongo endófito *Ilyonectria* cód:6M3.10



C. Hongo endófito Coprinellus sp1 cód:19M1.4.9 D. Hongo endófito Coprinellus sp2 cód: 38



E. Hongo endófito Ascomycota cód.: 9.2M2

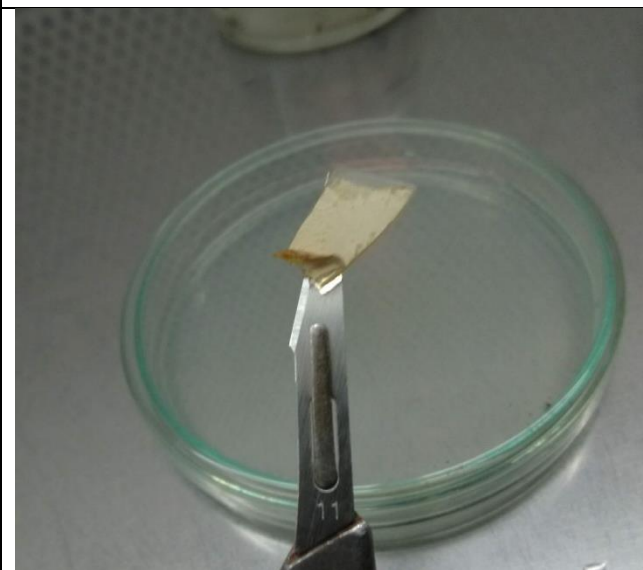
Anexo 3. Etapas de desinfección de la semilla y siembra de la semilla con el inculo del hongo.



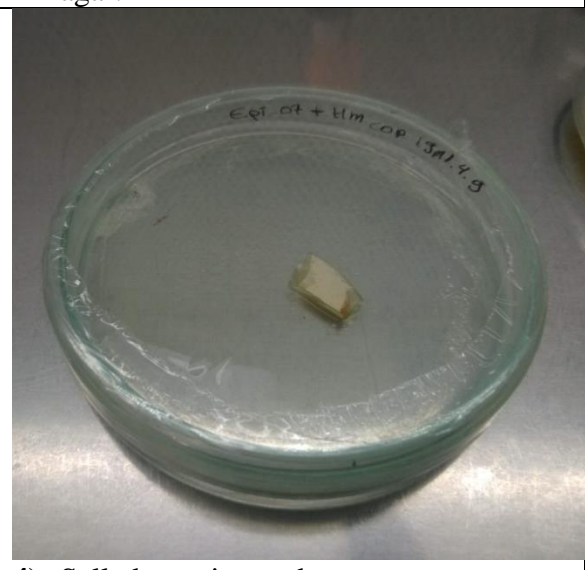
1) Desinfección de la semilla.



2) Siembra de la semilla en medio avena agar.


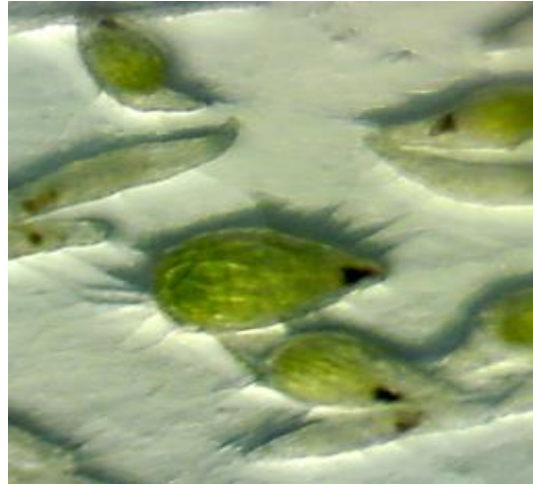
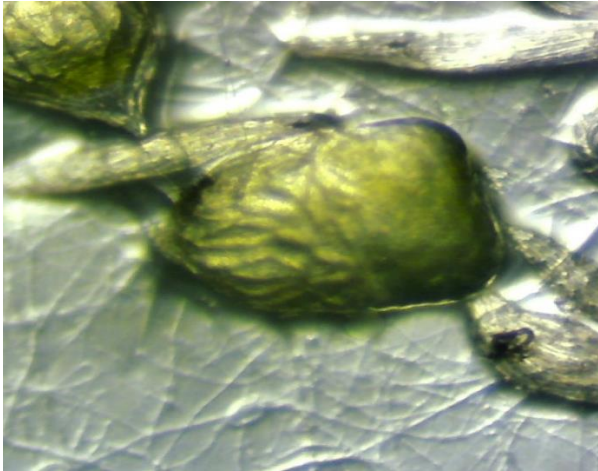

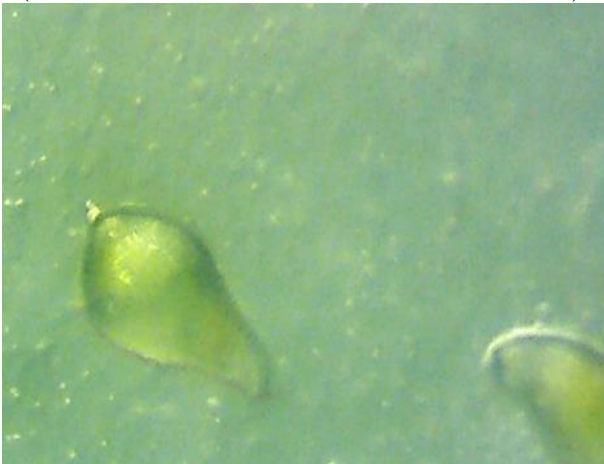


3) Inoculación del Hongo endófito

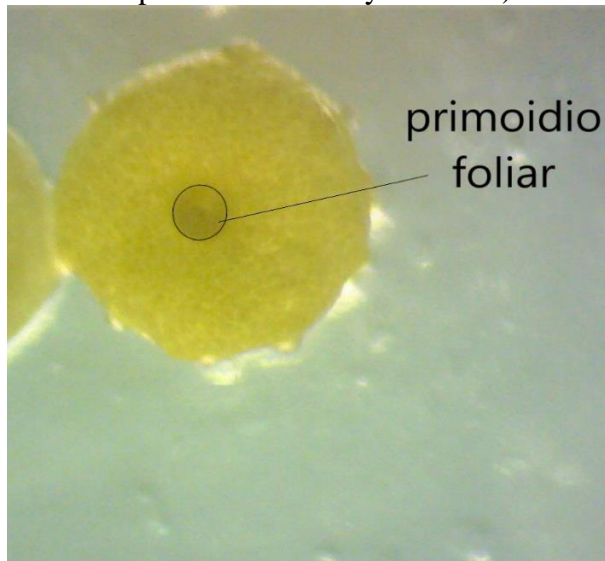


4) Sellado y etiquetado

Anexo 4. Efecto de los hongos endófitos y controles.

<p>1) Tratamiento con el HE 22M, semillas <i>Epidendrum dalstromii</i> en estado 1 (Imbibición de la semilla)</p> 	<p>2) Tratamiento con el HE 6M3.10, semillas de <i>Epidendrum dalstromii</i> estado 1 (Imbibición de la semilla)</p> 
<p>3) Tratamiento con el HE Coprinellus 19M1.4.9, semillas de <i>Epidendrum dalstromii</i> en estado 2 (Rutura de la testa)</p> 	<p>4) Tratamiento con el HE Coprinellus 38, semillas en estado 1 (Imbibición de la semilla)</p> 
<p>5) Tratamiento con el HE 9.2M2, semillas de <i>Epidendrum dalstromii</i> en estado 1 (Imbibición de la semilla).</p> 	

6) Control positivo (Phytamax) semillas de *Epidendrum dasltromii* en estado 4 (aparición de los primordios foliar y radicular)



7) Control Negativo (Avena agar) semillas de *Epidendrum dalstromii* en estado 2 (ruptura de testa).

