

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Ingeniería Ambiental

Evaluación de la germinación simbiótica de dos especies de orquídeas con el hongo micorrizico *Ceratobasidium* sp.

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Ambiental


Autores:

María Bernarda Quinde Luzuriaga

Janela Estefanía Tapia Cabrera


Directora:

María Elisa Durán López

ORCID:  0000-0003-1642-656X

Asesor:

Rodrigo Sebastián Caroca Cáceres

ORCID:  0000-0002-1405-0872

Cuenca, Ecuador

2023-07-21

Resumen

En la naturaleza, las semillas de orquídeas no pueden germinar por sí solas debido a que carecen de endospermo, por lo que requieren de una asociación simbiótica con hongos micorrízicos para poder germinar y desarrollarse. En este estudio se evaluó la germinación simbiótica *in vitro* de dos especies de orquídeas: *Odontioda* sp. (híbrido) y *Epidendrum* sp. (silvestre), utilizando el hongo micorrízico *Ceratobasidium* sp. Se aplicaron tratamientos asimbióticos (MS modificado coco y OMA no inoculado con hongo) y un tratamiento simbiótico (OMA inoculado con hongo). Después de 50 días de experimentación, se analizaron los porcentajes de germinación de semillas, el índice de germinación (IG) y el tamaño del embrión. El tratamiento simbiótico mostró los porcentajes e índice de germinación más altos para ambas especies. *Odontioda* sp. demostró ser una orquídea híbrida de desarrollo lento, incluso en simbiosis con el hongo micorrízico, dado que solo alcanzó el estadio uno en los 50 días de experimentación. Se concluye que el hongo micorrízico *Ceratobasidium* sp. promovió la germinación en ambas especies de orquídeas, aunque demostró una mayor afinidad con la especie silvestre *Epidendrum* sp., que durante este estudio sólo alcanzó un estadio tres de germinación.

Palabras clave: orquídeas; *Epidendrum*; *Odontioda*; simbiosis; micorriza



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

In nature, orchid seeds cannot germinate on their own because they lack endosperm, therefore they require a symbiotic association with mycorrhizal fungi to germinate and develop. The present study evaluated the symbiotic germination of two orchid species: *Odontioda* sp. (hybrid) and *Epidendrum* sp. (wild), using the mycorrhizal fungi *Ceratobasidium* sp. It applied asymbiotic treatments (MS and OMA not inoculated with fungi) and a symbiotic treatment (OMA inoculated with fungus). After 50 days of the experiment, the present study analyzed seed germination percentage, germination index (GI), and embryo size. The symbiotic treatment showed the highest germination percentages and germination index for both species. *Odontioda* sp. proved to be a slow-developing hybrid orchid, even in symbiosis with the mycorrhizal fungi, as it only reached the first stage in the 50 days of the experiment. It concluded that the mycorrhizal fungus *Ceratobasidium* sp. promoted germination in both orchid species. Still, the mycorrhizal fungi showed more affinities with the wild species *Epidendrum* sp., which only reached the third germination stage.

Keywords: orchids; *Epidendrum*; *Odontioda*; symbiosis; mycorrhiza



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de Contenido

Introducción	11
Objetivo general.....	13
Objetivos específicos.....	13
Capítulo I.....	14
1. Orquídeas	14
1.1. Generalidades de las orquídeas.....	14
1.2. Importancia ecológica de las orquídeas.....	15
1.3. Orquídeas en Ecuador.....	16
1.4. Especies de orquídeas utilizadas en el estudio	17
1.4.1. <i>Odontioda</i> sp.....	17
1.4.2. <i>Epidendrum</i> sp.....	19
2. Hongos micorrízicos	20
2.1. Generalidades de los hongos micorrízicos	20
2.2. Tipos de hongos micorrízicos	20
2.3. Micorrizas de orquídeas.....	21
2.4. Hongo micorrízico del género <i>Ceratobasidium</i>	22
3. Germinación de orquídeas	22
3.1. Germinación en el medio silvestre	22
3.2. Germinación <i>in vitro</i>	23
3.3. Germinación simbiótica.....	24
3.4. Germinación asimbiótica.....	24
3.5. Medios de cultivo empleados	24
Capítulo II.....	26
4. Materiales y métodos	26
4.1. Área de estudio	26
4.2. Reproducción del hongo micorrízico y comprobación de sus características macro y microscópicas.....	26

4.3. Selección de las especies de orquídeas y procesamiento de sus semillas	26
4.4. Protocolo de siembra de semillas.....	27
4.4.1. Desinfección de semillas	28
4.4.2. Preparación de medios de cultivo para los ensayos de germinación <i>in vitro</i> ...	28
4.4.3. Ensayos de germinación <i>in vitro</i> en condiciones asimbióticas y simbiótica.....	28
4.4.4. Siembra de semillas.....	29
4.4.5. Ingreso a la cámara de germinación	30
4.5. Ensayos de germinación <i>in vitro</i> en condiciones asimbióticas y simbiótica	30
Capítulo III.....	34
5. Resultados.....	34
Capítulo IV	44
6. Discusión.....	44
7. Conclusiones	50
8. Recomendaciones.....	51
9. Referencias	52
10. Anexos.....	67

Índice de figuras

Figura 1. Ejemplar de orquídea <i>Odontioda</i> sp.	18
Figura 2. Ejemplar de orquídea <i>Epidendrum</i> sp.	20
Figura 3. Características a) macroscópicas y b) microscópicas del hongo <i>Ceratobasidium</i> sp.....	34
Figura 4. Semillas con y sin embrión de a) <i>Odontioda</i> sp; y b) <i>Epidendrum</i> sp.....	35
Figura 5. Semillas de <i>Epidendrum</i> sp. con el embrión teñido de rojo por el Tetrazolio vista en el microscopio (aumento 10x)	35

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de las orquídeas	14
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Odontioda</i> sp.....	18
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>Epidendrum</i> sp.....	20
Tabla 4. Descripción de los tratamientos asimbióticos y simbiótico para cada especie de orquídea	29
Tabla 5. Diseño experimental para las dos especies de orquídeas.....	29
Tabla 6. Estadios de germinación de semillas de orquídeas	31
Tabla 7. Detalle de las semillas sembradas en los tres tratamientos de <i>Odontioda</i> sp.	35
Tabla 8. Detalle de las semillas sembradas en los tres tratamientos de <i>Epidendrum</i> sp.	36
Tabla 9. Estadios de germinación de <i>Odontioda</i> sp. con respecto al tiempo.....	36
Tabla 10. Estadios de germinación de <i>Epidendrum</i> sp. con respecto al tiempo.....	37
Tabla 11. Porcentaje de semillas en los diferentes estadios de germinación de <i>Odontioda</i> sp. a los 50 días.....	37
Tabla 12. Porcentaje de semillas en los diferentes estadios de germinación de <i>Epidendrum</i> sp. a los 50 días.....	38
Tabla 13. Índice de germinación a los 50 días para las dos especies de orquídeas estudiadas.....	38
Tabla 14. Estructuras morfológicas de semillas de <i>Odontioda</i> sp. en los estadios de germinación vistas en el estéreo microscopio	39
Tabla 15. Estructuras morfológicas de semillas de <i>Epidendrum</i> sp. en los estadios de germinación vistas en el estéreo microscopio	40
Tabla 16. Diámetros promedio de los embriones de las dos especies de orquídeas al finalizar el experimento (50 días).	41
Tabla 17 . Medias y desviaciones estándar del estadio uno de germinación (E1) para los tratamientos en <i>Odontioda</i> sp.	42
Tabla 18. Medias y desviaciones estándar del estadio uno de germinación (E1) para los tratamientos en <i>Epidendrum</i> sp.....	42
Tabla 19. Medias y desviaciones estándar del estadio dos de germinación (E2) para los tratamientos en <i>Epidendrum</i> sp.....	43

Agradecimientos

En primer lugar, deseo expresar mi más profundo agradecimiento a Dios y a la Virgen por guiarme en este camino, brindarme salud y sabiduría para tomar decisiones adecuadas y mantenerme firme hasta alcanzar este logro.

Agradezco de corazón a mis padres, Gladys y Heriberto, por su apoyo y aliento en cada una de las metas que me he propuesto en mi vida. Su amor incondicional y paciencia en los momentos difíciles, fueron un pilar fundamental que me motivó a cumplir con mis metas académicas. Cada logro alcanzado es gracias a su sacrificio y dedicación, y me siento afortunada de tenerlos como mis guías y ejemplo a seguir.

A mis hermanos, Pablo y Eddy, a mi hermana Johana y a mi cuñada Fernanda, les agradezco de corazón por estar siempre presentes en mi vida, pendientes de mí y ofreciéndome una mano amiga cuando más lo necesitaba. A mis queridos sobrinos Pablo, Carolina y Martín, quienes siempre han contagiado mi vida con su alegría y cariño, les agradezco por hacer más liviano este camino.

También quiero agradecer a mis amigas Bernarda, Karen e Hilda, y a mis amigos Kevin, Diego, Juan, Mateo y Alexanders, con quienes compartí muchas horas de estudio, desvelo y alegría, su apoyo incondicional y compañerismo fueron esenciales en los momentos más desafiantes de este proceso. A mi querido amigo Santiago por estar en los buenos y malos momentos en esta travesía y por ser un amigo verdadero en quien siempre puedo confiar. Su amistad ha sido un regalo invaluable, me siento bendecida de contar con amigos tan maravillosos. Siempre los llevaré conmigo, pues son amigos que cualquier persona anhela tener en su vida.

A Maria Elisa, por guiarnos y compartirnos sus conocimientos y experiencia para la realización de este trabajo de investigación.

Al laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Azuay, en especial al Ing, Rodrigo Caroca por abrirnos las puertas del laboratorio y siempre estar dispuesto a colaborarnos en el desarrollo del trabajo con sus compañeras de trabajo Johana y Daniela.

Agradezco también a todas las personas que, de una forma u otra, confiaron en mí y brindaron su ayuda o apoyo moral durante la realización de este trabajo de investigación.

Janela Tapia

Agradecimientos

Agradezco a Dios por darme salud y vida para poder llevar a cabo este proyecto, así como también por guiarme y darme sabiduría para culminarlo con éxito.

A mis abuelitos, Juan y Blanca, por brindarme su amor incondicional y apoyarme en cada una de las metas que me he propuesto. Sé que estarían muy orgullosos de este logro, un abrazo hasta el cielo.

A toda mi familia, porque han sido un soporte durante esta travesía. Gracias por no dejarme desistir en el camino, y siempre motivarme a seguir luchando por mis sueños.

A mis amigos Kevin, Janela, Karen, Alexanders y Juan, por las risas y el apoyo incondicional brindado en el transcurso de la carrera universitaria. Los llevaré por siempre en mi corazón. A Joseline por estar en los buenos y malos momentos, y siempre tener las palabras adecuadas de aliento cuando más lo he necesitado. A Dennis, por brindarme su amor incondicional, y siempre motivarme a creer en mí.

A María Elisa, por ser más que una tutora y ayudarnos durante la realización de esta tesis. Sus conocimientos y sugerencias fueron invaluable para el desarrollo de este trabajo.

Al laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Azuay, y en especial al Ing, Rodrigo Caroca, Ing. Johana e Ing. Daniela, por abrirnos las puertas del laboratorio y siempre estar dispuestos a colaborarnos y solventar todas las inquietudes.

Finalmente, me gustaría agradecer a todas las personas que, de una forma u otra, me brindaron su aliento y confianza. Su apoyo ha sido fundamental para alcanzar este logro académico.

María Bernarda Quinde

Dedicatorias

Dedico esta tesis a mis queridos abuelitos Blanca y Juan, quienes, aunque ya no estén físicamente conmigo, fueron un pilar y apoyo incondicional para alcanzar este logro. A Dennis, por el cariño incondicional. A Sammy y Bella por ser mi compañía en las largas noches de estudio y siempre recibirme moviendo su colita.

María Bernarda

Dedico este logro a mis padres, quienes me enseñaron que con paciencia, dedicación y perseverancia, todo es posible. Su ejemplo y enseñanzas han sido fundamentales en este camino hacia el éxito académico.

Janela

Introducción

La familia Orchidaceae es el grupo de plantas más diverso a nivel mundial, se estima que existen entre 17 000 a 35 000 especies de orquídeas (Pujasatria et al., 2020). Esta familia está presente en todos los continentes, excepto en la Antártida, con una variedad de especies terrestres y litófitas (Zhang et al., 2018). Entre los géneros más destacados de la familia Orchidaceae a nivel mundial, se encuentran *Pleurothallis*, *Dendrobium*, *Epidendrum* y *Bulbophyllum*, cada género cuenta con más de 1 000, 1 400, 1 500 y 2 000 especies, respectivamente (Sarsaiya et al., 2019).

Las orquídeas son especies codiciadas en todo el mundo debido a sus diversos fines medicinales, nutricionales, cosméticos, socioculturales y religiosos, pero el principal es el estético para embellecer espacios y provocar armonía (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2019). Debido a su importancia ecológica y su gran interés comercial, desde 1970 han sido incluidas en la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES), que regula el comercio ilícito de plantas en peligro de extinción.

En la actualidad, las orquídeas tienen un lugar destacado en la Lista Roja de especies amenazadas elaborada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (UICN), el cual menciona que un 56,5 % de especies forman parte de las diferentes categorías de amenazas de la Lista Roja, algunas de estas amenazas son comunes en las poblaciones de orquídeas silvestres como la deforestación y pérdida de hábitat, expansión de plantaciones agrícolas y forestales, pero principalmente por la sobreexplotación de plantaciones con fines medicinales, ornamentales y comerciales (Gale et al., 2018; Dolce et al., 2020).

Debido a las diferentes amenazas que presentan, se debe dar prioridad a la conservación de orquídeas. Sin embargo, en su entorno natural las orquídeas presentan grandes limitaciones para poder reproducirse, a pesar de que sus cápsulas poseen millones de semillas, solo el 1 o 2 % de estas germinan y alcanzan un estado adulto (Arias Oña, 2020). Además, tienen una gran dependencia de interacciones bióticas ya que requieren de polinizadores especializados para su transferencia de polen y reproducción, y de hongos micorrízicos para la obtención de nutrientes (Mercado & Delgado, 2020). En diversos estudios se ha demostrado que las semillas de las orquídeas dependen de una asociación simbiótica con un hongo micorrízico para poder germinar y desarrollarse (Guimarães et al., 2013; Mala et al., 2017; Castellanos Castro et al., 2018; Shahu Ji, 2021; Quijia-Lamina et al., 2022; Quijia-Lamiña et al., 2023).

Una forma de conservación y propagación de los progenitores de las orquídeas silvestres de sus diferentes amenazas, es la hibridación (Jitsopakul et al., 2022). La familia Orchidaceae comprende más de 8 000 géneros y 28 000 especies híbridas naturales y artificiales. Sin embargo, en general los híbridos presentan problemas en su germinación, por lo cual es importante darles un medio de cultivo adecuado para el desarrollo de sus semillas (Tiwari et al., 2022). En la actualidad, la germinación *in vitro* es una de las técnicas que se desarrolla para la multiplicación de diferentes especies de orquídeas silvestres e híbridos que presentan diferentes hábitos y hábitats (Shahu Ji, 2021).

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar si el hongo micorrízico *Ceratobasidium* sp. es capaz de promover la germinación y desarrollo temprano de forma *in vitro* de las orquídeas *Odontioda* sp. (híbrida) y *Epidendrum* sp. Los resultados obtenidos brindarán información para una mejor comprensión de la afinidad del hongo micorrízico con especies de orquídeas nativas y de valor comercial, así como los factores que pueden influir en dicha simbiosis.

Objetivo general

- Evaluar el efecto del hongo micorrízico *Ceratobasidium* sp. como promotor de la germinación de dos especies de orquídeas.

Objetivos específicos

- Determinar la afinidad del hongo micorrízico con las dos especies de orquídeas.
- Comparar el tiempo de establecimiento de la simbiosis entre el hongo micorrízico y las dos especies de orquídeas.
- Evaluar el desarrollo de los rizoides en la germinación simbiótica y asimbiótica de semillas de orquídeas.

Capítulo I

1. Orquídeas

1.1. Generalidades de las orquídeas

La palabra orquídea proviene del latín “*orchis*” o testículo, que hace referencia a los pseudobulbos que algunas especies poseen (Castellanos Castro et al., 2018). Dentro del reino Plantae, la familia Orchidaceae es la más abundante en el mundo, al contar con más de 700 géneros y 35 000 especies (Yeh et al., 2019). Cronquist (1981), presenta la clasificación taxonómica de las orquídeas de la siguiente manera (Tabla 1):

Tabla 1. Clasificación taxonómica de las orquídeas

Clasificación taxonómica de las orquídeas	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Orchidales o Aspargales
Familia	Orchidaceae

Nota: Información obtenida de Cronquist, (1981).

La familia Orchidaceae se distribuye en los trópicos y subtrópicos, especialmente en elevaciones medias (por encima de los 500 m.s.n.m.), predominando en Centro y Suramérica, exceptuando regiones desérticas y polares (Salazar, 2009; Zhang et al., 2018). En América del Sur están presentes más del 30 % de todas las especies de orquídeas, siendo Ecuador, Colombia, Brasil, Perú y Bolivia los países megadiversos en orquídeas de todo el mundo (Dolce et al., 2020).

Las orquídeas tienen diferentes hábitos de crecimiento, la mayoría son epífitas y viven sobre árboles, algunas son terrestres, otras son rupícolas o litófitas al vivir sobre rocas, y unas pocas son acuáticas. Su crecimiento depende de la especie y la mayoría de ellas se desarrollan lentamente, pudiendo tardar meses o años en alcanzar el estado adulto y producir flores (Chávez et al., 2015).

La presencia de las orquídeas en diferentes ecosistemas se debe a que tienen diversas interacciones ecológicas con otras plantas (vasculares y no vasculares), insectos, aves, mamíferos, reptiles y microorganismos como hongos y bacterias (Castillo Pérez y Carranza

Álvarez, 2019). Las orquídeas dependen de interacciones particulares con sus polinizadores y asociados de hongos micorrízicos para completar su ciclo de vida (Cevallos et al., 2018). Las abejas son el principal polinizador de las orquídeas, llegando a ser las encargadas del 60 % de la polinización de orquídeas, le siguen las moscas, mariposas y colibríes representando un 29 % de la polinización y el restante 11 % se encargan otros insectos (Téllez-Velasco & Tejeda-Sartorius, 2013).

Las orquídeas son monocotiledóneas, por lo que han desarrollado características morfológicas florales particulares para poder llevar a cabo su reproducción y polinización (Y. Li et al., 2022). Sus flores generalmente son hermafroditas, que presentan diversas formas, colores y ornamentaciones (Castellanos Castro et al., 2018). Los frutos de las orquídeas son cápsulas, en las cuales se encuentran numerosas semillas y muy pequeñas, por ello se las denomina “semillas de polvo” (Utami & Hariyanto, 2020).

Las cápsulas de las orquídeas pueden producir alrededor de 1 300 a cuatro millones de semillas diminutas. Presentan un tamaño de 0,01 a 0,09 mm x 0,05 a 6 mm y pesan alrededor de 0,3 a 24 microgramos (Pujasatria et al., 2020; Yeh et al., 2019). La testa en semillas de orquídeas terrestres es reticulada y fuerte, más que de las orquídeas epífitas. Sin embargo, al presentar diferentes anatomías en sus semillas, están adaptadas para dispersarse con el viento hacia nuevos hábitats (Trapnell & Hamrick, 2023).

A diferencia de otras plantas, las semillas de las orquídeas se caracterizan por tener un embrión pequeño que carece de endospermo, por lo tanto, para poder germinar en su hábitat natural requieren de una asociación obligatoria con los hongos micorrízicos (Castellanos Castro et al., 2018; Tsulsiyah et al., 2021; Chen et al., 2022).

1.2. Importancia ecológica de las orquídeas

Las orquídeas pueden establecer relaciones con otros organismos como hongos, plantas y animales. Sin embargo, la más importante es la relación simbiótica que realiza con los hongos micorrízicos para su desarrollo y obtención de nutrientes (Ospina & Bayman, 2009).

Las orquídeas destacan porque cumplen importantes funciones ecológicas dentro de sus hábitats, principalmente aportando a la regulación hídrica del ecosistema. Las orquídeas epífitas actúan como barrera interceptora de neblina y nubes bajas, ayudan a reducir la precipitación local y el volumen e impacto del escurrimiento de agua, disminuyen la erosión y facilitan la infiltración del agua en el suelo (Castellanos Castro et al., 2018). Mientras que, las orquídeas terrestres sirven de refugio y alimento para diferentes especies de animales y hongos (Ospina & Bayman, 2009). Así mismo, estas especies son usadas como indicadores

de la calidad ambiental, dado que son sensibles a cambios en su entorno. Igualmente, las orquídeas terrestres atraen a polinizadores específicos debido a la estructura de sus flores, de esta manera los polinizadores tienen una fuente alimento y contribuyen a la polinización de otras especies de plantas en sus ecosistemas (Light & MacConaill, 2011; Pieterse et al., 2023).

En general, las orquídeas contribuyen a la biodiversidad y al equilibrio ecológico de sus hábitats, dado que ocupan varios nichos ambientales, incluidos hábitats terrestres, epífitos y litófitas. Su presencia incrementa la riqueza general de las especies y diversidad de los ecosistemas (Hrivnák et al., 2020). También son consideradas como especies colonizadoras debido a su capacidad de adaptabilidad a diversos tipos de hábitats; y gracias a la dispersión de sus semillas por el viento o interacción con animales, suelen ser las primeras especies en colonizar nuevos entornos. Existe evidencia del crecimiento de orquídeas *Epidendrum* terrestres en medio de rocas y ceniza volcánica (Trapnell & Hamrick, 2023).

Sin embargo, la población de orquídeas se ha visto afectada por la extracción indiscriminada de especies gracias a su elevado costo y demanda comercial en el mercado a nivel internacional, debido a sus características ornamentales de forma, tamaño, color y durabilidad de su flor. Por lo general, los cultivos ornamentales son cruces entre especies (híbridos interespecíficos) y géneros (híbridos intergenéricos) (Vilcherrez-Atoche et al., 2022).

En algunos casos, los híbridos tienen problemas de germinación, esto por los mismos procesos de hibridación, la incompatibilidad de sus padres y el aborto del embrión después de la fertilización al fallar la hibridación. Por lo tanto, se requiere un adecuado cultivo de las semillas híbridas desarrolladas a partir del cruzamiento y crecimiento estable de la población híbrida (Tiwari et al., 2022).

1.3. Orquídeas en Ecuador

Ecuador es un país pequeño a comparación a los países de Sudamérica, pero debido a su ubicación geográfica cuenta con una alta diversidad de hábitats y microclimas que promueven su biodiversidad. En el país existe una alta diversidad de plantas, se han registrado cerca de 18 000 especies nativas, por lo que es considerado como uno de los 17 países megadiversos del mundo (Mestanza Ramon et al., 2019; Mites et al., 2022).

En el caso de las orquídeas, su diversidad y alta proliferación se debe a factores como variabilidad climática, la altura de la Cordillera de los Andes, la influencia de las corrientes oceánicas atmosféricas cálidas (El Niño) y frías (Humboldt), y un régimen de lluvias intensas (Mites et al., 2022). La colisión de las corrientes oceánicas frente a la costa del oeste del

Ecuador crea la gran variabilidad climática, que viene combinada con las altas precipitaciones, humedad y luz solar adecuada durante todo el año (Dodsworth, 2016).

Debido a las altas tasas de precipitación anual y humedad persistente en el país, se ha registrado que el mayor número de plantas vasculares no arbóreas y endémicas están al noroccidente del Ecuador, destacando las epífitas (bromelias y orquídeas) (Correa Zanotti-Cavazzoni, 2021). Las zonas del país con mayor riqueza de orquídeas son las estribaciones occidental y oriental de la Cordillera de los Andes (Millner et al., 2020).

Actualmente, en el Ecuador se han registrado 4 187 especies de orquídeas, de las cuales 1 707 son endémicas. Los Andes del sur de Ecuador son parte de los más importantes *hotspots* globales de plantas vasculares (Myers et al., 2000). Las orquídeas endémicas del Ecuador presentan patrones de distribución en altitudes que van desde la costa del Pacífico hasta 4 500 m.s.n.m; en los bosques de la Sierra ecuatoriana la mayor diversidad de orquídeas se concentra en el rango altitudinal de 1 500 a 2 500 m.s.n.m. (González Pozo, 2022).

En las cuatro regiones del Ecuador las orquídeas constituyen una gran biodiversidad de flora y se las encuentran dentro las 51 áreas protegidas del Sistema Nacional del Áreas Protegidas del Ecuador (SNAP) (Sánchez Macías y Rodríguez Gutiérrez, 2018). Actualmente, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) ubica 1 455 orquídeas ecuatorianas en diferentes categorías de amenaza (Durán-López et al., 2019). Según el Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica, Ecuador presentó la Lista Roja de plantas, en la cual la familia Orchidaceae tiene 24 especies amenazadas, 23 se encuentra en peligro crítico y una en estado vulnerable (MAATE, 2019).


1.4. Especies de orquídeas utilizadas en el estudio

1.4.1. *Odontioda* sp.

En el año de 1904 fue cuando Charles Vuylsteke florece el primer híbrido intergenérico de *Odontoglossum*, la *Odontioda Vuylstekeae*, (*Cochlioda noeziiana* x *Odontoglossum crispum*) en el Temple Show, en Londres (Jean & Houillet y el género Houilletia, 2020). La orquídea *Odontioda* es un híbrido intergenérico artificial de *Odontoglossum* y *Cochlioda*, nativos de regiones frías de alrededor de 2 000 m.s.n.m. de América del Sur y Central respectivamente, por lo que tiene baja tolerancia al calor (Kubota et al., 2005). La especie *Odontioda* como sus géneros paternos ha heredado la preferencia por temperaturas frescas para su crecimiento y floración (Blanchard & Runkle, 2005). Esta especie desarrolla su inflorescencia a temperaturas en un rango de 14 a 28 °C para una exposición diurna y nocturna (S. Zhang et al., 2018). Además, sus flores tienen una amplia gama de tamaños, diseños y colores que

van desde el amarillo y rosa hasta el rojo vivo. Es una orquídea de doble tallo, que puede producir una planta cada año (Kubota et al., 2009). Esto se debe a que el tiempo que requiere desde la generación de un brote hasta su floración es de 10 a 11 meses, siendo raro múltiples brotes en un año, es decir, se da un brote por planta (Kubota et al., 2006). Según el departamento de agricultura de Estados Unidos, esta especie es una de las orquídeas más cultivadas y uno de los productos más importantes en el mercado de la floricultura (Miguel & Leonhardt, 2011). La Tabla 2 muestra la clasificación taxonómica de *Odontioda* sp.:

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Odontioda* sp.

<i>Odontioda</i> sp.	
 <p>Figura 1. Ejemplar de orquídea <i>Odontioda</i> sp. Fotografía: Blga. María Elisa Durán</p>	<p style="text-align: center;">Clasificación Taxonómica</p> <p>Reino: Plantae Clase: Liliopsida Orden: Asparagales Familia: Orchidaceae Subfamilia: Epidendroideae Tribu: Cymbidieae Subtribu: Oncidiinae Género: <i>Odontioda</i></p>

Nota: Clasificación taxonómica tomada de GBIF Backbone Taxonomy de *Odontioda* Hort., 1904. (GBIF Secretariat, 2022).

- **Géneros parentales de *Odontioda* sp.**

El género *Odontoglossum* obtiene su nombre del griego “*odonto*” que significa diente y “*glossa*” que significa lengua, debido a la semejanza con una lengua a la lámina del labelo y su estructura dentada del callo. Su origen es América del Sur, en elevaciones ubicadas entre los 1 500 a 3 000 m.s.n.m. y cuentan con 80 especies epífitas simpodiales (Jean & Houillet y El Género Houilletia, 2020).

Por otro lado, el género *Cochlioda* obtiene su nombre del griego “*kokhliodes*” que hace referencia a un espiral, debido a su similitud con un caracol, y se observa una forma característica en los callos, los cuales se asemejan a las antenas de este molusco. Tiene una

distribución desde el Sur de Colombia hasta Bolivia, en elevaciones que van desde los 1 400 a 3 000 m.s.n.m. Cuenta con siete especies de plantas epífitas (Dodson & Bennett, 1989).

1.4.2. *Epidendrum* sp.


Es uno de los géneros de plantas más grandes del Neotrópico, cuenta con más de 1 500 especies que se distribuyen desde el sureste de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina. Muchas especies de *Epidendrum* se extienden a lo largo de América tropical, desde el nivel del mar hasta los 3 700 m.s.n.m. (Quijia-Lamiña et al., 2023).

Por su alta diversidad ocupan hábitats desde selvas tropicales secas hasta bosques húmedos; de forma natural la mayoría de especies crecen como epífitas, pero algunas pueden ser litófitas o terrestres (Thangavelu & Muthu, 2017). *Epidendrum* es un género conocido por su capacidad de colonizar rocas y suelos poco profundos, esta capacidad de colonizar hábitats contribuye a la amplia distribución de sus especies y éxito ecológico (Pena & Alves-Araújo, 2017).

Las orquídeas del género *Epidendrum* son fáciles de cultivar, debido a que crecen y florecen durante todo el año (Pinheiro & Cozzolino, 2013). Estas especies presentan un tallo que puede alcanzar los dos metros de altura, sus flores aparecen al extremo del tallo cuando está cubierto de hojas, permaneciendo así por varios meses. Su inflorescencia se muestra con docenas de flores diminutas, y presentan colores como el blanco, verde, amarillo, rojo y fucsia (White, 1996).

Epidendrum ocupa el segundo lugar en géneros de orquídeas del Ecuador, cuenta con 453 especies que crecen de forma silvestre y se las puede encontrar en la región costa, sierra y amazónica desde los 1 000 a 3 500 m.s.n.m. (Quijia-Lamiña et al., 2023). La Tabla 3 muestra la clasificación taxonómica de *Epidendrum* sp.

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Epidendrum* sp.

<i>Epidendrum</i> sp.	
	<p style="text-align: center;">Clasificación Taxonómica</p> <p>Reino: Plantae División: Magnoliophyta Clase: Liliopsida Orden: Asparagales Familia: Orchidaceae Subfamilia: Epidendroideae Tribu: Epidendreae Subtribu: Laeliinae Género: <i>Epidendrum</i></p>
<p>Figura 2. Ejemplar de orquídea <i>Epidendrum</i> sp. Fotografía: Bernarda Quinde y Janela Tapia.</p>	

Nota: Clasificación taxonómica del género *Epidendrum* (Chase et al., 2015)

2. Hongos micorrízicos

2.1. Generalidades de los hongos micorrízicos

Los hongos micorrízicos pueden asociarse con las raíces de más del 90 % de todas las especies de plantas vasculares y aportan hasta el 80 % de nutrientes minerales necesarios para el crecimiento y desarrollo de muchas plantas (Yeh et al., 2019; Uitzil Colli, 2019). Los hongos micorrízicos varían en taxonomía, fisiología y ecología. Además, se clasifican según su ubicación y características morfológicas de la unión raíz-hongo en: arbusculares, ectomicorrizas, arbutoide, monotropoide, ericoide y micorriza de orquídeas (Uitzil Colli, 2019; Kaur, 2020; Hossain, 2022).

2.2. Tipos de hongos micorrízicos

2.2.1. Ectomicorriza

Las ectomicorrizas son un tipo de asociación simbiótica entre ciertos hongos del suelo y las raíces de los árboles; mismos que aportan en la nutrición, el desarrollo y la salud de los árboles, protegiéndolos de ciertos patógenos del suelo (Seb, 2018). Se caracterizan porque las hifas de los hongos no penetran las células de las raíces, sino que rodean la corteza

radical formando la red “*Harting*”, misma que permite la transferencia de los nutrientes (Andrade-Torres, 2010; Uitzil Colli, 2019).

2.2.2. Ectendomicorriza

Este tipo de micorriza presenta características tanto de las ectomicorrizas como de las endomicorrizas. Los hongos del grupo Basidiomycotina y Ascomycotina presentan esta interacción con plantas coníferas y algunas angiospermas (Andrade-Torres, 2010).

2.2.3. Micorriza arbuscular

Este tipo de micorriza se caracteriza por formar estructuras denominadas arbuscúlos; las hifas del hongo penetran las células de las raíces de las plantas, lo que les permite intercambiar nutrientes, principalmente fósforo (García-Martínez et al., 2020; Hernández-Acosta, 2021). Esta micorriza juega un papel fundamental dentro de la agricultura ya que promueve un mejor desarrollo de los cultivos (Andrade-Torres, 2010).

2.2.4. Micorriza ericoide

En este tipo de micorriza, las hifas del hongo penetran y colonizan las células de las raíces de las plantas del orden Ericales; permitiendo la supervivencia y adaptación de estas plantas en ambientes hostiles y escaso en nutrientes (Setaro et al., 2006; Wei et al., 2022).

2.2.5. Micorriza monotropoide

Relacionada con plantas de la familia Monotropaceae, dado que este tipo de plantas son aclorófilas, y necesitan de esta micorriza para obtener nutrientes (Andrade-Torres, 2010).

2.2.6. Micorriza orquideoide

Es un tipo de micorriza específica para orquídeas, pues esta depende del hongo micorrízico para poder germinar y desarrollarse (Mosquera-Espinosa et al., 2010; Kaur, 2020; Romero-Salazar et al., 2022).

2.3. Micorrizas de orquídeas

El término micorriza orquideoide hace referencia a la relación simbiótica entre las raíces de orquídea y un hongo (Rivas et al., 1998). La mayoría de los hongos que forman asociaciones con las orquídeas pertenecen al género-forma *Rhizoctonia*, perteneciente a la clase de los Basidiomicetos (Kaur, 2020). Este género-forma en su fase asexual presenta un micelio incoloro, que oscurece con el tiempo; además, presenta ramificaciones en ángulo recto con

respecto a la hifa principal. Los géneros *Ceratobasidium*, *Tulasnella*, *Ypsilonidium*, *Sebacina* y *Thanatephorus* se encuentran dentro de la fase sexual de *Rhizoctonia*, los cuales pueden ser diferenciados por sus estructuras reproductivas (Andrade-Torres, 2010; Mosquera-Espinosa et al., 2010).

Los hongos micorrízicos se caracterizan por originar una estructura denominada ‘pelotón’, que es un enrollamiento hifal, el cual es degradado por las orquídeas para obtener nutrientes (Mosquera-Espinosa et al., 2010). Esta estructura varía en cuanto a forma, tamaño y arreglo de la masa hifal (Romero-Salazar et al., 2022). Es importante destacar que las hifas de los hongos micorrízicos pueden penetrar los tejidos de la orquídea en todas sus etapas de desarrollo, invadiendo la testa, los protocormos o la corteza de las raíces (Kaur, 2020).

2.4. Hongo micorrízico del género *Ceratobasidium*

Ceratobasidium es un género perteneciente a la clase de los Basidiomicetos, del género-forma *Rhizoctonia* (Pereira et al., 2003). Las especies de *Ceratobasidium* son saprótrofos que habitan en el suelo, produciendo cuerpos frutales en tallos muertos y restos de hojas, pero principalmente han sido aislados de las raíces de orquídeas (Sneh et al., 1991).

Los hongos del género *Ceratobasidium* pueden asociarse con una amplia variedad de orquídeas neotropicales y de otros hábitats, lo que lo convierte en un importante hongo para la conservación y preservación de orquídeas en peligro de extinción (Mosquera-Espinosa et al., 2010).

3. Germinación de orquídeas

3.1. Germinación en el medio silvestre

Las semillas de las orquídeas no pueden germinar por sí solas en su hábitat natural debido a que no poseen endospermo (Tsulsiyah et al., 2021). Tan solo el 1 o 2 % de semillas germinan de un total de un millón, y de estas, tan solo una o dos plantas llegan a la etapa de adultez después de dos o tres años (Arias Oña, 2020; Ordoñez et al., 2016). Por esta razón, las orquídeas requieren de una asociación simbiótica con hongos micorrízicos para poder germinar y desarrollarse, pues estos proporcionan a las plantas los azúcares y nutrientes necesarios hasta que la planta pueda fabricar sus propios nutrientes (Lopes Ferreira et al., 2015). Sin embargo, solo las orquídeas no fotosintéticas mantienen dicha relación hasta su estado adulto (Mosquera-Espinosa et al., 2010).

Las orquídeas pueden asociarse con diferentes tipos de hongos en todas sus etapas de desarrollo, desde una asociación con las semillas o a su vez, a lo largo de su ciclo de vida. Además, cada especie de orquídea prefiere a sus hongos simbióticos dependiendo del nicho ambiental en el que prosperan, ya sean terrestres o epífitas (Kaur, 2020).

La relación entre los hongos micorrízicos y las orquídeas difiere con cualquier otro tipo de simbiosis, dado que empieza como una relación unidireccional en la cual el hongo aporta nutrientes a las semillas sin recibir nada a cambio. Sin embargo, se convierte en una relación beneficiosa mutuamente cuando la orquídea crece, pues esta puede realizar la fotosíntesis, y brindarle al hongo carbono necesario y refugio (Yeh et al., 2019; Romero-Salazar et al., 2022).

3.2. Germinación *in vitro*

Las técnicas de cultivo *in vitro* son alternativas viables para la germinación y crecimiento de plántulas de orquídeas en un período corto de tiempo, en comparación a la germinación en su hábitat natural. Además, estas técnicas juegan un papel importante para la conservación y propagación de especies amenazadas o en peligro de extinción (Salazar-Mercado & Delgado-Botello, 2020). Existen dos formas de reproducir orquídeas y que son aptas para cualquier especie: asexual o sexualmente. La primera permite producir clones de especies mejoradas con fines comerciales u ornamentales, mientras que la reproducción sexual, realizada a través de sus semillas, es utilizada para mantener la variabilidad genética (Sorgato et al., 2015).

Las técnicas de germinación *in vitro* pueden ser asimbióticas o simbióticas, dependiendo de la especie y las necesidades de cada orquídea (Salazar-Mercado & Delgado-Botello, 2020). Sin embargo, cada especie requiere de un método específico para su reproducción (Díaz-Álvarez et al., 2015). Por otro lado, existen diversos factores que pueden afectar la germinación *in vitro* como la condición de las semillas, las condiciones físicas de germinación y la composición del medio de cultivo (Chen et al., 2015).

Los métodos de germinación *in vitro* permiten mejorar la tasa de germinación de semillas de orquídeas, con la reducción en un 85 % de tiempo en comparación con métodos tradicionales (Vasco Ávila, 2020; Ayuso Vilaboa, 2021). También han demostrado ser una gran estrategia de conservación *ex situ* porque permite la producción de un gran número de plantas en un corto periodo de tiempo (Pérez Martínez & Castañeda Garzón, 2016) y facilitan la germinación de aproximadamente un 90 % de las semillas viables de las cápsulas (Vasco Ávila, 2020).

3.3. Germinación simbiótica

En el caso de las orquídeas, la germinación *in vitro* es conocida como una alternativa eficiente para su producción y como herramienta para la conservación y reintroducción de especies amenazadas o en peligro de extinción (Vasco Ávila, 2020). Para llevar a cabo la germinación simbiótica en condiciones *in vitro*, en un medio agar sólido se siembran las semillas junto con un inóculo de hongo micorrízico que tenga afinidad con la orquídea (Pujasatria et al., 2020). Realizar una germinación simbiótica puede resultar más eficiente si se cuenta con el hongo micorrízico apropiado para la especie de orquídea, debido a que acelera el proceso de germinación y desarrollo temprano de la planta (Otero Ospina & Bayman, 2009; Tsulsiyah et al., 2021).

3.4. Germinación asimbiótica

El cultivo *in vitro* de semillas de orquídeas de forma asimbiótica se da cuando se proporciona un medio de cultivo que aporte de forma exógena azúcares, aminoácidos y vitaminas a las semillas (Alghamdi, 2019). Para el cultivo asimbiótico, el medio Murashige & Skoog (MS) es el más utilizado para la germinación *in vitro* de diversas especies de orquídeas debido a su alto contenido de vitaminas, carbohidratos y nutrientes, dado que ha demostrado resultados óptimos de germinación y crecimiento (Hunhoff et al., 2018).

3.5. Medios de cultivo empleados

- **Murashige & Skoog (MS) modificado de coco**

El medio MS es el apropiado para la germinación de orquídeas dado que aporta un alto contenido de vitaminas, carbohidratos y nutrientes a las semillas (Hunhoff et al., 2018). Además, se puede modificar el medio MS añadiendo sustratos orgánicos como banana, piña, agua de coco o papa, con el fin de suministrar más nutrientes y potenciar la germinación de semillas (Chen et al., 2015; Nguyen et al., 2022; Salazar-Mercado & Osorio-Jaimes, 2022)

- **Oat Meal Agar (OMA)**

Este medio de cultivo es utilizado comúnmente para la germinación simbiótica entre orquídeas y un hongo micorrízico. La avena, dado que es un cereal, aporta vitaminas y azúcar al hongo, el cual favorece a la germinación de las semillas (Zettler et al., 2007). Una mayor cantidad de avena añadida al medio promueve una mejor germinación y desarrollo de protocormos de orquídeas en simbiosis con el hongo micorrízico (Mala et al., 2017).

- **Papa Dextrosa Agar (PDA)**

Es uno de los medios universales para crecimiento y reproducción de hongos, preparado a base de papa, dextrosa y agar. La papa proporciona carbono y vitaminas al hongo, mientras que la dextrosa es la fuente de azúcar y energía (Atlas, 2010; Wantini & Octavia, 2018).

Capítulo II

4. Materiales y métodos

4.1. Área de estudio

La experimentación se llevó a cabo en el Laboratorio de Micropropagación en el Orquideario de la Universidad de Cuenca en el Campus Balzay y en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Azuay.

4.2. Reproducción del hongo micorrízico y comprobación de sus características macro y microscópicas

El hongo micorrízico *Ceratobasidium* sp. fue aislado e identificado previamente de las raíces de orquídeas nativas de tres niveles altitudinales de la sierra sur ecuatoriana; en el marco del proyecto: “Estudio de la relación simbiótica orquídea – micorriza en la Provincia del Azuay, Ecuador” (Durán-López et al, 2019).

Para este estudio se reprodujo el hongo micorrízico, se inoculó micelio del hongo proveniente de una cepa anterior, aislada en medio PDA en cajas Petri y se lo incubó a temperatura controlada de 25 °C. Se realizaron 30 replantes en total en este estudio, con el fin de tener un hongo de al menos 10 días de incubación antes de usarlo en las siembras simbióticas.

Además, se analizaron las características macro y microscópicas del hongo micorrízico. Se observó que el micelio aéreo del hongo fue esponjoso, presentó un color pardo, y que su crecimiento se dio en forma de anillos concéntricos (Hoang et al., 2017). Para el análisis de las características microscópicas, se realizó la prueba de cinta y se coloreó con azul de metileno al 1 %. Se colocó la cinta en un portaobjetos, y mediante el microscopio (aumento 10x), se verificó que las hifas formaran ángulos de 90° y presentaran constricciones en el punto de origen de su ramificación, hifas tabicadas cerca del punto de crecimiento y número de núcleos (uni, bi o multinucleadas) (Medina et al., 2012).

4.3. Selección de las especies de orquídeas y procesamiento de sus semillas

4.3.1. Recolección de cápsulas y deshidratación de las semillas de orquídeas

Las semillas de *Epidendrum* sp. se obtuvieron de cápsulas maduras recolectadas en el Campus Central de la Universidad de Cuenca, en diciembre de 2022. Estas cápsulas presentaban coloración en tonos verdes y morados, lo que indicaba que eran cápsulas maduras (Seaton & Ramsey, 2009). Las cápsulas recolectadas fueron envueltas en papel

aluminio y colocadas en un frasco de vidrio (volumen 50 ml), con gel de sílice a temperatura ambiente para ser deshidratadas durante cinco días (Correa et al., 2013; Giraldo & González, 2018; Franceschi et al., 2019). Después del periodo de deshidratación, las semillas se almacenaron en frascos ámbar estériles (volumen 4ml) con gel de sílice y puestas en refrigeración a 4 °C hasta su procesamiento.

Por otro lado, las semillas de *Odontioda* sp. fueron obtenidas de cápsulas maduras del Banco de semillas del Orquideario de la Universidad de Cuenca. Dichas semillas se encontraban almacenadas en refrigeración a 4 °C desde agosto del año 2022. *Odontioda* sp. permaneció en refrigeración seis meses y *Epidendrum* sp. cuatro meses aproximadamente. Ambas especies fueron recolectadas en una zona altitudinal de 2 560 m.s.n.m. correspondientes a la ciudad de Cuenca, Azuay.

4.3.2. Prueba de viabilidad de las semillas de las orquídeas

Con el fin de verificar la viabilidad, se tomó una muestra de 1 mg de semillas de cada especie y se observaron en el microscopio marca Nikon (aumento de 10x) para corroborar si presentaban un embrión. Además, se aplicó la prueba de Tetrazolio, la cual consistió en sumergir 200 semillas de cada especie de orquídea en una solución compuesta de 1 g de Tetrazolio (2,3,5 - cloruro trifenil tetrazolio: solución incolora) y 9 ml de agua destilada, durante 24 horas en oscuridad (Salazar-Mercado et al., 2020). Transcurrido este tiempo, se tomó una muestra de cada especie y se observó al microscopio (aumento 10x) si existían embriones teñidos de color rojo. De esta manera se comprobó que las células del embrión estaban vivas y tenían potencial para germinar.

Para determinar el porcentaje de viabilidad de semillas sembradas en los diferentes tratamientos, se contó el número de semillas que presentaban embrión y se utilizó la fórmula 1 propuesta por Hossain et al., (2010):

$$(1) \frac{\text{Número de semillas que presentan embrión}}{\text{Número total de semillas}} \times 100$$

4.4. Protocolo de siembra de semillas

Todo el procedimiento experimental de siembra simbiótica y asimbiótica se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Azuay, dentro de la cámara de flujo laminar (modelo: CSB 120) para evitar la contaminación.

4.4.1. Desinfección de semillas

Confirmada la viabilidad, se pesaron las semillas sobre un pedazo de papel filtro (medidas: 2 cm x 2 cm) en una balanza analítica BOECO. De acuerdo con estudios previos y al *stock* limitado de semillas, se colocaron las semillas hasta alcanzar un peso de 1,8 a 2 mg, equivalente a 200 semillas aproximadamente (Bermeo Criollo & Sari Cumbe, 2018; Beltrán Aguilar & Solórzano Chávez, 2022). Después, cada papel filtro se cerró como un sobre para la desinfección y lavado de las semillas.

El proceso de desinfección se realizó dentro de la cámara de flujo, se colocaron los sobres con las semillas dentro de un tubo Falcon, con una solución desinfectante (contenido: 90 ml de agua estéril, 5 ml de etanol y 5 ml de hipoclorito de sodio) hasta cubrir por completo los sobres. Se dejó reposar durante diez minutos, seguido se realizaron dos lavados con agua estéril (Seaton & Ramsey, 2009).

4.4.2. Preparación de medios de cultivo para los ensayos de germinación *in vitro*

Los medios de cultivo utilizados se prepararon a partir de la formulación de componentes puros, homogeneizados y autoclavados, los cuales se describen a detalle en el ANEXO A. En este estudio se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

- a) **Medio Oat Meal Agar (OMA)**, constituido por avena y agar, es una fuente de carbohidratos complejos, lo que favorece la simbiosis.
- b) **Murashige Skoog (MS) modificado de coco**, constituido por carbón activado, azúcar, vitaminas y agua de coco, óptimo para la germinación y desarrollo de las plántulas.
- c) **Medio Patata Dextrosa Agar (PDA)**, constituido por puré de papa, azúcar y agar, adecuado para el crecimiento y aislamiento de hongos.

4.4.3. Ensayos de germinación *in vitro* en condiciones asimbióticas y simbiótica

En la Tabla 4 se detallan los tratamientos utilizados y el procedimiento de siembra para evaluar la germinación simbiótica y asimbiótica de las dos especies de orquídeas.

Tabla 4. Descripción de los tratamientos asimbióticos y simbiótico para cada especie de orquídea

Tratamientos	Descripción	Procedimiento de siembra
Tratamiento 1 (MS)	Medio de cultivo MS + semillas de orquídea: control positivo.	Se extendieron las semillas sobre toda la superficie.
Tratamiento 2 (OMA -)	Medio de cultivo OMA + semillas de orquídea: control negativo.	Se extendieron las semillas sobre toda la superficie
Tratamiento 3 (OMA + HM)	Medio de cultivo OMA + semillas de orquídea + hongo micorrízico <i>Ceratobasidium</i> sp.: tratamiento simbiótico	Se colocó un pedazo de agar con micelio (tamaño aproximado de 1 cm x 1 cm) y luego se extendieron las semillas de orquídea alrededor, evitando tocar el hongo inoculado

A continuación, se detalla el diseño experimental realizado para cada especie de orquídea (Tabla 5).

Tabla 5. Diseño experimental para las dos especies de orquídeas

Especie	No. de ensayos	Tratamientos por ensayo	Réplicas por tratamiento	Total de cajas Petri por tratamiento	Total de cajas Petri por especie
<i>Odontioda</i> sp.	3	3	10	30	90
<i>Epidendrum</i> sp.	3	3	10	30	90
Total de cajas Petri del experimento					180

4.4.4. Siembra de semillas

Luego del proceso de desinfección de las semillas, se abrieron los sobres con un bisturí y pinzas estériles para esparcir las semillas en el medio de cultivo contenido en las cajas Petri de cada tratamiento. Es importante destacar que a las semillas que fueron sembradas en las cajas Petri con medio MS modificado, se le agregó 0,5 ml de agua estéril para tener una mejor

dispersión de las semillas en el medio de cultivo. Por otro lado, para el tratamiento simbiótico (OMA + HM), se colocó en el centro de la caja Petri un cuadrado de aproximadamente 2 cm x 2 cm de medio de cultivo inoculado de 10 días con *Ceratobasidium* sp. Posteriormente, se colocaron las semillas alrededor del inóculo, evitando tener contacto directo con el hongo micorrízico, caso contrario puede dar lugar a una competencia por nutrientes o una invasión potencial de las células de la orquídea por parte del hongo (Shimura et al., 2007; Pujasatria et al., 2020).

Al finalizar, cada tratamiento fue etiquetado y envuelto en papel aluminio para ser almacenados dentro de la cámara de flujo por un período de siete días en completa oscuridad, a temperatura ambiente.

4.4.5. Ingreso a la cámara de germinación

Transcurrido el período de oscuridad, se retiró el papel aluminio de las cajas para trasladarlas a la cámara de germinación del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Azuay. La cámara de germinación fue configurada para que las semillas reciban un período de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con una intensidad de 5 000 lúmenes, y en un rango de temperatura de 24 a 28 °C aproximadamente, las 24 horas (Yan & Chen, 2020).

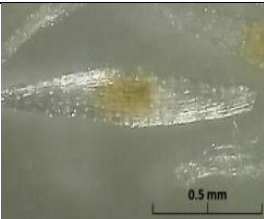
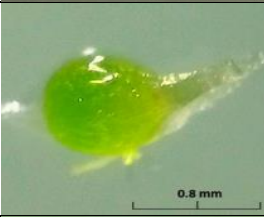

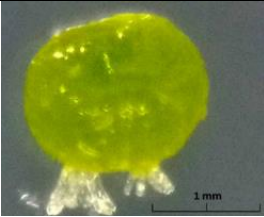
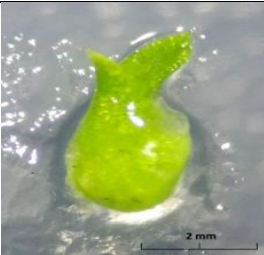

4.5. Ensayos de germinación *in vitro* en condiciones asimbióticas y simbiótica

La germinación de las semillas y el desarrollo de protocormos se revisaron inicialmente a intervalos de cinco días (5, 10, 15, 20 días). Esto debido a estudios previos, en los que dentro de los primeros cinco días ya se presentaban cambios en las semillas (Durán-López et al., 2019). A partir de los 20 días el intervalo de observación fue de 10 días hasta completar el período total en la cámara de germinación (30, 40, y 50 días) (Dalam et al., 2011; Durán-López et al., 2019; Shao et al., 2020).

4.6. Análisis de la germinación

Para el análisis de germinación se utilizó la metodología de los estadios de desarrollo planteada por Stewart & Zettler (2002) y modificada por Salazar-Mercado & Delgado-Botello (2020). En esta metodología se cataloga cada estadio de cero a cinco, como indica la Tabla 6. Para la observación de los diferentes estadios de germinación alcanzados en los tres tratamientos se utilizó un estereo microscopio (marca UNICO), y se llevó un registro del período de aparición de cada estadio en los tres tratamientos.

Tabla 6. Estadios de germinación de semillas de orquídeas

Estadio	Descripción	Fotografía de referencia
E0	Semillas sin embrión germinado	
E1	Aumento del tamaño del embrión	
E2	Rotura de testa	
E3	Presencia de rizoides	
E4	Aparición de la primera hoja	
E5	Elongación de la primera hoja y desarrollo de plántula	

Nota: Estadio 0 (E0), estadio 1 (E1), estadio 2 (E2), estadio 3 (E3), estadio 4 (E4), estadio 5 (5). Información obtenida del estudio de Salazar-Mercado & Delgado-Botello (2020).

4.6.1. Cálculo del Índice de germinación

El índice de germinación permite evaluar la capacidad de las semillas para germinar y establecer plántulas. Para determinar el porcentaje de germinación de las semillas, se utilizó la fórmula 2 modificada a partir de Spoerl (1948):

$$(2) \text{ IG} = \frac{(N_1 + N_2 * 2 + N_3 * 3 + N_4 * 4 + N_5 * 5)}{(N_0 + N_1 + N_2 + N_3 + N_4 + N_5)} * 100$$

Donde IG es el índice de germinación; N_0 es el número de semillas en el estadio cero (E0), N_1 es el número de semillas en el estadio uno (E1), y así sucesivamente hasta N_5 que corresponde al estadio cinco (E5).

En esta fórmula se debe tener en cuenta que, a pesar de que las semillas comiencen a germinar, pueden ser incapaces de desarrollarse hasta convertirse en una plántula. Por lo tanto, el IG puede ser alto por el estadio alcanzado, pero su porcentaje de germinación de semillas aún podría ser cercano cero (Yang et al., 2021).

4.6.2. Evaluación del proceso de germinación de las semillas

Al finalizar el experimento, se evaluó el proceso de germinación de las semillas de las dos especies de orquídea. Para esto se midió el diámetro del embrión de 10 semillas por cada tratamiento, mediante el uso de microscopio digital calibrado (escala: 0,1 mm) marca CoolingTech Digital Microscope. El objetivo de esta medición fue obtener un valor promedio del tamaño final del embrión y evaluar su crecimiento (Maldonado et al., 2020). Se analizó microscópicamente el cambio de los estadios de germinación de las dos especies a los 5, 20 y 50 días. También, al finalizar el experimento se realizó un análisis cualitativo a las semillas de las orquídeas, mediante el uso del estéreo microscopio para determinar la presencia o ausencia de rizoides en los tres tratamientos.

4.6.3. Análisis estadístico

Para evaluar la germinación de las semillas con los tratamientos asimbióticos y simbiótico, se tomó en cuenta el porcentaje de germinación que presentaron las dos especies al finalizar el tiempo de experimentación. Los análisis estadísticos se realizaron en el software R-Studio versión 4.2.2. Para *Odontioda* sp. se utilizaron los datos del estadio uno (E1), dado que no hubo más cambios en su germinación hasta el final del experimento. Para *Epidendrum* sp. se analizaron los estadios uno y dos (E1 y E2); pero no se analizó el estadio tres (E3) porque no había suficientes datos hasta los 50 días de observación.

Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA), para el cual, todos los datos se transformaron con la raíz cuadrada para normalizar la variación. Esto con el fin de realizar un análisis de varianza (ANOVA), seguido de una prueba *post-hoc* de Tukey con un nivel de significancia del 5 % ($p < 0,05$), para ver las diferencias significativas entre los tratamientos para cada especie en su máximo estadio alcanzado (Gutiérrez Pulido & Vara Salazar, 2008).

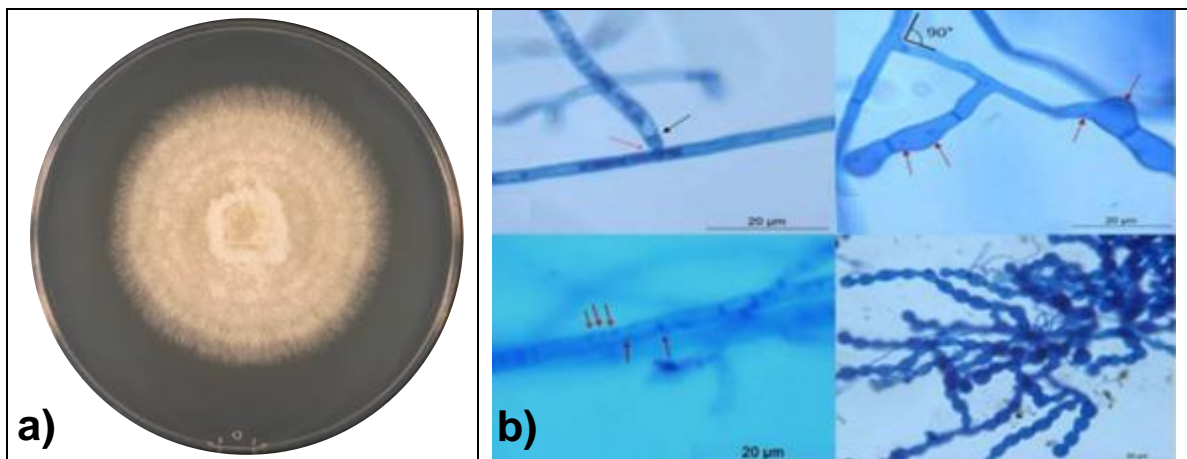
Capítulo III

5. Resultados

5.1. Análisis de las características macro y microscópicas del hongo micorrízico *Ceratobasidium* sp.

Después de realizar el primer replante del hongo micorrízico *Ceratobasidium* sp., se procedió a comprobar sus características macro y microscópicas. Se comprobó que el micelio aéreo del hongo fue esponjoso y su crecimiento se dio en forma de anillos concéntricos (Figura 3a). En cuanto a sus características microscópicas, se observó que las hifas formaban ángulos de 90°, constricciones en el punto de origen de la ramificación de la hifa y número de núcleos multinucleadas (Figura 3b).

Figura 3. Características a) macroscópicas y b) microscópicas del hongo *Ceratobasidium* sp.

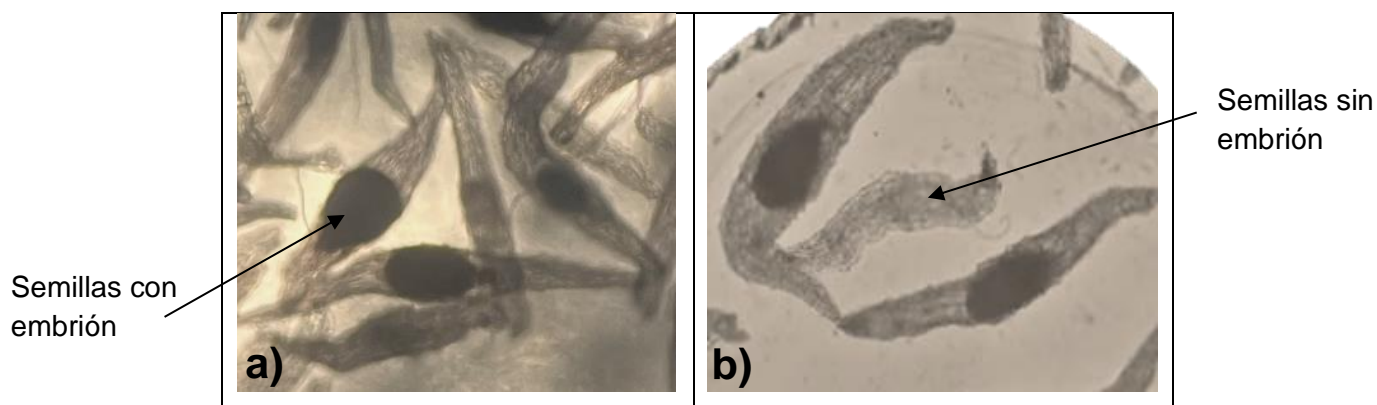


Nota: Fotografías de referencia tomadas de los estudios de Hoang et al. (2017) y Montes (2016).

5.2. Viabilidad de las semillas de *Odontioda* sp. y *Epidendrum* sp.

Se pudo observar que las semillas viables de ambas especies de orquídeas presentaron embrión, a diferencia de las semillas no viables que se encontraban vacías (Figura 4).

Figura 4. Semillas con y sin embrión de a) *Odontioda sp.*; y b) *Epidendrum sp.*



De acuerdo con los resultados de la prueba de Tetrazolio al aplicar la fórmula 1 de viabilidad, se obtuvo un porcentaje de semillas viables con el embrión teñido del 96 % para *Odontioda sp.* y del 79 % para *Epidendrum sp.* (Figura 5).

Figura 5. Semillas de *Epidendrum sp.* con el embrión teñido de rojo por el Tetrazolio vista en el microscopio (aumento 10x)



Los resultados presentados en la tabla 7 y 8 muestran un porcentaje entre el 80 y 90 % de semillas viables sembradas para *Odontioda sp.* en los tres tratamientos, mientras que para *Epidendrum sp.* el porcentaje de viabilidad alcanzó un 70 %.

Tabla 7. Detalle de las semillas sembradas en los tres tratamientos de *Odontioda sp.*

Tratamientos	Semillas totales	Semillas viables (%)	Semillas no viables (%)
MS	22 302	89,72 %	10,28 %
OMA (-)	16 474	84,02 %	15,98 %
OMA + HM	16 156	90,54 %	9,46 %

Nota: MS: control positivo, OMA (-): control negativo, OMA + HM: OMA + hongo micorrízico

Tabla 8. Detalle de las semillas sembradas en los tres tratamientos de *Epidendrum sp.*

Tratamientos	Semillas totales	Semillas viables (%)	Semillas no viables (%)
MS	15 807	72,34 %	27,66 %
OMA (-)	13 645	77,55 %	22,43 %
OMA + HM	13 585	74,00 %	25,98 %

Nota: MS: control positivo, OMA (-): control negativo, OMA + HM: OMA + hongo micorrízico

Es importante destacar que durante el proceso de desinfección se perdieron semillas, pues al ser diminutas se quedaban adheridas en el papel filtro. Así mismo, al finalizar el conteo del experimento (50 días), los tratamientos OMA (-) y OMA + HM de las dos especies cuentan con un número inferior de semillas totales en comparación a MS. Esto debido a que no fue fácil visualizar y contabilizar todas las semillas en el medio de cultivo porque se encontraban superpuestas; especialmente en el tratamiento simbiótico (OMA + HM), en el cual gran cantidad de semillas estaban sobrepuestas y cubiertas por el hongo micorrízico.

5.3. Cambios de los estadios de germinación con respecto al tiempo

De acuerdo con la revisión periódica establecida previamente en la metodología, se observó la aparición de los diferentes estadios de germinación en los tratamientos de cada especie. Las semillas de *Odontioda sp.* no presentaron cambios en los tres tratamientos durante los cinco primeros días de revisión. Sin embargo, en el día 15 ya se evidenciaron semillas en estadio uno en los tratamientos OMA (-) y OMA + HM. Por otro lado, en el medio MS no se observaron cambios hasta el día 20. A partir de esta última revisión (20 días), no hubo más cambios en las semillas de los tres tratamientos hasta el final del experimento (Tabla 9).

Tabla 9. Estadios de germinación de *Odontioda sp.* con respecto al tiempo

Tratamientos	Días de cambio de los diferentes estadios						
	5	10	15	20	30	40	50
	Estadios alcanzados						
MS	E0	E0	E0	E1	E1	E1	E1
OMA (-)	E0	E0	E1	E1	E1	E1	E1
OMA + HM	E0	E0	E1	E1	E1	E1	E1

Nota: Estadio 0 (E0), Estadio 1 (E1).

Según los resultados obtenidos, *Epidendrum* sp. presentó cambios de estadio en sus semillas en menor tiempo a comparación con *Odontioda* sp. (Tabla 10). A los cinco días de revisión, los tratamientos OMA (-) y OMA + HM ya presentaban un aumento en el tamaño del embrión; no obstante, el tratamiento MS no experimentó cambios en sus semillas. A los 15 días de revisión, MS presentó semillas en estadio uno, mientras que OMA (-) y OMA + HM ya presentaban semillas con rotura de la testa (estadio dos). Transcurridos 20 días, el tratamiento MS alcanzó el estadio dos, y no presentó más cambios hasta el final del experimento. Por otro lado, OMA + HM y OMA (-) a los 30 días presentaron semillas con rizoides (estadio tres) y se mantuvieron así hasta el último día de revisión (50 días).

Tabla 10. Estadios de germinación de *Epidendrum* sp. con respecto al tiempo

Tratamientos	Días de cambio de los diferentes estadios						
	5	10	15	20	30	40	50
	Estadios alcanzados						
MS	E0	E0	E1	E2	E2	E2	E2
OMA (-)	E1	E1	E2	E2	E3	E3	E3
OMA + HM	E1	E1	E2	E2	E3	E3	E3

Nota: Estadio 0 (E0), Estadio 1 (E1), Estadio 2 (E2), Estadio 3 (E3).

5.4. Porcentaje de semillas en los diferentes estadios de germinación a los 50 días

La Tabla 11 indica el porcentaje de semillas de *Odontioda* sp. en cada estadio alcanzado hasta el final del experimento. Se observa que, del total de semillas viables sembradas en el tratamiento MS, el 81,12 % de semillas no presentaron cambios hasta el último día de revisión del cultivo. Por el contrario, un porcentaje superior al 60 % de las semillas de los tratamientos OMA + HM y OMA (-) alcanzaron el estadio uno de germinación, siendo los mejores resultados de los tres tratamientos para esta especie.

Tabla 11. Porcentaje de semillas en los diferentes estadios de germinación de *Odontioda* sp. a los 50 días

Tratamientos	Total de semillas viables	Porcentaje de semillas en los diferentes estadios de germinación a los 50 días					
		E0	E1	E2	E3	E4	E5
MS	20 009	81,12 %	18,89 %	N/A	N/A	N/A	N/A
OMA (-)	13 842	35,30 %	64,71 %	N/A	N/A	N/A	N/A
OMA + HM	14 627	32,73 %	67,27 %	N/A	N/A	N/A	N/A

Nota: Se colocó N/A en los estadios no alcanzados por las semillas.

En cuanto a las semillas de *Epidendrum* sp., los tratamientos OMA (-) y OMA + HM mostraron los mejores resultados pues alcanzaron un estadio tres de desarrollo a los 50 días del experimento, con 0,24 % y 0,26 % de semillas respectivamente. En el tratamiento con medio MS solo el 0,16 % de semillas alcanzaron el estadio dos de germinación (Tabla 12).

Tabla 12. Porcentaje de semillas en los diferentes estadios de germinación de *Epidendrum* sp. a los 50 días

Tratamientos	Total de semillas viables	Porcentaje de semillas en los diferentes estadios de germinación a los 50 días					
		E0	E1	E2	E3	E4	E5
MS	11 435	53,67 %	46,17 %	0,16 %	N/A	N/A	N/A
OMA (-)	10 582	35,98 %	46,34 %	17,44 %	0,24 %	N/A	N/A
OMA + HM	10 053	30,45 %	50,20 %	19,09 %	0,26 %	N/A	N/A

Nota: Se colocó N/A en los estadios no alcanzados por las semillas.

5.5. Germinación simbiótica vs germinación asimbiótica

En la Tabla 13 se presentan los índices de germinación (IG) de las dos especies de orquídeas estudiadas. Como se puede observar, la especie *Epidendrum* sp. presentó un IG mayor a *Odontioda* sp. en los tres tratamientos; esto debido a que algunas las semillas de *Epidendrum* sp. alcanzaron un estadio tres de germinación.

Los tratamientos OMA (-) y OMA + HM son los que presentan un mayor IG para las dos especies en comparación con MS. Sin embargo, el tratamiento simbiótico (OMA + HM) obtuvo un mayor IG para la especie *Epidendrum* sp., con una diferencia del 8 % sobre el tratamiento asimbiótico (OMA (-)). Por otro lado, la especie *Odontioda* sp. tuvo tan solo un 2,5 % de diferencia entre los IG del tratamiento simbiótico (OMA + HM) versus el asimbiótico OMA (-).

Tabla 13. Índice de germinación a los 50 días para las dos especies de orquídeas estudiadas










Tratamientos	Índice de germinación (IG)	
	<i>Odontioda</i> sp.	<i>Epidendrum</i> sp.
MS	18,66 %	46,39 %
OMA (-)	64,85 %	81,97 %
OMA + HM	67,34 %	89,97 %

5.6. Evaluación cualitativa de la germinación con respecto al tiempo

Transcurridos los 50 días del experimento, se observó que, a nivel microscópico, las semillas de las dos especies de orquídeas presentaron características morfológicas similares a las descritas en la Tabla 6 por Stewart & Zettler (2002) y modificada por Salazar-Mercado & Delgado-Botello (2020).

Del análisis cualitativo realizado se pudo observar que las semillas de *Odontioda* sp. tuvieron un desarrollo lento, dado que, transcurridos los 50 días del experimento, las semillas solo incrementaron el tamaño de su embrión en los tres tratamientos, alcanzando el estadio uno (E1) de germinación (Tabla 14).

Tabla 14. Estructuras morfológicas de semillas de *Odontioda* sp. en los estadios de germinación vistas en el estéreo microscopio

Tratamientos	5 días	20 días	50 días
MS			
Estadio alcanzado	E0	E1	E1
OMA (-)			
Estadio alcanzado	E0	E1	E1
OMA + HM			
Estadio alcanzado	E0	E1	E1

Nota: Estadio 0 (E0), Estadio 1 (E1). Elaboración propia (2023)

Por otro lado, las semillas de *Epidendrum* sp. tuvieron una mejor germinación que *Odontioda* sp. A los 20 días los tres tratamientos presentaron semillas en estadio dos (E2). En la revisión final a los 50 días, las semillas en OMA (-) y OMA + HM alcanzaron el estadio tres (E3), con la presencia de rizoides; mientras que, las semillas de MS seguían en estadio dos (E2) de germinación. Las semillas no presentaron más cambios hasta el final del experimento.

Tabla 15. Estructuras morfológicas de semillas de *Epidendrum* sp. en los estadios de germinación vistas en el estéreo microscopio

Tratamientos	5 días	20 días	50 días
MS			
Estadio alcanzado	E0	E2	E2
OMA (-)			
Estadio alcanzado	E1	E2	E3
OMA + HM			
Estadio alcanzado	E1	E2	E3

Nota: Estadio 0 (E0), Estadio 1 (E1), Estadio 2 (E2), Estadio 3 (E3). Elaboración propia (2023)

5.5. Evaluación del proceso de germinación de las semillas

Al final del experimento se midió el diámetro del embrión de 10 semillas de cada tratamiento, y se comparó con el diámetro inicial del embrión de la semilla. El tamaño inicial del embrión de las semillas de *Odontioda* sp. es inferior al de *Epidendrum* sp. (Tabla 16). En cuanto a las semillas de *Odontioda* sp. en los tratamientos OMA (-) y OMA + HM, el aumento del tamaño

del embrión fue de 2,7 y 2,9 veces respectivamente, en comparación con el diámetro inicial. En el tratamiento MS el incremento fue de 1,5 veces al tamaño inicial del embrión. Para *Epidendrum* sp., en los tratamientos OMA (-) y OMA + HM, el embrión tuvo un aumento de 2,5 veces más que el tamaño inicial; mientras que en el tratamiento MS el aumento del embrión fue 1,8 veces.

Tabla 16. Diámetros promedio de los embriones de las dos especies de orquídeas al finalizar el experimento (50 días).

Especies	Tamaño inicial (mm)	Diámetro promedio del embrión (mm)		
		MS	OMA (-)	OMA + HM
<i>Odontioda</i> sp.	0,081	0,121	0,221	0,241
<i>Epidendrum</i> sp.	0,125	0,227	0,308	0,323

Nota: Los valores corresponden al promedio del diámetro de los embriones medidos al final del experimento.

5.8. Análisis estadístico

5.8.1. Análisis de la varianza de *Odontioda* sp. del estadio uno de germinación

El resultado de la prueba ANOVA arrojó un $F = 60,85$ y valor $p < 2e-16$, lo que indica que hay diferencias significativas entre los tratamientos considerados en el análisis para el estadio uno (E1) de *Odontioda* sp. De acuerdo con los resultados de la prueba de Tukey, se observaron diferencias significativas entre el tratamiento MS y los tratamientos OMA + HM y OMA (-) en relación al porcentaje de semillas en estadio uno (E1).

Los resultados muestran que las medias de los tratamientos OMA + HM y OMA (-) son mayores en comparación con el tratamiento MS (Tabla 17). Estos hallazgos indican que el tratamiento OMA + HM fue el que obtuvo una mayor cantidad de semillas en estadio uno. Es evidente que el tratamiento OMA + HM tuvo un impacto significativo en la promoción de la germinación en comparación con el tratamiento MS y el tratamiento OMA (-).

Tabla 17. Medias y desviaciones estándar del estadio uno de germinación (E1) para los tratamientos en *Odontioda sp.*

Tratamientos	Media de los porcentajes de germinación en E1	Desviación estándar	Grupos
OMA + HM	2,54	0,485	a
OMA (-)	2,48	0,586	a
MS	1,32	0,348	b

Nota: Las letras a y b se utilizan para indicar que hay diferencias significativas entre los tratamientos, la misma letra indica que no hay diferencias significativas.

5.8.2. Análisis de la varianza de *Epidendrum sp.* del estadio uno y dos de germinación

El resultado de la prueba de ANOVA arrojó un $F = 0,163$ y un valor $p = 0,849$, lo indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos considerados en el análisis, para el estadio uno (E1) de *Epidendrum sp.* De acuerdo con los resultados de la prueba de Tukey, no se observaron diferencias significativas entre los tres tratamientos en relación al porcentaje de semillas en estadio uno (E1).

Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, es importante destacar que el tratamiento OMA + HM exhibió una media ligeramente más alta que los otros tratamientos (Tabla 18). Esto sugiere que el tratamiento OMA + HM obtuvo una mayor cantidad de semillas en estadio uno (E1) en comparación con los tratamientos MS y OMA (-) a los 50 días del experimento.

Tabla 18. Medias y desviaciones estándar del estadio uno de germinación (E1) para los tratamientos en *Epidendrum sp.*

Tratamientos	Media de los porcentajes de germinación en E1	Desviación estándar	Grupos
OMA + HM	2,164	0,442	a
OMA (-)	2,114	0,441	a
MS	2,106	0,374	a

Nota: La misma letra en los grupos indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos.

En cambio, para el estadio dos (E2), el resultado del ANOVA con un $F = 230,6$ y un valor $p < 2e-16$, indica que hay diferencias significativas entre los tratamientos considerados en el análisis para *Epidendrum* sp. De acuerdo con los resultados de la prueba de Tukey, se observaron diferencias significativas entre el tratamiento MS y los tratamientos OMA + HM y OMA (-) en relación al porcentaje de semillas en el estadio dos (E2).

Por otro lado, los resultados mostraron que el tratamiento OMA + HM presenta una media mayor en comparación con OMA (-), lo que indica que fue el tratamiento que obtuvo una mayor cantidad de semillas en el estadio dos (Tabla 19). Por el contrario, el tratamiento MS presentó una media cercana cero, lo que indica que hubo una presencia mínima de semillas en estadios dos. Los resultados resaltan que el tratamiento simbiótico (OMA + HM) tuvo un efecto significativo en la promoción de la germinación en comparación con el tratamiento MS y el tratamiento OMA (-).

Tabla 19. Medias y desviaciones estándar del estadio dos de germinación (E2) para los tratamientos en *Epidendrum* sp.

Tratamientos	Media de los porcentajes de germinación en E2	Desviación estándar	Grupos
OMA + HM	1,387	0,317	a
OMA (-)	1,285	0,316	a
MS	0,05	0,111	b

Nota: Las letras a y b se utilizan para indicar que hay diferencias significativas entre los tratamientos; la misma letra indica que no hay diferencias significativas.

Capítulo IV

6. Discusión

La orquídea *Odontioda sp.* es un híbrido intergenérico, cultivado principalmente por su valor comercial. Esta especie florece una vez al año, y el tiempo que requiere desde la generación del brote hasta su floración es de 10 a 11 meses, por lo que es raro que ocurran múltiples brotes en ese periodo de tiempo. Por el contrario, algunas especies silvestres del género *Epidendrum* pueden producir varios brotes de flores por año (Kubota et al., 2006; Pinheiro & Cozzolino, 2013). Las especies de *Epidendrum* muestran una amplia adaptabilidad reproductiva y poseen características anatómicas que les permiten sobrevivir en diversos entornos (Pinheiro et al., 2010; Rindyastuti et al., 2018). Por esta razón se las conoce como orquídeas colonizadoras debido a que se las puede encontrar en varios hábitats, desde bosques tropicales, dunas, matorrales, páramos andinos, hasta bordes de carreteras, e incluso en áreas perturbadas y degradadas (Hágsater & Wrazidlo, 2020; Trapnell & Hamrick, 2023).

En general, la germinación de las semillas de las orquídeas puede ser un proceso lento y complejo, debido a que dependen de una relación simbiótica que puede tardar meses o años en establecerse (Ma et al., 2022; Zhang et al., 2022). Así mismo, depende del tipo de polinización y del proceso de maduración del fruto, viéndose patrones diferentes en el tiempo de germinación. En condiciones *in vitro*, después de 154 – 200 días de polinización natural se ha logrado un 50% de germinación de semillas; mientras que, un 80 % de semillas germinaron después de 44 días de polinización artificial (Menchaca, 2021).

Adicionalmente, a las orquídeas híbridas les toma más tiempo desarrollarse de forma *ex situ*; como se evidencia en otros estudios de germinación con otras orquídeas híbridas intergenéricas (*A. multiflora* x *R. coelestis* y *Vanda liouvillei* x *Seidenfadenia mitrata*). Estos híbridos desarrollaron una cápsula madura de forma natural después de 160 a 200 días. Así mismo, presentaron estadios tres y cuatro de germinación a los 50 y 113 días de su siembra asimbiótica *in vitro* en medio Vacin y Went (VM) modificado (Jitsopakul et al., 2022, 2023). Esto demuestra que el cambio de un estadio a otro en las orquídeas intergenéricas puede tomar varios meses en suceder como ocurrió con la híbrida *Odontioda sp.* Sus semillas se obtuvieron de una cápsula que tardó un año en madurar en condiciones naturales y al transcurrir los 50 días que duró el experimento solo se observó un aumento en el tamaño de su embrión (estadio uno) en los tratamientos simbiótico y asimbióticos.

Por otro lado, la orquídea *Epidendrum* sp., a los 30 días de la siembra simbiótica presentó los primeros rizoides (estadio tres), lo que indica que el tiempo para cambiar de estadio varía con la especie y también influye el hecho de que *Epidendrum* sp. es una especie silvestre. Esto concuerda con los resultados de la especie *Epidendrum geminiflorum*, sus semillas alcanzaron el estadio tres (formación de protocormos) a las dos semanas de su siembra en medios asimbióticos y simbiótico con el hongo micorrízico *Tulasnella calospora*, pero se mantuvieron así durante ocho semanas hasta pasar a un estadio cuatro de germinación (Quijia-Lamiña et al., 2023). En cambio, la especie *Epidendrum secundum* a los 10 días de su siembra simbiótica *in vitro* ya presentaba agrandamiento de embriones y sus primeros rizoides (Durán-López et al., 2019).

En relación a lo anterior, para evaluar la capacidad de las semillas para germinar se usó la fórmula descrita por Hossain et al., (2010). Las semillas de *Odontioda* sp. y *Epidendrum* sp. presentaron una alta viabilidad, con porcentajes superiores al 80% y 70% respectivamente, en los tres tratamientos evaluados. Sin embargo, debemos tener en cuenta que las semillas de cada especie de orquídea responden de diferente manera al medio de cultivo empleado (Jolman et al., 2022). En los resultados obtenidos de la germinación simbiótica y asimbiótica de este estudio, el IG del tratamiento simbiótico fue superior para las dos especies, con un 87 % para *Epidendrum* sp. y 67 % para *Odontioda* sp., a pesar de que *Epidendrum* sp. tenga un bajo porcentaje de semillas germinadas en estadio tres. Esto lo afirma Yang (2017) cuando menciona que, aunque el porcentaje de germinación de semillas sea cercano a cero puede resultar en un valor alto del IG, debido a que la fórmula del IG pondera el número de semillas que han alcanzado un máximo estadio, dándoles un mayor peso debido a los multiplicadores.

Los altos índices de germinación obtenidos en los tratamientos simbióticos, como se mencionó anteriormente, resaltan la importancia de evaluar el efecto de los hongos micorrízicos. Se ha demostrado que los hongos micorrízicos juegan un papel fundamental en la conservación de las orquídeas, dado que pueden asociarse con diversas especies de todo el mundo (Gang et al., 2017; S. da Cruz et al., 2022). Se ha demostrado que los hongos micorrízicos transfieren nutrientes minerales como nitrógeno (N), fósforo (P) y carbono (C), que favorecen la germinación de semillas y mejoran el porcentaje de germinación simbiótica *in vitro* (Yeh et al. 2019). Se conoce que los miembros de Ceratobasidiaceae promueven la germinación de semillas en una amplia variedad de orquídeas de diferentes hábitats, especialmente de la gama de subfamilias Apostasiodeae, Vanilloideae, Epidendroideae, Orchidoideae (Jolman et al., 2022). Las orquídeas de este estudio pertenecen a la subfamilia Epidendroideae, lo que justifica la afinidad del hongo micorrízico del género *Ceratobasidium* con las dos especies.

En cuanto a la interacción micorriza-orquídea, las orquídeas pueden llegar a ser generalistas, y otras específicas. Generalmente, las orquídeas epífitas son específicas en su interacción micorrízica, y no pueden germinar con un hongo aislado de otra especie de orquídea; mientras que las especies terrestres pueden asociarse con una gran variedad de micobiontes del suelo (Chávez et al., 2015). De igual manera, no todos los hongos micorrízicos pueden promover la germinación de las semillas, pero si relacionarse con la orquídea cuando alcance su etapa adulta (Rafter et al., 2016; McCormick et al., 2021). Es importante destacar que el hongo micorrízico *Ceratobasidium* sp. utilizado en este estudio fue aislado por Durán-López et al. (2019) de la raíz de la orquídea *Trichoceros antenniferum* y conservado en medio PDA hasta la realización de este experimento. Se sabe que los hongos micorrízicos utilizados para la germinación simbiótica han sido aislados e identificados de las raíces de plantas adultas (McCormick et al., 2021). Sin embargo, varios autores afirman que la mayoría de hongos micorrízicos aislados de las raíces de plantas maduras pueden no ser adecuados para inducir la germinación de semillas, y obtener un cultivo puro de estos hongos es complicado (T. Li et al., 2021; McCormick et al., 2021; Zhao et al., 2021).

Se ha encontrado hallazgos de que el género *Ceratobasidium* puede perder su capacidad fúngica con el transcurso de los años, dado que, una cepa aislada de las raíces de la orquídea *Dendrophylax lindenii* y conservada durante dos años en medio PDA a 4 °C, no generó el mismo efecto de germinación de las semillas de la orquídea de la que fue aislado, que cuando se utilizó un inóculo joven (Hoang et al., 2017). Estos hallazgos concuerdan con los de este estudio, puesto que a pesar de haber reproducido el hongo para cada siembra simbiótica y poder trabajar con un inóculo joven (10 días de crecimiento), este ya no tenía la misma capacidad para promover la germinación de las dos especies de orquídeas. Sin embargo, *Ceratobasidium* sp. es un hongo micorrízico que promueve la germinación cuando su periodo de conservación no es extenso. En el estudio realizado con la orquídea *Prasophyllum frenchii*, se utilizó aislados fúngicos de *Ceratobasidium* conservado durante siete meses, y después de tres meses de la siembra simbiótica se obtuvieron semillas en estadio cuatro en medios con salvado de trigo y agar avena (Freestone et al., 2022).

A pesar de que el medio MS es ampliamente utilizado en la propagación *in vitro* de orquídeas, no todos los tipos de semillas de esta familia responden bien a este medio de cultivo (Jolman et al., 2022). En cuanto a la germinación asimbiótica, el medio MS modificado con coco en este estudio fue preparado de manera artesanal, por lo que no fue óptimo para la germinación de *Epidendrum* sp. y *Odontioda* sp.; a pesar de que ambas especies presentaron una respuesta rápida en el hinchamiento de sus semillas las dos primeras semanas del experimento. Las orquídeas *Acianthera prolifera* y *Epidendrum secundum*, también

presentaron esta rápida respuesta en etapas iniciales de germinación, pero su desarrollo de protocormos e incluso formación de plántulas fue mejor en otros medios de cultivo (Koene et al., 2019; Durán-López et al., 2019). Así mismo, en las semillas de la orquídea híbrida *Laeliocattleya* el medio MS modificado con coco no fue el adecuado, dado que fue el medio de cultivo menos eficiente para el desarrollo de embriones hinchados, ruptura de testa, formación de protocormos y formación de rizoides en comparación con el medio MS modificado con jugo de piña (Salazar-Mercado & Botello-Delgado, 2020).

En algunos casos, el medio MS es utilizado para el desarrollo de plántulas, y no como medio para la germinación asimbiótica de semillas. Este es el caso de la orquídea híbrida *Vanda coerulea x Ascocentrum auranticum*, que alcanzó el máximo crecimiento de plántulas en el medio MS, pero no fue el medio ideal para la germinación de sus semillas (Kishor et al., 2006). Por el contrario, el medio de cultivo MS suplementado con agua de coco, y jugo de piña fue el más eficiente para la germinación de híbridos de *Phalaenopsis* a las 18 semanas de cultivo *in vitro* (S. Salazar et al., 2013). Estos resultados concuerdan con el estudio de Jitsopakul (2022) sobre la germinación *in vitro* de orquídeas híbridas, en el cual usan medio MS y VM modificado, se presenta que MS puede estimular la germinación en ciertas especies híbridas y en otras no, debido a la composición del medio.

De esta manera, se puede decir que determinar el tratamiento ideal para promover la germinación de las semillas, desarrollo de protocormos y formación de plántulas, varía de acuerdo a las necesidades de cada especie (Salazar-Mercado & Botello-Delgado, 2020). Sin embargo, las orquídeas requieren de una asociación simbiótica con hongos micorrízicos para poder germinar y desarrollarse, pues estos proporcionan a las plantas los azúcares y nutrientes necesarios hasta que la planta pueda fabricar sus propios nutrientes (Lopes Ferreira et al., 2015). Algunos autores confirman que realizar una germinación simbiótica puede resultar más eficiente si se cuenta con el hongo micorrízico apropiado para la especie de orquídea, debido a que acelera el proceso de germinación (Otero Ospina & Bayman, 2009; Tsulsiyah et al., 2021).

Por otra parte, no solo es fundamental el medio de cultivo, sino también las condiciones en las que se lleva a cabo la germinación *in vitro* son de vital importancia. Las semillas de las dos especies de orquídeas estudiadas presentaban condiciones óptimas para poder germinar en todos los tratamientos. Sin embargo, estudios previos han demostrado que existen diversos factores que pueden afectar su viabilidad y, por ende, su germinación. Dentro de estos factores se incluye la luz, la humedad, la temperatura e incluso el proceso de desinfección a las que se encuentran expuestas previo a su siembra (Doria, 2010; Alghamdi,

2019; Duarte et al., 2022). El hipoclorito de sodio es un desinfectante efectivo para realizar el cultivo *in vitro* de semillas de orquídeas, pero se debe tener precaución con las dosis y tiempos de inmersión, porque puede ocasionar elevada mortalidad de semillas incluso varios días después del cultivo. Al finalizar este estudio, se pudo evidenciar la presencia de semillas con embriones blancos, es decir semillas muertas.

De igual manera, las semillas de orquídeas son conocidas por tener una baja tasa de germinación y pueden requerir condiciones de germinación muy específicas, como temperaturas y niveles de humedad controlados (Jolman et al., 2022). La temperatura y la luz, juegan un papel importante en la germinación de semillas de orquídeas. Varios estudios mencionan que el rango de temperatura para la germinación *in vitro* de semillas varía entre los 15 a 28 °C. Sin embargo, se debe tener en cuenta los requisitos de temperatura de cada especie en sus hábitats naturales (Yan & Chen, 2020).

En el cultivo comercial, la orquídea *Odontioda* sp. se expone a temperaturas superiores a los 28 °C durante varias horas y crece bien, pero se recomienda el cultivo *in vitro* a una temperatura de 26 °C diurna y nocturna (Blanchard & Runkle, 2005). En cuanto a las orquídeas *Epidendrum* se sabe que son adaptables y pueden tolerar una amplia gama de temperaturas, estas se clasifican típicamente como orquídeas intermedias a cálidas, prefieren temperaturas entre 15 y 30 °C para un crecimiento y desarrollo óptimo (Vega & Marques, 2015). Para este estudio se estableció un rango de temperatura de 24 a 28 °C las 24 horas.

Igualmente, la luz a la que son sometidas las semillas de las orquídeas llega a ser un factor crucial para la germinación y desarrollo. Según Alghamdi (2019), las orquídeas se desarrollan mejor en ausencia de luz en medios asimbióticos, pero en medios simbióticos la luz es un factor clave para su germinación. Así mismo, se debe considerar los requisitos de la especie, pues ciclos de luz 12h/12h o 16h/8h se usan comúnmente para semillas de especies epífitas, mientras que para especies terrestres es necesario un período de oscuridad continua para la germinación (Jolman et al., 2022). Un claro ejemplo de que la luz es un factor de prioridad para la germinación es el caso de la orquídea terrestre *Vanilla planifolia*, que se desarrolla en condiciones de luz y sombra; para su germinación asimbiótica se dejaron las semillas en oscuridad durante 30 días, y llegó a formar protocormos después de 60 días de cultivo (Carranza Alvarez, 2021).

Por último, la densidad de las semillas sembradas pudo llegar a afectar la germinación de estas en los tratamientos asimbióticos como simbiótico. De acuerdo a estudios previos, se usó un peso estándar de 1,8 a 2 mg, equivalente a 200 semillas para realizar las siembras por caja Petri (Durán-López et al., 2019; Beltrán Aguilar & Solórzano Chávez, 2022). Para

este estudio ese peso equivalía a aproximadamente 800 semillas para *Odontioda* sp. y 500 para *Epidendrum* sp. Es importante destacar que las semillas de las dos especies difieren en tamaño (Tabla 16). Por esta razón, la densidad de las semillas utilizada llega a ser un factor importante en la germinación simbiótica y asimbiótica. Generalmente se sugiere el uso de 80 a 100 semillas por caja Petri (Aggarwal et al., 2012; Sathiyadash et al., 2014). Sin embargo, en el estudio de Decruse et al. (2018) se corroboró que los cultivos simbióticos y asimbióticos con baja densidad de semillas, entre 25 y 50 semillas por caja Petri, presentaron mejores porcentajes de germinación y un crecimiento rápido para la orquídea *Vanda thwaitesii*.

7. Conclusiones

El hongo micorrízico *Ceratobasidium* sp. logró promover la germinación con las dos especies de orquídeas: *Odontioda* sp. (híbrido) y *Epidendrum* sp. Sin embargo, demostró mayor afinidad con la especie silvestre *Epidendrum* sp., que durante este estudio sólo alcanzó un estadio tres de germinación.

La germinación simbiótica demostró una mayor eficiencia para ambas especies de orquídeas, ya que exhibieron índices de germinación más elevados en comparación con la germinación asimbiótica en los medios MS modificado de coco y OMA sin inoculación de hongo.

El tratamiento simbiótico con *Epidendrum* sp. presentó una mejor germinación que con *Odontioda* sp., pues hubo presencia de semillas con rizoides al finalizar el experimento, a comparación de *Odontioda* sp. (híbrido) que solo incrementó el tamaño de su embrión.

Finalmente, se comprueba que el hongo micorrízico *Ceratobasidium* sp. no es un simbiote específico, pues puede asociarse con varias especies de orquídeas.

8. Recomendaciones

Se recomienda realizar la germinación simbiótica y asimbiótica monitoreando periódicamente las condiciones de luz, temperatura y humedad, para corroborar que se mantengan constantes y así probar la eficiencia de la germinación de las semillas.

Para llevar un mejor control de las siembras *in vitro*, se aconseja contar las semillas en lugar de usar un peso establecido en estudios previos, debido a que el peso de las semillas varía dependiendo de la especie.

Para posteriores estudios se debería realizar un preacondicionamiento a las semillas que se encuentren en refrigeración u otros métodos de conservación, sumergiéndolas en sacarosa al 10 %, para estudiar cómo afecta en su viabilidad y posterior germinación.

Probar diferentes tiempos y concentraciones de hipoclorito de sodio en el proceso de desinfección de las semillas, para evaluar su efecto en la germinación y posterior mortalidad de semillas.

Se sugiere duplicar el periodo de experimentación para las especies híbridas, debido a que el tiempo para establecer una relación simbiótica con los hongos micorrízicos y la germinación de las semillas varía con la especie.

En futuras investigaciones, se recomienda probar la germinación asimbiótica con medio MS comercial, con el fin de evaluar la germinación de las semillas y posterior desarrollo de plántulas.

Se recomiendan más estudios sobre los subcultivos de *Ceratobasidium* sp. para determinar si con el tiempo el hongo micorrízico presenta una disminución en su capacidad para germinar semillas de orquídeas.

9. Referencias

- Aggarwal, S., Nirmala, C., Beri, S., Rastogi, S., & Adholeya, A. (2012). In vitro symbiotic seed germination and molecular characterization of associated endophytic fungi in a commercially important and endangered Indian orchid *Vanda coerulea* Griff. Ex Lindl. *European Journal of Environmental Sciences*, 2(1), 33–42. <https://doi.org/10.14712/23361964.2015.36>
- Alghamdi, S. A. (2019). Influence of mycorrhizal fungi on seed germination and growth in terrestrial and epiphytic orchids. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(3), 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.10.021>
- Andrade-Torres, A. (2010). Micorrizas: Antigua interacción entre plantas y hongos. *Ciencia - Academia Mexicana de Ciencias*, 61(4), 84–90. https://www.academia.edu/653234/Micorrizas_Antigua_interacción_entre_plantas_y_hongos
- Arias Oña, C. G. (2020). *Germinación asimbiótica en condiciones in vitro de Oncidium pentadactylon y Elleanthus capitatus: orquídeas nativas del Ecuador*. 1–52. <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/8769>
- Atlas, R. M. (2010). Handbook of Microbiological Media. In *Handbook of Microbiological Media*. <https://doi.org/10.1201/ebk1439804063>
- Ayuso Vilaboa, M. (2021). *In vitro culture of Eryngium viviparum: An endangered plant with therapeutic phytochemical potential*. <http://www.investigacion.biblioteca.uvigo.es/xmlui/handle/11093/1913>
- Beltrán Aguilar, D. A., & Solórzano Chávez, A. P. (2022). *Estudio de la germinación y desarrollo temprano "in vitro" de una especie de orquídea del género Cymbidium cultivada entre diferentes tratamientos simbióticos y asimbióticos*. 1–44. <http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/11933>
- Bermeo Criollo, C. A., & Sari Cumbe, F. A. (2018). *Simbiosis Hongo – Micorriza como factor promotor de la germinación en semillas de orquídeas del género Epidendrum*. 1–65. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/30479>
- Blanchard, M. G., & Runkle, E. S. (2005). Temperature Regulates Flowering of Two Odontioda Orchid Hybrids. *HortScience*, 40(4), 1099D – 1099. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.40.4.1099D>

- Carranza Alvarez, C. (2021). Efecto de extractos orgánicos naturales sobre la micropropagación in vitro de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews (Orchidaceae). *Biocencia*, 23(1), 5–12. <https://doi.org/10.18633/biocencia.v23i1.805>
- Castellanos Castro, C., Torres Morales, G., Betancur, J., Cárdenas, C., Castro, C., Cely-Vargas, N., Flórez-Pulido, M. A., García L., L. M., García, N., Gastelbondo Medina, M., González-Román, R., Guiot, S., Gutiérrez-Morales, N., Ibarra, J., López, D., Pico-Villalobos, A., Pinedo-Castro, M., Rincón Ruíz, A., Rincón-González, M., ... Vallejo, M. I. (2018). *Orquídeas de Cundinamarca. Conservación y aprovechamiento sostenible*. (C. Castellanos-Castro & G. Torres-Morales, Eds.). Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. <http://repository.humboldt.org.co/handle/20.500.11761/34287#.Y11QM4Uqjw.mendel ey>
- Castillo Pérez, L. J., & Carranza Álvarez, C. (2019). *¿Cómo crecen y se relacionan las orquídeas?* [Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca, UASLP]. https://www.researchgate.net/profile/Luis-Castillo-Perez/publication/335001494_Como_crecen_y_se_relacionan_las_orquideas/links/5d499faf299bf1995b6a7b26/Como-crecen-y-se-relacionan-las-orquideas.pdf
- Cevallos, S., Declerck, S., & Suárez, J. P. (2018). In situ orchid seedling-trap experiment shows few keystone and many randomly associated mycorrhizal fungal species during early plant colonization. *Frontiers in Plant Science*, 871, 1664. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.01664/BIBTEX>
- Chase, M. W., Cameron, K. M., Freudenstein, J. V., Pridgeon, A. M., Salazar, G., Van Den Berg, C., & Schuiteman, A. (2015). *INVITED REVIEW An updated classification of Orchidaceae*. <https://academic.oup.com/botlinnean/article/177/2/151/2416341>
- Chávez, H. K., Mosquera-Espinosa, A. T., & Otero Ospina, J. T. (2015). In vitro propagation of *Compantia falcata* Poepp. & Endl. (Orchidaceae) seeds using symbiotic and asymbiotic techniques. *Acta Agronómica*, 64(2), 125–133. <https://doi.org/10.15446/ACAG.V64N2.42976>
- Chen, X. G., Wu, Y. H., Li, N. Q., & Gao, J. Y. (2022). What role does the seed coat play during symbiotic seed germination in orchids: an experimental approach with *Dendrobium officinale*. *BMC Plant Biology*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03760-0>

- Chen, Y., Goodale, U. M., Fan, X. L., & Gao, J. Y. (2015). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Paphiopedilum spicerianum*: An orchid with an extremely small population in China. *Global Ecology and Conservation*, 3, 367–378. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2015.01.002>
- Correa, E. M., Alvarez, S. C., Espitia, M. M., & Cardona, C. E. (2013). Modelos de secado y tolerancia a la desecación de semillas de *Tectona grandis* L.f. y *Gmelina arborea* Roxb. *Revista De Ciencias Agrícolas*, 30(302), 20–33.
- Correa Zanotti-Cavazzoni, C. L. (2021). *La importancia de reservas pequeñas en la conservación: descripción de una nueva especie de orquídea del noroccidente de Ecuador*. 1–42. <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/10386>
- Cronquist, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press.
- Dalam, V., Mikoriza, P., Simbiosis, P., Salifah, H. A. B., Muskhazli, M., Rusea, G., & Nithiyaa, P. (2011). Variation in Mycorrhizal Specificity for In Vitro Symbiotic Seed Germination of *Grammatophyllum speciosum* Blume. In *Sains Malaysiana* (Vol. 40, Issue 5).
- Díaz-Álvarez, E. A., Torres-Galeano, C., Rojas-Cortés, Á. P., & De La Barrera, E. (2015). In vitro germination and development of two endangered endemic Colombian orchids *Cattleya mendelii* and *Cattleya quadricolor*. *Gayana Bot.*, 72(2), 213–220. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432015000200005>
- Dodson, & Bennett. (1989). *Cochlioda*. Icones Planetarum Tropicarum Series II Orchids of Peru Plate 0031. <http://asoabo.com/index.php/enciclopedia/itemlist/category/83-cochlioda>
- Dodsworth, S. (2016). 848. PLATYSTELE MISERA. *Curtis's Botanical Magazine*, 33(4), 294–302. <https://doi.org/10.1111/CURT.12163>
- Dolce, N. R., Medina, R. D., Terada, G., González-Arao, M. T., & Flachsland, E. A. (2020). In Vitro Propagation and Germplasm Conservation of Wild Orchids from South America. *Orchid Biology: Recent Trends & Challenges*, 37–94. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9456-1_4/COVER
- Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción , conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, 31(1), 74–85. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000100011

- Durán-López, M. E., Caroca-Cáceres, R., Jahreis, K., Narváez-Vera, M., Ansaloni, R., & Cazar, M. E. (2019). The micorrryzal fungi *Ceratobasidium* sp. and *Sebacina vermifera* promote seed germination and seedling development of the terrestrial orchid *Epidendrum secundum* Jacq. *South African Journal of Botany*, 125, 54–61. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2019.06.029>
- Franceschi, C. R. B., Smidt, E. C., Vieira, L. N., & Ribas, L. L. F. (2019). Storage and in vitro germination of orchids (Orchidaceae) seeds from atlantic forest – Brazil. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 91(3), 1–11. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180439>
- Freestone, M., Linde, C., Swarts, N., & Reiter, N. (2022). *Ceratobasidium* orchid mycorrhizal fungi reveal intraspecific variation and interaction with different nutrient media in symbiotic germination of *Prasophyllum* (Orchidaceae). *Symbiosis*, 87(3), 255–268. <https://doi.org/10.1007/s13199-022-00874-9>
- Gale, S. W., Fischer, G. A., Cribb, P. J., & Fay, M. F. (2018). Orchid conservation: bridging the gap between science and practice. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 186(4), 425–434. <https://doi.org/10.1093/BOTLINNEAN/BOY003>
- Gang, G. H., Cho, G., Kwak, Y. S., & Park, E. H. (2017). Distribution of rhizosphere and endosphere fungi on the first-class endangered plant *Cypripedium japonicum*. *Mycobiology*, 45(2), 97–100. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.2.97>
- García-Martínez, L. I., Sánchez-Mendoza, S., & Bautista-Cruz, A. (2020). Combination of mycorrhizal fungi and phosphorus fertilization in the growth of two wild agaves. *Terra Latinoamericana*, 38(4), 771–780. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i4.702>
- GBIF Secretariat. (2022). *Odontioda Hort., 1904*. GBIF Backbone Taxonomy. Checklist Dataset <https://doi.org/10.15468/39omei>.
- Giraldo, W., & Gonzalez, J. (2018). Manual de operación. *Science Direct*, 1, 400.
- González Pozo, D. P. (2022). *Áreas prioritarias para la conservación y zonas de protección para Epidendrum y Elleanthus en Ecuador*. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/26493>
- Guimarães, F. A. R., Pereira, M. C., Felício, C. da S., Torres, D. P., Oliveira, S. F., Veloso, T. G. R., & Kasuya, M. C. M. (2013). Symbiotic propagation of seedlings of *Cyrtopodium*

- glutiniferum Raddi (Orchidaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 27(3), 590–596. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062013000300016>
- Gutiérrez Pulido, H., & Vara Salazar, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. www.FreeLibros.org
- Hágsater, E., & Wrazidlo, M. (2020). *Epidendrum katarun-yariku* (Orchidaceae), a new species of the *Schistochilum* group from the tepuis of the Guiana Highlands in South America. *Phytotaxa*, 472(1), 33–40. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.472.1.4>
- Hernández-Acosta, E. (2021). Distribution and effect of mycorrhizal fungi in the coffee agroecosystem: A review. *Revista de Biología Tropical*, 69(2), 445–461. <https://doi.org/10.15517/rbt.v69i2.42256>
- Hoang, N. H., Kane, M. E., Radcliffe, E. N., Zettler, L. W., & Richardson, L. W. (2017). 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*, 119(3), 379–393. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw220>
- Hossain, M. M. (2022). Orchid mycorrhiza: Isolation, culture, characterization and application. *South African Journal of Botany*, 151, 365–384. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.10.003>
- Hossain, M. M., Sharma, M., Teixeira da Silva, J. A., & Pathak, P. (2010). Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. *Scientia Horticulturae*, 123(4), 479–487. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.10.009>
- Houllet, R. J.-B. (2020). *Orquideología: Vol. XXXVII#2*. www.sco.org.co
- Hrivnák, M., Slezák, M., Galvánek, D., Vičko, J., Belanová, E., Rízová, V., Senko, D., & Hrivnák, R. (2020). Species Richness, Ecology, and Prediction of Orchids in Central Europe: Local-Scale Study. *Diversity 2020*, Vol. 12, Page 154, 12(4), 154. <https://doi.org/10.3390/D12040154>
- Hunhoff, V. L., Lage, L. A., Palú, E. G., Krause, W., & Silva, C. A. (2018). Nutritional requirements for germination and in vitro development of three Orchidaceae species in the southern Brazilian Amazon. *Ornamental Horticulture*, 24(2), 87–94. <https://doi.org/10.14295/oh.v24i2.1130>

- Jitsopakul, N., Chunthaworn, A., Pongket, U., & Thammasiri, K. (2022). Interspecific and Intergeneric Hybrids of *Aerides* Species with *Rhynchostylis coelestis* Rchb.f. and Germination of Hybrid Seeds In Vitro. *Trends in Sciences*, 19(8). <https://doi.org/10.48048/tis.2022.3429>
- Jitsopakul, N., Chunthaworn, A., Pongket, U., & Thammasiri, K. (2023). Ability of *Seidenfadenia mitrata* (Rchb.f.) Garay, pollinia stored at low temperature on fertilization, pod formation and in-vitro hybrid seed germination. *INDIAN JOURNAL OF GENETICS AND PLANT BREEDING*, 83(01), 122–126. <https://doi.org/10.31742/ISGPB.83.1.15>
- Jolman, D., Batalla, M. I., Hungerford, A., Norwood, P., Tait, N., & Wallace, L. E. (2022). The challenges of growing orchids from seeds for conservation: An assessment of asymbiotic techniques. *Applications in Plant Sciences*, 10(5), 1–18. <https://doi.org/10.1002/aps3.11496>
- Kaur, S. (2020). Mycorrhiza in Orchids. *Orchids Phytochemistry, Biology and Horticulture*, 1–14. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11257-8_7-1
- Kishor, R., Sha Valli Khan, P. S., & Sharma, G. J. (2006). Hybridization and in vitro culture of an orchid hybrid *Ascocenda* “Kangla.” *Scientia Horticulturae*, 108(1), 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.12.004>
- Koene, F. M., Amano, & Ribas, L. L. F. (2019). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Acianthera prolifera* (Orchidaceae). *South African Journal of Botany*, 121, 83–91. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2018.07.019>
- Kubota, S., Kaneko, Y., Takahashi, A., Matsuura, M., Sakasai, H., Watanabe, K., & Ito, M. (2006). Uniformity of Time of Shoot Development by Shoot Decapitation in *Odontioda* Orchid. *Horticultural Research (Japan)*, 5(2), 165–169. <https://doi.org/10.2503/HRJ.5.165>
- Kubota, S., Muramatsu, Y., Matsuura, M., Ito, M., Sumiyoshi, H., & Koshioka, M. (2009). The Growth and Flowering of *Odontioda* Orchid are Stimulated by Nitrogen Application. *Horticultural Research (Japan)*, 8(2), 175–180. <https://doi.org/10.2503/HRJ.8.175>
- Kubota, S., Yamamoto, J., Takazawa, Y., Sakasai, H., Watanabe, K., Yoneda, K., & Matsui, N. (2005). Effects of light intensity and temperature on growth, flowering, and single-leaf CO₂ assimilation in *Odontioda* orchid. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 74(4), 330–336. <https://doi.org/10.2503/JJSHS.74.330>

- Li, T., Wu, S., Yang, W., Selosse, M. A., & Gao, J. (2021). How Mycorrhizal Associations Influence Orchid Distribution and Population Dynamics. *Frontiers in Plant Science*, 12(May). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.647114>
- Li, Y., Zhang, B., & Yu, H. (2022). Molecular genetic insights into orchid reproductive development. *Journal of Experimental Botany*, 73(7), 1841–1852. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERAC016>
- Lopes Ferreira, D., De Camargo Smidt, E., & Lopes Fortes Ribas, L. (2015). Efficient micropropagation of *Epidendrum secundum* Jacq. from leaves and protocorms. *African Journal of Biotechnology*, 14(13), 1122–1128. <https://doi.org/10.5897/AJB2015.14467>
- Ma, G. H., Chen, X. G., Selosse, M. A., & Gao, J. Y. (2022). Compatible and Incompatible Mycorrhizal Fungi With Seeds of *Dendrobium* Species: The Colonization Process and Effects of Coculture on Germination and Seedling Development. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.823794>
- MAATE. (2019, February 19). *40 especies en peligro crítico de extinción en el Ecuador – Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica*. Boletín N° 090. <https://www.ambiente.gob.ec/40-especies-en-peligro-critico-de-extincion-en-el-ecuador/>
- Mala, B., Kuegkong, K., Sa-ngiaemsri, N., & Nontachaiyapoom, S. (2017). Effect of germination media on in vitro symbiotic seed germination of three *Dendrobium* orchids. *South African Journal of Botany*, 112, 521–526. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.05.008>
- Maldonado, G. P., Yarzabal, L. A., Cevallos-Cevallos, J. M., Chica, E. J., & Peña, D. F. (2020). Root endophytic fungi promote in vitro seed germination in *Pleurothallis coriacardia* (Orchidaceae). *Lankesteriana*, 20(1), 107–122. <https://doi.org/10.15517/LANK.V20I1.41472>
- McCormick, M., Burnett, R., & Whigham, D. (2021). Protocorm-supporting fungi are retained in roots of mature *tipularia discolor* orchids as mycorrhizal fungal diversity increases. *Plants*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/plants10061251>
- Medina, A., González-Vera, A., Pineda, J., & Hernández, A. (2012). Incidencia, caracterización cultural y prueba de patogenicidad de *ceratobasidium* sp. aislado de manchas bandeadas en maíz. *Bioagro*, 24(3), 197–204.

- Menchaca, R. (2021). *In vitro propagation of Vanilla Handbook of Vanilla Science & Technology* Publisher: Wiley-Blackwell. June.
- Mestanza Ramon, C., Figueroa Saavedra, H., Capa, M. S., Uvidia Vilema, M., Veloz Veloz, D., Campaña, D. L., Velasco, A. A., Cargua, C., & Ortiz Naveda, N. (2019). Floristic Inventory of Vascular Plants in the Shuar Community of Kunkuk, Orellana-Ecuador. *International Journal of Innovations in Engineering Research and Technology*, 6(7), 1–6. <https://www.neliti.com/publications/427844/>
- Miguel, T. P., & Leonhardt, K. W. (2011). In vitro polyploid induction of orchids using oryzalin. *Scientia Horticulturae*, 130(1), 314–319. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2011.07.002>
- Millner, H. J., Bachman, S. P., & Baldwin, T. C. (2020). An assessment of the conservation status of *Restrepia* (Orchidaceae) reveals the threatened status of the genus. <https://doi.org/10.1080/17550874.2020.1735553>, 13(2), 115–131. <https://doi.org/10.1080/17550874.2020.1735553>
- Montes, N. (2016). Especificidad potencial de hongos micorrícicos en el proceso de germinación y supervivencia in vitro de orquídeas terrestres. [Tesis Previa a La Obtención Del Grado de Maestra En Ciencias Biológicas]. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Biología., 1–107.
- Mosquera-Espinosa, A. T., Bayman, P., & Otero, J. T. (2010a). Ceratobasidium como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia. *Acta Agronómica*, 59(3), 316–326. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28122010000300007&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Mosquera-Espinosa, A. T., Bayman, P., & Otero, J. T. (2010b). Ceratobasidium como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia Ceratobasidium as orchid mycorrhizal fungi in Colombia. *Acta Agronómica*, 1–326.
- Myers, N., Mittermeyer, R. A., Mittermeyer, C. G., Da Fonseca, G. A. B., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 2000 403:6772, 403(6772), 853–858. <https://doi.org/10.1038/35002501>
- Nguyen, T. O., Nguyen, T. D., Nguyen, H. T., & Nguyen Thi, K. C. (2022). Optimal condition for Propagation and Growing of *Dendrobium thyrsiflorum*. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 10(3), 524–532. [https://doi.org/10.18006/2022.10\(3\).524.532](https://doi.org/10.18006/2022.10(3).524.532)

- Ordoñez, S. L., Pillacela, D. P., Salazar, J. M., & Peña, D. F. (2016). Especificidad del hongo micorrizico (*Rhizoctonia* sp.) en *Phalaenopsis* sp. , *Cymbidium* sp. , *Trichoceros* antenifer , *Oncidium excavatum* , y *Cyrtochilum* sp. *Revista Semestral DIUC*, 7(1), 83–87. <https://doi.org/10.18537/mskn.07.01.08>
- Ospina, J. T. O., & Bayman, P. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epifitas. *Acta Agronómica*, 58(4), 270–276. <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v58n4/v58n4a06.pdf>
- Otero Ospina, J. T., & Bayman, P. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epifitas. *Acta Agronómica*, 58(4), 270–276.
- Pena, N. T. L., & Alves-Araújo, A. (2017). Angiosperms from rocky outcrops of Pedra do Elefante, Nova Venécia, Espírito Santo, Brazil. *Rodriguésia*, 68(5), 1895–1905. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201768522>
- Pereira, O. L., Rollemberg, C. L., Borges, A. C., Matsuoka, K., & Kasuya, M. C. M. (2003). *Epulorhiza epiphytica* sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. *Mycoscience*, 44(2), 153–155. <https://doi.org/10.1007/s10267-002-0087-7>
- Pérez Martínez, B. A., & Castañeda Garzón, S. L. (2016). Propagación in vitro de orquídeas nativas como una contribución para la conservación ex situ. *Biotecnología Vegetal*, 16(3), 143–151. <https://biblat.unam.mx/es/revista/biotecnologia-vegetal/articulo/propagacion-in-vitro-de-orquideas-nativas-como-una-contribucion-para-la-conservacion-ex-situ>
- Pieterse, C., Thomas, B., Everham, E. M., Bovard, B., & Owen, M. (2023). Potential drivers of spatial distribution of the ghost orchid, *Dendrophylax lindenii*, in a South Florida cypress strand: a preliminary study. *Lankesteriana: International Journal on Orchidology*, 23(1), 81–90–81–90. <https://doi.org/10.15517/LANK.V23I1.54576>
- Pinheiro, F., & Cozzolino, S. (2013). *Epidendrum* (Orchidaceae) as a model system for ecological and evolutionary studies in the Neotropics. *TAXON*, 62(1), 77–88. <https://doi.org/10.1002/TAX.621007>
- Pujasatria, G. C., Miura, C., & Kaminaka, H. (2020a). In Vitro Symbiotic Germination: A Revitalized Heuristic Approach for Orchid Species Conservation. *Plants* 2020, Vol. 9, Page 1742, 9(12), 1742. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9121742>

- Pujasatria, G. C., Miura, C., & Kaminaka, H. (2020b). In Vitro Symbiotic Germination: A Revitalized Heuristic Approach for Orchid Species Conservation. *Plants 2020*, Vol. 9, Page 1742, 9(12), 1742. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9121742>
- Quijia-Lamina, P. H., Baquero, L. E., Kane, M. E., & Zettler, L. W. (2022). *Asymbiotic and Symbiotic Seed Culture of Polystachya Concreta (Jacq.) Garay & H.R. Sweet From Ecuador*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1680422/v1>
- Quijia-Lamiña, P. H., Baquero, L. E., Kane, M. E., & Zettler, L. W. (2023). Symbiotic Seed Germination and Seedling Development of *Epidendrum geminiflorum* Knuth from Ecuador. *Diversity 2023*, Vol. 15, Page 236, 15(2), 236. <https://doi.org/10.3390/D15020236>
- Rafter, M., Yokoya, K., Schofield, E. J., Zettler, L. W., & Sarasan, V. (2016). Non-specific symbiotic germination of *Cynorkis purpurea* (Thouars) Kraezl., a habitat-specific terrestrial orchid from the Central Highlands of Madagascar. *Mycorrhiza*, 26(6), 541–552. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0691-6>
- Rindyastuti, R., Nurfadilah, S., Rahadianoro, A., Hapsari, L. I. A., & Abywijaya, I. K. (2018). Leaf anatomical characters of four epiphytic orchids of sempu island, east java, indonesia: The importance in identification and ecological adaptation. *Biodiversitas*, 19(5), 1906–1918. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d190543>
- Rivas, M., Warner, J., & Bermúdez, M. (1998). Presencia de micorrizas en orquídeas de un jardín botánico neotropical. *Revista de Biología Tropical*, 46(2), 211–216. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77441998000200004&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Romero-Salazar, N. C., Galvis-Gratz, J. M., Universidad de Cundinamarca, Moreno-López, J. P., & Universidad de Cundinamarca. (2022). Hongos formadores de micorrizas aislados a partir de raíces de la orquídea *Rodriguezia granadensis*. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.*, 25(1). <https://doi.org/10.31910/rudca.v25.n1.2022.2086>
- S. da Cruz, E., Freitas, E. F. S., Da Silva, M., Pereira, O. L., & Kasuya, M. C. M. (2022). A new mycorrhizal species of *Ceratobasidium* (Ceratobasidiaceae) associated with roots of the epiphytic orchid *Gomesa recurva* from Brazilian Atlantic Forest. *Phytotaxa*, 550(Vol. 550 No. 3: 16 June 2022 Section), 224–232. <https://doi.org/https://doi.org/10.11646/phytotaxa.550.3.2>

- Salazar, G. A. (2009). Orquídeas. In *Biodiversidad del Ecosistema Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel* (pp. 153–169). <https://www.academia.edu/3332194/Orquídeas>
- Salazar Mercado, A. S., & Botello Delgado, A. E. (2020). Effect of the medium composition on the asymbiotic germination and in vitro development of the *Laeliocattleya* hybrid. *South African Journal of Botany*, 135, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.08.011>
- Salazar, S., Amaya, A., & Barrientos, F. (2013). Evaluación de diferentes medios de cultivo in vitro en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 97–105. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=94332687&lang=es&site=ehost-live>
- Salazar-Mercado, S. A., & Osorio-Jaimes, Y. M. (2022). Implementation of organic components to the culture medium to improve the in vitro propagation of *Cattleya warscewiczii* and *Cattleya gaskelliana*. *South African Journal of Botany*, 148, 352–359. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.05.002>
- Salazar-Mercado, S. A., Quintero-Caleño, J. D., & Moreno-Rozo, L. Y. (2020). Improvement of the methodology of the tetrazolium test using different pretreatments in seeds of the genus *Epidendrum* (orchidaceae). *Journal of Seed Science*, 42. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v42231028>
- Sánchez Macías, A. E., & Rodríguez Gutiérrez, K. S. (2018). Las orquídeas y su importancia en el desarrollo turístico de la provincia de Manabí, Ecuador. *Revista ECOVIDA*, 8(1), 64–83. <https://revistaecovida.upr.edu.cu/index.php/ecovida/article/view/127/html>
- Sarsaiya, S., Shi, J., & Chen, J. (2019). A comprehensive review on fungal endophytes and its dynamics on Orchidaceae plants: current research, challenges, and future possibilities. *Bioengineered*, 10(1), 316. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1644854>
- Sathiyadash, K., Muthukumar, T., Murugan, S. B., Sathishkumar, R., & Pandey, R. R. (2014). In vitro symbiotic seed germination of South Indian endemic orchid *Coelogyne nervosa*. *Mycoscience*, 55(3), 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2013.08.005>
- Seaton, P., & Ramsey, M. (2009). *Cultivo de orquídeas por semillas* (P. Seaton, Ed.). Royal Botanic Gardens, Kew. <https://press.uchicago.edu/ucp/books/book/distributed/C/bo9114867.html>

- Seb, J. (2018). Role of Ectomycorrhiza in Forest Ecosystems: a Review. *International Journal of Advanced Research*, 6(8), 866–873. <https://doi.org/10.21474/ijar01/7588>
- Setaro, S., Kottke, I., & Oberwinkler, F. (2006). Anatomy and ultrastructure of mycorrhizal associations of neotropical Ericaceae. *Mycological Progress*, 5(4), 243–254. <https://doi.org/10.1007/s11557-006-0516-7>
- Shahu Ji, C. (2021). Prospects of Plant Tissue Culture in Orchid Propagation: A Review Cell, Tissue and Organ Culture in Sugarcane Genetic improvement and its role in rapid multiplication of Sugarcane varieties/genotypes View project in silico drug designing for Jaundice. View project Nand Lal. *Article in Indian Journal of Biology*. <https://doi.org/10.21088/ijb.2394.1391.7220.15>
- Shao, S. C., Wang, Q. X., Beng, K. C., Zhao, D. K., & Jacquemyn, H. (2020). Fungi isolated from host protocorms accelerate symbiotic seed germination in an endangered orchid species (*Dendrobium chrysotoxum*) from southern China. *Mycorrhiza*, 30(4), 529–539. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00964-w>
- Shimura, H., Matsuura, M., Takada, N., & Koda, Y. (2007). An antifungal compound involved in symbiotic germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* (Orchidaceae). *Phytochemistry*, 68(10), 1442–1447. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2007.03.006>
- Sneh, B., Burpee, L., & Ogoshii, A. (1991). *Identification of Rhizoctonia* (VI). APS Press.
- Sorgato, J. C., Soares, J. S., Pinto, J. V. da C., & Rosa, Y. B. C. J. (2015). Potencial germinativo de sementes e qualidade de keikis de *Dendrobium nobile* em diferentes fases do desenvolvimento dos frutos. *Ciência Rural*, 45(11), 1965–1971. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20141129>
- Spoerl, E. (1948). Amino Acids As Sources of Nitrogen for Orchid Embryos. *American Journal of Botany*, 35(2), 88–95. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1948.tb05191.x>
- Stalin Rodríguez Gutiérrez, K., Eduardo Sánchez Macías, A., & Sandra Pibaque Pionce, M. (2019). *Orchids as a Tourist Resource in the Southern Area of Manabí Province* (Issue 5).
- 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)

- Téllez-Velasco, & Tejeda-Sartorius. (2013). La importancia de los aromas en la polinización de las Orquídeas. *Agro Productividad*, 6(3). <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/463>
- Thangavelu, M., & Muthu, S. (2017). *Article in Modern Phytomorphology*. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1078523>
- Tiwari, P., Sharma, A., Bhakta, C. G., Bose, S. K., & Gautam, A. (2022). *Biotechnological interventions in Orchids: Recent updates, Translational success, and Commercial outcomes*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1382018/v1>
- Trapnell, D. W., & Hamrick, J. L. (2023). Genetic inference of orchid population dynamics on different-aged lava flows in Costa Rica. *Biotropica*, 55(1), 95–105. <https://doi.org/10.1111/btp.13163>
- Tsulsiyah, B., Farida, T., Sutra, C. L., & Semiarti, E. (2021). Important role of mycorrhiza for seed germination and growth of dendrobium orchids. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 6(2). <https://doi.org/10.22146/JTBB.60805>
- Uitzil Colli, M. O. (2019). Ectomicorrizas: las redes sociales y nutricionales ocultas en el bosque tropical. *Revista de Biología Tropical*, 29(5), Blog. <https://doi.org/10.15517/rbt.v0i2.36149>
- Utami, E. S. W., & Hariyanto, S. (2020). Organic Compounds: Contents and Their Role in Improving Seed Germination and Protocorm Development in Orchids. *International Journal of Agronomy*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/2795108>
- Vasco Ávila, C. A. (2020). *Evaluación del enraizamiento in vitro y aclimatación de plántulas de la orquídea Epidendrum ibaguense* [Universidad Militar Nueva Granada]. <https://repository.unimilitar.edu.co/handle/10654/35961>
- Vega, Y., & Marques, I. (2015). Both biotic and abiotic factors influence floral longevity in three species of Epidendrum (Orchidaceae). *Plant Species Biology*, 30(3), 184–192. <https://doi.org/10.1111/1442-1984.12046>
- Vilcherrez-Atoche, J. A., Iiyama, C. M., & Cardoso, J. C. (2022). Polyploidization in Orchids: From Cellular Changes to Breeding Applications. *Plants 2022*, Vol. 11, Page 469, 11(4), 469. <https://doi.org/10.3390/PLANTS11040469>
- Wantini, S., & Octavia, A. (2018). Perbandingan Pertumbuhan Jamur *Aspergillus flavus* Pada Media PDA (Potato Dextrose Agar) dan Media Alternatif dari Singkong (Manihot

- esculenta Crantz). *Jurnal Analis Kesehatan*, 6(2), 625. <https://doi.org/10.26630/jak.v6i2.788>
- Wei, X., Zhang, W., Zulfiqar, F., Zhang, C., & Chen, J. (2022). Ericoid mycorrhizal fungi as biostimulants for improving propagation and production of ericaceous plants. *Frontiers in Plant Science*, 13(November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1027390>
- White, Judy. (1996). *Taylor's guide to orchids*. 385. https://books.google.com/books/about/Taylor_s_Guide_to_Orchids.html?hl=es&id=6omp1WoHuxMC
- Yan, A., & Chen, Z. (2020). The Control of Seed Dormancy and Germination by Temperature, Light and Nitrate. *Botanical Review*, 86(1), 39–75. <https://doi.org/10.1007/s12229-020-09220-4>
- Yang, Q., Xu, L., Xia, W., Liang, L., Bai, X., Li, L., Xu, L., & Liu, L. (2021). Mycorrhizal compatibility and germination-promoting activity of tulasnella species in two species of orchid (*Cymbidium mannii* and *epidendrum radicans*). *Horticulturae*, 7(11). <https://doi.org/10.3390/horticulturae7110472>
- Yeh, C. M., Chung, K. M., Liang, C. K., & Tsai, W. C. (2019). New Insights into the Symbiotic Relationship between Orchids and Fungi. *Applied Sciences 2019, Vol. 9, Page 585*, 9(3), 585. <https://doi.org/10.3390/APP9030585>
- 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. <https://doi.org/10.21273/hortsci.42.1.135>
- Zhang, L., Rammitsu, K., Tetsuka, K., Yukawa, T., & Ogura-Tsujita, Y. (2022). Dominant *Dendrobium officinale* mycorrhizal partners vary among habitats and strongly induce seed germination in vitro. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.994641>
- Zhang, S., Yang, Y., Li, J., Qin, J., Zhang, W., Huang, W., & Hu, H. (2018). Physiological diversity of orchids. *Plant Diversity*, 40(4), 196–208. <https://doi.org/10.1016/J.PLD.2018.06.003>
- Zhao, D. K., Selosse, M. A., Wu, L., Luo, Y., Shao, S. C., & Ruan, Y. L. (2021). Orchid Reintroduction Based on Seed Germination-Promoting Mycorrhizal Fungi Derived From

Protocorms or Seedlings. *Frontiers in Plant Science*, 12(June), 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.701152>

10. Anexos

Anexo A. Composición de los medios de cultivo empleados

• Medio de cultivo OMA

Compuesto	Cantidad
Avena	1,25 g
Agar	4 g
Agua destilada	500 ml

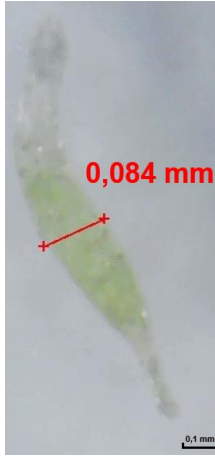

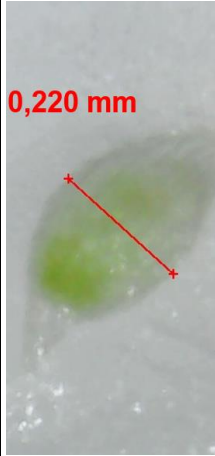
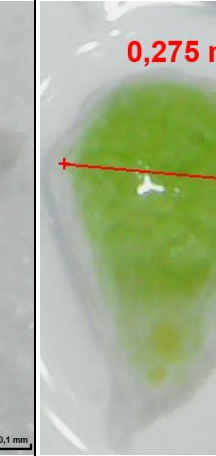
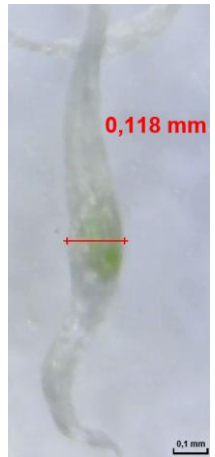
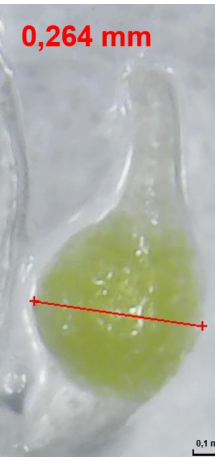
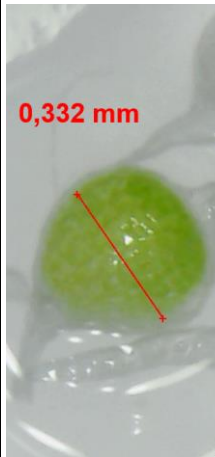
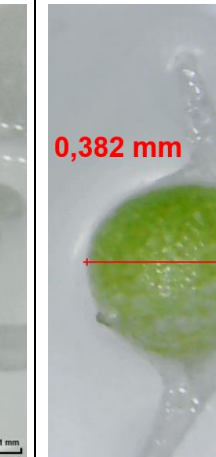
• Medio de cultivo MS modificado coco

Compuesto	Cantidad
Agua destilada	500 ml
Agua de coco	75 ml
Sacarosa	10 g
Carbón activado	1 g
Agar	4 g
Soluciones (A, B, C, D y E)	5 ml
Vitamina B1	0,5 ml
Tween	2 gotas

• Medio de cultivo PDA

Compuesto	Cantidad
Puré de papa	2,5 g
Glucosa	5 g
Agar	5 g
Agua destilada	250 ml

Anexo B. Medición del diámetro de las semillas de las dos especies de orquídeas a al finalizar el experimento.

Especies	Medición del diámetro del embrión a los 50 días			
	Inicial	MS	OMA (-)	OMA + HM
<i>Odontioda</i> sp.				
<i>Epidendrum</i> sp.				

Nota: La barra lateral inferior derecha es la escala de medición: 0,1 mm.