



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA.

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA.

TITULÓ DE BIOQUÍMICO FARMACEUTICO.

Estudio de la influencia de cepas de hongos micorrízicos de orquídeas en crecimiento y desarrollo de las plántulas de algunas especies de orquídeas epífitas en condiciones de laboratorio.

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTORAS: Calva Cabrera, Paola Vanessa.

Amari Malla, Jhosselyn Lucrecia.

DIRECTOR: Cruz Sarmiento, Darío Javier, Ph.D.

LOJA-ECUADOR

2017



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2017

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.

Doctor.

Darío Javier Cruz Sarmiento.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN.

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación “Estudio de la influencia de cepas de hongos micorrízicos de orquídeas en crecimiento y desarrollo de las plántulas de algunas especies de orquídeas epífitas en condiciones de laboratorio” realizado por: Calva Cabrera Paola Vanessa y Amari Malla Jhossellyn Lucrecia, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, abril del 2017

f)

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS.

Yo, Cabrera Calva Paola Vanessa y Amari Malla Jhossellyn Lucrecia, declaramos ser autoras del presente trabajo de titulación “Estudio de la influencia de cepas de hongos micorrízicos de orquídeas en crecimiento y desarrollo de las plántulas de algunas especies de orquídeas epífitas en condiciones de laboratorio”, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Darío Javier Cruz Sarmiento. Ph.D., director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimiento y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de nuestra exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaramos conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f.....

Autor: Calva Cabrera Paola Vanessa.

Cédula: 1104863277

f.....

Autor: Amari Malla Jhossellyn Lucrecia.

Cédula: 1104037054

DEDICATORIA.

Queremos dedicar el presente trabajo de tesis a:

Dios, por habernos dado luz, fortaleza para alcanzar esta meta, ser la guía y darnos sabiduría y valor necesario para saber sobrellevar todos los obstáculos y terminar con éxito esta investigación.

Nuestros padres, por darnos la vida, por su sacrificio, trabajo y constancia en formarnos y por brindarnos siempre todo su amor y comprensión, velando por el bienestar y educación, siendo de gran apoyo en todo momento. Depositando su entera confianza en cada reto que se nos presentaba sin dudar ni un solo momento en la inteligencia y capacidad que tenemos. Es por ello que estamos logrando esta meta ahora y por todo aquello los amamos.

Nuestros hermanos que han sido una gran ayuda, confiando y dándonos sus sabios consejos y apoyo incondicional.

Cada uno de aquellos amigos que contribuyeron con un granito de arena en todo el recorrido de esta hermosa carrera.

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Técnica Particular de Loja la cual abre sus puertas a jóvenes como nosotras, preparándonos para un futuro competitivo y formándonos como personas de bien contribuyendo en nuestra formación personal y profesional.

A los docentes de Bioquímica por la paciencia, a quienes les debemos gran parte de los conocimientos, gracias a su enseñanza, entrega y guía educativa.

A todos los docentes investigadores del grupo de micorrizas, por compartir sus experiencias y conocimiento. En especial a la Ph.D. Alzbeta Novotna, por haber compartido con nosotras su experiencia, su paciencia en la enseñanza para lograr la ejecución de esta investigación.

Al Ph.D. Ángel Benitez por su comprensión y ayuda con respecto a la interpretación de nuestros resultados.

Este proyecto es el resultado del esfuerzo conjunto de todos los que formamos el grupo de trabajo. Por esto agradecemos a nuestro director de tesis el Ph.D. Darío Cruz quien nos ayudó en todo momento guiándonos e inculcándonos sus conocimientos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS.

| | |
|---|------|
| CARATULA..... | i |
| APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN. | ii |
| DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS. | iii |
| DEDICATORIA. | iv |
| AGRADECIMIENTOS..... | v |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS..... | vi |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | viii |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | ix |
| RESUMEN..... | 1 |
| ABSTRACT..... | 2 |
| INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| CAPÍTULO I..... | 5 |
| 1.1 Ecología e importancia económica de orquídeas..... | 6 |
| 1.2 Sistemática y clasificación taxonómica de las orquídeas..... | 6 |
| 1.3 Generalidades de las orquídeas, <i>Cattleya iricolor</i> , <i>Galeottia acuminata</i> , <i>Helcia sanguinolenta</i> | 8 |
| 1.4 Micorriza y su clasificación..... | 10 |
| 1.5 Importancia ecológica de las micorrizas de orquídeas..... | 12 |
| 1.6 Ensayos de germinación de semillas de orquídeas in vitro y su problemática al no poseer hongos micorrízicos específicos. | 13 |
| CAPÍTULO II..... | 15 |
| 2.1 Metodología..... | 16 |
| 2.1.1. Especímenes de hongos. | 16 |
| 2.1.2. Especímenes de orquídeas..... | 16 |
| 2.1.3. Procedimiento y diseño experimental. | 16 |
| 2.1.3.1. Siembra de hongos y plántulas de orquídeas (réplicas y tratamientos). | 16 |
| 2.1.4. Evaluación de colonización de raíces de orquídeas. | 18 |
| 2.1.5. Análisis de datos. | 18 |
| CAPÍTULO III..... | 19 |
| 3.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 20 |

| | |
|--|----|
| 3.1.1. Colonización..... | 20 |
| 3.1.2. Análisis de las variables en los ensayos hongos vs orquídeas..... | 21 |
| 3.1.2.1. <i>Cattleya iricolor</i> | 21 |
| 3.1.2.2. <i>Helcia sanguinolenta</i> | 23 |
| 3.1.2.3. <i>Galeottia acuminata</i> | 24 |
| CONCLUSIONES. | 27 |
| RECOMENDACIONES..... | 28 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 29 |

ÍNDICE DE FIGURAS.

| | |
|---|----|
| Figura 1. Filogenia de las principales familias de orquídeas dentro del orden Asparagales.... | 7 |
| Figura 2. Flores de <i>Cattleya iricolor</i> | 8 |
| Figura 3. Flor de <i>Helcia sanguinolenta</i> | 9 |
| Figura 4. Flores de <i>Galeottia acuminata</i> | 9 |
| Figura 5. Esquema demostrativo para los diferentes tipos y subtipos de micorrizas..... | 12 |
| Figura 6. Colonización de hongos micorrízicos..... | 20 |
| Figura 7. Análisis de las características fenotípicas de <i>Cattleya iricolor</i> | 22 |
| Figura 8. Análisis de las características fenotípicas de <i>Helcia sanguinolenta</i> | 24 |
| Figura 9. Análisis de las características fenotípicas de <i>Galeottia acuminata</i> | 25 |

ÍNDICE DE TABLAS.

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Diseño simple aleatorio. | 17 |
|--|----|

RESUMEN.

Las orquídeas son plantas muy diversas en los ecosistemas y requieren una asociación con hongos específicos formadores de micorrizas. Nuestro estudio busca evaluar si los hongos micorrízicos seleccionados pueden mejorar el desarrollo de las plántulas de orquídeas *Cattleya iricolor*, *Galeottia acuminata*, *Helcia sanguinolenta*. Cinco cepas de hongos pertenecientes al género *Tulasnella* y *Ceratobasidium* fueron aplicadas en los experimentos de crecimiento in vitro. Cinco variables como peso de plántulas PP; Largo de plántulas LP; número de hojas NH; número de raíces NR, Largo de raíces LR, fueron evaluadas al inicio y al final del experimento durante seis meses en condiciones controladas. Los resultados mostraron que el efecto de los hongos puede variar para cada especie de orquídea. Una especie de *Tulasnella* influenció significativamente sobre el peso y largo de las plántulas de *Cattleya iricolor* y *Helcia sanguinolenta*. Por otra parte, una especie de *Ceratobasidium* tuvo efecto sobre la variable peso para las plántulas de *Galeottia acuminata* denotando un grado de especificidad de dichos hongos para las diferentes especies de orquídeas evaluadas.

Palabras Claves: Simbiosis, *Tulasnella*, *Ceratobasidium*, Cultivo in vitro.

ABSTRACT.

Orchid plants are very diverse in the ecosystems and they require an association with specific mycorrhizal fungi. The overall aim of this study was test if the selected mycorrhizal fungi can improve the development of orchid seedlings *Cattleya iricolor*, *Galeottia acuminata*, *Helcia sanguinolenta*. Five fungi strains belonging to the genera *Tulasnella* and *Ceratobasidium* were inoculated for in vitro growth experiments. Five variables such as seedling weight (PP); seedling length (LP); Leave number (NH); Root number (NR); and root length (LR), were evaluated at the beginning and at the end of the experiment during six months in controlled conditions. Results show differences responses among orchid species. One species of *Tulasnella* had a significant effect on the weight and the length of the seedlings of *Cattleya iricolor* and *Helcia sanguinolenta*. On the other hand, the species *Ceratobasidium* presented an effect on the seedlings weight of *Galeottia acuminata* showing a grade of fungi specificity on evaluated orchid species.

Keywords: Symbiosis, *Tulasnella*, *Ceratobasidium*, In vitro culture.

INTRODUCCIÓN.

El Ecuador es un país que posee gran biodiversidad de orquídeas, contando con 219 géneros de orquídeas, 4.125 especies clasificadas y 1.301 especies endémicas, correspondiéndose casi al 14% de las especies de orquídeas a escala mundial (Ecuador Megadiverso, 2011; Andes, 2015). Sin embargo, las orquídeas se encuentran amenazadas por la elevada tasa de deforestación a nivel nacional e internacional (Jorgensen & León-Yáñez, 1999). Adicionalmente, las orquídeas generan miles de semillas diminutas con escasas reservas nutritivas por lo cual requieren asociación con hongos específicos para su supervivencia, denominándose micorriza a esta asociación (Bernard, 1909; Arditti & Ghani, 2000; Smith & Read, 2008; Otero & Bayman, 2009; Kottke et al. 2010). Las micorrizas de orquídeas corresponde a un tipo de endomicorriza, donde se presenta la colonización a la orquídea por medio del ingreso de las hifas del hongo hacia las células corticales de la raíz (Dearnaley, Martos & Selosse, 2012). Las hifas colonizadoras de los hongos no infringen daño a la membrana celular cortical, pero se ramifican en el espacio entre la pared celular y la membrana, formando elaboradas estructuras en espiral conocidas como pelotones (Dearnaley et al. 2012).

En las zonas tropicales predominan las orquídeas fotosintéticas, las cuales son micoheterotróficas por poseer hongos asociados durante los primeros estadios de desarrollo y otras orquídeas pueden ser micotróficas por poseer asociado el o los hongos hasta su estado adulto (Cameron et al. 2006; Dearnaley, 2007). Es así que la mayoría de las orquídeas llegan a formar una relación muy dependiente con el hongo facilitando el intercambio de minerales y nutrientes (McKendrick, 2000). Las micorrizas en las orquídeas están formadas principalmente por hongos basidiomicetes de los grupos Cantharellales, Sebaciniales y Atractielalles, Suárez & Kottke (2016), incrementando la eficiencia de la absorción de nutrientes desde el suelo por parte de la planta (Chaverri, Huhndorf, & Rogers, 2011). Sin embargo varios factores pueden influir sobre la presencia de determinados géneros de hongos como por ejemplo las condiciones climáticas (Rasmussen & Whigham, 2002; Suárez et al. 2006). El conocimiento acerca de la frecuencia y la diversidad, así como el papel ecológico de los hongos micorrízicos en orquídeas sigue siendo en gran medida desconocido (Bayman & Otero, 2006).

Gran parte de los hongos formadores de micorrizas se han estudiado en su estado anamorfo (estado asexual) los cuales se han clasificado artificialmente dentro del grupo forma-*Rhizoctonia*, sin embargo, estos hongos pertenecen a varios teleomorfos (estado sexual), que incluyen los generos *Ceratobasidium*, *Thanatephorus*, *Tulasnella* y *Sebacina* (Zelmer, Cuthbertson & Currah, 1996; Otero, Ackerman & Bayman, 2002). Pocos hongos

micorrizicos han sido factibles de generar estados teleomorfos en cultivos in vitro, por ejemplo el anamorfo de *Epulhorriza* spp. ha generado sus teleomorfos *Tulasnella* spp. aislados desde raíces de orquídeas terrestres (Warcup & Talbot, 1967; Sneh et al. 1991). Por esta dificultad de obtener estados sexuales de estos hongos micorrizicos, muchos estudios han enfatizado sus trabajos en la obtención de basidiomas (e. g. *Tulasnella* y *Ceratobasidium*) en el campo donde se los ha reportado creciendo sobre madera en descomposición (Roberts, 1999; Cruz et al. 2011). Esta metodología de colecta de basidioma es muchas veces ineficaz por la naturaleza de las fructificaciones las cuales son resupinados y prácticamente invisibles al ojo humano. Por lo que actualmente estudios de los hongos micorrizicos de orquídeas se basan en datos moleculares donde se determina diversidad de OTUs (unidades taxonómicas operacionales) equivalentes a especies (Suárez et al. 2006; Chaverri et al. 2011; Martos et al. 2012).

La determinación de OTUs, demuestra que existe una altísima diversidad de especies moleculares de géneros como *Tulasnella* asociados a las orquídeas, volviéndose un requisito crucial la determinación de estos hongos y si estos son hongos específicos o generalistas para las orquídeas, además de conocer si los hongos cumplen con algún rol dentro de la evolución de las orquídeas (Suárez & Kottke 2016). Por estas razones varios estudios generan análisis de diversidad incluyendo pruebas de laboratorio como la germinación de semillas de orquídeas con hongos micorrizicos aislados desde orquídeas (Dearnaley et al. 2012; Cueva, 2014).

Bajo estos antecedentes, el objetivo principal en este estudio es demostrar el beneficio que provoca la inoculación de las cepas de hongos micorrizicos *Tulasnella* spp. y *Ceratobasidium* spp. en el desarrollo de plántulas de las especies de orquídeas *Cattleya iricolor*, *Galeottia acuminata* y *Helcia sanguinolenta*.

CAPÍTULO I

1.1 Ecología e importancia económica de orquídeas.

Las orquídeas presentan una alta distribución y diversidad en los trópicos, especialmente en el Neotrópico, como por ejemplo los Andes del Ecuador (Sierra, 1999). El Ecuador un país megadiverso cuenta con una diversidad elevada de especies de la familia Orchidaceae (Alec, 1994). Las orquídeas muestran varios hábitos de crecimiento debido a su gran variabilidad morfológica, por ejemplo crecen sobre los árboles (epífitas), sobre las rocas (litofitas) y/o en el suelo (terrestres) (Dressler, 1994). El epifitismo es muy importante en bosques y selvas para atrapar nutrientes gracias a sus estructuras especializadas (Caneva, 1990; Abdelnour-Esquivel & Muñoz-Bustos, 1999). Esta diversidad de especies de orquídeas y su colonización de varios ecosistemas probablemente es el resultado evolutivo de la especialización promovida por su estrategia reproductiva con polinizadores específicos y la asociación en sus raíces con hongos formadores de micorrizas (Granados, López, Hernández & Sánchez, 2003). Es así que las orquídeas cumplen roles ecológicos importantes en una alta diversidad de ecosistemas.

No obstante las orquídeas también poseen importancia desde un punto de vista económico, por ejemplo, en Ecuador las orquídeas se solicitan principalmente para fines decorativos, especialmente durante la temporada de Navidad y en mayor medida, por los coleccionistas extranjeros que pagan precios exorbitantes por las orquídeas raras (Cueva & González, 2009). Así mismo, las orquídeas producen productos de interés como la vainilla de la cual se extrae la "tintura de Vainilla y el Elixir de Vainilla", los mismos que son empleados como aromatizantes entre otras aplicaciones (Daniel, 1959; Havkin-Frenkel, French, Pak & Frenkel, 2005). En América del Sur, la producción de orquídeas a gran escala está limitada a un corto número de productores, debido a la ausencia de información genética y protocolos de cultivo in vitro para las especies nativas y endémicas (Cueva & González, 2009).

1.2 Sistemática y clasificación taxonómica de las orquídeas.

La familia Orchidaceae está dentro del orden Asparagales (Monocotiledóneas), con un número aproximado de 25.000 spp. Las subfamilias más relevantes son: Epidendroideae, Orchidoideae, Vanilloideae, Cyripedioideae y Apostasioideae (**Figura 1**) (Givnish et al. 2015; Jones, 2006).

Hasta el 2009 se describieron 228 géneros y 4023 especies de orquídeas en Ecuador, donde aproximadamente el 40% son endémicas (Jijón & Navarrete, 2007). Entre los géneros

de orquídeas más comúnmente cultivadas se destacan *Cattleya*, *Epidendrum*, *Brassia* entre otras (Landcare Research, 2013).

Especies como: *Cattleya iricolor*, *Galeottia acuminata*, *Helcia sanguinolenta* tomadas para este estudio se encuentran categorizadas (**Figura 1**) de la siguiente forma, *C. iricolor* pertenece a la tribu: Epidendreae, subtribu: Laeliinae, y género: *Cattleya* (Lindl, 1824). *Galeottia acuminata* corresponde a la tribu: Cymbidieae, subtribu: Zygopetalinae, y género: *Galeottia* (Rich & Galeotti, 1945). *Helcia sanguinolenta* tiene Tribu: Cymbidieae, subtribu: Oncidiinae, con género: *Helcia* (Edwards, 1845). Siendo *Cattleya* una de las de mayor importancia la cual tiene 50 especies de la subfamilia Epidendroideae (Rittershausen, 2014).

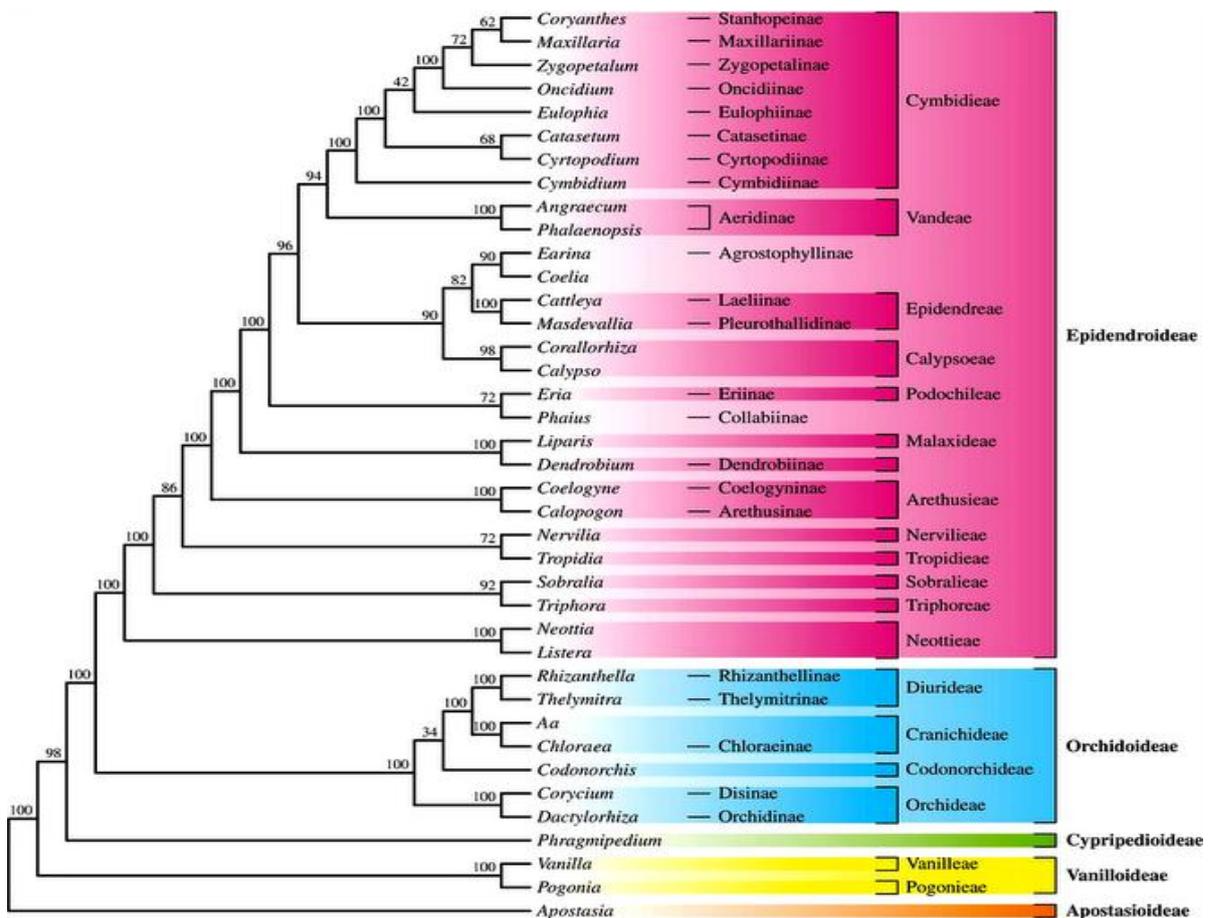


Figura 1. Filogenia de las principales familias de orquídeas dentro del orden Asparagales. Las especies *Cattleya iricolor*, *Galeottia acuminata* y *Helcia sanguinolenta* se agrupan dentro de la subfamilia: Epidendroideae (color rosado).

Fuente: (Givnish et al. 2015).

1.3 Generalidades de las orquídeas, *Cattleya iricolor*, *Galeottia acuminata*, *Helcia sanguinolenta*.

***Cattleya iricolor*:** Se caracteriza por ser una orquídea de diferente tamaño, con hábitos epifitos y con pseudobulbos sutilmente comprimidos, llevando por lo general una sola hoja apical, con forma oblonga, elíptica o aguda (Rchb, 1874). Esta orquídea contiene unas cuantas flores pequeñas aproximadamente de 6.25 cm de largo, por lo general pálidas de color amarillo pajizo con bandas de color rojo, amarillo y blanco en el labio (**Figura 2**). Sus sépalos elípticos y pétalos son libres y extendidas (Rchb, 1874). Esta especie suele poseer de 6-10 flores con estigma ventral, estas surgen de una vaina duplicada desde un pseudobulbo el cual se mantiene en la mitad de la hoja. El floreciendo usualmente se da al final del invierno y la primavera (Rchb, 1874). *Cattleya iricolor* habita naturalmente en lo alto de las ramas de los árboles que se desarrollan en elevaciones de 400-1220 m.s.n.m, esta especie se distribuye geográficamente principalmente en bosques húmedos distribuidos a lo largo de los Andes Orientales del Perú hasta el Ecuador (Rchb, 1874). Hasta la actualidad no se han reportado estudios que indiquen sobre la micorrización de la especie *C. iricolor*, sin embargo varios estudios sugieren datos de micorrización para el género *Cattleya* (Ovando et al. 2005; Correa & Andrade, 2008; Peñafiel, 2012).



Figura 2. Flores de *Cattleya iricolor*.

Fuente: (Ecuagenera, 2017).

***Helcia sanguinolenta*:** Se define por ser una especie de orquídea epifita, con preferencia de clima fresco a caliente, con tres pseudobulbos ovoides, alargados, parcialmente envueltos por vainas que son cuidadosamente envueltos en un rizoma. Esta especie tiene una flor producida a partir de las axilas de las vainas, con pétalos amarillos incluyendo grandes manchas rojas, el labio es de color blanco (**Figura 3**) conocidas como flores fragantes de larga duración (Edwards, 1845). Los individuos de esta especie tienen una única hoja alargada, elíptica de 10 a 20 cm de largo (Edwards, 1845; Celi, 2011). *Helcia sanguinolenta* mientras crece requiere temperaturas frías especialmente en la noche, lo cual cambia en el verano cuando requiere una sombra con alta humedad y agua (Hágsater & Salazar, 1990). Este género y la especie se encuentra principalmente en Ecuador

(provincias de Bolívar, Loja, Azuay y Chimborazo), Perú y Colombia a elevaciones de 600 a 3000 m.s.n.m, creciendo en bosques montañosos, (Jorgensen & León-Yáñez, 1999). Conforme a la bibliografía revisada Celi (2011) no se reportan datos de micorrización para su especie y género.



Figura 3. Flor de *Helcia sanguinolenta*.

Fuente: (Ecuagenera, 2017).

***Galeottia acuminata*:** Estas orquídeas son epífitas y terrestres, tienen características de crecimiento cilíndrico, a veces cónico con rizomas cortos, pero con pseudobulbos oblongos a ovalados, rodeados por vainas y hojas glaucosas lanceoladas conteniendo un pecíolo (Schweinf, Dressler & Christenson, 1989). Las flores en individuos de esta especie son de color verde a marrón oscuro con márgenes amarillos cerca de los ápices de los segmentos, el labio es marrón, la flor presenta lóbulos laterales pequeños. Las flores (**Figura 4**) se agrupan lateralmente de forma arqueada suspendidos en una ramificación de 32 cm de largo (Schweinf, Dressler & Christenson, 1989). La distribución de la especie y género se da principalmente en bosques húmedos montanos con elevaciones de 1500 a 1850 m.s.n.m, ubicados generalmente en Ecuador, Perú y Bolivia (Schweinf, Dressler & Christenson, 1989).



Figura 4. Flores de *Galeottia acuminata*.

Fuente: (Mundiflora, 2017).

1.4 Micorriza y su clasificación.

Se llama micorriza a la asociación simbiótica que se da entre hongos específicos y las raíces de diferentes plantas vasculares (Frank, Tafel & Minister, 1885). El hongo o los hongos que colonizan la raíz se benefician por los carbohidratos producto de la fotosíntesis de sus hospederos, por otra parte la planta aumenta la absorción de agua, nutrientes y minerales como el fósforo (Smith & Read, 2008).

Las micorrizas según su estructura morfológica se han clasificado en tres tipos principales; ectomicorrizas, ectendomicorrizas y endomicorrizas (**Figura 5**) (Escalante & Ofelia, 1995).

Ectomicorrizas (ECM): El desarrollo del hongo se da en los espacios intercelulares de los tejidos de la raíz, formando la llamada red de Hartig y un manto de hifas en la zona externa, nunca penetrando en sus células (**Figura 5**). Los hongos que generan estas micorrizas, son mayoritariamente basidiomicetes (Brundrett, Merryweather & Moyersoen, 1996; Huertes, 2011). La mayoría de estos hongos son con sombreros carnosos y hongos ascomycetes llamados trufas (Escalante & Ofelia, 1995). Este tipo de micorrización prevalece entre los árboles de zonas templadas como por ejemplo robles y pinos (Quizhpe, 2014).

Ectendomicorrizas: Son asociaciones formadas entre un número limitado de ascomicetos y los géneros de coníferas *Pinus* y *Larix*. Se trata de una colonización del tejido de la raíz, característica de los dos tipos tanto de ectomicorriza como de endomicorriza, no existen ni vesículas ni arbusculos, pero si se genera un manto externo y una estructura compleja altamente ramificada llamada red de Hartig, que luego incorpora hifas intracelulares en células de la epidermis y en la corteza de la raíz (**Figura 5**) (Escalante & Ofelia, 1995; Yu, Egger & Peterson, 2001; Quizhpe, 2014).

Endomicorrizas: Estos hongos micorrízicos son característicos en todos los suelos del mundo, estando presentes en forma natural, exceptuado los suelos donde el hombre ha inducido alta perturbación (**Figura 5**) (Escalante & Ofelia, 1995; Huertes, 2011).

Las endomicorrizas acorde a sus estructuras formadas por su tipo de colonización, y a la alta diversidad de especies vegetales y fúngicas que están involucradas en este tipo de asociación, se dividen en varios subtipos; vesículo-arbusculares, ericoides, arbutoides, monotropoides, orquídoides (**Figura 5**) (Moreno & Read, 2004).

Micorrizas vesículo-arbusculares (VAM): Se da la asociación entre la planta y el hongo, donde el hongo forma generalmente vesículas y arbusculos que son las estructuras donde se realiza el intercambio de carbono y fósforo, a su vez los hongos transfieren amonio a la

planta huésped (**Figura 5**) (Cuenca et al. 2002; Koegel, Brulé, Wiemken, Boller & Courty, 2015). Las VAM son generadas por hongos del filo Glomeromycota (Brundrett et al. 1996). Estos hongos son probablemente taxones primitivos relacionados con Zygomycetes (Gómez, Portugal, Arriaga & Alonso, 1994; Navarro, 2004).

Micorrizas ericoides: Representa un tipo único de micorrizas, confinadas a varias familias de plantas del orden Ericales, con hongos Basidiomicetes. Su asociación incluye la colonización de las células de la epidermis y carecen de crecimiento secundario, dándose la formación de un complejo de hifas ramificadas que penetran en las células para formar ovillos (**Figura 5**) (Brundrett et al. 1996; Cairney & Ashford, 2002; Huertes, 2011; Ortiz, 2012).

Micorriza arbutoides: Estas micorrizas tienen un manto, una red de Hartig y forman complejos hifales intracelulares confinados a la epidermis presentando un manto externo junto con hifas que penetran a las células para formar rulos. Son hongos Basidiomicetes (**Figura 5**) (Molina & Trappe, 1981; Ortiz, 2012).

Micorriza monotropoides: Es la que posee presencia de hifas septadas desarrollando manto, red de Hartig y colonización intracelular de sus células epidermales. Por lo que esta simbiosis tiene lugar principalmente con hongos Basidiomicetes (**Figura 5**) (Santos, 2009; Luna & Ruiz., 2014).

Micorrizas orquídoides o micorriza de oville: Son características de la familia Orchidaceae. Esta asociación se da con hongos Basidiomicetes donde la mayoría de los hongos que participan en esta asociación se han clasificado por sus anamorfos dentro de un grupo artificial denominado forma-*Rhizoctonia*, los cuales poseen fases teleomorfas pertenecientes a los órdenes Cantharellales; (Tulasnellales y Ceratobasidiales), Atractiellales y Sebaciniales (Sneh et al. 1991; Otero, Ackerman & Bayman, 2004; Suárez, Weiß, Abele, Oberwinkler & Kottke, 2008; Kottke et al. 2010; Piepenbring, 2015). Por lo general estos hongos se encuentran en las células corticales de las raíces de las orquídeas y forman estructuras denominadas pelotones (ovillos) (**Figura 5**) que sirven para el intercambio de nutrientes y minerales (Dearnaley, 2007). En algunos casos las hifas fúngicas solo colonizan raíces jóvenes, excepto en orquídeas, en las que el hongo puede infectar células del tallo. Siendo la planta quien realmente controla la intensidad de la simbiosis, por el crecimiento de su raíz, pero también por la digestión en la fase de intercambio nutritivo (Smith & Read, 2008). Las micorrizas de orquídeas son diferentes de otros tipos de micorrizas, en el que el hongo probablemente recibe poco o casi nada desde la planta (Smith & Read, 2008; Rasmussen & Rasmussen 2009; Selosse & Roy 2009).

En estudios de micorrizas de orquídeas en bosques tropicales montañosos del sur del Ecuador se han reportado los órdenes Cantharellales (Tulasnellales - *Tulasnella*), Sebaciniales y

Atractiellales como los principales formadores de esta asociación simbiótica, donde el género *Tulasnella* se constituye como el hongo más comúnmente encontrado (Suárez et al. 2006, 2008; Kottke et al. 2010).

El género *Tulasnella* particularmente en aislamientos *in vitro* se caracteriza por generar estructuras asexuales denominándolo así como género *Epulorhiza* el mismo que es una clasificación artificial dentro del grupo forma-*Rhizoctonia* (Kristiansen, Freudenstein, Rasmussen & Rasmussen, 2004; McCormick, Whigham & O'Neill, 2004; Shefferson, Weiß, Kull & Taylor, 2005; Kottke et al. 2008).

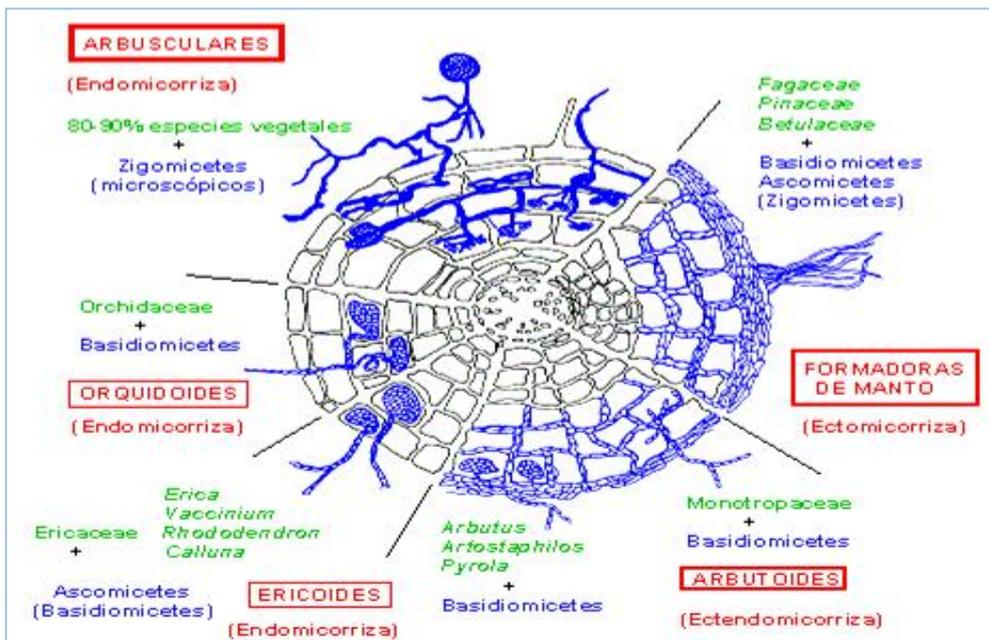


Figura 5. Esquema demostrativo para los diferentes tipos y subtipos de micorrizas.

Fuente: (José Miguel Barea Navarro, 1998).

1.5 Importancia ecológica de las micorrizas de orquídeas.

Ecológicamente las micorrizas de orquídeas colaboran directamente con la germinación, establecimiento y desarrollo de orquídeas contribuyendo así a su conservación (Dearnaley, 2007; Jacquemyn, Honnay, Cammue, Brys & Lievens, 2010; Soriano, Martínez & Segundo, 2012; Nurfadilah, Swarts, Dixon, Lambers & Merritt, 2013). El motivo de la presencia de determinados géneros de hongos micorrízicos, puede relacionarse con la altitud y las condiciones climáticas, siendo las micorrizas las más esparcidas en el mundo (Bayman & Otero, 2006; Suárez et al. 2006; NCYT, 2017). Así mismo, la micorrización incrementa los niveles de fitohormonas en los tejidos de las plantas lo que provoca que el hongo exude al medio sustancias con actividad auxínica, giberelínica y citoquinínica, mejorando la

germinación de semillas de orquídeas en la naturaleza (Barea, 1985; Pflieger & Linderman, 1994; Moncalvo et al., 2006; Porras Alfaro & Bayman, 2007; Ming et al. 2014).

A su vez, la micorrización contribuye en su estado nutricional transfiriendo a través de la matriz interfacial, producido entre el pelotón de hongos y la membrana celular de orquídeas, los nutrientes como el carbono (C), el fósforo (P) y el nitrógeno (N) a la planta (Bougoure et al. 2013; Kuga, Sakamoto & Yurimoto, 2014). Por otra lado, las orquídeas fotosintéticas exportan azúcares y solo recibe P a través del hongo por las membranas intactas (Cameron, Leake & Read, 2006). Siendo la simbiosis micorrízica de gran importancia debido a que los micelios externos del hongo ayudan en la asimilación de nutrientes como son: Zinc (Zn), Azufre (S), Potasio (K), Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Manganeseo (Mn) y N por la planta, favoreciendo de esta manera para su mejor desarrollo y función, debido a la fijación del nitrógeno atmosférico (Plenchette, 1982; Alarcon & Ferrera, 2000). Sin embargo, los niveles altos de metales pesados como; aluminio (Al), cobre (Cu) o hierro (Fe), parecen tener un efecto negativo sobre las simbiosis de las micorrizas (Hepper & Warner, 1983).

Sin duda alguna los hongos micorrízicos de orquídeas tienen la capacidad de utilizar diferentes fuentes de N, donde la mayoría de las orquídeas fotoautótrofas tienen una comunidad diversa de hongos micorrízicos de orquídeas en sus protocormos y raíces, incluyendo a menudo especies de *Tulasnella* y *Ceratobasidium* los cuales se desarrollan de mejor forma en las fuentes de N orgánico (e. g. glutamina, ácido glutámico y amonio NH₄⁺) empleados como parte de medios sólidos que se aplican en experimentos de germinación y crecimiento de orquídeas *in vitro* (Gress, Nichols, Northcraft & Peterjohn, 2007; Leigh, Hodge & Fitter, 2008; Jacquemyn, Honnay, Cammue, Brys & Lievens, 2010; Ercole et al. 2013; Fochi et al. 2017).

Adicionalmente la simbiosis micorrízica reduce el estrés de las orquídeas en periodos de falta de agua (sequia), por falta de nutrientes, cambio de pH del suelo o por metales tóxicos (Otero & Bayman, 2009; Aguilar & Martinez, 2011).

1.6 Ensayos de germinación de semillas de orquídeas *in vitro* y su problemática al no poseer hongos micorrízicos específicos.

Para la germinación de semillas *in vitro*, se pueden utilizar frascos de vidrio o plástico que contenga un medio nutritivo específico para que estas germinen y desarrollen plántulas normalmente (McKendrick, 2000). Es así que el cultivo *in vitro* permite una rápida multiplicación de especies sin necesidad de hongos micorrízicos (Martínez et al. 2003).

Es así que se han generado dos tipos de germinación: el primero la germinación asimbiótica y el segundo la germinación simbiótica (McKendrick, 2000).

Al hablar sobre germinación asimbiótica, nos referimos a la ausencia de hongos simbióticos u hongos específicos (Mosqueda, Camero, Lázaro & Hernández, 2010). En este tipo de germinación no existe la ayuda del hongo, por lo que el medio requiere contar con los nutrientes orgánicos e inorgánicos necesarios para que las semillas de la planta germine y se desarrolle por completo (McKendrick, 2000), convirtiéndose en un tipo de germinación más compleja que la germinación simbiótica. Este tipo de germinación es frecuentemente empleada en la propagación de orquídeas tropicales (McKendrick, 2000).

Por otro parte, la germinación simbiótica implica que el hongo coloniza las semillas estableciendo una relación simbiótica (Cueva, 2014). El propósito de esta simbiosis, es que los azúcares necesarios para la germinación y primordialmente para el desarrollo del protocormo sean proporcionados por el hongo (Weber & Webster, 2001). El beneficio de utilizar un medio simple como por ejemplo avena en polvo, con una mínima cantidad de extracto de levadura, permite la propagación de orquídeas terrestres en zonas templadas, teniendo como resultado plantas micorrizadas más resistentes y fuertes (McKendrick, 2000). Sin embargo, el inconveniente es la selección y obtención del hongo específico o adecuado para que se establezca la simbiosis (Villalobos & Thorpe, 1991). Muchos estudios como el de Herrera (2011) se mostraron fallidos en la obtención de aislamientos puros de hongos micorrízicos de orquídeas.

CAPÍTULO II

2.1 Metodología.

2.1.1. Especímenes de hongos.

Los hongos micorrízicos que se utilizaron en este trabajo fueron aislados por Alzbetha Novotna y almacenados *in vivo* en medio PDA a 4°C en el cepario HUTPL. Tres de las cepas corresponden a *Tulasnella* spp., donde la cepa (*Stelis* sp Q3) aislada desde la orquídea *Stelis* sp., la cepa (SS2A) aislada desde la orquídea *Stelis superbiens*, y la cepa 0030AN aislada desde *Elleanthus aurantiacus*. Por otra parte, las dos cepas de *Ceratobasidium* spp., corresponden a la cepa (209A) aislada desde *Cyrtochilum myanthum*, y la cepa (0544x) aislada desde *Cyrtochilum* sp.

2.1.2. Especímenes de orquídeas.

Se adquirieron 900 plántulas de tres especies de orquídeas epifitas (300 por especie). Las especies son *Catleya iricolor*, *Galeottia acuminata* y *Helcia sanguinolenta*. Las plántulas de orquídeas estaban desarrolladas hasta los 20 días desde su germinación, en botellas de vidrio estériles con medio sólido enriquecido libres de la presencia de hongos. Las plántulas contaban aproximadamente con dos hojas laterales para cada especie de orquídea. Estas plántulas se adquirieron desde la empresa Ecuagenera (Orquídeas de Ecuador-Cuenca).

2.1.3. Procedimiento y diseño experimental.

2.1.3.1. Siembra de hongos y plántulas de orquídeas (réplicas y tratamientos).

Las cepas de los cinco hongos (*Stelis* sp Q3, SS2A, 0030AN, 209A, 0544x) fueron cultivadas en medio PDA, luego se replicaron en condiciones de asepsia a frascos de vidrio que contenían medio de agar avena OMA (4 g. de agar y 3.7 g. de avena en 500 ml de agua destilada). Se hicieron 25 réplicas (repeticiones), para los cinco hongos más sus respectivos controles negativos sin hongo micorrízico, sumando un total de 150 frascos en el estudio. Los hongos en todos los frascos se llevaron a incubación a 23° C por un periodo de siete días.

Una vez transcurrido este periodo de tiempo y observando que el hongo haya crecido en su totalidad o la mayoría del área del frasco, se procede con la siembra de las tres especies de las plántulas de orquídeas (*Catleya iricolor*, *Galeottia acuminata*, y *Helcia sanguinolenta*) en cada frasco (**Tabla 1**).

Previo a la inoculación de las plántulas de cada especie de orquídea se realizó una limpieza superficial y medición de todas las plántulas, donde el proceso consistió en colocar 10

plántulas en frascos con agua estéril durante 3 min con movimientos circulares, finalizando con un secado de las plántulas en papel filtro esterilizado.

Una vez secas las plántulas se tomaron mediciones de cada uno de las plántulas sobre una hoja milimetrada, así como varias características que se constituirán en las variables de nuestro estudio. Así, por ejemplo: peso semi-seco de las plántulas (PP), largo de las plántulas (LP), número de hojas (NH), largo de las raíces (LR), número de raíces (NR), y pesadas en la pesa (g). Todos los datos registraron y se dieron seguimiento en una hoja de cálculo Excel.

Las plántulas sembradas o inoculadas junto con los hongos se mantuvieron bajo incubación a 23°C durante seis meses con un foto-período de 12 horas con luz y 12 horas sin luz. Al cabo de los seis meses se volvieron a tomar nuevas mediciones de las cinco variantes ya antes mencionadas con el fin de evaluar el efecto de los hongos micorrízicos sobre el desarrollo de las plántulas de las tres diferentes especies de orquídeas. Los tratamientos y replicas se detallan en la siguiente **(Tabla 1)**.

| Descripción de tratamientos y replicas para los diferentes frascos de medio (OMA) conteniendo los hongos micorrízicos y plántulas de las orquídeas inoculadas | | | | | | | |
|---|------------------------|------|---------|----------------------------|------|---------|-------------------------------|
| Cepas de Hongos. Tres especies de Orquídeas. | <i>Tulasnella</i> spp. | | | <i>Ceratobasidium</i> spp. | | Control | Total, de Frascos (Replicas). |
| | <i>Stelis</i> sp Q3 | SS2A | 0030 AN | 0544x | 209A | | |
| <i>Cattleya iricolor.</i> | 25f | 25f | 25f | 25f | 25f | 25f | 150f x 2 plántulas = 300. |
| <i>Galeottia Acuminata.</i> | 25f | 25f | 25f | 25f | 25f | 25f | 150f x 2 plántulas = 300. |
| <i>Helcia sanguinolenta.</i> | 25f | 25f | 25f | 25f | 25f | 25f | 150f x 2 plántulas = 300. |
| | | | | | | | 450f x 2 plántulas = 900. |

Tabla 1. Diseño simple aleatorio. (f) = Frascos. Consistió en cinco especies, Hongos + control = 6 x 25 fraos x 3 spp. Orquídeas = 450 frascos x 2 plántulas = 900 plántulas del experimento.

2.1.4. Evaluación de colonización de raíces de orquídeas.

La colonización de hongos en las tres especies de orquídeas para todos los tratamientos y replicas se evaluó mediante la revisión totalmente observacional mediante microscopía a un aumento de 40x y 100x, donde se buscó la presencia de pelotones (ovillos) de hifas en las células corticales de las raíces.

Para esta observación se efectuó previamente al menos tres cortes transversales de las raíces de todas las orquídeas en los tratamientos, réplicas y controles. La visualización de hifas requirió de una tinción con azul de metileno al 0.05 %. Las observaciones microscópicas se registraron en fotos.

2.1.5. Análisis de datos.

Para analizar los datos de los efectos de los hongos sobre las variables en las orquídeas antes mencionadas se realizó un análisis de varianza (ANOVA), seguido de una prueba de comparación múltiple post-hoc Tukey HSD (García, Portillo & Cezón, 1993; Pasin, 2014).

CAPÍTULO III

3.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1.1. Colonización.

La colonización de hongos tanto de *Tulasnella* spp., como *Ceratobasidium* spp., se evidenció al observar la presencia de hifas fúngicas dentro de las células corticales en un 100 % de plántulas sobrevivientes de los especímenes de *Cattleya iricolor*, *Galeottia acuminata* y *Helcia sanguinolenta*. La característica de las hifas fue que estaban formando pelotones y otras solamente colonizaban el velamen de la raíz sin daño evidente de los tejidos de las raíces (**Figura 6. A, B, C**). La evidencia de colonización del hongo a las raíces de las tres especies de orquídeas nos sugiere una compatibilidad de algunas cepas de *Tulasnella* spp., y *Ceratobasidium* spp. No se evidenció daño en los tejidos como ya se reportó en varios trabajos de micorrización de orquídeas (Dearnaley, 2007; Smith & Read, 2008; Dearnaley et al. 2012). Sin embargo, esto no es indicador de especificidad entre los hongos y las orquídeas evaluadas, debido a que *in vitro* puede existir un forzamiento de ingreso de los hongos hacia las raíces de las orquídeas (Cevallos, 2012).

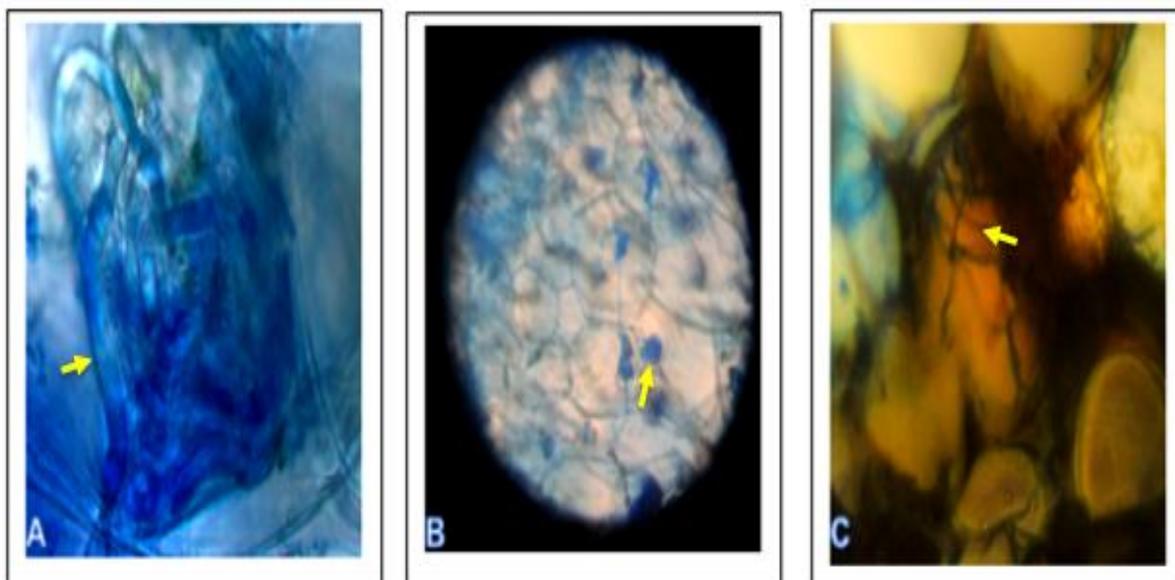


Figura 6. Colonización positiva de hongos micorrízicos. A) Hifas de la cepa *Stelis* sp Q3 de *Tulasnella* sp. dentro de células corticales de la raíz de *Cattleya iricolor* (flecha amarilla). 100x. B) Pelotones de hifas de la cepa 0544x de *Ceratobasidium* en células corticales de raíz de *Galeottia acuminata* (flecha amarilla), 40x. C) Hifas de la cepa 0030AN de *Tulasnella* sp., en células corticales de raíz de *Helcia sanguinolenta* (flecha amarilla), 100x. A, B y C) Coloración azul debido a la tinción con azul de metileno.

3.1.2. Análisis de las variables en los ensayos hongos vs orquídeas.

Al evaluar las diferentes variables (Peso de plántulas PP; largo de plántulas LP; Número de hojas NH; Número de raíces NR; Largo de raíces LR) de manera predominantemente se muestra que las especies del género *Tulasnella* favorecen algunas de las variables en las especies de orquídeas teniendo un efecto positivo. Por ejemplo, en *Cattleya iricolor* las variables, PP, LR, NR y en *Helcia sanguinolenta* las variables, PP, LP, NR, respectivamente (**Figura 7 y 8**). La variable PP se muestra incrementado significativamente en *Cattleya iricolor* lo que aparentemente está directamente relacionado al incremento del LR y NR en las plántulas. Por otra parte, las plántulas de *H. sanguinolenta* también tuvieron un incremento en el PP, pero correlacionado con el incremento LP y NR. Las orquídeas pueden reaccionar diferentemente según la presencia de hongos específicos como *Tulasnella* o *Ceratobasidium* (Otero et al. 2002) asociados para su germinación, desarrollo y establecimiento de orquídeas debido a la activación y represión de diferentes genes (Zettler, Corey, Jacks, Gruender & Lopez 2013).

El efecto positivo o negativo de las diferentes cepas de hongos con respecto de sus hospederos se detallan a continuación acorde a la especie de orquídea.

3.1.2.1. *Cattleya iricolor*.

Nuestros resultados muestran que algunos hongos micorrízicos del género *Tulasnella* pueden influenciar positivamente en el desarrollo de las orquídeas según su especificidad, por ejemplo las variables de PP se ven aumentadas en *Cattleya iricolor* con aproximadamente 0,5 g, y un incremento en el LR de 2 mm al ser tratadas con las cepas *Stelis* sp Q3 y SS2A, así mismo estas cepas influenciaron el NR donde en promedio se incrementaron 2 raíces más por plántula al compararlas con el control (**Figura 7. A, D, E**). Las dos cepas de *Tulasnella* spp., no tuvieron un valor significativo para el resto de las variables analizadas (**Figura 7. A, D, E**). Los efectos positivos anteriormente mencionados pueden deberse a que algunas especies de *Tulasnella* si tienen afinidad con miembros del género *Cattleya* como lo menciona Gálvez García et al. (2000).

Adicionalmente la relación de cepas de *Tulasnella* spp., con la especie *Cattleya iricolor* puede probablemente ser factible ya que las cepas evaluadas fueron aisladas desde orquídeas *Stelis* spp., las mismas que pertenecen a la familia; Orchidaceae subfamilia; Epidendroideae y tribu; Epidendreae, similar a la especie *Cattleya iricolor*. Adicionalmente, la compatibilidad de *Tulasnella* spp. con *Cattleya iricolor* se puede deber a que el género *Tulasnella* se reporta como el mayor colonizador de especies de orquídeas en bosques tropicales (Suárez et al. 2006; Kottke et al. 2010) donde también se desarrolla *Cattleya iricolor* la cual no ha sido exhaustivamente estudiada. Así mismo hay otros estudios como el

de Dearnaley et al. (2007), en el cuál se indica que especies de *Tulasnella* como por ejemplo *Tulasnella calospora* puede formar micorrizas con más de una orquídea inclusive en diferentes partes del planeta (e. g. Europa, América del Norte, América del Sur, Australia y Asia). Otros estudios ya determinan que *Tulasnella* spp. aportan significativamente en el desarrollo de plántulas de orquídeas (Otero et al. 2002). De igual forma autores como Martos et al. (2012), sugirieron a *Tulasnella* como el principal linaje de hongos implicados en la simbiosis de micorrizas de orquídeas.

Por otra parte, la cepa *Ceratobasidium* código 0544x no presentó un efecto positivo con respecto al control, en tres de las variables analizadas. En el PP de *Cattleya iricolor* se evidenció un valor inferior en aproximadamente 0,5 g, además, en el NH se observó menor cantidad de hojas, 5 hojas por plántula y adicionalmente el LR presentó una inferioridad de 10 mm respecto del control. Porrás-Alfaro & Bayman (2007) en su estudio indica que varios hongos micorrízicos que se evaluaron en su experimento no presentaron una buena relación con el género de orquídea *Vanilla* lo cual repercutió en el buen desarrollo de las plántulas especialmente en el diámetro, el número de hojas. Estos resultados son similares a los nuestros especialmente respecto de la especie *Cattleya iricolor* ya que coincidentemente se tratan de las mismas variables (Figura 7. A, C, E).

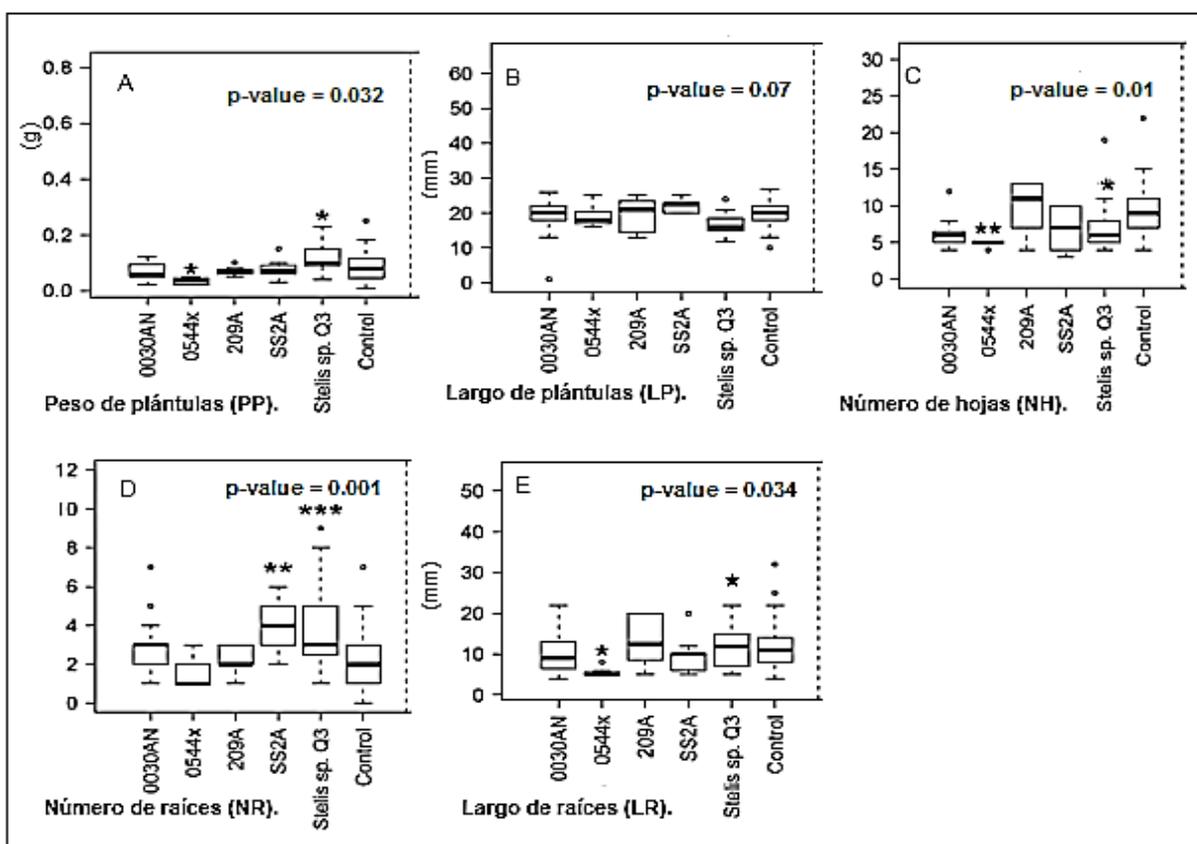


Figura 7. Análisis de las características fenotípicas de *Cattleya iricolor*. Variables: A). PP; B). LP; C). NH; D). NR; y E). LR. Cada una de las variables está en función de las cinco cepas de hongos

(*Stelis* sp Q3, SS2A, 0030AN, 209A, 0544x) versus el control. El p-valor del ANOVA se indica por cada grupo de datos. Los valores de significancia de la prueba de Tukey HSD se señalan sobre los boxplot: * ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.01$), *** ($p \leq 0.001$).

3.1.2.2. *Helcia sanguinolenta*.

En cuanto a *Helcia sanguinolenta*, se muestra que la cepa de *Tulasnella* spp. 0030AN, fue la mejor especie de hongo asociada influyendo significativamente en las variables PP con un aumento de 0,7 g, en el LP con un aproximado de 6 mm y en NR con un incremento cercano a 5 raíces siendo superiores a los datos obtenidos en el control (**Figura 8. F, G**). Por otra parte, el efecto del hongo micorrízico en las demás variables no tuvo valor significativo en comparación con el control.

La factibilidad de la especie de *Tulasnella* al asociarse con la orquídea *Helcia sanguinolenta*, puede deberse a la cercanía de relación taxonómica existente entre *Helcia sanguinolenta* y *Elleanthus aurantiacus* cuya orquídea es de donde se aisló el hongo micorrízico. Ambas orquídeas con afinidad de receptar al hongo micorrízico pertenecen a la familia; Orchidaceae, Subfamilia; Epidendroideae. Adicionalmente se fortalece la hipótesis que las especies de *Tulasnella* son los micobiontes más comunes asociados a orquídeas especialmente en los trópicos (Suárez et al. 2006; Kottke et al. 2010).

Sin embargo, la especie de *Tulasnella* con la cepa SS2A presento valores negativos respecto de los controles para las variables, NR con valores menores de aproximadamente 3 mm y el LR donde el valor fue inferior con al menos 3 mm aproximadamente (**Figura 8. I, J**). Por lo que esta cepa de *Tulasnella* no se muestra beneficiosa para el desarrollo de las plántulas de la especie *Helcia sanguinolenta*.

Por otro lado, la orquídea *Helcia sanguinolenta* también se mostró con afinidad de receptar a la cepa *Ceratobasidium* sp. 0544x, con la que se obtuvo un efecto significativamente positivo sobre la variable PP donde el valor elevado fue de aproximadamente 0,7 g frente a los valores para el control (**Figura 8. F**). Este resultado se correlaciona con otros estudios como por ejemplo, Segovia et al. (2012) donde se menciona que los hongos micorrízicos benefician varios aspectos del desarrollo de la planta como: altura y número de hojas. El hongo *Ceratobasidium* influye positivamente en la variable PP, pero su significancia es menor, dado que presenta disminución en la variable NH por parte de las cepas 0544x y 209A (**Figura 8. H**), siendo *Tulasnella* spp., el hongo micorrízico que presenta más eficacia en comparación con el aporte a las variables de la planta, esto puede deberse que la forma en que actúan las especies de estos dos géneros de hongos *Tulasnella* y *Ceratobasidium* es

probablemente diferente por lo que el mecanismo de intercambio de nutrientes y minerales para desarrollo de las plántulas y su expresión fenotípica difiere (Porrás-Alfaro & Bayman, 2007).

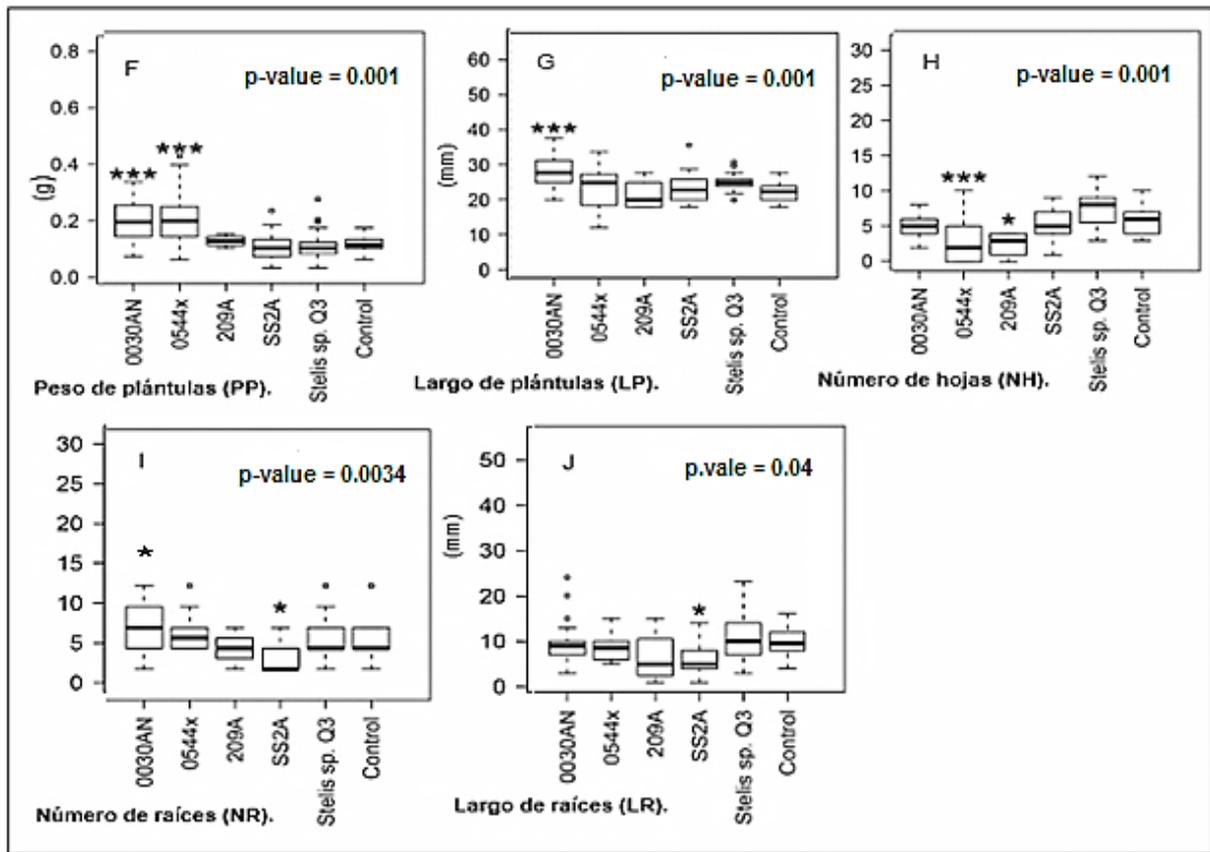


Figura 8. Análisis de las características fenotípicas de *Helcia sanguinolenta*. Variables: A). PP; B). LP; C). NH; D). NR; y E). LR. Cada una de las variables está en función de las cinco cepas de hongos (*Stelis* sp Q3, SS2A, 0030AN, 209A, 0544x) versus el control. El p-valor del ANOVA se indica por cada grupo de datos. Los valores de significancia de la prueba de Tukey HSD se señalan sobre los boxplot: * ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.01$), *** ($p \leq 0.001$).

3.1.2.3. *Galeottia acuminata*.

Al evaluar la especie de *Galeottia acuminata* con el hongo *Ceratobasidium* spp., cepa 0544x y la cepa 209A, se presentó un efecto positivo significativo (**Figura 9. K**), donde se aumentó aproximadamente 0,10 g y 0,20 g en el PP respectivamente según la cepa muy superiores a los valores obtenidos para los controles. En cuanto a los otros hongos micorrízicos no presentaron significancia alguna con respecto al control en las diferentes orquídeas. Datos similares a estos resultados fueron obtenidos por Otero, Aragón & Ackerman (2007) donde se resalta que especies del género *Ceratobasidium* son beneficiosos como hongo

micorrízicos para una amplia diversidad de orquídeas principalmente en variables como altura de la planta, masa y longitud de raíces (Ordoñez, 2012).

Aparentemente la correlación entre la familia; *Orchidaceae*, Subfamilia; Epidendroideae y tribu; Cymbidieae tanto para la especie *Galeottia acuminata* y *Cyrtochilum* spp. de donde se asilaron las cepas de *Ceratobasidium* spp. 0544x y 209A sugiere que la cercanía en grupos taxonómicos podría estar influenciando en la asociación de hongos micorrízicos y sus hospederos.

Aunque no se tengan suficientes datos para sugerir que este género de *Ceratobasidium* tenga una preferencia hacia esta especie de orquídea, estudios Kennedy et al. (2011) indican que éstos hongos son los primeros simbiontes micorrízicos en especies de la subfamilia; Epidendroideae (Kennedy et al. 2011).

Por otra parte, la especie de *Tulasnella* con la cepa SS2A presento valores negativos respecto de los controles para las variables, LP con valores inferiores de aproximadamente 3 mm y el LR donde el valor fue inferior con al menos 4 mm (**Figura 9. L, O**). Es así que esta cepa de *Tulasnella* no se muestra beneficiosa para el desarrollo de las plántulas de la especie *Galeottia acuminata*.

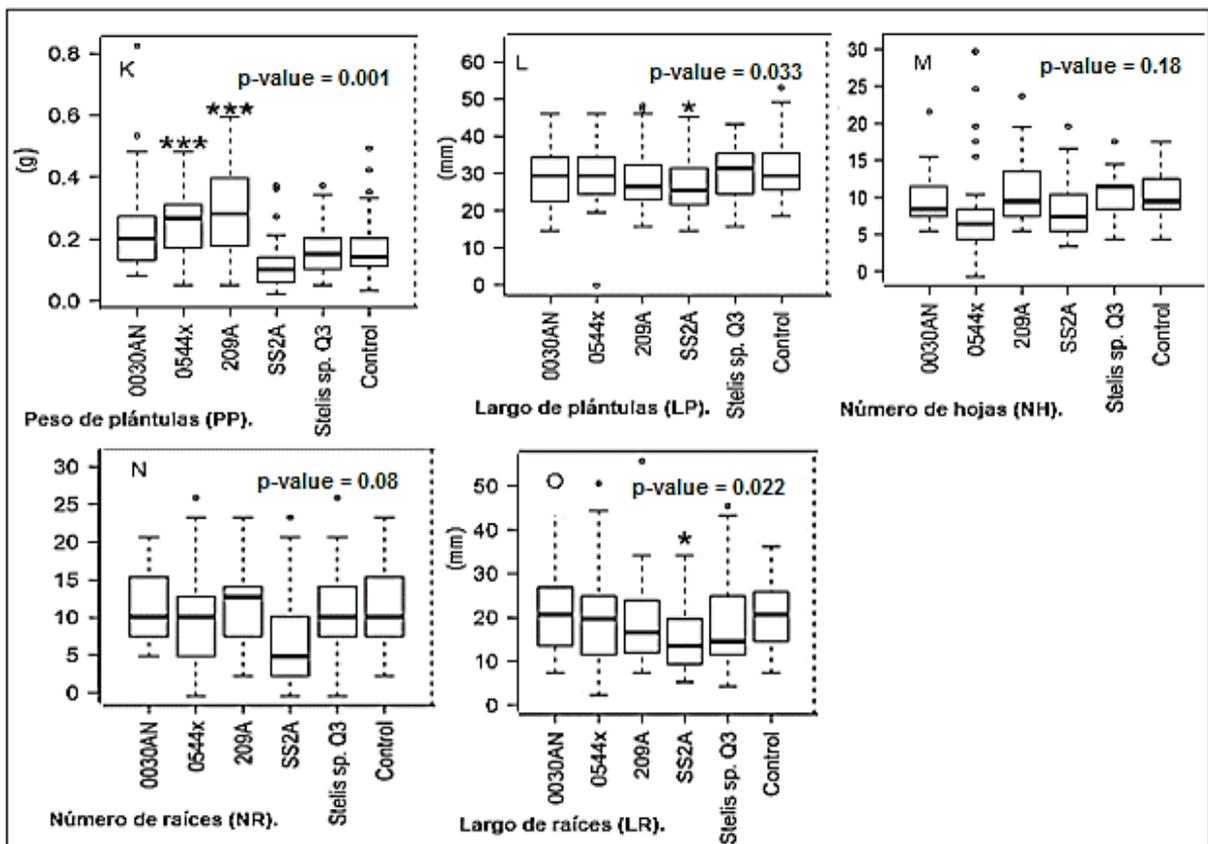


Figura 9. Análisis de las características fenotípicas de *Galeottia acuminata*. Variables: A). PP;

B). LP; C). NH; D). NR; y E). LR. Cada una de las variables está en función de las cinco cepas de hongos (*Stelis* sp Q3, SS2A, 0030AN, 209A, 0544x) versus el control. El p-valor del ANOVA se indica por cada grupo de datos. Los valores de significancia de la prueba de Tukey HSD se señalan sobre los boxplot: * ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.01$), *** ($p \leq 0.001$).

Los resultados de nuestra investigación presentan de forma preliminar que varios de los hongos micorrízicos aislados pueden tener un comportamiento simbiote con especies de orquídeas, aunque no fuesen aislados de estas. Todo esto parece confirmar la posibilidad de una relación simbiótica hongo-orquídea, de manera inespecífica, dejando la hipótesis que muchos hongos micorrízicos sean generalistas colonizando otras orquídeas como ya se menciona en algunos estudios (Warcup & Talbot, 1967; Brundrett, 2004; Suárez et al. 2006; Cueva & González, 2009 Chutima, Dell & Lumyong, 2010). Así mismo, Porrás-Alfaro & Bayman (2007) estudiando orquídeas del género *Vanilla*, reportó un mayor porcentaje de germinación de semillas cuando estas se inocularon con hongos provenientes de otras orquídeas, descartando la especificidad por lo menos a nivel de especie por parte de los hongos micorrízicos.

Nuestros resultados son importantes al demostrar que los hongos tanto *Tulasnella* o *Ceratobasidium* de alguna forma colaboran en el desarrollo de las orquídeas, por ejemplo, en el incremento del peso y del número de raíces. Es así que es de vital importancia continuar con estudios de especificidad de hongos micorrízicos con pruebas *in vitro* que permitan la generación de datos concluyentes que a su vez nos lleven a la creación de nuevas estrategias para la conservación y reinserción de orquídeas en su hábitat natural (Dixon, 2003).

CONCLUSIONES.

- Las especies de *Tulasnella* y *Ceratobasidium* analizadas se muestran generalistas al colonizar especies diferentes de orquídeas de las que fueron aisladas.
- *Tulasnella* spp. se constituyen en los hongos más influyentes significativamente sobre el desarrollo para las variables: PP, LR, NR y LP en las plántulas de *Cattleya iricolor* y *Helcia sanguinolenta*.
- *Ceratobasidium* spp. influenciaron significativamente sobre la variable PP en la especie de *Galeottia acuminata*
- *Tulasnella* spp. y *Ceratobasidium* spp. colonizaron las células corticales de las orquídeas estudiadas, formando pelotones (ovillos) características distintivas de la simbiosis micorrízica de orquídeas.

RECOMENDACIONES.

- Se podría realizar un estudio sobre otros tipos de hongos micorrízicos, que sean puestos a pruebas con orquídeas de la misma especie de la que fueron aislados.
- Para trabajos posteriores incluir más variables como ancho de tallo, peso de frasco para un análisis más exacto.
- Implementar un Banco de Cepas de hongos micorrízicos de orquídeas tropicales que ya hayan sido identificadas y así contribuir en la conservación de orquídeas.

BIBLIOGRAFÍA.

- Abdelnour-Esquivel, A. M., & Muñoz-Bustos, A. (1999). Rescate, establecimiento y conservación de orquídeas en vías de extinción. *Tecnología en Marcha*, 13(1), 24–30.
- Aguilar, J. M. De, & Martínez, D. G. (2011). Las micorrizas, nuestras aliadas ocultas., 5.
- Alarcón, A., & Ferrera C. R. (2000). *Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular*. Mexico: Mundi-Prensa.
- Alec, O. Q. (1994). VIII International Orchid Exhibition, First International Convention for the Conservation of Orchids of the Andes.
- Andes. (2015). “El Reino de las Orquídeas”, un emprendimiento de ecoturismo desde Carchi, Ecuador. Agencia Pública de Noticias Del Ecuador Y Suramerica. Recuperado de <http://www.andes.info.ec/es/noticias/reino-orquideas-emprendimiento-ecoturismo-carchi-ecuador.html>
- Arditti, J., & Ghani, A. K. A. (2000). Tansley Review No. 110: Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*, 145(3), 367–421. doi:10.1046/j.1469-8137.2000.00587.x
- Barea, J. M. (1985). Importance of hormones and root exudates in mycorrhizal phenomena. *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*.
- Bayman, P., & Otero, J. T. (2006). Microbial Endophytes of Orchid Roots, 153–181. doi:10.1007/3-540-33526-9
- Bernard, N. (1909). *L'évolution dans la symbiose: les orchidées et leurs champignons commensaux*. Paris: Masson et Cie, Éditeurs.
- Brundrett, M., Merryweather, J., & Moyersoen, B. (1996). Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR Monograph. *The Journal of Biological Chemistry*, 32 (June 1982), 374. doi:10.1046/j.1469-8137.1997.00703-7.x
- Bougoure, J., Ludwig, M., Brundrett, M., Cliff, J., Clode, P., Kilburn, M., & Grierson, P. (2013). High-resolution secondary ion mass spectrometry analysis of carbon dynamics in mycorrhizas formed by an obligately myco-heterotrophic orchid. *Plant, Cell and Environment*, 37(5), 1223–1230. doi:10.1111/pce.12230
- Brundrett., M. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews*, 79(3), 473–495. doi: 10.1017/S1464793103006316

- Brundrett, M., Merryweather, J., & Moyersoen, B. (1996). Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR Monograph. *The Journal of Biological Chemistry*, 32 (June 1982), 374. doi: 10.1046/j.1469-8137.1997.00703-7.x
- Cairney, J. W. G., & Ashford, A. E. (2002). Biology of mycorrhizal associations of epacrids (Ericaceae). *New Phytologist*, 154(2), 305–326. doi: 10.1046/j.1469-8137.2002.00398.x
- Cameron, D. D., Leake, J. R., & Read, D. J. (2006). Mutualistic mycorrhiza in orchids: Evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytologist*, 171(2), 405–416. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01767.x
- Caneva, S. (1990). Orquídeas. Principales géneros y especies. Su cultivo.
- Celi, R. E. P. (2011). *Caracterización morfológica de semillas y del proceso germinativo de seis especies de orquídeas amenazadas en la provincia de Loja para la conservación en el banco de germoplasma de la UTPL*. (Tesis de Grado, Universidad Técnica de Ambato). Recuperado de <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/1921/1/BQ%2017.pdf>
- Cevallos, S. (2012). *Colección, caracterización morfológica–molecular y experimentos de inoculación in-vitro de Basidiomicetes potencialmente micorrízicos de orquídeas en Bosque Montano del Sur del Ecuador*. (Tesis de Grado, Universidad Técnica Particular de Loja). Recuperado de [http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Especial:Libro&bookcmd=download&collection_id=1f5d1e2ecca3c53&writer=rl&return_to=Loja+\(Ecuador\)](http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Especial:Libro&bookcmd=download&collection_id=1f5d1e2ecca3c53&writer=rl&return_to=Loja+(Ecuador))
- Chaverri, P., Huhndorf, S. M., & Rogers, J. D. (2011). *Microhongos Comunes de Costa Rica y Otras Regiones Tropicales / Common Microfungi of Costa Rica and other Tropical Regions (Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes)*. (INBio, Ed.) (1st ed.).
- Chutima, R., Dell, B., & Lumyong, S. (2010). Effects of mycorrhizal fungi on symbiotic seed germination of *Pecteilis susannae* (L.) Rafin (Orchidaceae), a terrestrial orchid in Thailand. *Symbiosis*, 53(3), 149–156. doi: 10.1007/s13199-011-0120-8
- Correa, I. C. C., & Andrade, S. S. (2008). *Micropropagación De Cattleya Quadricolor*. (Tesis de grado, Universidad Eafit). Recuperado de <http://www.corpoica.org.co/sitioweb/documento/jatrophacontrataciones/bodiesel-eafil.pdf#page=122>

- Cuenca, G., Andrade, Z. D. E., Lovera, M., Fajardo, L., Meneses, E., & Márquez, M. (2002). Para la Rehabilitación de Áreas, 27, 165–172.
- Cueva. (2014). *Caracterización molecular de hongos micorrízicos aislados a partir de cuatro especies de orquídeas epífitas, en dos pisos altitudinales de bosque montano*. (Tesis de grado, Universidad Técnica Particular de Loja). Recuperado de http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/10242/1/Cueva_Agila_Anabel_de_los_Angeles.pdf
- Cueva, A., & González, Y. (2009). In vitro germination and somatic embryogenesis induction in *Cyrtorchilum loxense*, an endemic, vulnerable orchid from Ecuador. *Proceedings of the second scientific conference on Andean Orchids*, 56–62.
- Cruz, D., Suárez, J. P., Kottke, I., Piepenbring, M., & Oberwinkler, F. (2011). Defining species in *Tulasnella* by correlating morphology and nrDNA ITS-5.8S sequence data of basidiomata from a tropical Andean forest. *Mycological Progress*, 10(2), 229–238. doi: 10.1007/s11557-010-0692-3
- Daniel, H. (1959). Anatomía de Orquídeas. *La Maravillosa Naturaleza*, 312–335.
- Dearnaley, J. D. W. (2007). Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza*, 17(6), 475–486. doi: 10.1007/s00572-007-0138-1
- Dearnaley, J. D. W., Martos, F., & Selosse, M. -a. (2012). Orchid Mycorrhizas: Molecular Ecology, Physiology, Evolution and Conservation Aspects. *Fungal Associations*, 2, 216. doi: 10.1007/978-3-642-30826-0
- Dixon., K. (2003). *Raising terrestrial orchids from seed*. Australia.
- Dressler, R. L. (1994). *Phylogeny and Classification of the Orchid Family*. Australia.
- Ecuador Megadiverso. (2011). El reino de las Órquídeas. *Wordpress*. Recuperado de <https://ecuadormegadiverso.wordpress.com/>
- Ecuagenera. (2017). *Helcia sanguinolenta*. *Orchids from Ecuador*. Recuperado de <http://www.ecuagenera.com/Helcia-sanguinolenta/en>
- Ecuagenera. (2017). Orquídea *Cattleya iricolor*.
- Edwards. (1845). *Helcia* Lindl. *Bot*, 17.

- Ercole, E., Rodda, M., Molinatti, M., Voyron, S., Perotto, S., & Girlanda, M. (2013). Cryopreservation of orchid mycorrhizal fungi: A tool for the conservation of endangered species. *Journal of Microbiological Methods*, 93(2), 134–137. doi: 10.1016/j.mimet.2013.03.003
- Escalante, P., & Ofelia., F. (1995). *Efecto de la micorrización sobre la respuesta a la sequía en plántulas de Eucalipto*. Mexico.
- Fochi, V., Chitarra, W., Kohler, A., Voyron, S., Singan, V. R., Lindquist, E. A., ... Perotto, S. (2017). Fungal and plant gene expression in the *Tulasnella calospora*–*Serapias vomeracea* symbiosis provides clues about nitrogen pathways in orchid mycorrhizas. *New Phytologist*, 213(1), 365–379. doi: 10.1111/nph.14279
- Frank, B., Tafel, M., & Minister, H. (1885). 21. B. Frank: Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unter, 128–145. doi:10.1111/j.1438-8677.1885.tb04240.x
- Gálvez García, D. Y. (2000). *Evaluación de hongos micorrízicos y sustratos para el cultivo de las orquídeas *Cattleya skinneri* y *Meracyllium trinasatum**. (Tesis de Grado, Universidad Autónoma de Chiapas). Recuperado de <http://bibliotecasibe.ecosur.mx/sibe/book/000024626>
- García, J. M. C., Portillo, E. M., & Cezón, P. A. (1993). Introducción a la programación estadística con R para profesores.
- Givnish, T. J., Spalink, D., Ames, M., Lyon, S. P., Hunter, S. J., Zuluaga, A., ... Cameron, K. M. (2015). Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. *Proceedings of the Royal Society B*, 282(1814). doi: 10.1098/rspb.2015.1553
- Gómez, L. I. A., Portugal, V. O., Arriaga, M. R., & Alonso, R. C. (1994). Micorrizas arbusculares. *Ciencia Ergo Sum*, 14, 300–306.
- Granados, D., López, G. F., Hernández, M. Á., & Sánchez, A. (2003). Ecología de las plantas epífitas, 9(2), 101–111.
- Gress, S. E., Nichols, T. D., Northcraft, C. C., & Peterjohn, W. T. (2007). Nutrient Limitation in Soils Exhibiting Differing Nitrogen Availabilities: What Lies Beyond Nitrogen Saturation? *Ecology*, 88(1), 119–130. doi: 10.1890/0012-9658(2007)88[119:NLISED]2.0.CO;2

- Hágsater, E., & Salazar, G. A. (1990). Icones Orchidacearum. Fascicle I. *Asociacion Americana de Orquideologia A.C.*, 1, 53–123.
- Havkin-Frenkel, D., French, J., Pak, F., & Frenkel, C. (2005). Vanilla planifolia's: botany, curing options and future market prospects. *Perfumer & Flavorist*, 30, 36–55.
- Hepper, C. M., & Warner, A. (1983). Role of organic matter in growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in soil. *Transactions of the British Mycological Society*, 81(1), 155–156. doi: 10.1016/S0007-1536(83)80219-8
- Herrera, P., Suarez, J. P., & Kottke, I. (2010). Orchids keep the ascomycetes outside: a highly diverse group of ascomycetes colonizing the velamen of epiphytic orchids from a tropical mountain rainforest in Southern Ecuador. *Mycology*, 262–268. doi:10.1080/21501203.2010.526645
- Huertes, Pa. (2011). “*Estudio Micológico De Las Especies Más Representativas Del Valle Del Jaramilla Y Pico Del Ocejón (Guadalajara).*” (Tesis de Grado, Universidad Politécnica de Madrid). Recuperado de http://oa.upm.es/15576/1/PFC_Pablo_Huertes.pdf
- Jacquemyn, H., Honnay, O., Cammue, B. P. A., Brys, R., & Lievens, B. (2010). Low specificity and nested subset structure characterize mycorrhizal associations in five closely related species of the genus *Orchis*. *Molecular Ecology*, 19(18), 4086–4095. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04785.x
- Jijón, C., & Navarrete, H. (2007). *Ecuador país de Orquídeas*: (Ecuador). Quito.
- Jorgensen, P. M., & León-Yáñez, S. (1999). *Catálogo de las Plantas Vasculares del Ecuador*. (Missouri B). Quito-Ecuador: St. Louis, Missouri, USA.
- Kennedy, A. H., Taylor, D. L., & Watson, L. E. (2011). Mycorrhizal specificity in the fully mycoheterotrophic *Hexalectris* Raf. (Orchidaceae: Epidendroideae). *Molecular Ecology*, 20(6), 1303–1316. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05000.x
- Koegel, S., Brulé, D., Wiemken, A., Boller, T., & Courty, P. E. (2015). The effect of different nitrogen sources on the symbiotic interaction between *Sorghum bicolor* and *Glomus intraradices*: Expression of plant and fungal genes involved in nitrogen assimilation. *Soil Biology and Biochemistry*, 86(3), 159–163. doi: 10.1016/j.soilbio.2015.03.003

- Kottke, I., Haug, I., Setaro, S., Suárez, J. P., Weiß, M., Preußing, M., ... Oberwinkler, F. (2008). Guilds of mycorrhizal fungi and their relation to trees, ericads, orchids and liverworts in a neotropical mountain rain forest. *Special Feature: Facing a Hotspot of Tropical Biodiversity*, 9(1), 13–23. doi: 10.1016/j.baae.2007.03.007
- Kottke, I., Suárez, J. P., Herrera, P., Cruz, D., Bauer, R., Haug, I., & Garnica, S. (2010). Atractiellomycetes belonging to the “rust” lineage (Pucciniomycotina) form mycorrhizae with terrestrial and epiphytic neotropical orchids. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 277(December 2009), 1289–1298. doi: 10.1098/rspb.2009.1884
- Kristiansen, K. A., Freudenstein, J. V, Rasmussen, F. N., & Rasmussen, H. N. (2004). Molecular identification of mycorrhizal fungi in *Neuwiedia veratrifolia* (Orchidaceae), 33, 251–258. doi: 10.1016/j.ympcv.2004.05.015
- Kuga, Y., Sakamoto, N., & Yurimoto, H. (2014). Stable isotope cellular imaging reveals that both live and degenerating fungal pelotons transfer carbon and nitrogen to orchid protocorms. *New Phytologist*, 202(2), 594–605. doi: 10.1111/nph.12700
- Landcare Research. (2013). Orchidaceae: orchid, ladyslipper, *Vanilla*. Recuperado de, <http://plantphylogeny.landcareresearch.co.nz/webforms/ViewTree.aspx?ObjectID=78384aef-ffbf-44a3-a489-fb816f4f0c7f>
- Leigh, J., Hodge, A., & Fitter, A. H. (2008). Arbuscular mycorrhizal fungi can transfer substantial amounts of nitrogen to their host plant from organic material. *New Phytologist*, 181(1), 199–207. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02630.x
- Lindl. (1824). *Cattleya*, p. 33.
- Luna., C. N., & Ruiz., L. V. (2014). 37 3 Simbiosis micorrícica: un análisis. doi: 10.13140/2.1.3829.5361
- Martos, F., Munoz, F., Pailler, T., Kottke, I., Gonneau, C., & Selosse, M. A. (2012). The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. *Molecular Ecology*, 21(20), 5098–5109. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05692.x
- McCormick, M. K., Whigham, D. F., & O'Neill, J. (2004). Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist*, 163(2), 425–438. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01114.x

- McKendrick, S. (2000). *Manual para la germinación in vitro de orquídeas*. Ceiba Foundation for Tropical Conservation.
- Ming, X., Lan, C., Mei, X., Qin, Y., Qiang, Y., Xiong, A., ... Xing, S. (2014). In vitro seed germination and seedling growth of an endangered epiphytic orchid, *Dendrobium officinale*, endemic to China using mycorrhizal fungi (*Tulasnella* sp.). *Scientia Horticulturae*, 165, 62–68. doi: 10.1016/j.scienta.2013.10.031
- Molina, R., & Trappe, J. M. (1981). By Specificity Lack of Mycorrhizal *Menziesii* Hosts *Arbutus* the Ericaceous *Uva-Ursi* and *Arctostaphylos*. *New Phytol*, 90(3), 495–509.
- Moncalvo, J., Carolina, N., Nilsson, R. H., Koster, B., Dunham, S. M., Matheny, P. B., ... Larsson, E. (2006). The cantharelloid clade: dealing with incongruent gene trees and phylogenetic reconstruction methods. *Mycologia*, 98(6), 937–948.
- Moreno, J. P., & Read, D. J. (2004). Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia*, 29(5), 239–247. doi: 10.4067/S0716-078X2009000100011
- Mosqueda, A. M., Camero, J. G. C., Lázaro, E. de la C., & Hernández, A. F. (2010). Germinación in vitro de Semillas y Desarrollo de Plántulas de Orquídeas Silvestres de Tabasco. Villahermosa, Tabasco. México. Biodiversidad. Desarrollo Sustentable y Trópico Húmedo. Recuperado de <http://www.archivos.ujat.mx/2011/difusion/libros/11.pdf>
- Mundiflora. (2017). Orquídea *Galeottia acuminata*.
- Navarro, J. de D. F. (2004). Efecto beneficioso de las micorrizas sobre las plantas. Universidad de Sevilla. Recuperado de http://www.bioscripts.net/col/Apuntes/Nutricion_Vegetal/Trabajo_de_nutricion_vegetal.pdf
- NCYT. (2017). La importancia de las micorrizas. Recuperado de <http://noticiadelaciencia.com/not/14730/la-importancia-de-las-micorrizas/>
- Nurfadilah, S., Swarts, N. D., Dixon, K. W., Lambers, H., & Merritt, D. J. (2013). Variation in nutrient-acquisition patterns by mycorrhizal fungi of rare and common orchids explains diversification in a global biodiversity hotspot. *Annals of Botany*, 111(6), 1233–1241. doi: 10.1093/aob/mct064

- Ordoñez, N. (2012). *Efecto de hongos endófitos de orquídeas del grupo rhizoctonia y otros endófitos cultivables sobre el desarrollo de plantas de Vanilla planifolia Jacks.* (Tesis de Magíster Universidad Técnica de Colombia). Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/6760/1/52518492.2012.pdf>
- Ortiz, R. (2012). *Hongos Ectomirricicos.* (Tesis de Grado, Universidad Autónoma Agrario Antonio Narro). Recuperado de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1019/62125s.pdf?sequence=1>
- Otero, J. T., Ackerman, J. D., & Bayman, P. (2002). Diversity and host specificity of endophytic Rhizoctonia-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*, 89(11), 1852–1858. doi: 10.3732/ajb.89.11.1852
- Otero, J. T., Ackerman, D. J., & Bayman, P. (2004). Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology*, (2004), 13, 2393–2404. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02223.x
- Otero, J. T., Aragón, S., & Ackerman, J. D. (2007). Site variation in spatial aggregation and phorophyte preference in *Psychilis monensis* (Orchidaceae). *Biotropica*, 39(2), 227–231. doi: 10.1111/j.1744-7429.2006.00258.x
- Otero, J. T., & Bayman, P. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epifitas. *Acta Agronómica*, 58(4), 270–276.
- Ovando, I., Damon, A., Bello, R., Ambrosio, D., Albores, V., Adriano, L., & Salvador, M. (2005). Isolation of Endophytic Fungi and Their Mycorrhizal Potential for the Tropical Epiphytic Orchids *Cattleya skinneri*, *C. aurantiaca* and *Brassavola nodosa*. *Journal of Plant Sciences*, 4(3), 309–315. doi: 10.3923/ajps.2005.309.315
- Pasin, M. (2014). Performing Anova Test in R: Results and Interpretation. Recuperado de <http://www.analyticsforfun.com/2014/06/performing-anova-test-in-r-results-and.html>
- Peñafiel, D. V. (2012). *Establecimiento de un protocolo para el cultivo in vitro de semillas de Cattleya violacea.* (Tesis de Grado, Universidad de Guayaquil). Recuperado de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1671/1/Establecimiento%20de%20un%20rotocolo%20para%20el%20cultivo%20in%20vitro%20de%20semillas%20de%20Cattleya%20violacea.%20Vargas,%20Daniela.pdf>
- Pfleger, F. L., & Linderman, R. G. (1994). Mycorrhizae and Plant Health, 6(9), 360.

- Piepenbring, M. (2015). *Introducción a la Micología en los Trópicos*. Alemania: APS PRESS.
- Plenchette, C. (1982). Les endomycorhizes à vésicules et arbuscules(VA): un potentiel à exploiter en agriculture. *Scientifique*, 108.
- Porras-Alfaro, A., & Bayman, P. (2007). Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *Mycologia*, 99(4), 510–525. doi: 10.3852/mycologia.99.4.510
- Quizhpe., V. M. V. (2014). Tipos de micorrizas. Igarss 2014, 1885(1), 1–5. doi: 10.1007/s13398-014-0173-7.2
- Rasmussen, H. N., & Rasmussen, F. N. (2009). Orchid mycorrhiza: Implications of a mycophagous life style. *Oikos*, 118(3), 334–345. doi: 10.1111/j.1600-0706.2008.17116.x
- Rasmussen, H. N., & Whigham, D. F. (2002). Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. *New Phytologist*, 154(3), 797–807. doi: 10.1046/j.1469-8137.2002.00422.x
- Rchb F. (1874). *Cattleya iricolor*.
- Rich., & Galeotti. (1945). Annales des Sciences Naturelles. *Botanique*, 3, 25.
- Rittershausen, B. (2014). *Orquídeas. Enciclopedia práctica* (Lexus).
- Roberts, P. (1999). *Rhizoctonia-forming Fungi: A Taxonomic Guide*. (Whitstable). Royal Botanic Garden.
- Santos, J. M. V. (2009). Boletín Micológico Lazarillo. *Salamanca*, 4, 90.
- Schweinf., C., Dressler, & Christenson. (1989). Galeottia Acuminata. Recuperado de <http://www.orchidspecies.com/galacuminata.htm>
- Segovia, F. A. M. (2012). *Aislamiento, caracterización y efecto de la inoculación de endomicorrizas orquídeas sobre dos especies híbridas en el noroccidente de pichincha (Mindo y Pacto)*. Departamento de Ciencias de la vida. (Tesis de Grado, Escuela Politécnica del ejército). Recuperado de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/8718/1/T-ESPE-IASA I-004604.pdf>
- Selosse., M. A., & Roy, M. (2009). Green plants that feed on fungi: facts and questions about mixotrophy. *Trends in Plant Science*, 14(2), 64–70. doi: 10.1016/j.tplants.2008.11.004

- Shefferson, R. P., Weiß, M., Kull, T., & Taylor, D. L. (2005). High specificity generally characterizes mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. *Molecular Ecology*, 14(2), 613–626. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02424.x
- Sierra, R. (1999). Propuesta Preliminar de un Sistema de Clasificación de Vegetación para el Ecuador Continental. *Proyecto INEFAN/GEF-BIRG Ecociencia*. ResearchGate. Quito. doi: 10.13140/2.1.4520.9287
- Smith, S. E., & Read, D. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis* (Third Edition) (2008th ed.). Amsterdam, London, New York, Paris: Elsevier.
- Sneh, B., Burpee, L., & Ogoshi, A. (1991). *Identification of Rhizoctonia species*. Sapporo-Japan: APS Press.
- Soriano, L. C., Martínez, J. G., & Segundo, B. S. (2012). The arbuscular mycorrhizal symbiosis promotes the systemic induction of regulatory defence-related genes in rice leaves and confers resistance to pathogen infection. *Molecular Plant Pathology*, 13(6), 579–592. doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00773.x
- Suárez, J. P., & Kottke, I. (2016). Main fungal partners and different levels of specificity of orchid mycorrhizae in the tropical mountain forests of Ecuador. *Lankesteriana*, 16(2), 299-305.
- Suárez, J. P., Weiß, M., Abele, A., Garnica, S., Oberwinkler, F., & Kottke, I. (2006). Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycological Research*, 110(11), 1257–1270. doi: 10.1016/j.mycres.2006.08.004
- Suárez, J. P., Weiß, M., Abele, A., Oberwinkler, F., & Kottke, I. (2008). Members of Sebaciniales subgroup B form mycorrhizas with epiphytic orchids in a neotropical mountain rain forest. *Mycological Progress*, 7(2), 75–85. doi: 10.1007/s11557-008-0554-4
- Villalobos, M. V., & Thorpe, T. A. (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. Ciat. Recuperado de <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20a%20Agricultura/capitulo6.pdf>
- Warcup, J. H., & Talbot, P. H. B. (1967). Perfect States of Rhizoctonias associated with Orchids. lli. *New Phytologist*, 86(3), 267–272. doi: 10.1111/j.1469-8137.1980.tb00787.x

- Weber, R. W. S., & Webster, J. (2001). Teaching techniques for mycology: 14. Mycorrhizal infection of orchid seedlings in the laboratory. *Mycologist*, 15(2), 55–59. doi: 10.1016/S0269-915X(01)80077-X
- Yu, T. E., Egger, K. N., & Peterson, L. R. (2001). Ectendomycorrhizal associations - Characteristics and functions. *Mycorrhiza*, 11(4), 167–177. doi: 10.1007/s005720100110
- Zelmer, C. D., Cuthbertson, L., & Currah, R. S. (1996). Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. *Mycoscience*, 37(4), 439–448. doi: 10.1007/BF02461001
- Zettler, L. W., Corey, L. L., Jacks., A. L., Gruender., L. T., & Lopez., A. M. (2013). *Tulasnella irregularis* (Basidiomycota: tulasnellaceae) from roots of *encyclia tampensis* in south florida, and confirmation of its mycorrhizal significance through symbiotic seed germination. *Lankesteriana*, 13, 129–128.