

# EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN *in vitro* de *Epidendrum oxysepalum* HAGSATER & E. SANTIAGO EN PRESENCIA DE HONGOS MICORRIZICOS AISLADOS DE ORQUÍDEAS DE ECOSISTEMAS ALTOANDINOS

## EVALUATION OF IN VITRO GERMINATION OF *Epidendrum oxysepalum* HAGSATER & E.SANTIAGO IN PRESENCE OF MICORRHIZAL FUNGI INSOLATED FROM ORCHIDS OF HIGH-ANDEAN ECOSYSTEMS

Liliana Nieto Melo<sup>1</sup>, Concepción Bailón Aijón<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Estudiante de ingeniería agronómica. Universidad De Ciencias Aplicadas y Ambientales. Correo: lilnieto@udca.edu.co. <sup>2</sup> BSc. Facultad de Ciencias. Universidad De Ciencias Aplicadas y Ambientales. Correo: cbailón@udca.edu.co

### RESUMEN

En los diferentes ecosistemas de Colombia se pueden encontrar aproximadamente 3.700 especies de orquídeas. Esta investigación se realizó para comparar la germinación *in vitro* en presencia o ausencia del hongo (*Nigrospora oryzae* y *Ascomycetes sp.*) en semillas de *Epidendrum oxysepalum*, y además para obtener mayor información sobre la especificidad del hongo en relación con la germinación de las semillas de orquídea. Para ello se aplicaron dos métodos utilizando los medios de cultivo P723, agar-agar y PDA, aplicando 7 tratamientos con un diseño experimental completamente al azar y una prueba Dunnet. No se logró realizar los experimentos con el *Nigrospora oryzae* debido a contaminación exógena. Los resultados se evidenciaron a los 44 días después de la siembra, en los tratamientos con presencia de hongo 64% de germinación para el tratamiento hongo inoculado tres días después de la siembra de semillas y 72% para el tratamiento hongo inoculado al mismo tiempo que la siembra de las semillas. También se observó estadios de desarrollo 20 días después de la siembra donde se encontró estadios en fase 0 (semillas con embrión no germinado) y fase 1 (expansión del embrión, ruptura de la testa, germinación) y 52 días después de la siembra se presentó la fase 2 (aparición del protocormo y rizoides) en los mismos tratamientos. Para otros tres tratamientos realizados la fase 2 se presentó 60 días después de la siembra. No se encontró colonización del hongo en las semillas.

**Palabras claves:** inoculación, estadios, colonización, germinación simbiótica.

### SUMMARY

3,700 species of orchids can be found in the different ecosystems of Colombia. This research was conducted in order to compare the *in vitro* germination in *Epidendrum oxysepalum* seeds in presence or absence of micorrhizal fungus, and in addition to obtain more information about the fungal specificity in relation to seeds germination. Two germination methods were applied using P723, agar-agar and PDA cultures media, on which 7 treatments with 5 repetitions with a completely randomized experimental design (DCA) and Dunnet test. It was not possible to perform experiments with *Nigrospora oryzae* due to exogenous contamination. Germination was seen after 44 days on both treatments with the presence of *Ascomycete sp.* Fungus, inoculation three days after sowing seeds (64%) and simultaneal inoculation as the planting of seeds (72%). Stages of development were observed 20 days after sowing the stages found were phase 0 (no seeds germinated embryo) and Phase 1 (expansion embryo, seed coat rupture, germination). 52 days after sowing the phase 2 (protocorm appearance and rhizoids) in the same treatments was observed. For the three other treatments performed Phase 2 was observed at 60 days after planting. No fungal colonization was found in seeds.

**Keywords:** Inoculation, stadiums, colonization

### INTRODUCCIÓN

Colombia es uno de los países con mayor biodiversidad en orquídeas, alrededor 3.700 especies, y gracias a sus características de crecimiento y adaptación se pueden

encontrar en los diferentes ecosistemas y en diferentes regiones del país cómo los son la región andina, pacífica, amazonia, caribe y Orinoquia (Díaz et al., 2002). Sin embargo, a pesar de lo anterior estas plantas son amenazadas por la extinción debido al saqueo de sus hábitats y la deforestación (Orejuela et al., 2010).

Algunas de las especies que podemos encontrar en mayor cantidad son las pertenecientes a los géneros *Maxillaria*, *Masdevallia*, *Stellis*, *Lepanthes*, *Pleurothallis* y *Epidendrum*, este último es uno de los géneros más abundantes y que más se adapta a los diferentes ecosistemas (Mejía y Pino, 2009; Valencia y González, 2004). Dentro de este género destacaremos la especie *Epidendrum oxysepalum*, de hábito terrestre o epífita con una altura de 24 a 45 cm, la cual se puede encontrar en el páramo de Matarredonda a una altitud de 3400 msnm. Esta especie está presente en la colección del germoplasma de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (U.D.C.A.) como parte de un esfuerzo por la conservación de las orquídeas.

Las orquídeas requieren una asociación micorrícica para la germinación de sus semillas, principalmente con hongos basidiomicetos del grupo de Rhizoctonia, ya que le aportan al embrión azúcares y otros nutrientes de los cuales carece la semilla, que no tiene nada o poca reserva para la germinación (Rasmussen, 1995).

Además, la germinación simbiótica para el cultivo de orquídeas parece ser favorable para el desarrollo de la planta, ya que esta al asociarse con el hongo puede ayudar a evitar el progreso de otros hongos o microorganismos que pueden afectar su crecimiento (Porrás, A.; Bayman, P. 2007.; Chávez, H. 2014)

Algunas especies de orquídeas como lo es *Tolumnia variegata* germinan mejor en asociación con hongos micorrícicos que en medio del cultivo Knudson, aunque este beneficio no se cumple para todas las especies de orquídea, por lo que se creería que la relación orquídea- hongo es más específica de lo que se creía (Otero, J.; Bayman, P. 2009).

Las orquídeas epifitas dependen de asociaciones simbióticas para la germinación de las semillas y la persistencia de las plantas, ya que, si esto no se da, implica altas pérdidas cuando estas pasan de in vitro a ex vitro (Damon, A. et al 2004).

Para reemplazar el beneficio de la asociación del hongo y semilla en el cultivo in vitro de orquídeas se utilizan medios de cultivo que proporcionan sacarosa, vitaminas, minerales y reguladores de crecimiento. Los medios más usados son M&S (Murashige y Skoog), Knudson C y P723 a los cuales se les adiciona algunos suplementos como agua de coco

o carbón activado, que favorecen un mejor desarrollo y aceleran la germinación (Pedroza, J., Serrato, I. 2010.; Flores, G et al. 2008).

Esta investigación se realizó con el fin de realizar una comparación de la germinación in vitro de semillas de *Epidendrum oxysepalum* en presencia y ausencia de los hongos *Ascomycetes sp.* Y *Nigrospora oryzae*, aislados de raíces de orquídeas epifitas de los páramos Guasca y Matarredondo (en investigaciones previas). Se desea también obtener más información acerca de la especificidad de los hongos utilizados con las semillas de *Epidendrum oxysepalum* y su capacidad de germinación en los diferentes medios con y sin el hongo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL.** Se realizó la colección de capsulas en estadio C3 (Ruiz et al. 2008) de la especie *Epidendrum oxysepalum*, orquídea del parque ecológico Matarredonda, ubicado en el páramo de Cruz Verde (Cundinamarca) a una altura de 3400 msnm. Se colectaron en dos fechas diferentes, la primera se realizó el 11 de septiembre del 2014 y la segunda el 18 de febrero del 2015. Las capsulas se colocaron en bolsas plásticas y transportadas en neveras portátiles hasta el laboratorio de biotecnología agrícola, donde se colocaron en refrigeración a 4° C.

### PROPAGACIÓN DE HONGOS

Se realizó la propagación de dos especies de hongos: *Nigrospora oryzae* y *Ascomycete sp.*, aislados de las orquídeas *Epidendrum oxysepalum* y *Pleurothallis crocodelante* en un trabajo previo del grupo de investigación (Datos no publicados). Los métodos de propagación que se implementaron fueron diferentes para cada especie de hongo.

Para rehidratar y propagar el hongo *Ascomycete sp* se repicaron cuatro secciones de hongo que fueron colocadas en el medio de cultivo PDA (Agar Papa Dextrosa).

Para propagar el *Nigrospora oryzae* presente en el laboratorio se unieron las bases de 2 cajas de Petri con medios enfrentados, una de ellas estaba sin hongo y en la otra se ubicó el hongo con el fin de que este se transportara a la base con el medio libre antes de ser contaminado por otros hongos, y así poner tener un buen desarrollo de este.

Debido a la contaminación que se presentó, como segunda alternativa para el cultivo de *Nigrospora oryzae* se decidió aislar el hongo de semillas de arroz (*Oryza sativa*) que según literatura lo contienen (Neninger, I. et al. 2003). Para

ello se colocaron las semillas en incubación durante siete días en cajas Petri con papel filtro humedecido, luego de esto fueron observadas al microscopio para identificar la presencia del hongo. Debido a que las estructuras eran poco visibles para ser clasificadas taxonómicamente, las semillas fueron colocadas en medio de cultivo PDA con el fin de que los hongos presentes se desarrollaran mejor y así poder identificar y realizar el aislamiento.

### PREPARACIÓN DE MEDIOS

Se prepararon diferentes medios de cultivo: P 723 (Phytotechnology) más agua de coco, el cual fue utilizado para el tratamiento sin presencia del hongo (semilla sola). PDA, y Agar – Agar sin ningún nutriente, para los tratamientos en presencia del hongo (Semilla y hongo inoculados al mismo tiempo, semilla y hongo inoculado tres días después). Para todos los tratamientos se dispensaron 10 ml de medio en cada caja Petri (de 100mm x15mm).

### PROCESO DE DESINFECCIÓN

Previamente a la introducción de las semillas a los medios de cultivo se realizó el proceso de desinfección el cual consistió inicialmente en limpiar las capsulas con hipoclorito al 15 %, luego se dejaron secar por 10 segundos, para luego ser flameadas. Finalmente, se les realizó un corte transversal, para así obtener las semillas. Este procedimiento se realizó dentro de una cabina de flujo laminar.

### INTRODUCCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL EN MEDIO DE CULTIVO HONGO Y SEMILLAS

Se realizaron 7 tratamientos (con un testigo T3), con 5 repeticiones (Tabla 1).

Para realizar la introducción de las semillas recolectadas el 11 de septiembre del 2014 se implementaron dos métodos: el primer método consistió en trazar una X en cada una de las bases de las cajas Petri, para realizar la siembra de forma

organizada y así mismo un mejor conteo. Se ubicaron veinte semillas por segmento, obteniendo un total de ochenta semillas por caja Petri.

Para el segundo método se pesaron 0,01g de semillas, las cuales fueron introducidas en una jeringa de 10 mL con un volumen de agua destilada de 5 mL, esto con el fin de poder agitar las semillas y tener una dispersión homogénea en el momento de la dispersión en el medio de cultivo. Seguidamente la introducción de las semillas se realizó depositando 40 gotas de la solución agua y semillas en cada caja Petri.

Tanto para los tratamientos con hongo y sin hongo se implementaron las semillas recolectadas el 18 de febrero del 2015, utilizando cajas de Petri de 100 mm x 15mm. Se sembró 25 semillas por segmento teniendo un total de 100 semillas por caja de Petri. Para los tratamientos con presencia de hongo se situó un pequeño segmento de este en el centro de cada caja Petri.

### RECOLECCIÓN DE DATOS

Se tomaron datos de germinación a los 20, 28, 36, y 44 días de siembra.

Para comparar porcentajes de germinación en condiciones tanto en presencia y ausencia de hongo se contaron las semillas germinadas y no germinadas, para ello se tuvo en cuenta: expansión de embrión, ruptura de la testa (indicó de germinación) fase 1, y semillas con embrión no germinado, fase 0. Esto se realizó para los tratamientos T1, T2, T3, T5 Y T7, exceptuando los tratamientos T4 Y T6 (tabla 1).

Para cotejar el estado de desarrollo de los protocormo en ambas condiciones experimentales se tuvo en cuenta los estadios de desarrollo (tabla 2). Esto se realizó desde los 20 días de la siembra hasta 60 días después.

TRATAMIENTOS						
Presencia de hongo			Ausencia de hongo			
SEMILLA SOLA			SEMILLA Y HONGO INTRODUCIDO 3 DIAS DESPUES		SEMILLA Y HONGO AL MISMO TIEMPO	
PDA	Agar-agar	P-723	PDA	Agar-agar	PDA	Agar-agar
T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7

Tabla 1. Tratamientos en condiciones de presencia y ausencia de hongo.

Fase	Descripción
0	Semilla con embrión no germinado.
1	Expansi de embrión, ruptura de la testa (germinación).
2	Aparición de protocormo y rizoides.
3	Emergencia y aparición de la primera hoja.
4	Una hoja y aparición de raíces.
5	Presencia de dos o más hojas, raíz presente (plántula).

Tabla 2. Estadios de desarrollo (adaptado por Johnson y Kane, 2007).

Para determinar si hay o no colonización y posible simbiosis embrión de orquídea con el hongo micorrícico en los tratamientos de T4 a T7 se escogieron 7 semillas al azar de cada cuadrante por caja de Petri, luego estas se colocaron en láminas para realizar montajes con azul de lactofenol, con el fin de colorear el hongo presente en la semilla, enseguida se colocó una laminilla encima de la semilla realizando una presión sobre esta. También se preparó un segundo método donde se realizó el mismo montaje, pero sin realizar la presión sobre la laminilla.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño estadístico para evaluar el porcentaje de germinación consistió en un diseño de conteo al azar (DCA), con experimento factorial 3X2 más un testigo (T3) además de una prueba de comparación Dunnet.

## RESULTADOS Y DISCUSION

#### PROPAGACIÓN DEL HONGO

Como resultado de la propagación se obtuvo un buen desarrollo del *Ascomycete sp* en las tres ocasiones que fue propagado a comparación del *Nigrospora oryzae* del cual no se obtuvo el desarrollo esperado con los diferentes métodos aplicados, ya que este se encontraba en un medio

deshidratado y contenía otros hongos contaminantes que impidieron su aislamiento. Así mismo no se encontró su presencia en el intento de aislar el hongo de semillas de arroz, ni cuando se realizó la incubación ni tampoco cuando estas fueron colocadas en medio PDA.

#### PORCENTAJE DE GERMINACIÓN

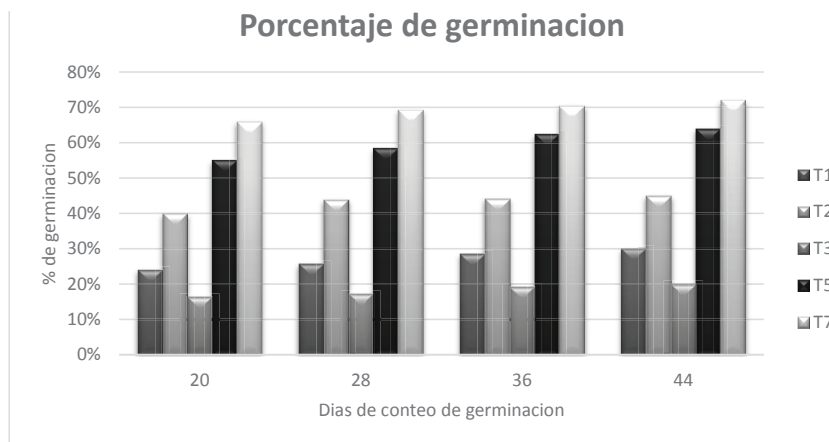
A los 20 días después de la siembra se evidenció el tratamiento de mayor porcentaje de germinación con un 66% en el tratamiento T7, seguido por un 55% del T5, y los menores porcentajes se encontraron en el T1 con un 24% de germinación, 40% en el T2, y 16.4% en el T3 (Grafica 1). En el segundo conteo, a los 28 días, se obtuvo un 25,80% para el T1, un 43,80% para el T2, para el tratamiento T3 se obtuvo un 17,2%, para el T5 un 58,4%, y para el T7 se obtuvo un 69,2%.

En el tercer conteo, a los 36 días se obtuvo porcentajes de germinación para los tratamientos T1, T2, T3, T5, T7, con 28,6%, 44,2%, 19,2%, 62,4% y 70,4% respectivamente.

En el cuarto conteo (44 días después de la siembra), los mayores porcentajes de germinación se obtuvieron en los tratamientos T5 y T7 con 64% y 72% respectivamente a comparación de los tratamientos T1, T2 y T3 con 30%, 45% y 20% respectivamente (Grafica 1; Tabla 3; anexos).

TRATAMIENTOS	T1	T2	T3	T5	T7
DÍAS DE EVALUACIÓN					
20	24%	40%	16,4%	55%	66%
28	25,80%	43,80%	17,2%	58,4%	69,2%
36	28,6%	44,2%	19,2%	62,4%	70,4%
44	30%	45%	20%	64%	72%

Tabla 3. Porcentajes de germinación



Grafica 1. Porcentaje de germinación.

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis de varianza mostro diferencias significativas entre los porcentajes de germinación de cada tratamiento ( $p < 0,05$ ) (tabla 3) por lo cual se realizó una prueba Dunnet para reconocer cuál de los tratamientos difiere con el testigo (T3).

Se calculó tanto las medias de cada tratamiento evaluado (tabla 4) como el comparador Dunnet (Imagen 1) para luego calcular las diferencias entre estos (Tabla 5) y así poder determinar cuál difiere con el testigo. Como resultado se obtuvo que los tratamientos que difieren significativamente del tratamiento T3 (testigo) son el T2, T5 Y T7.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	8230,3	4	2.057,58	19,2356653	9,04115E-06	3,055568276
Dentro de los grupos	1604,5	15	106,97			
Total	9834,8	19				

Tabla 3. Análisis de varianza.

	TRATAMIENTOS					
	SIN PRESENCIA DE HONGO			CON PRESENCIA DE HONGO		
	SEMILLA SOLA			SEMILLA Y HONGO INTRODUCIDO 3 DÍAS DESPUÉS	SEMILLA Y HONGO AL MISMO TIEMPO	
	PDA	Agar-agar	P-723	Agar-agar	Agar-agar	
	T1	T2	T3	T5	T7	
R1	32	64	19	60	68	
R2	29	62	27	74	78	
R3	30	22	20	68	65	
R4	27	25	17	63	69	
R5	32	52	17	55	80	
<b>MEDIAS DE LOS TRATAMIENTOS</b>	30	45	20	64	72	

Tabla 4. Cálculo de las medias de los tratamientos evaluados.

$$\frac{4,15}{5} \sqrt{\frac{106,97}{2}} - \frac{2,73}{5} \sqrt{\frac{106,97}{2}} = 17.85$$

Figura 1. Calculo de comparador Dunnet.

DUNNET	
TRATAMIENTOS	DIFERENCIAS ENTRE MEDIAS
T1-T3	10
T2-T3	25
T5-T3	44
T7-T3	52

Tabla 5. Diferencias entre medias del tratamiento testigo T3 con los demás tratamientos.

**ESTADIOS DE DESARROLLO**

Se registraron todos en los tratamientos exceptuando los tratamientos PDA con hongo y semilla sembrados al mismo tiempo (T6) y PDA con hongo inoculado tres días después (T4), estos no se pudieron observar debido a que el hongo se expandió rápidamente por la caja de Petri, perdiendo así la visibilidad del desarrollo de las semillas.

Los estadios de desarrollo en condiciones de presencia y ausencia de *Ascomycete sp* que se observaron 20 días después de la siembra se pudo observar estadios en fase 0 (semillas con embrión no germinado; Imagen 2.A) y fase 1 (expansión del embrión, ruptura de la testa, germinación; Imagen 2. B), estas últimas se encontraron en mayor cantidad en los tratamientos con presencia de hongo en Agar-Agar (T5 y T7), en comparación con los tratamientos sin inoculación de hongo (T1, T2 y T3) en los cuales hubo una menor cantidad de semillas en esta fase.

A los 52 días se presentó la fase 2 (aparición del protocormo y rizoides), (Imagen 2.C) en los tratamientos T5 y T7. Mientras que para los tratamientos T1, T2 y T3 se presentó esta fase 60 días después de la siembra.

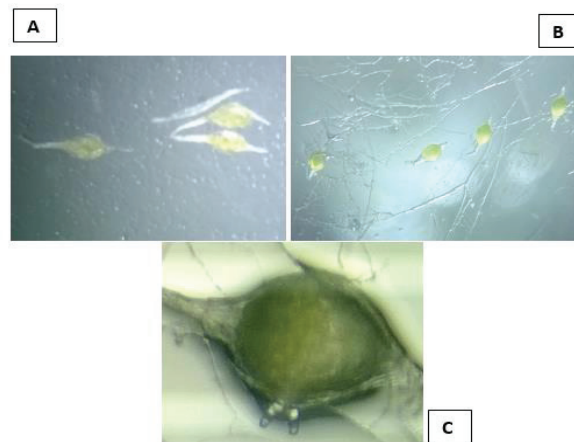


Imagen 2. Estadios de desarrollo. A. Fase 0: semillas con embrión no germinado, B. Fase 1: expansión del embrión, ruptura de la testa, germinación, y C. Fase 2: aparición del protocormo y rizoides.

**DETERMINACION DE COLONIZACION DE HONGO EN LA SEMILLA**

Al observar las semillas en los montajes (imagen 2) que se realizaron con azul de lactofenol no se observó la colonización de *Ascomycete sp*. En las semillas de ninguno de los tratamientos T5, T7, T4 y T6. Este solo se expandió por toda la caja Petri rodeando las semillas, pero sin colonizarlas. Por lo tanto tampoco se puede hablar de la posibilidad de simbiosis.

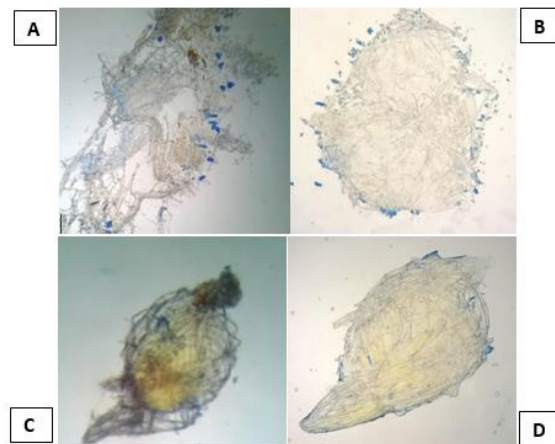


Imagen 2. Montajes de semillas con azul de lactofenol para la observación de la inoculación del hongo *Ascomycete sp*, A y B. primer método presión en la laminilla. B y C. montaje sin presión.

La germinación sin presencia de hongo en este trabajo fue de 20%, 30% y 45% para los tratamientos T3, T1 Y T2 respectivamente, la cual fue baja a comparación de otros trabajos realizados donde se tiene porcentajes de germinación del 47.69 % y según la germinación de orquídeas epifitas son mayores al 50% (Santos et al., 2005). Se debe denotar que en los tratamientos con el medio de cultivo p723 se esperaba obtener un porcentaje de germinación alto ya que es uno de los medios óptimos para la germinación asimbiótica, sin embargo no siempre es posible de obtener un medio de cultivo en que las semillas de una especie determinada se desarrollen óptimamente (Arditti, 1982).

La germinación de los tratamientos T1 y T2, al ser realizados en medios de cultivo sin ningún nutriente óptimo para las semillas de orquídeas, fue lento. En el caso de medio PDA lograron el desarrollo con dificultad posiblemente gracias a la presencia de la dextrosa, un azúcar proveniente del almidón de maíz, estos azúcares son importantes ya que son fuente de energía para las semillas hasta que estas producen clorofila. Por otro lado, el PDA también está compuesto por infusión de papa, la cual contiene almidón compuesto por polisacáridos que aportan los carbohidratos necesarios para el desarrollo de los cultivos in vitro. En el caso del medio agar-agar el desarrollo de las plántulas pudo estar debido a que el medio está compuesto por una mezcla de polisacáridos obtenidos de algas rojas conocidas como agarofitas, la mezcla está compuesta por dos fracciones: un polímero neutro, agarosa de alta fuerza de gel y agar pectina, un polisacárido. (Roca, W.; Mroginski, L. 1991).

La germinación de las semillas con presencia de hongo mostro mejores resultados presentado mayores porcentajes de germinación, un mayor desarrollo en los estadios de desarrollo y un menor tiempo de crecimiento que el de los tratamientos sin hongo. A pesar de que este hongo no era el específico de la *Epidendrum oxypetalum* y de que no colonizo, sino que rodeo las semillas con una maraña de hifas. No necesariamente el hongo debe invadir completamente los tejidos de la orquídea para generar una relación lo que nos lleva a hablar de orquídeas generalistas (Curtis, 1939; Hadley, 1970; Masuhara et al., 1993) y que se suelen observar especialmente en los casos de las especies epifitas (Taylor y Bruns, 1997), como es el caso de la *Epidendrum nocturnum* que puede germinar con el hongo de otra orquídea (zettler et al., 2007). Aunque las orquídeas generalistas se puedan desarrollar con hongos no específicos de la especie, es de esperar que si se inoculara un hongo específico habría mayores porcentajes de germinación ya que llegarían a formar una simbiosis beneficiosa entre las dos especies. Lo que corrobora que la relación entre orquídeas y sus hongos son más específicas de lo que se pensaba (Arditti et al. 1990).

En la primera siembra donde se sembraron 200 semillas por caja Petri se presentó contaminación debido al tiempo de exposición al ambiente el cual fue de 40 minutos, por lo cual se recomienda realizar estos procedimientos con mayor precaución y en el menor tiempo posible, o realizar la siembra directamente con el hongo simbionte, ya que estos pueden bajar los indicadores de contaminación (Chávez, H. 2014).

En el esfuerzo del cultivo de semillas de orquídea in vitro es importante que se logre la relación con un hongo micorrízico específico. Para ello es prioritario mantener una óptima reserva del hongo, y paralelamente realizar un estudio del mismo para mejorar las condiciones de propagación ya que son necesarios y aportan un gran beneficio al proporcionar elementos nutritivos de consumo inmediato para un mayor desarrollo en un menor tiempo.

Se pudo comprobar que el beneficio que genera el hongo en la germinación in vitro de semillas de orquídeas es el de aportar los nutrientes que contiene los medios de cultivo al catalizarlos, algo que no se pudo observar en los tratamientos donde no se inoculo las semillas con el hongo, obteniendo bajos porcentajes de germinación. Sin embargo, se pudo observar que la germinación en medios de cultivo que son utilizados para el crecimiento de microorganismo también proporcionan nutriente que optimizan la germinación a un que en un nivel bajo.

Para obtener mejores resultados la siembra de semillas se debe realizar en el menor tiempo posible para evitar la contaminación exógena tanto del medio como del material vegetal.

## BIBLIOGRAFIA

1. AGUILAR, M.; LÓPEZ, A. (2013). Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas. Ed. Zea (Nebraska). 147p.
2. ARDITTI, J. (1982). Introduction, north american terrestrial orchids. En: Orchid biology. II. Ed. Cornell (Nueva York). 245p.
3. ARDITTI, J.; ERNST, R.; T. W. YAM, C. GLABE. (1990). The contributions of orchid mycorrhizal fungi to seed germination: a speculative review. Rev. Lindleyana. (Estados unidos) 5:249-255.
4. BERTOLINI, V.; DAMON, A.; ROJAS, A. (2014). Quelato de hierro y agua de coco en la germinación in vitro de *Rossioglossum grande* (Orchidaceae). Rev. Act biol. (México). 63(3):229-237.

5. CHAVEZ, H.; MOSQUERA, A.; OSPINA, J. (2014). Propagación in vitro de semillas de la orquídea *Comparettia falcata* Poepp. & Endl. (Orchidaceae) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas. Rev. Act. Agr. (Colombia). 64(2): 125-133.
6. CURTIS, J. T. (1939). The relation of specificity of orchid mycorrhizal fungi to the problem of symbiosis. Rev. BSA.(Estados unidos) 26:390-399
7. DAMON, A.; AGUILAR, et al. (2004). Germinación in vitro de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del soconusco, Chiapas, México. Rev. Chapingo Ser. Hort. 10(2):195-203.
8. DÍAZ, J.; SOLANO, J. et al (2004).Riqueza y distribución de las *Orchidaceae* en la provincia de pamplona. Rev. Bistua. Univ. (Colombia). 2(1):106-112.
9. FLORES, G.; LEGARIA, J. et al. (2008).Propagacion in vitro de *Oncidium stramineum* Lindl.: Una orquídea amenazada y endémica de México. Rev. Chapingo Ser. Hortic 14(3):347-353.
10. FLORES, G.; GIL, I., et al.(2011). Propagación in vitro de la orquídea *Brassia verrucosa* Bateman ex. Lindl. Rev. Chapingo Ser.Hortic. (México). 17(1):5-8.
11. HADLEY, G. (1970)Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. Rev. New Phytol. (Escocia). 69(4):15-102.
12. MAYO, A., GAZARES, Jet al..(2010). Germinación in vitro de semillas y desarrollo de plántulas de orquídeas silvestres de tabasco. Ed. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (México). 31p.
13. MASUHARA. G.; KATSUYA, K., et al (1993). Potential for symbiosis of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* with seeds of *Spiranthes sinensis* var. amoena in vitro. Rev. Mycol. Res. (Australia). 97(6):746-752.
14. MENCHACA, R.; RAMOS, J., et al.. (2011). Germinación in vitro de híbridos de *Vainilla planifolia* y *Vainilla pompona*. Rev. Colomb biotecnol. (México) 13(1):80-84.
15. MEJIA, H.; PINO, N. (2009). Diversidad de orquídeas epifitas en un bosque húmedo tropical del departamento del Choco, Colombia. Rev. Act. Biol. Colomb.15(2):37-46.
16. MOSQUERA, A.; BAYMAN, P., et al. (2010). *Ceratobasidium* como hongo micorrizico de orquídeas en Colombia. Rev. Act. Agr. 59(3):316-326.
17. NENÍNGER, L.; HIDALGO, et al.. (2003). Hongos presentes en semillas de arroz (*Oryza sativa* .) en cuba. Rev. Fitosanidad. 7(3):7-11.
18. OREJUELA, J.; JORGE, E. (2010). La conservación de orquídeas en Colombia y un caso en proceso en la cuenca del río Cali, municipio de Santiago de Cali, Valle del Cauca, Colombia. Rev. Homb. Máq. 35:53-66.
19. OTERO, J.; BAYMAN, P. (2009). Germinación simbiótica y asimbiotica en semillas de orquídeas epifitas. Rev. Acta. Agr. (Colombia). 58(4):270-276.
20. PEDROZA, J.; SERRATO, L. (2010). Efecto del carbón activado y ácido indol acético en el desarrollo de protocormos de *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl. y *Maxillaria nutans* Lindl. In vitro. Rev. Colomb. Biotecnol. (Colombia). 12(2):86-102
21. PORRAS, A.; BAYMAN, P. (2007). Mycorrhizal fungi of *Vainilla*: diversity, specificity, and effects on seed germination and plant growth. Rev. Mycol. (Estados unidos). 99(4):510-525.
22. RASMUSSEN, H. (1995) Terrestrial Orchids from Seed to Mycotrophic Plants. Ed. Cambridge University Press (Cambridge). 460p.
23. ROCA, W.; MROGINSKI, L.(1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Ed. CIAT (Colombia). 969p.
24. RUÍZ, B.; LAGUNA, C., et ak. (2008). Germinación in vitro de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae). Rev. Internacional de botánica experimental. (Argentina) 77:203-215.
25. SALAZAR, S. (2012). Germinación asimbiotica de semillas y desarrollo in vitro de plántulas de *Cattleya mendelii dombrain* (orchidaceae). Rev. Act. agr. (Colombia). 61(1):69-78.
26. SALAZAR, S., AMAYA, A.,. (2013). Evaluacion de diferentes medios de cultivo in vitro en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (orchidaceae). Rev. Colomb. Biotecnol. (Colombia). 15(2):97-105.



27. SALAZAR, S.; CANCINO, G. (2012). Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación in vitro de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 14(1):53-59.
28. SANTA, N.; GARCÍA, T. et al (2009). Estructura y composición de orquídeas en zonas de la reserva natural "la montaña del ocaso" Quimbaya-quindío. *Rev. Invest. univ. Quindío.* 19:122-134.
29. TAYLOR, D. L. Y BRUNS, T. D. (1997). Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two non-photosynthetic orchids. *Rev. Proceedings of the National Academy of Sciences (Estados Unidos).* 94:4510 – 4515.
30. VALENCIA, J.; GONZÁLEZ, F. (2004). Las orquídeas de San José de Suaita (Santander, Colombia). *Rev. Acta Biol.* 9(2):85.