UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Tesis previa a la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

AISLAMIENTO DE MICORRIZAS EN SEIS ESPECIES DE ORQUÍDEAS NATIVAS DE ECUADOR PARA LA ELABORACIÓN DE UN BIOFERTILIZANTE POTENCIALMENTE ÚTIL EN RUSTICACIÓN DE ORQUÍDEAS

AUTORES:

LUIS RICARDO HOYOS CARRERA
ANDREA DANIELA RODRÍGUEZ CABRERA

DIRECTORA:

IVONNE VACA SUQUILLO

Quito, septiembre del 2013

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DEL USO DEL TRABAJO DE GRADO

Nosotros, Luis Ricardo Hoyos Carrera y Andrea Daniela Rodríguez Cabrera autorizamos a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de grado y su reproducción sin fines de lucro.

Además declaramos que los conceptos, análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad de los autores.

Quito, septiembre del 2013

Luis Ricardo Hoyos Carrera	Andrea Daniela Rodríguez Cabrera
172192261-3	172189448-1

DEDICATORIA

A mamita Herminia y mi tío Pepe, que a pesar de la distancia física, siempre estarán a mi lado protegiéndome y cuidándome en buenos y malos momentos.

A mis padres Luis y Estela que me dieron la vida y se convirtieron en el pilar fundamental en todo mi desarrollo, con su apoyo incondicional, sabiduría, consejos y valores, me permitieron seguir en esta ardua trayectoria profesional.

A mis hermanos Fernando, Cristian, Karina y Majo por todo el apoyo, confianza y en especial por estar a mi lado en todos los momentos inolvidables que los guardo en el corazón.

A mi mami Rocío, mi tía Susana y tíos Guillermo y Fernando; por creer en mí y por marcar etapas muy importantes en mi vida.

A mis sobrinas Nicole, Francis, Abigail, Isabela y mi sobrino David para que esto sea una guía y un ejemplo a seguir en sus vidas, los quiero mucho.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

Luis Ricardo Hoyos

Este trabajo está dedicado a Dios, por haber sido quien me dio la fortaleza, sabiduría y paciencia para seguir adelante a pesar de todas las adversidades que se han presentado en esta etapa de mi vida.

A mi madre Silvana, quien es una mujer ejemplar, la cual, con sus enseñanzas, consejos y cariño, ha logrado convertirme en toda una profesional.

A mis abuelos Susana y Gustavo, por su apoyo incondicional durante todo este tiempo.

Gracias padres por confiar en mí y darme la oportunidad de recompensar todo lo que me han brindado a lo largo de este tiempo, esto es especialmente para ustedes.

Dedico de manera especial a mi esposo Javier, por su comprensión, confianza y amor incondicional y a mi pequeña hija Jhuliana la cual ha sido, es y será mi inspiración para luchar y salir adelante.

Andrea Daniela

AGRADECIMIENTOS

Al Msc. Abraham Oleas, por su ardua colaboración en el proceso de identificación de los aislados pertenecientes al género-forma *Rhizoctonia*.

Al Instituto Agronómico Superior Andino (IASA), en especial al Dr. César Falconí, por prestación de sus instalaciones y apoyo en el proceso de liofilización.

A la Universidad Politécnica Salesiana, por brindarnos una excelente formación académica, espiritual y su apoyo a través de los fondos obtenidos bajo el proyecto "Banco de Germoplasma de especies de orquídeas del Ecuador Fase I".

Al laboratorio CIVABI (Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad), en especial a la Msc. María Belén Aldás, por su apoyo y ayuda incondicional en el desarrollo práctico del proyecto.

Al Msc. Marco Cerna, por su apoyo en la identificación de orquídeas y colección del material vegetal.

A la Msc. Ivonne Vaca por su colaboración en la presente investigación.

Al Magíster Patricio Yánez, por su ayuda en el desarrollo estadístico del presente estudio.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN **1**
CAPÍTULO I **3**
GENERALIDADES **3**
1.1 Justificación 3
1.2 Hipótesis 4
1.2.1 Hipótesis alternativa 4
1.2.2 Hipótesis nula 4
1.3 Objetivos 4
Objetivo General 4
Objetivos Específicos 5
CAPÍTULO II **6**
MARCO TEÓRICO **6**
2.1 Micorrizas 6
2.1.1 Generalidades 6
2.1.2 Clasificación 7
2.1.2.1. Ectomicorrizas 7
2.1.2.2 Endomicorrizas 8
2.1.2.3 Importancia de micorrizas 10
2.1.3 Géneros simbiontes orquidioides 11
2.1.3.1 Género-forma *Rhizoctonia* 12
2.1.4 Medios de crecimiento y conservación de hongos simbiontes 14
2.1.4.1 Generalidades 14
2.1.4.2 Tipos de medios 14
2.1.4.3 Determinación del medio de cultivo 15
2.2 Orquídeas nativas en Ecuador 17
2.2.1 Generalidades 17
2.2.2 Taxonomía 17
2.2.3 Morfología 18
2.2.4 Hábitat 18
2.2.5 Orquídeas por regiones 19
2.2.6 Géneros de orquídeas con simbiosis 19

2.2.6.1 *Epidendrum* 19
2.2.6.2 *Oncidium* 19
2.2.6.3 *Stelis* 20
2.2.6.4 *Pleurothallis* 20
2.2.6.5 *Maxillaria* 21
2.2.6.6 *Prostechea* 21
2.2.7 Importancia de orquídeas nativas de Ecuador 21
2.2.7.1 Importancia de conservación y mantenimiento 22
2.3 Conservación de hongos 23
2.3.1 Generalidades 23
2.3.2 Metodologías de conservación 23
2.3.2.1 Conservación en refrigeración 23
2.3.2.2 Conservación en discos 24
2.3.2.3 Conservación en aceite 24
2.3.2.4 Liofilización 24
2.4 Degradación de compuestos 24
2.5 Biofertilizantes 25
2.5.1 Generalidades 25
2.5.2 Composición 25
2.5.2.1 Dosis admisibles para desarrollo de orquídeas en etapa de aclimatación 26
2.5.3 Importancia de simbiosis 26
2.5.4 Utilización e importancia de simbiosis en etapa de aclimatación de orquídeas 27
2.5.5 Cambios generados con aplicaciones de biofertilizantes 28
2.5.5.1 Ventajas de los biofertilizantes 28
2.5.5.2 Desventajas de los biofertilizantes 29
CAPÍTULO III 30
MARCO METODOLÓGICO 30
3.1 Materiales 30
3.1.1 Reactivos 30
3.1.2 Insumos 30
3.1.3 Equipos 30
3.2 Ubicación 31

3.3 Colección e identificación de 6 especies de orquídeas nativas de Ecuador 32
3.3.1 Colección de muestras 32
3.3.2 Identificación de especies de orquídeas 33
3.4 Metodología para el aislamiento y caracterización macroscópica y microscópica de micorrizas 33
3.4.1 Preparación de medios 34
3.4.2 Protocolo de desinfección 35
3.4.3 Protocolo de siembra y aislamiento 35
3.4.4 Identificación de hongos aislados 36
3.4.4.1 Caracterización taxonómica de género-forma *Rhizoctonia* 37
3.4.5 Adaptación de micorrizas en tratamientos 38
3.4.6 Evaluación del crecimiento 39
3.4.7 Conservación 39
3.4.7.1 Refrigeración 39
3.4.7.2 Conservación en aceite mineral 40
3.4.7.3 Conservación en discos 40
3.4.7.4 Liofilización 40
3.5 Evaluación de las metodologías de conservación 41
3.5.1 Evaluación de conservación en refrigeración 41
3.5.2 Evaluación de conservación en aceite mineral 41
3.5.3 Metodología utilizada en la evaluación de conservación en discos 42
3.6 Elaboración de un biofertilizante a base de micorrizas 42
3.6.1 Evaluación fisiológica de micorrizas 42
3.6.1.1 Degradación de celulosa 42
3.6.1.2 Degradación de grenetina 42
3.6.1.3 Degradación de almidón 43
3.6.2 Elaboración de biofertilizante 43
3.6.2.1 Biofertilizante líquido 44
3.6.2.2 Biofertilizante sólido 44
3.7 Unidades experimentales y variables utilizadas en la investigación 44
3.8 Análisis de Componentes Principales basado en una Matriz de Correlación..47
CAPÍTULO IV 48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 48
4.1 Colección e identificación de 6 especies de orquídeas nativas de Ecuador 48

4.2 Aislamiento y caracterización macroscópica y microscópica de micorrizas ...52
4.2.1 Identificación de hongos aislados.....52
4.2.2 Caracterización del género-forma *Rhizoctonia*.....61
4.2.3 Adaptación a los medios de cultivo.....72
4.2.4 Evaluación del crecimiento.....75
4.2.4.1 Curva de crecimiento.....84
4.3 Selección de la metodología óptima de conservación para micorrizas, mediante pruebas de viabilidad.....86
4.4 Selección de una o varias micorrizas para la elaboración de un biofertilizante 90
4.4.1 Pruebas de degradación de compuestos.....90
4.4.2 Elaboración de biofertilizante 95
CONCLUSIONES 98
RECOMENDACIONES.....101
LISTA DE REFERENCIAS.....103
ANEXOS 111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Vista microscópica de pelotones (masa de hifas) en raíz de orquídea..... 9
Figura 2 Estructuras del género-forma *Rhizoctonia* 13
Figura 3 Esquema de zonas específicas de raíz para la recolección de muestras por planta.....32
Figura 4 Codificación de las 4 secciones de siembra de raíces de orquídeas, en un contenedor con medio de cultivo 36
Figura 5 Porcentaje de hongos aislados clasificados como simbiontes, patógenos o biocontroladores 53
Figura 6 Vista macroscópica y microscópica de *Fusarium* sp. 1 en *Pleurothallis* sp. 2 54
Figura 7 Vista macroscópica y microscópica de *Fusarium* sp. 3 en *Oncidium* sp. 55
Figura 8 Vista macroscópica y microscópica de *Fusarium* sp. 2 en *Stelis* sp. 3.....55
Figura 9 Vista macroscópica y microscópica de *Fusarium* sp. 4 en *Prostechea aemula* 56
Figura 10 Vista macroscópica y microscópica de *Penicllium* sp. 2 en *Oncidium klotzschianum* 57
Figura 11 Vista macroscópica y microscópica de *Penicillium* sp. 1 en *Odontoglosum halii* 58
Figura 12 Vista macroscópica y microscópica de *Trichoderma* sp. en *Pleurothallis* sp. 3 59
Figura 13 Vista macroscópica y microscópica de *Trichoderma* sp. en *Mormodes* sp. 60
Figura 14 Micelio e hifas de la micorriza aislada de *Pleurothallis* sp. a los 30 días de evaluación.....62
Figura 15 Micelio e hifas de la micorriza aislada de *Epidendrum nocturnum* a los 30 días de evaluación.....63
Figura 16 Micelio e hifas de la micorriza aislada de *Oncidium klotzchianum* a los 30 días de evaluación.....64
Figura 17 Micelio e hifas de la micorriza aislada de *Epidendrum* sp. a los 30 días de evaluación.....65
Figura 18 Micelio e hifas de la micorriza aislada de *Stelis* sp. 1 a los 30 días de evaluación.....66

Figura 19 Micelio e hifas de la micorriza aislada de *Prostechea aemula* a los 30 días de evaluación 67
Figura 20 Micelio e hifas de la micorriza aislada de *Stelis* sp. 2 a los 30 días de evaluación.....68
Figura 21 Micelio e hifas de la micorriza aislada de la Morfoespecie 1 a los 30 días de evaluación 69
Figura 22 Porcentaje de adaptación de 8 micorrizas en 3 medios de cultivo en el período de maduración (30 días) 72
Figura 23 Porcentaje de adaptación del género-forma *Rhizoctonia* aislados en 8 especies de orquídeas de acuerdo a sus repeticiones en medios de cultivo SDA y MS 73
Figura 24 Porcentaje de adaptación y viabilidad del género-forma *Rhizoctonia* en medios de cultivo SDA, MS y Czapek 74
Figura 25 Crecimiento a los 6 y 21 días del aislado de *Epidendrum nocturnum*.....76
Figura 26 Crecimiento a los 6 y 21 días del aislado de *Pleurothallis* sp. 77
Figura 27 Crecimiento a los 6 y 21 días del aislado de *Oncidium klotzchianum*.....78
Figura 28 Crecimiento a los 6 y 21 días del aislado de *Epidendrum* sp. 79
Figura 29 Crecimiento a los 6 y 21 días del aislado de *Stelis* sp. 1.....80
Figura 30 Crecimiento a los 6 y 21 días del aislado de *Prostechea aemula*.....81
Figura 31 Plano de ordenamiento de los géneros de *Rhizoctonia* sp., *Cerathoriza* sp. y *Waitea* sp.) aisladas de 6 especies de orquídeas con 3 repeticiones a los 21 días del experimento en función de las características anatómicas. 83
Figura 32 Curva de crecimiento de 6 hongos viables del género-forma *Rhizoctonia* aislados de especies de orquídeas 85
Figura 33 Porcentaje de viabilidad, pureza y estabilidad morfológica en metodologías de refrigeración, aceite y discos a los 60 días 88
Figura 34 Plano de ordenamiento de 6 micorrizas afines a los géneros *Rhizoctonia* sp., *Waitea* sp. y *Cerathoriza* sp. de acuerdo a la capacidad de degradar compuestos (celulosa, almidón, grenetina) 92
Figura 35 Imágenes de las pruebas fisiológicas de degradación de compuestos efectuadas por la micorriza *Waitea* sp. aislada de *Epidendrum* sp.....94
Figura 36 Imágenes de las pruebas fisiológicas de degradación de compuestos efectuadas por la micorriza *Cerathoriza* sp. aislada de *Stelis* sp. 1.....95
Figura 37 Evaluación de los biofertilizantes elaborados 96

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Dosis de diluciones del biofertilizante aplicadas al follaje 26
Cuadro 2 Provincias de recolección de muestras de orquídeas 31
Cuadro 3 Códigos de las 15 especies de orquídeas colectadas para utilización en el proceso de aislamiento y caracterización de hongos 33
Cuadro 4 Medios de cultivo utilizados en el proceso de aislamiento y adaptación ...38
Cuadro 5 Unidades experimentales y variables utilizadas en el presente estudio.....45
Cuadro 6 Identificación taxonómica de 8 especies de la Familia *Orchidaceae*.....49
Cuadro 7 Aislamientos de hongos clasificados como patógenos, biocontroladores o simbiontes en raíces de 15 especies de orquídeas 52
Cuadro 8 Características específicas del género-forma *Rhizoctonia* presentes en los simbiontes aislados en raíces de 8 especies de orquídeas a los 30 días de evaluación 70
Cuadro 9 Registro de características macroscópicas de los subcultivos de 6 micorrizas viables en 3 repeticiones, a los 21 días de inoculación.....82
Cuadro 10 Porcentaje de viabilidad, pureza y estabilidad morfológica de las metodologías de conservación analizadas en 6 micorrizas orquideales 87
Cuadro 11 Valor promedio de degradación de compuestos en 6 micorrizas aisladas de orquídeas nativas.....90

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Proceso de desinfección de muestras radiculares 111
Anexo 2 Registro de adaptación de micorrizas en 3 medios nutritivos 112
Anexo 3 Registro de evaluación de crecimiento de micorrizas 112
Anexo 4 Conservación de micorrizas 112
Anexo 5 Proceso de liofilización 113
Anexo 6 Proceso de elaboración de biofertilizantes 114
Anexo 7 Autorización de investigación científica 115

RESUMEN

Las orquídeas dependen de micorrizas para su germinación y nutrición. En la presente investigación se realizó el aislamiento y caracterización de simbiontes, en raíces de 8 especies de orquídeas nativas de Ecuador mediante el uso de 3 medios comerciales (SDA, Czapek y MS); siendo sometidos a pruebas fisiológicas de degradación de compuestos para seleccionar micorrizas con mayor capacidad de desdoblamiento y elaborar biofertilizantes útiles en rusticación de orquídeas; así como una colección de cepas, conservadas en aceite, discos, refrigeración y liofilización, disponibles en el Centro de investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI). Los resultados muestran diferentes patrones de colonización micorrícica radicular y variedad de hongos asociados a orquídeas, obteniendo 6 micorrizas viables pertenecientes al género-forma *Rhizoctonia* identificados macroscópica y microscópicamente, siendo 2 afines a los géneros anamorfos *Waitea* y *Ceratorhiza.* Se determinaron como medios adecuados para el aislamiento de micorrizas: SDA, con mayor velocidad de crecimiento ramificado y textura esponjosa en *Rhizoctonia* sp. 1, *Rhizoctonia* sp. 2 y *Rhizoctonia* sp. 3, aislados de *Oncidium klotzchianum, Epidendrum nocturnum* y *Pleurothallis* sp.; y MS con velocidad de crecimiento lento de forma longitudinal, aumento de micelio aéreo y generación de esclerocios en *Rhizoctonia* sp. 4, *Waitea* sp. y *Cerathoriza* sp., aislados de *Prostechea aemula, Epidendrum* sp. y *Stelis* sp. Los biofertilizantes fueron elaborados usando micorrizas con mayor capacidad de desdoblamiento de compuestos, en una concentración de micelio del 1% aislado de *Waitea* sp. y *Cerathoriza* sp., utilizando como soporte inerte: sustrato de *Sphagnum* y solución de Cloruro de Sodio 0,9%, obteniendo supervivencia y pureza a los 30 días de evaluación.

Palabras clave: *Rhizoctonia, Waitea, Cerathoriza,* orquídea, aislamiento, conservación, biofertilizante.

ABSTRACT

Orchids depend on mycorrhizal for germination and nutrition. In the present investigation, we performed isolation and characterization of symbionts in roots of 8 species of native orchids of Ecuador by using 3 commercial media (SDA, Czapek & MS) undergoing physiological evidence of degradation of compounds for select mycorrhizal with greater ability to split and develop useful biofertilizers in rustication of orchids; And a collection of strains, preserved in oil, disks, cooling and lyophilization, available at the Centre for Research and Assessment of Biodiversity (CIVABI). The results show different patterns of mycorrhizal`s roots colonization and variety of fungi associated with orchids, we obtained 6 mycorrhizal viable belonging of the genus-form *Rhizoctonia*, identified macroscopic and microscopically, 2 being related to anamorphic *Waitea* and *Ceratorhiza*. Media were identified as suitable for the isolation of mycorrhiza: SDA, , which higher branched growth spongy texture in *Rhizoctonia* sp. 1 *Rhizoctonia* sp. 2 and *Rhizoctonia* sp. 3 isolated from *Oncidium klotzchianum*, *Epidendrum nocturnum* and *Pleurothallis* sp., And MS with slow growth velocity in a longitudinal, increased generation aerial mycelium and sclerotia in *Rhizoctonia* sp. 4, *Waitea* sp. and *Cerathoriza* sp., isolated from *Prostechea aemula*, *Epidendrum* sp. and *Stelis* sp. Biofertilizer were prepared using higher capacity mycorrhizae cleavage of compounds, in a concentration of 1% mycelium isolated *Waitea* sp. and *Cerathoriza* sp., using inert support: *Sphagnum* substrate and sodium chloride solution 0.9%, obtaining pure survival at 30 days of evaluation.

Keywords: *Rhizoctonia*, *Waitea*, *Cerathoriza*, orchid, isolation, conservation, bio-fertilizer.

INTRODUCCIÓN

La familia *Orchidaceae* constituye uno de los grupos de plantas más diversos, existen alrededor de 20000 especies distribuidas en 800 géneros en el mundo; siendo registrados en Ecuador 219 géneros de orquídeas, 4250 especies clasificadas y 1301 especies endémicas en ambientes tropicales, subtropicales, en zonas templadas o frías (Radio Turismo Ecuador, 2013), poblaciones que se han visto afectadas por la pérdida de su hábitat generada por la alteración de la estructura del suelo, deforestación y erosión, de manera que resulta importante la germinación mediante técnicas de propagación de orquídeas (Beltrán, 2010).

En general, uno de los mayores problemas en el manejo y propagación de orquídeas radica en la escasa capacidad de germinación de sus semillas, debido a la deficiente reserva nutritiva para el embrión, por lo que dependen de un hongo micorrízico para su germinación en condiciones naturales (Durán, Rivero & Seemann, 2007), razón por la cual las semillas y plántulas de orquídeas son micotrofas obligadas, generalmente con hongos pertenecientes al género-forma *Rhizoctonia*, ya que dependen del suministro de nutrimentos esenciales para germinar y crecer durante las primeras etapas, mientras que las plantas adultas se pueden considerar como micotrofas facultativas, que se aprovechan de las hifas para obtener nutrientes y compuestos en el proceso de digestión de las mismas (Rivas, Warner & Bermúdez, 1998). El aislamiento y uso de micorrizas constituye una herramienta biológica eficaz para el mantenimiento, conservación y preservación de orquídeas, especialmente de poblaciones afectadas.

En la última década han aumentado los estudios relacionados con hongos micorrízicos de orquídeas epifitas tropicales (Otero y Bayman, 2009; Suárez y otros, 2006; Otero y otros, 2002; Pereira y otros, 2005). En el trabajo realizado con orquídeas epifitas de Puerto Rico se encontró variación en la especificidad micorrizal entre plantas y la preferencia marcada de ciertos grupos de orquídeas por hongos del género *Ceratobasidium* (Otero & Bayman, 2009; Otero, Ackerman & Bayman, 2002); mientras que algunas especies de orquídeas andinas en el Ecuador presentaron hongos micorrízicos en los géneros teleomórficos *Tulasnella* y *Sebacina* (Suárez y

otros, 2006). En el caso de orquídeas epífitas de la selva del Brasil se reportan los géneros anamórficos *Epulorhiza* y *Ceratorhiza* (sus teleomorfos son *Tulasnella* y *Ceratobasidium*, respectivamente). Parte de aquí el interés del estudio de aislamiento, caracterización morfológica, biológica y fisiológica de las micorrizas, con la finalidad de planear estrategias de remediación de su ambiente natural y de su comercialización, evitando así la extinción de las especies (Munguía, Gómez & Olalde, 2008).

En la presente investigación se aisló e identificó macroscópica y microscópicamente micorrizas afines al género-forma *Rhizoctonia*, en 8 especies de orquídeas nativas del Ecuador, mediante la evaluación de 3 medios de cultivo (SDA, Czapek y MS) y la elaboración de un biofertilizante, a partir de la selección de aislados sometidos a pruebas fisiológicas de degradación de compuestos, elaborando un producto potencialmente útil en procesos de rusticación, el cual pretende mejorar el crecimiento de las orquídeas en el proceso *ex vitro*.

CAPÍTULO I
GENERALIDADES

1.1 Justificación

El Ecuador es considerado 1 de los 17 países con mayor diversidad de plantas en el mundo, y dentro de esta diversidad se destaca la familia *Orchidaceae* como una de las más importantes en nuestro país, ya que de cada 5 especies de plantas vasculares, una es orquídea. Hasta el año 2009 se han catalogado en el Ecuador 228 géneros y 4023 especies de orquídeas; sin embargo, el número podría superar las 4500 especies (Jijón & Navarrete, 2009).

Las semillas de orquídea son minúsculas, de 1-2 mm. de largo y 0.05-1 mm. de ancho, su peso varía de 0.31- 24 μg., se producen alrededor de 4`000000 de semillas por cápsula; como el embrión es muy pequeño la semilla contiene una gran porción de aire lo cual permite que se disperse con gran facilidad por el aire y que recorra grandes distancias hasta encontrar las condiciones ideales para su germinación, así mismo contienen pocas reservas de alimento indispensables para que la semilla germine. Debido a esto el establecimiento de la simbiosis con un hongo micorriza es crucial para la supervivencia y desarrollo de la semilla pues éste le abastecerá de nutrientes y azúcares hasta que la plántula sea capaz de generar su propio alimento (Munguía, Gómez & Olalde, 2008).

Nuestro propósito es aislar los hongos que realizan una simbiosis con orquídeas a través de procesos microbiológicos para conocer sus estructuras, diferenciarlos, supervisar el tiempo de crecimiento en 3 medios nutritivos distintos, y encontrar el medio óptimo en el que puedan desarrollarse o en el que se muestre mejor desarrollo, el cual será el que lo tomaremos como ideal para el siguiente proceso.

Dentro de este contexto, cabe mencionar que los biofertilizantes elaborados con micorrizas son productos benéficos que se asocian a las raíces de las plantas y favorecen su nutrición. Están presentes en todos los suelos agrícolas y su asociación con las plantas es benéfica tanto para la planta como para la micorriza debido al intercambio de sustancias nutritivas (Medina, 2010).

El estudio se basó en micorrizas que presentaron mayor desarrollo en 1 de los 3 medios utilizados, con los cuales se busca realizar un biofertilizante, el cual pudiera ser utilizado en los procesos de rusticación de orquídeas, en investigaciones posteriores para demostrar su efectividad.

El aporte científico que se pretende brindar es el de facilitar la absorción y transporte en los procesos de rusticación de orquídeas, mejorar la estabilidad y supervivencia del cultivo, la efectividad del proceso, disminuir el porcentaje de pérdida existente de plántulas, proveer de un mejor transporte de nutrientes así como fortalecer estos cultivos frente a los factores ambientales.

1.2 Hipótesis

1.2.1 Hipótesis alternativa

Es posible aislar micorrizas en seis especies de orquídeas nativas de Ecuador para la elaboración de un biofertilizante potencialmente útil en rusticación de orquídeas.

1.2.2 Hipótesis nula

No es posible aislar micorrizas en seis especies de orquídeas nativas de Ecuador para la elaboración de un biofertilizante potencialmente útil en rusticación de orquídeas.

1.3 Objetivos

Objetivo General

Aislar micorrizas en seis especies de orquídeas nativas de Ecuador para la elaboración de un biofertilizante potencialmente útil en rusticación de orquídeas.

Objetivos Específicos

- Colectar e identificar seis especies de orquídeas nativas de Ecuador de las regiones Sierra y Oriente para la utilización de sus raíces.

- Aislar y caracterizar macroscópica y microscópicamente micorrizas con fines de conservación, mediante la evaluación del crecimiento y adaptación en 3 medios de cultivo.

- Seleccionar la metodología óptima de conservación para micorrizas, mediante pruebas de viabilidad.

- Seleccionar una o varias micorrizas mediante procesos fisiológicos para la elaboración de un biofertilizante potencialmente útil en futuros ensayos de rusticación de orquídeas.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Micorrizas

2.1.1 Generalidades

El término micorriza se origina por la fusión de 2 palabras: *mykes* que significa hongo y *rhiza* que es raíz. Es la asociación simbiótica entre las raíces de las plantas y ciertos hongos del suelo pertenecientes a los basidiomicetos, ascomicetos y glomales (Bernal & Morales, 2006). El termino micorriza describe las asociaciones que los hongos establecen en las raíces o rizoides de las plantas formando una relación simbiótica de tipo mutualista, es decir, un beneficio mutuo en la asociación; por una parte la planta obtiene nutrientes (minerales, agua, entre otros) y el hongo obtiene hidratos de carbono y vitaminas, hasta el 20% del producto de la fotosíntesis, que de otra forma no podría obtener (Travieso, 2012). Adicionalmente, las hifas son capaces de penetrar partes del suelo inaccesibles para las raíces, compitiendo eficientemente por la variedad de nutrimentos con otros microorganismos (Villegas & Cifuentes, 2004).

La historia de esta asociación se remonta a unos 400 millones de años cuando las plantas acuáticas lograron colonizar el medio terrestre mediante la simbiosis, permitiendo así su adaptación a un nuevo entorno. En la actualidad esta asociación se presenta en casi todos los grupos de plantas terrestres, aparecen en Briofitas, Pteridofitas, Gimnospermas y en la mayoría de Angiospermas, excepto algunas familias que han generado resistencia como las: Ciperáceas, Juncáceas y Crucíferas (Franco, 2008). Los hongos micorrizógenos son los microorganismos beneficiosos más estudiados y empleados en la actualidad, son tantas las especies de cepas existentes y tan diversas sus formas de actuar en la planta y en el suelo, que se han logrado aislar y reproducir de manera vertiginosa por el hombre, convirtiéndolos en grandes aliados en fines naturales y ecológicos (Vacacela, 2012).

2.1.2 Clasificación

Las micorrizas se clasifican en base a su estructura, morfología y modo de infección en 2 tipos principales: ectomicorrizas y endomicorrizas (Salas, 2004).

2.1.2.1. Ectomicorrizas

Las ectomicorrizas se caracterizan por crecer en el exterior de las raíces formando una capa denominada manto que crece hacia el interior entre células formando una estructura llamada "Red de Harting" (Dávila, Ramos & Rosales, 2009). Son más frecuentes en especies forestales como árboles y arbustos, generalmente en plantas leñosas perennes, donde la morfología radicular es corta y lignificada e impide la absorción óptima de nutrimentos. La presencia de simbiosis modifica la morfología radicular aumentando la superficie de absorción con una mejor proyección en el suelo, algunas especies pueden formar cordones miceliares o rizomorfos, para tolerar condiciones adversas fácilmente (Salas, 2004).

Las asociaciones ectomicorrícicas son dominantes en bosques de coníferas, en regiones boreales frías o alpinas, y en muchos bosques de regiones templadas, también se presentan en sabanas tropicales o subtropicales y en bosques lluviosos. Las ectomicorrizas contribuyen significativamente con la biomasa de los ecosistemas, al encontrarse extensamente distribuidas por el suelo, tienen una gran importancia en el ciclaje y absorción de nutrimentos (Salas, 2004). En condiciones atmosféricas adecuadas, sus órganos reproductores (carpóforos) pueden sobresalir del suelo, son lo que normalmente conocemos como setas. Se estiman más de 6000 las especies de hongos capaces de formar ectomicorrizas. Entre ellos, podemos citar algunos de los comestibles más conocidos, *Lactarius deliciosus* (níscalo, robellón), *Amanita caesarea* (oronja, boleto rojo), *Pleurotus ostreatus* (seta de chopo) entre otros, a los que hay que sumar las setas tóxicas y las carentes de interés culinario (Aguilar & González, 2011).

Las ectomicorrizas son un tipo de asociación simbiótica, en general bastante específica, debido a que el hongo solo puede asociarse con una o pocas especies de plantas, siendo específicos para éstas y para el medio de desarrollo (suelo, clima y temperatura), en general son mucho más sensibles a factores externos que las endomicorrizas (Dávila, Ramos & Rosales, 2009).

2.1.2.2 Endomicorrizas

Las endomicorrizas son el tipo de asociación micorrizógena más extendida en las plantas, el hongo penetra en las células corticales de las raíces formando vesículas y arbúsculos intracelulares característicos, de ahí su nombre internacional *Vesicular-arbuscular mycorrhizas* (VAM). Es una de las asociaciones benéficas más antiguas, crecen en suelos áridos y semiáridos de las zonas tropicales, en lugares con baja concentración de fósforo o con gran capacidad de retención de este nutrimento (Cubas, 2007).

Los hongos que forman micorrizas arbusculares, se ubican en el orden *Glomales* de la clase Zygomycetes y comprenden 8 géneros con alrededor de 150 especies (Vacacela, 2012), que son considerados obligadamente dependientes de las plantas como fuente de carbono orgánico, calculándose que del 4 al 20% de compuestos foto sintetizados por la planta son transferidos al hongo, además se ha establecido que las raíces micorrizadas son más eficientes para nutrirse ya que los hongos absorben nutrimentos no móviles del suelo como fosforo, zinc y cobre, entre otros (Villegas & Cifuentes, 2004).

Aproximadamente 80% de las plantas terrestres forman endomicorrizas, reportándose más de 200 familias y más de 1000 géneros de plantas, especialmente Briofitas, Pteridofitas, Angiospermas y Gimnospermas (Guzman & Farías, 2005). Las Leguminosas, Papilionoideae y Mimosoideae normalmente tienen endomicorrizas y a la vez tienen la peculiaridad de formar nódulos con bacterias fijadoras de nitrógeno (Cubas, 2007).

Las endomicorrizas caracterizadas por la colonización intracelular del hongo, se pueden subdividir en ericoides, arbusculares y orquidioides (micorrizas de ovillo)

(Vacacela, 2012). En la naturaleza, todas las orquídeas utilizan hongos endomicorrízicos para iniciar la germinación de las semillas y el desarrollo de las plántulas, generando una necesidad absoluta en el ciclo de vida de las orquídeas. La simbiosis se inicia cuando las semillas son infectadas por uno o varios hongos, que penetran la testa e invaden el embrión, imprescindibles para su desarrollo y vida juvenil, una vez que la planta crece y fotosintetiza, cuando está en la fase adulta, generalmente se independiza de la simbiosis (Athipunyakom, Manoch & Piluek, 2004).

2.1.2.2.1 Micorrizas en Orquídea

Las orquídeas en sus primeras etapas de desarrollo, no contienen clorofila, en estas etapas los hongos con los que se asocian, especialmente hongos endófitos pertenecientes a los basidiomicetos, son capaces de transferir a las plantas compuestos orgánicos de carbono y otros nutrimentos. El grado de interdependencia es tal, que en muchos casos ninguno de los asociados puede ser cultivado sin el otro, pues forman una verdadera simbiosis (Carranza, 2006).

La simbiosis se genera en las células corticales infectadas por las hifas que forman masas de hifas fuertemente entretejidas llamadas “pelotones” (Figura 1). Los pelotones se consideran como la característica más distintiva de las micorrizas orquidioides. Son digeridos por la orquídea, de una manera controlada, esto permite que los hidratos de carbono atados dentro de la hifa, se liberen y se absorban (Athipunyakom, Manoch & Piluek, 2004).

Figura 1 Vista microscópica de pelotones (masa de hifas) en raíz de orquídea

Fuente: Molina, 2012

Las orquídeas poseen endomicorrizas orquidioides o de ovillo (pelotones), que representan el tercer tipo más importante de simbiosis, ya que estas plantas son dependientes en estado juvenil (protocormo). Entre la raíz de la planta y el hongo puede tomarse un número de formas distintas de transferencia de nutrientes: hifa intercelular e intracelular y arbúsculo intracelular (Molina, 2012).

2.1.2.3 Importancia de micorrizas

La generación de una asociación micorrízica se basa principalmente en las ventajas nutricionales obtenidas por los integrantes de tal asociación, además algunos hongos pueden producir auxinas, que estimulan el crecimiento vegetal, y otros producen antibióticos que funcionan como protección ante patógenos (Carrillo, 2003).

Los beneficios más importantes se pueden detallar a continuación:

- Mejorar la absorción de macro y micronutrientes como: fósforo, nitrógeno, potasio, y calcio del suelo, a través de las redes de hifas externas por transportadores como H+- ATPasa, localizados en la hifa extra radical. Los compuestos son convertidos a cadenas cortas para ser traslocados a través de vacuolas móviles del hongo, se transfieren al apoplasto interfacial por flujo, siendo tomados por la planta por transportadores de membrana, de tal manera que genera un aumento del crecimiento, sanidad y resistencia al estrés (Guzman & Farías, 2005).
- Las hifas son capaces de penetrar partes del suelo inaccesibles para las raíces aumentando la absorción de agua que mejora la resistencia en cuanto al estrés hídrico (Aguilar & González, 2011).
- Producción de diversas hormonas, como auxinas y citoquininas que afectan positivamente el desarrollo de las orquídeas, movilización de nutrientes e iniciación del crecimiento apical radicular (Carrasco, 2010).
- Incremento de la resistencia frente a hongos patógenos del suelo por su efecto antagónico. Una raíz micorrizada es difícil que sea colonizada por un hongo patógeno (Aguilar & González, 2011). Existen diferentes mecanismos mediante los cuales las micorrizas pueden actuar en protección contra

enfermedades como: Barrera física, impidiendo que en el lugar ocupado se instale cualquier agente perjudicial; y producción de compuestos fungistáticos y antibióticos, en caso de que logre instalarse (Carrasco, 2010).

- Mejor estructuración del suelo, gracias a la generación de exudados producidos por los hongos micorrízicos, evitando la pérdida de la morfología terrestre (Aguilar & González, 2011).

El desarrollo de la asociación micorrízica, regula el microambiente alrededor de las raíces y contribuye a prevenir el desarrollo de infecciones en las plantas, pero a pesar de los beneficios generados en algunas especies vegetales, en otras pueden causar daño considerable al actuar como patógenos agresivos (Carrillo, 2003). Debido a esto existen mecanismos de regulación molecular de la simbiosis que involucran un número de etapas claramente definidas y exactas, en las cuales, probablemente ocurran alteraciones en la expresión genética de la planta o el hongo, durante el proceso de colonización y funcionamiento del hongo micorrízico, que evita el funcionamiento como patógeno (Guzman & Farías, 2005).

Carrillo (2003) establece que las plantas poseen mecanismos de defensa, para prevenir el posible daño causado por ejemplares que generan asociaciones micorrízicas, como la formación de compuestos fenólicos y ciertas proteínas protectoras (quitinasas y peroxidasas) producidas por la planta, que pueden tener un efecto antimicrobiano significativo.

2.1.3 Géneros simbiontes orquidioides

En muchos casos las orquídeas llegan a formar una relación tan dependiente del hongo que se considera que la planta lo parasita. La asociación simbionte se encuentra desarrollada por micorrizas orquidioides, se caracteriza porque la mayoría de los hongos que participan en esta asociación son basidiomicetos miembros del género *Rhizoctonia* (Mosquera, Bayman & Otero, 2010).

2.1.3.1 Género-forma *Rhizoctonia*

Rhizoctonia es un grupo heterogéneo de hongos filamentosos que no producen esporas asexuales y comparten caracteres morfológicos generales como la formación de micelio y esclerocios de coloración parda en medios sintéticos. Los organismos pertenecientes a este género están distribuidos por el mundo; muchos son patógenos importantes de plantas de interés agrícola, forestal, e incluso de especies acuáticas, mientras que algunos tienen un comportamiento saprobio y viven en materia orgánica en descomposición, a la vez pueden establecer relaciones simbióticas con determinadas especies de orquídeas y musgos.

La identificación de especies dentro del grupo se hace difícil, ya que tienen pocos caracteres morfológicos, y los rasgos fisiológicos y patogénicos varían de un individuo a otro (González, 2008).

2.1.3.1.1. Morfología

El género-forma *Rhizoctonia* en su fase asexual (anamorfo[1]) se caracteriza por presentar un micelio estéril incoloro, que se torna oscuro a medida que va madurando. Presenta células largas y ramificaciones en ángulo de 45º y 90° con respecto a la hifa principal, en ocasiones una estrecha constricción a nivel de la bifurcación (clamp) y posee un septo cerca a ella (Figura 2). Las ramificaciones de esta hifa empiezan a acortarse y dar lugar a esclerocios o grupos de infección (Castillo, 2004).

Según Athipunyakom, Manoch & Piluek, 2004 la fase asexual que corresponde a género-forma *Rhizoctonia* incluye los géneros anamorfos:

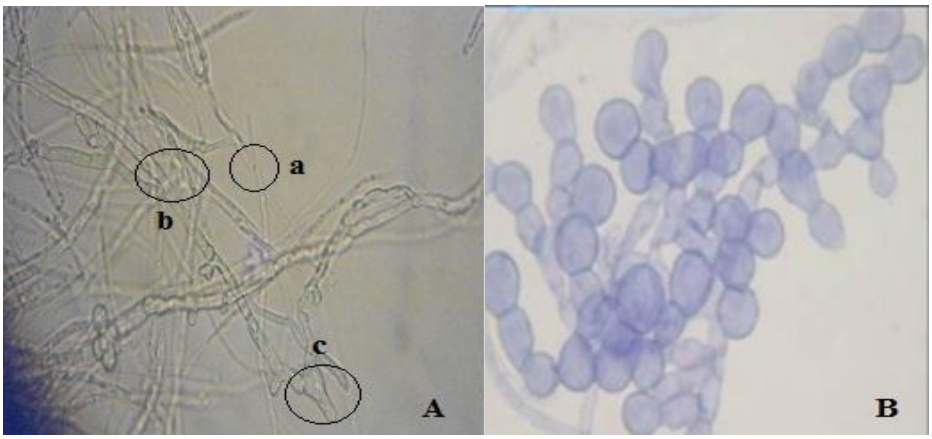
- *Cerathoriza* presenta características microscópicas de hifas alargadas, delgadas y gruesas de coloración café, con células binucleadas y parentosoma perforado o anastomosis perfecta característico del género.

[1] Fase asexual del hongo Basidiomycete donde se produce únicamente micelio

- *Rhizoctonia* presenta hifas alargadas, delgadas y gruesas con septos, formando ramificaciones en ángulos de 45º y 90º.
- *Waitea* presenta hifas gruesas, largas y septadas con células multinucleadas que se caracterizan por forma una estructura similar a un basidio.
- *Epulorhiza* presenta hifas gruesas, cortas y claviformes con células de forma irregular denominadas monilioides desarrolladas a manera de cadenas compactas.

Desafortunadamente es difícil conseguir estructuras reproductivas en condiciones de laboratorio (Mosquera, Bayman & Otero, 2010).

Figura 2 Estructuras del género-forma *Rhizoctonia*



Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez. A.- Género-forma *Rhizoctonia a* .Células largas y ramificaciones en ángulo 45° (b.) y 90°. c. Clamp. B.- Células monilioides, Fuente para A: Hoyos y Rodríguez, (2013); Fuente para B: Beltrán, (2010).

Existen 3 inconvenientes básicos al trabajar la taxonomía de *Rhizoctonia* de orquídeas a partir de aislamientos en cultivo puro: (1) al aislar los hongos en medios de cultivo artificial estos no esporulan y dificultan su identificación, por lo cual se agrupan en géneros anamorfos; (2) la mayoría que logran crecer en medios artificiales son indistinguibles morfológicamente y se deben identificar por técnicas de sistemática molecular PCR y (3) algunos no crecen en medios artificiales, por lo cual la única manera de identificarlos es por amplificación directa de su ADN con primers específicos para hongos (Mosquera, Bayman & Otero, 2010).

2.1.3.1.2 Fusión de hifas (Anastomosis)

Se denomina anastomosis a la fusión de dos hifas por disolución de sus paredes con intercomunicación de sus contenidos, favoreciendo el transporte e intercambio de sustancias nutritivas, los aislados del género-forma *Rhizoctonia* se pueden asignar a diferentes grupos de anastomosis (perfecta, imperfecta y fusión de contacto), si los pares aislados que se examinan son capaces de crecer y fusionarse hifalmente. La fusión perfecta incluye, fusión de las células de las paredes y citoplasmas, generándose una continuidad en el citoplasma. La fusión imperfecta suele ser una plasmólisis o fusión de células mientras que la de contacto se origina sin lisis de las paredes únicamente una superposición (Mosquera, Bayman & Otero, 2010).

2.1.4 Medios de crecimiento y conservación de hongos simbiontes

2.1.4.1 Generalidades

Al identificar los hongos generadores de simbiosis en plantas, es indispensable aislar los microorganismos que se encuentran en la interdependencia. Para lograr este objetivo, los microorganismos, principalmente hongos y bacterias, se aíslan en medios de cultivo artificiales con el fin de poder purificarlos y estimular su desarrollo, para su posterior identificación morfológica (Gilchrist y otros, 2005). Un medio de cultivo es una solución en la cual se encuentran disueltas sales minerales que aportan los elementos esenciales Macronutrientes (N, P, K, S. Ca y Mg) y Micronutrientes (Fe, B, Mn, Zn, Cu, Mo, y Co), normalmente es imprescindible una fuente de carbono que generalmente es sacarosa (Universidad de Oviedo, 2012).

2.1.4.2 Tipos de medios

Los medios de cultivo son combinaciones de sustancias o soluciones que permiten el crecimiento de uno o más organismos. Estos pueden ser sólidos o líquidos; se utilizan para aislar y mantener a los microorganismos, para su estudio y conservación. Los medios líquidos se usan principalmente para incrementar la biomasa de hongos y bacterias, ya sea en condiciones estáticas o en agitación,

permitiendo un crecimiento uniforme útil para determinar sus propiedades fisiológicas (Gilchrist y otros, 2005).

Los medios se pueden agrupar, según su composición, en:
Carentes de nutrientes: utilizados para obtener cultivos monospóricos, aislar patógenos que se encuentran en el tejido vegetal, y también para forzar la esporulación de algunos hongos (Gilchrist y otros, 2005).
Nutritivos: entre estos figuran los naturales, los semisintéticos y los sintéticos. Los naturales contienen únicamente tejidos vegetales (hojas, raíces, vainas y granos), en trozos o macerados, que han sido esterilizados. Los semisintéticos contienen sustancias naturales (extractos de animales y extractos o preparados vegetales, como harina de maíz y hojuelas de avena) y elementos sintéticos. Todo el contenido de los medios sintéticos está químicamente definido, y pueden ser reproducidos en forma específica cuando son requeridos (Gilchrist y otros, 2005).

2.1.4.3 Determinación del medio de cultivo

La determinación del medio de cultivo a usar depende de la tarea que se va a realizar: aislamientos, estudios biológicos y fisiológicos de un hongo o a la vez la producción de biomasa. La selección del medio es de suma importancia, ya que de él depende que el organismo mantenga su patogenicidad y capacidad de producir propágulos de reproducción. Otro factor importante en los medios de cultivo es el pH que en el caso de los hongos, debe ser de 5.6 a 6.5, estableciendo a la par sus factores físicos según las necesidades del organismo en cuestión. Los principales factores físicos a considerar son: aireación, luz, humedad y temperatura; que afectan directamente el crecimiento y la esporulación de los patógenos, el punto óptimo de los factores varía según el organismo de estudio (Gilchrist y otros, 2005).

Entre los medios usados para el aislamiento y conservación de hongos simbiontes orquidioides, especialmente los afines al género-forma *Rhizoctonia*, están: PDA (Potato dextrosa agar), SDA (Agar Sabouraud Dextrosa), Czapek, MAF (medio de aislamiento fúngico) y MS (Murashige & Skoog) (Athipunyakom, Manoch & Piluek, 2004; Molina, 2012; Cevallos, 2012 y Beltrán, 2010).

2.1.4.3.1 SDA

Agar Sabouraud Dextrosa (SDA), llamado también Agar Sabouraud Modificado, es un medio de cultivo muy utilizado para el aislamiento y conservación de hongos. Debido a su composición, los hongos crecen exuberantemente y esporulan bien, siendo generalmente utilizado como estándar para observar la morfología típica de los hongos. La composición comercial del medio SDA contiene: peptona 10,0 g.; dextrosa 20,0 g.; agar 18,0 g. (Cañedo & Ames, 2004).

2.1.4.3.2 Czapek

Czapeck es un medio de esporulación y mantenimiento para hongos, constituido por: Sacarosa 30 g., $NaNO_3$ 2 g., K_2HPO_4 0.5 g., $MgSO_4$-7H2O 0.5 g. y $FeSO_4$-7H2O 0.01 g. Es un medio especializado para estudios de hongos, se utiliza de forma muy especial para el desarrollo de características diferenciales, estimulando su filamentación y facilitando su identificación (Robles, 2004).

2.1.4.3.3 Murashige & Skoog (MS)

El medio MS se ha empleado de una manera muy general para todos los tipos de cultivo *in vitro*, especialmente en la micropropagación de orquídeas; está caracterizado, principalmente, por un contenido elevado de nitrógeno del cual 1/3 del total está aportado en forma reducida (NH4+) y por una concentración igualmente elevada en potasio, que a la vez brinda nutrimentos necesarios para el crecimiento de simbiontes (Campo, Sanz & Hernández, 2006). Su uso radica en establecer características específicas de desarrollo y adaptación de microorganismos simbiontes como una herramienta importante para el estudio de la relación que se puede establecer entre la germinación y el desarrollo de plantas (*in vitro* y *ex vitro*) con los microorganismos, ya que el uso del medio MS permite un mayor control de diversos factores físicos y químicos que pueden afectar a esa interacción, llegando a establecer metodologías óptimas para una micorrización controlada (Munguía, Gómez & Olalde, 2008).

2.2 Orquídeas nativas en Ecuador

2.2.1 Generalidades

Ecuador es considerado uno de los 17 países con mayor diversidad de vegetación en el mundo, destacando la Familia *Orchidaceae* como una de las más importantes, se considera que el 20% de especies son orquídeas. Hasta 2009, se catalogaron 228 géneros y 4023 especies de orquídeas en Ecuador, del total de estas especies, aproximadamente el 40% son endémicas[2] (Jijón & Navarrete, 2009).
Las orquídeas tienen una asombrosa adaptación, pueden crecer sobre los árboles, suelo, rocas e inclusive sobre lava volcánica; se las puede encontrar desde los bosques tropicales hasta los páramos (Pérez, 2005).

> Una de las razones para que Ecuador sea tan diverso en orquídeas es la presencia de la cordillera de Los Andes, que se levanta desde los 500 hasta más de 6000 msnm., aspecto que marca de manera significativa la distribución de orquídeas en nuestro país. En términos generales, la mayor diversidad de orquídeas se encuentra en un rango de altitud entre 1000 y 3000 msnm.; bajo este rango la diversidad de orquídeas representa un 22% del total de especies en tanto que sobre los 3000 msnm. apenas el 18% (Jijón & Navarrete, 2009, pág. 8).

2.2.2 Taxonomía

Reino: Plantae
División: Angiospermae
Clase: Monocotiledoneae
Orden: Asparagales
Familia: *Orchidaceae*
Consta de un total de 768 géneros con 19500 especies (Paredes, 2012).

[2]Se aplica al ser vivo que solamente se encuentra en una región determinada

2.2.3 Morfología

De acuerdo a su eje de crecimiento, las orquídeas pueden presentar 2 formas básicas: monopodial, poseen un único y esbelto tallo de crecimiento vertical que en su centro generan constantemente nuevas hojas (las hojas viejas se tornan amarillentas y se marchitan); y simpodial, que generan de uno a varios tallos anualmente a partir de su rizoma, su crecimiento es aparentemente horizontal con presencia de órganos abultados (bulbos o pseudobulbos) que la planta emplea como reserva de agua y nutrientes (Paredes, 2012).

Hojas alternas, dísticas o rara vez opuestas o verticiladas, algunas veces todas basales, simples, enteras, paralelinervias y a menudo algo carnosas (Universidad de Hamburgo, 1999).

Las orquídeas en cuanto a la estructura monocotiledónea, presenta 2 ciclos florales de 3 piezas: el cáliz formado por sépalos y la corola formada por pétalos, uno de ellos distinto (labelo). La flor posee una simetría bilateral en la que el gineceo y el androceo (órganos reproductivos) están soldados, formando una estructura denominada columna, la cual mantiene al ovario en su interior, que al ser fecundado y maduro dará origen al fruto o cápsula. La cápsula contiene las semillas, que consta de 2 partes: embrión y testa; carecen de endosperma por lo que necesitan que una asociación simbiótica (micorriza), que se encargue de suplir de alimento al embrión para que éste pueda germinar y luego aportar nutrientes a las plántulas (Paredes, 2012).

2.2.4 Hábitat

Según Paredes (2012) las orquídeas de acuerdo a su hábitat se clasifican en:

- Terrestres: se desarrollan en el suelo.
- Epífitas: utilizan únicamente un árbol como soporte para su crecimiento más no lo parasitan.
- Litófitas: crecen sobre rocas.

2.2.5 Orquídeas por regiones

Según Dodson & Escobar (2003) las orquídeas se encuentran distribuidas de la siguiente manera:

Región Costa: La región costa alcanza hasta los 800 msnm. No se puede dar una estimación exacta de la cantidad de especies de orquídeas; sin embargo, se han catalogado aproximadamente 501 especies.

Región Sierra: Se encuentra en los rangos desde los 900 hasta los 3000 msnm. La mayor diversidad de orquídeas se encuentra entre los 900 y 2400 msnm. Se han catalogado alrededor de 1050 especies en esta región.

Región Oriente: No se tiene datos completos en la región pero se han reconocido alrededor de 465 especies de orquídeas por debajo de los 900 msnm.

2.2.6 Géneros de orquídeas con simbiosis

2.2.6.1 *Epidendrum*

Las especies del género *Epidendrum,* son mayoritariamente epífitas, tienen tallos que miden hasta 2 m. de altura con hojas planas no superpuestas; poseen flores blancas, verdes, amarillas, rojas y fucsias, de agradable aroma, con inflorescencias que contienen docenas de pequeñas flores bien elaboradas, las cuales aparecen en el extremo del tallo. En Ecuador son conocidas como “mayitas”, se la utiliza en medicina tradicional para controlar la fiebre y enfermedades renales (Placencia, 2010); se han estudiado 442 especies en Ecuador, de las cuales 324 han sido identificadas (Dodson & Escobar, 2003).

2.2.6.2 *Oncidium*

Este género muestra flores muy coloridas y extravagantes, con bulbos fuertes; son conocidas como “lluvia de oro”, por tener abundantes flores amarillas .Presenta

especies epífitas y pocas son terrestres, con inflorescencias ramificadas; tienen un labelo[3] lobulado[4], la parte dorsal de sus flores es más grande que sus partes laterales (Rollke, 2010 y Roura, 2010); en Ecuador se han reportado alrededor de 127 especies (Dodson & Escobar, 2003).

2.2.6.3 *Stelis*

Son plantas epífitas, cespitosas[5],con rizomas cortos; flores numerosas, simultáneas, pequeñas a diminutas, zigomorfas[6] sépalos iguales en forma y tamaño o el dorsal más grande; pétalos diferentes y más pequeños que los sépalos, labelo casi del mismo tamaño que los pétalos, con una excavación más o menos profunda en la mitad apical o cerca de la base (Solano, 1999); en Ecuador se han reportado 428 especies de este género (Dodson & Escobar, 2003).

2.2.6.4 *Pleurothallis*

Proviene de la palabra griega "pleurothallos" que significa ramas parecidas a costillas, debido a la similitud que presentan los tallos de algunas especies a las costillas. Es uno de los géneros extensos con más de 1000 especies, tiene ramificaciones delgadas en vez de pseudobulbos, sus hojas pueden ser delgadas o suculentas en forma de cuchara, lanza o corazón, las flores tienen pétalos pequeños y surgen de la base de la hoja, pueden encontrarse solas o en grupos pequeños, de todos los colores a excepción del azul real. El sépalo dorsal forma una capucha sobre la columna mientras que los inferiores se fusionan parcialmente, los cuales forman un espejismo de un petirrojo bebé con pico ancho extendido para un gusano (Cullina, 2004); en Ecuador han sido reportadas 472 especies bajo este género (Dodson & Escobar, 2003).

---

[3]Pétalo modificado, que se distingue claramente de otros pétalos y de los sépalos por su gran tamaño y su generalmente forma irregular, se presenta comúnmente en orquídeas.
[4] Presenta una parte redondeada y saliente que está separada de las demás partes por un pliegue o hendidura
[5] A manera de césped
[6] Un solo plano de simetría, un lado siempre es diferente del otro

2.2.6.5 *Maxillaria*

Proviene de la palabra latina *Maxilla,* que significa "barbilla", por la movilidad que tiene el labelo en sus especies. Tiene pseudobulbo[7] unifoliado, liso y comprimido de manera lateral, puede tener o no vainas foliáceas. Las flores tienen un pie prominente y no producen néctar, pueden generar pseudopolen[8] en la superficie del labelo, lo cual es una característica específica de este género (Asociación Costaricense de Orquideología, 2010).

2.2.6.6 *Prostechea*

"La derivación del nombre *Prosthechea* viene del vocablo griego "*prostheke*", en referencia al apéndice de tejido en la parte trasera de la columna de *Prosthechea glauca*" (Acuña, 2010); presenta pseudobulbos alargados y aplanados, prominente espátula, las flores tienen pétalos y sépalos libres de igual tamaño, el labelo se encuentra unido hasta la mitad de la columna y su callo aparenta la forma de una almohadilla abultada; la columna no tiene alas, es dentada y cubierta por un apéndice carnoso; una característica importante es que presenta cristales de glucósido en toda la planta, lo que es observable a través del microscopio (Acuña, 2010) en Ecuador han sido reportadas 20 especies bajo este género (Dodson & Escobar, 2003).

2.2.7 Importancia de orquídeas nativas de Ecuador

Se ha incrementado la importancia de las orquídeas debido a su belleza y los altos costos de comercialización que presentan en la actualidad; su cultivo es totalmente rentable ya sea como flor cortada o como planta en maceta y tiene gran importancia económica a nivel mundial. En el país se puede generar una amplia gama de plazas laborales para la incursión en la producción y exportación. Existen varias formas de multiplicación; sin embargo, en la actualidad la técnica de cultivo *in vitro* ha incrementado las tasas de multiplicación de plantas de orquídea en menor tiempo (Serrano, 2007).

---

[7]Órgano de almacenamiento que deriva de parte de un tallo entre 2 nódulos de hojas.
[8] Material pulverulento parecido al polen que se forma sobre la superficie del labelo

> No es exagerado decir que las orquídeas son fantásticas: hay tan grandes como un árbol y con flores tan pequeñas como la cabeza de un alfiler. Exhiben notables especializaciones de polinización y presentan avanzados sistemas de almacenamiento de agua, que contribuyen a su éxito en la lucha por la supervivencia. Son especiales por lo hermosas y variadas, por la compañía que significan para expertos y profanos (Vallejo, 2009).

Ecuador tiene la mayor diversidad del mundo en cuanto a orquídeas, tomando en cuenta el número de especies en relación con su superficie geográfica, por ello, hace 35 años, Dinamarca, Suecia y el Jardín Botánico de Missouri decidieron investigar y publicar la obra completa de la Flora del Ecuador (Velasco, 2007).

2.2.7.1 Importancia de conservación y mantenimiento

Las orquídeas, al presentar la mayor variedad de flores en Ecuador, tienen gran importancia, ya que de su subsistencia depende mantener una cadena de vida equilibrada en los ecosistemas. Si desaparecen las orquídeas, miles de especies polinizadoras de plantas estarían en peligro de extinción. De esta manera, se perdería un ciclo completo en donde las especies frutales podrían desaparecer, las plantas quedan estériles, y no podrían reproducirse (Radio Turismo Ecuador, 2013).

Las causas principales de la disminución del tamaño poblacional de las orquídeas son la extracción frecuente e intensa de especies de su lugar de origen, para la comercialización ilegal, así como la destrucción de sus hábitats (Ávila, 2012).

> Las orquídeas constituyen una de las familias de plantas de mayor demanda entre las ornamentales. La explotación irracional a la que han sido sometidas, unido a las exigencias ambientales para su reproducción y desarrollo natural, han contribuido a que muchas especies se encuentren amenazadas o en peligro de extinción. El uso de técnicas de cultivo *in vitro* es una alternativa viable para su

conservación, desarrollo y fortalecimiento de las iniciativas de conservación *ex situ* (Roura, 2010).

2.3 Conservación de hongos

2.3.1 Generalidades

Según Ángel (2006), la conservación de hongos consiste, en retardar, mediante alguna metodología, el proceso metabólico del hongo, evitando de esta manera los cambios degenerativos normales que ocurren en las células.

En la actualidad, los hongos juegan un papel crucial en el funcionamiento de los ecosistemas naturales, por ello es de gran importancia su conservación, ya que existen especies unidas a otros habitantes y que en ocasiones, se encuentran amenazados. De la misma manera, la destrucción de hábitats naturales y la contaminación ambiental, son otros factores que fomentan la extinción de estas especies (ADESPER (Agrupación para el desarrollo sostenible y la promoción del empleo rural), 2007).

2.3.2 Metodologías de conservación

Entre las metodologías más importantes de conservación de hongos podemos citar: conservación en refrigeración, en discos, en aceite y liofilización.

2.3.2.1 Conservación en refrigeración

El método en refrigeración consiste en mantener el medio de cultivo a una temperatura entre 4 y 10ºC., con la finalidad de inhibir los procesos metabólicos debido a las condiciones adversas para su desarrollo, por tanto, consumirá una baja cantidad de nutrimentos del medio de cultivo (CIAT, 1980).

2.3.2.2 Conservación en discos

La conservación en discos es un método que reduce drásticamente el metabolismo debido a la deshidratación (Mateos, 2004); se utilizan discos de papel filtro esterilizado, los cuales son colocados en una caja Petri para la colonización del hongo de interés. Posterior a ello son guardados en tubos a una temperatura de 4ºC. en un refrigerador. Pueden ser almacenados por el lapso de 1 a 2 años (Setas, 2013).

2.3.2.3 Conservación en aceite

El método de conservación en aceite tiene como objetivo, disminuir la deshidratación del medio y retardar el metabolismo del cultivo, por la reducción del intercambio gaseoso. Es un método ampliamente aplicable a formas miceliares por un período de 12 a 30 meses. El aceite mineral estéril recubre un cultivo que se encuentre en óptimas condiciones de crecimiento (Ángel, 2006).

2.3.2.4 Liofilización

Según Cañedo & Ames (2004) y Ángel (2006) la liofilización es un proceso a largo plazo, muy recomendado, que involucra la deshidratación de cualquier estructura propagativa; el principio de este método, se basa en congelar la suspensión miceliar y remover el agua por sublimación mediante vacío. Los equipos utilizados para este fin, presentan 3 componentes: equipos de precongelamiento, fuente de vacío y trampa de vapor de agua. El período de viabilidad para algunos hongos conservados mediante este proceso es de 23 años.

2.4 Degradación de compuestos

Los microorganismos tienen una gran cantidad de enzimas extracelulares que degradan polímeros para su nutrición y supervivencia en ambientes específicos. Las enzimas hidrolíticas rompen las moléculas complejas (almidón, gelatina, celulosa, lignina lípido, úrea y aminoácido) en subunidades más pequeñas (monosacáridos, aminoácidos y ácidos orgánicos) para obtener fuentes de carbono y nitrógeno. Los

alimentos se digieren por enzimas hidrolíticas y los transportan por sitios metabólicos activos, para transformarlos en energía útil para el mantenimiento y procesos biosintéticos. Las pruebas de degradación de compuestos se basan, en que los hongos como cualquier organismo viviente tienen la capacidad de digerir moléculas complejas como: celulosa, gelatina y almidón. Para esto se suele realizar en primera instancia pruebas cualitativas de amilasas y proteasas, indispensables en la relación simbiótica (Carranza, 2006).

2.5 Biofertilizantes

2.5.1 Generalidades

Los biofertilizantes son productos elaborados a base de microorganismos benéficos (bacterias y hongos), que viven asociados o en simbiosis con las plantas y ayudan a su proceso natural de nutrición, además de ser regeneradores de suelo, se utilizan con la función específica de mejorar la productividad de las plantas. Los microorganismos obtienen de la rizósfera minerales y nutrimentos que son transportados hacia la planta (Aguirre y otros, 2009).

2.5.2 Composición

La composición se establece de un cultivo puro de microorganismos aislados de la parte vegetal (raíz) donde se localiza el simbionte de interés siendo obtenidos e incorporados al suelo o sustrato en forma de inóculo. El proceso de inoculación es complejo, por una parte, implica diseñar métodos adecuados de aislamiento, selección, multiplicación e incorporación de microorganismos específicos para cada especie o propósito. Por lo tanto la base principal en la composición es el correcto aislamiento y selección del microorganismo de interés inoculado en un soporte o sustrato adecuado de manera que brinde una manejo eficiente de los recursos y no representen un gran gasto a los productores en comparación a los beneficios obtenidos (Aguirre y otros, 2009).

Los biofertilizantes pueden ser aplicados conjuntamente con compost o humus e inclusive con fertilizantes químicos, ya que en todos los casos compensan la acción

de éstos, al aumentar la absorción de la planta y hacer posible que ésta aproveche una mayor cantidad de los mismos (Luisa, Toledo & Ravelo, 2010).

2.5.2.1 Dosis admisibles para desarrollo de orquídeas en etapa de aclimatación

Suquilanda (1995), afirma que las dosis recomendadas de biofertilizante, dependen de la vía por la que se aplique el producto, de esta condición se tiene:

Cuadro 1 Dosis de diluciones del biofertilizante aplicadas al follaje

Solución	Biol (litros)	Agua (litros)	Total (litros)
10 %	2	18	20
15%	3	17	20
20 %	5	15	20

Fuente: Suquilanda, 1995.

2.5.3 Importancia de simbiosis

La importancia se establece en los diferentes cambios morfológicos que se genera por la asociación con los simbiontes, éstos mediante su micelio externo facilitan la asimilación de nutrimentos (P, N, Ca, Mn, Mg, Zn, entre otros) por la planta. Asimismo, contribuyen en la funcionalidad fisiológica de la planta hospedante, propiciando un mayor desarrollo, generado mediante la fijación del nitrógeno atmosférico y el transporte de nutrientes. Representa un proceso de intercambio sucesivo de sustancias nutritivas, ya que la planta dirige una buena parte de sus fotosintatos hacia el sistema radical de modo que los hongos puedan captar compuestos de carbono para satisfacer sus requerimientos nutricionales y facilitar el mutualismo de la simbiosis entre ambos componentes (Alarcón & Ferrera, 2000). Los hongos micorrízicos más usados como biofertilizantes son los endófitos (endomicorrizas), que tienen la propiedad de penetrar en la corteza de la raíz y su micelio se extiende hacia el exterior, explorando mayor volumen de suelo generando

así un mejor abastecimiento de nutriente y agua (tolerancia a sequias) (Aguirre y otros, 2009).

2.5.4 Utilización e importancia de simbiosis en etapa de aclimatación de orquídeas

Aclimatación, también conocida como proceso de transplante o proceso *ex vitro*, es un método por el cual las plántulas después de desarrollarse en un recipiente totalmente cerrado y limpio deben acostumbrarse de manera gradual al ambiente externo antes de ser transplantadas a una maceta. El proceso es difícil, ya que en el medio natural existen variaciones tanto de temperatura como de humedad, condiciones a las cuales las plantas no estaban expuestas. Además, son susceptibles a los rayos solares y presentan cutículas débiles, debido a la alta humedad a la que son sometidas en el proceso *in vitro*, por lo que necesitan acostumbrarse a medios con menor humedad relativa antes de ser transplantadas (Mckendrick, 2000).

La asociación micorrízica potencia la supervivencia y el crecimiento de las plantas, al reducir el estrés que puede presentarse por la falta de nutrición, de agua, los cambios en la estructura del suelo, pH, presencia de sales, metales tóxicos y patógenos; por ello, son considerados de extrema utilidad como inoculantes durante las diferentes fases de micropropagación de los cultivos (Fernández, 2010). Las técnicas de germinación simbiótica de semillas de orquídeas podrían mejorar la viabilidad de cultivo tanto para fines comerciales como de conservación (Otero & Bayman, 2009).

Es importante a gran escala debido a que reduce los costos de producción y aumenta la productividad; otro punto muy importante es que reduce el uso de fertilizantes químicos, evita la contaminación de los recursos naturales y mejora los ingresos de los productores (Ramírez, 2012).

2.5.5 Cambios generados con aplicaciones de biofertilizantes

Según Ramírez (2012), las aplicaciones de los biofertilizantes en las plantas pueden presentar los cambios detallados a continuación:

- Mayor disponibilidad de nutrientes como Fósforo (P), Nitrógeno (N), Potasio (K), Calcio (Ca), Azufre (S), Zinc (Zn), Cobre (Cu), Boro (B), debido al crecimiento radical, lo cual permite abarcar un gran espacio de suelo.
- En las plantas inoculadas, aumenta la superficie de absorción 10 veces más, por presentar mayor cantidad de raíces secundarias.
- Por cada cm. de raíz colonizada se obtiene hasta 80 cm. de hifas externas.
- Genera mayor actividad fotosintética, aumenta de esta manera la productividad.

2.5.5.1 Ventajas de los biofertilizantes

Según Morales (2009), los biofertilizantes presentan las siguientes ventajas:

- No contaminan el ambiente y son regeneradores de la población microbiana.
- Tienen función protectora del sistema radicular frente a organismos patógenos.

- Es la forma más eficiente y económica de aprovechar el nitrógeno atmosférico y los nutrientes disponibles en el suelo, ya que estimulan el desarrollo de las raíces y permite una mayor solubilidad y conductividad de nutrientes.

- Poco volumen que representa su aplicación.

- Las micorrizas son capaces de absorber, acumular y transferir los principales macro y micronutrientes y el agua a la planta, más rápidamente que las raíces sin micorrizas.

- Incrementan la tolerancia de las plantas a la sequía, compactación, altas temperaturas del suelo, metales pesados, salinidad, toxinas orgánicas e inorgánicas y extremos de pH del suelo.

2.5.5.2 Desventajas de los biofertilizantes

Según Caballero (2010), las desventajas de los biofertilizantes son:

- Limitado tiempo de almacenamiento (3-6 meses), ya que muchos microorganismos no soportan un almacenamiento prolongado y la biomasa que sobrevive no es suficiente para producir los efectos deseados en las plantas.

- Existe una alta variabilidad en el crecimiento de las plantas y el rendimiento de la cosecha.

- Es importante realizar una estricta selección de los mejores microorganismos que promuevan el crecimiento y el rendimiento vegetal.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 Materiales

3.1.1 Reactivos

Ácido láctico, alcohol 96º, tetraciclina, alcohol al 70%, solución de hipoclorito de sodio al 2,5%, solución de megacilina, gelatina, almidón soluble, yodo, aceite vegetal, metanol, solución de hidróxido de sodio (NaOH), ácido clorhídrico (HCl), azúcar, agar, agua destilada estéril y solución de cloruro de sodio al 0,9%.
Medios comerciales para el aislamiento, purificación y conservación de micorrizas orquideales: Agar Sabouraud Dextrose (SDA), Czapek, Potato Dextrosa Agar (PDA) y Murashige Skoog (MS).
Medios líquidos: Sabouraud Dextrose Broth (SDB).

3.1.2 Insumos

Papel filtro, papel aluminio, papel milimetrado, papel toalla, servilletas, papel periódico, rollo pack, algodón, contenedores plásticos, cajas petri de plástico, frascos de vidrio, pinzas, asa de platino, bisturí, kit de disección, mecheros, mascarillas, guantes, cofias, jeringuillas de 5 y 10 ml., pipetas de 5 y 10 ml., probetas de 50ml., vasos de precipitación, frascos boehco de 500 y 1000ml., aspersores, embudos, tubos eppendorf de 2ml., tubos de ensayo, fósforos, espátula, sustrato de *Sphagnum*, macetas, contenedores de aluminio, porta y cubre objetos.

3.1.3 Equipos

Cámara de flujo laminar, autoclave vertical, pH-metro, agitador magnético, estufa, microondas, microscopio, estéreomicroscopio, calibrador, balanza analítica,

liofilizador CRYODOS TELSTAR Modelo Cryodos-80, precongelador, refrigeradora, shaker, incubadora, homogenizador y vórtex.

3.2 Ubicación

El trabajo en campo, correspondiente a la recolección del material vegetal en estudio, se realizó en las provincias detalladas en el Cuadro 2.

Cuadro 2 Provincias de recolección de muestras de orquídeas

Provincia	Información técnica	Cantón	Localidad
Morona Santiago	Temperatura: 17ºC.. Coordenadas: 2º34 S, 78º06 O Altitud: 1823 msnm.	Santiago	Recinto Copal
			Parroquia Méndez
Chimborazo	Temperatura: 13ºC.. Coordenadas: 2º01 S, 78º45 O Altitud: 3386 msnm.	Guamote	Vía Guamote-Macas
Tungurahua	Temperatura: 14-17ºC. Coordenadas: 0º8 S, 78º28 O Altitud: 3757 msnm.	Baños	Pondoa
Cotopaxi	Temperatura: 12-17ºC. Coordenadas: 0º48 S, 78º55 O Altitud: 3125 msnm.	La Maná	Centro Recreacional Somaq
			Recinto Las Playas
		Pujilí	Pilaló
Bolívar	Temperatura: 22-25ºC. Coordenadas: 1º34 S, 79º06 O Altitud: 1890 msnm.	Guaranda	Playas del Rosario
Imbabura	Temperatura: 8-28ºC. Coordenadas: 0º22 N, 78º23 O Altitud: 3310 msnm.	Cotacachi	Valle del Intag
Loja	Temperatura: 16ºC. Coordenadas: 4º09 S, 79º32 O Altitud: 1640 msnm.	Loja	Vía Cuenca-Loja Sector San Lucas

Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez. Fuente: Temperatura (Cerna, 2012), Coordenadas: (Google Earth, 2013) y Localidad: Marco Cerna, com. pers.

El trabajo experimental se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI) de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede Quito, Campus El Girón.

Metodología Fase 1:

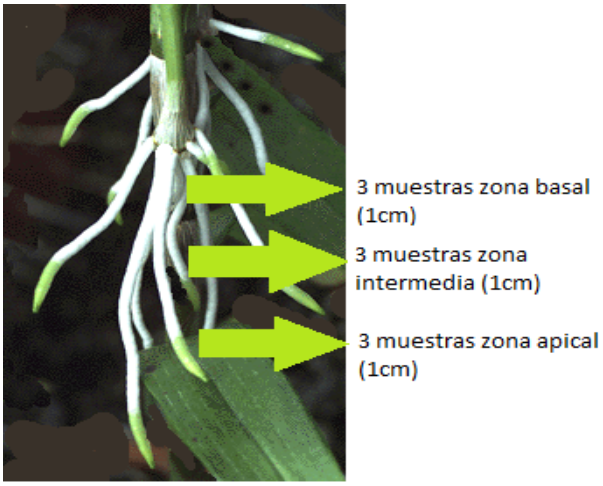
3.3 Colección e identificación de 6 especies de orquídeas nativas de Ecuador

3.3.1 Colección de muestras

Las muestras de raíces de orquídeas utilizadas en el proceso de aislamiento fueron colectadas en 10 sectores, correspondientes a las regiones descritas en el Cuadro 2, obteniéndose de manera inicial muestras de raíces de un total de 40 especies de orquídeas.

En campo, localizada la orquídea, se hizo un surco alrededor de la planta, hasta dejar expuestas las raíces, posteriormente se obtuvieron 9 segmentos de raíz de 1 cm. cada una, por especie de orquídea tomadas de 3 zonas: basal, intermedia y apical (Figura 3); seleccionando segmentos que provengan de la raíz principal y sin enfermedad visible.

Figura 3 Esquema de zonas específicas de raíz para la recolección de muestras por planta



Fuente: Davoli, adaptado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez, 2013.

Se tomaron las muestras y retirando el sustrato, se guardaron en sobres de papel para ser transportados al laboratorio CIVABI en contenedores frescos y secos. Las muestras fueron etiquetadas con un código específico, establecido en el libro de campo de Cerna (2012).

3.3.2 Identificación de especies de orquídeas

Para la identificación de orquídeas, se tomó en cuenta únicamente las especies de orquídeas que presentaron el hongo de interés, identificándose los códigos en el libro de campo mencionado.

Se procedió a identificar el material vegetal, mediante visualización de las especies fotografiadas en campo, a través del material bibliográfico Dodson & Escobar (2003), se describieron características como hábito, localidad, eje de crecimiento, morfología de hojas y flores.

3.4 Metodología para el aislamiento y caracterización macroscópica y microscópica de micorrizas

Se trabajó con muestras de raíces de 40 especies de orquídeas, de las cuales se descartaron 25 ya que presentaron microorganismos que no cabían en la descripción de los hongos de interés. A partir de entonces, se trabajaron con 15 especies de orquídeas que reunían los hongos de interés (Cuadro 3).

Cuadro 3 Códigos de las 15 especies de orquídeas colectadas para utilización en el proceso de aislamiento y caracterización de hongos

N°- de Especie	Código M. Cerna
1	1633
2	1957
3	2093
4	2272
5	1546
6	2181
7	2173
8	1585
9	1946
10	1987
11	2037
12	2054
13	2265
14	2114*
15	2067*

Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.
* Identificadas en Cárdenas y Cruz, 2012.

3.4.1 Preparación de medios

Los medios utilizados en el proceso de aislamiento fueron:

SDA (A): En un frasco BOEHCO, se disolvieron 65 g. de medio nutritivo en 1 L. de agua destilada, homogenizando con un agitador magnético y ajustando el pH a 5,6 (establecido por la marca comercial).

Czapek (B): En un frasco BOEHCO, se disolvieron 49 g. de medio nutritivo en 1 L. de agua destilada, homogenizando con un agitador magnético y ajustando el pH a 6,8 (Molina, 2012).

MS (C): En un frasco BOEHCO, se disolvieron 35,41 g. de medio nutritivo y 8g. de agar en 1 L. de agua destilada, homogenizando con un agitador magnético y ajustando el pH a 5,6 (establecido por la marca comercial).

El pH fue regulado utilizando soluciones buffer de NaOH 1M y HCl 1M. Los medios fueron esterilizados vía autoclave a 121ºC. durante 30 minutos, en cámara de flujo se añadió ácido láctico al 0.2% y tetraciclina al 0.04 $g.L^{-1}$, para evitar el crecimiento bacteriano según el protocolo descrito por Otero Ackerman, & Bayman (2002).

PDA: Se cocieron 250g. de papa en agua destilada estéril hasta su ebullición, después de filtrar se adicionó 20g. de sacarosa y 20g. de agar, ajustando el pH a 5,6 y esterilizando a 121ºC. durante 30 minutos (Molina, 2012).

Medios líquidos para incrementar la biomasa miceliar:

SDB (Sabouraud dextrose broth): En un frasco BOEHCO, se disolvieron 50 g. de medio nutritivo en 1 L. de agua destilada, homogenizando con un agitador magnético y ajustando el pH a 5,6 (establecido por la marca comercial).

MS (C): En un frasco BOEHCO, se disolvieron 35,41 g. de medio nutritivo en 1 L. de agua destilada, homogenizando con un agitador magnético y ajustando el pH a 5,6 (establecido por la marca comercial).

Los medios fueron esterilizados vía autoclave a 121ºC. durante 30 minutos.

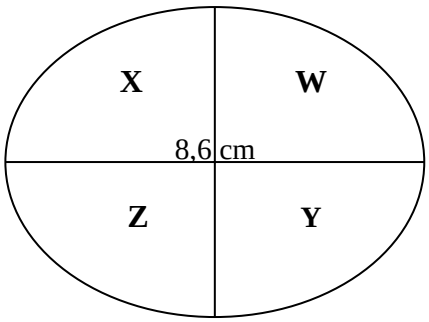
3.4.2 Protocolo de desinfección

En cámara de flujo laminar, las muestras de raíces fueron hidratadas en una caja petri con agua destilada estéril; se retiró el velamen mediante la utilización de pinzas y bisturí, después se lavaron con agua destilada estéril y fueron incubadas en tubos eppendorf, con 2ml. de una solución de megacilina 20ppm. durante 24 horas a 24ºC. según el protocolo de Zhu, Yu, Gui & Liu (2008). Las muestras fueron desinfectadas con lavados consecutivos de: agua destilada estéril, alcohol al 70%, agua destilada estéril, hipoclorito de sodio al 2,5% y agua destilada estéril, durante 2 minutos en cada solución, según el protocolo de Otero, Ackerman & Bayman (2002).

3.4.3 Protocolo de siembra y aislamiento

Las muestras radiculares previamente desinfectadas fueron medidas en papel milimetrado estéril y cortadas en 12 segmentos de 0,25 cm. (Anexo 1), para ser sembradas en 3 medios nutritivos (SDA, Czapek y MS). Se colocaron 4 segmentos (0,25 cm.) en un contenedor con medio de cultivo en secciones claramente definidas, con la finalidad de obtener una mejor visualización del desarrollo y adaptación de los microorganismos presentes en la muestra vegetal, para lo cual se estableció la codificación (Figura 4), en donde W, X, Y, Z son zonas para evaluación de crecimiento de hongos hasta el posterior subcultivo.

Figura 4 Codificación de las 4 secciones de siembra de raíces de orquídeas, en un contenedor con medio de cultivo



Elaborado por: Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Después de la siembra en el medio, los contenedores fueron incubados a 26ºC. según el protocolo de Zhu, Yu, Gui & Liu (2008). A las 72 horas, se visualizó la presencia y desarrollo del micelio, siendo subcultivados según rayado en el medio de cultivo con un asa de platino. Al término del período de incubación, los contenedores subcultivados, fueron almacenados por el lapso de 30 días a temperatura ambiente en un sitio libre de contaminación, para la posterior observación e identificación de estructuras taxonómicas específicas del género-forma *Rhizoctonia.*

3.4.4 Identificación de hongos aislados

Para la identificación de los hongos aislados se procedió a observar en el microscopio pequeñas muestras de micelios maduros aislados de raíces de 15 especies de orquídeas. La muestra se obtuvo con una jeringuilla obtenida mediante raspado, el micelio se colocó en un portaobjetos con una gota de agua destilada estéril para su hidratación. La muestra fue expandida bajo el estéreomicroscopio con ayuda de agujas de disección para una mejor observación.

Se realizaron observaciones con lentes 20x y 40x identificando las estructuras celulares del micelio con el apoyo de Abraham Oleas (IASA, Sangolquí), y comparando con claves taxonómicas descritas por Barnett & Hunter (2003). Mediante esta metodología pudieron ser clasificados como micorrízicos, patógenos o biocontroladores.

3.4.4.1 Caracterización taxonómica de género-forma *Rhizoctonia*

Para la caracterización taxonómica de las micorrizas aisladas a partir de raíces de orquídeas, se realizaron subcultivos con 3 repeticiones de los hongos clasificados como micorrízicos mediante rayado vertical, para obtener un cultivo puro y homogéneo. Los hongos micorrízicos purificados fueron almacenados en un sitio libre de contaminación a temperatura ambiente por el lapso de 30 días, para su maduración y determinación de características morfológicas específicas; mediante observación se compararon características macroscópicas y microscópicas con estructuras morfológicas y claves taxonómicas propias del género-forma *Rhizoctonia* (Cruz 2007 y Barnett & Hunter 2003).

Las características macroscópicas evaluadas fueron:

• Textura: Existen 2 tipos, esponjoso cuyo crecimiento es en forma de ramificaciones en dirección horizontal, y algodonoso con crecimiento en forma superpuesta y en dirección vertical.

• Coloración del micelio: en su estado juvenil presenta una coloración blanca que al madurar toma tonalidades crema, marrón y en ocasiones rojiza.

• Presencia de esclerocios: masa compacta de micelio endurecido que puede sobrevivir a condiciones extremas.

• Morfología: Existen 2 tipos, radial cuando la biomasa presenta un crecimiento circular al inóculo, y ramificada cuando la biomasa presenta un crecimiento irregular y con diversas prolongaciones al lugar del inóculo.

Las características microscópicas evaluadas fueron:

• Hifas: alargadas o anchas, ramificadas, con septos, que formen ángulos de 45º o 90º.

• Ausencia de esporas.

• Desarrollo de hifas anastomosadas: fusión de 2 hifas por disolución de sus paredes, con intercomunicación de sus contenidos.

• Presencia de estructuras microscópicas de resistencia: microesclerocios.

3.4.4.2 Crecimiento en PDA

Las micorrizas viables caracterizadas previamente, fueron subcultivadas mediante el método de punción en contenedores con medio PDA, con la finalidad de comparar el desarrollo del micelio (coloración, forma, crecimiento en el contenedor), estableciendo similitudes entre los morfotipos clasificados previamente por la observación microscópica como simbiontes, con los aislados por Athipunyakom, Manoch & Piluek (2004), permitiendo una posible inclusión dentro de los anamorfos del género-forma *Rhizoctonia*.

3.4.5 Adaptación de micorrizas en tratamientos

Los medios utilizados para determinar la adaptación al medio de cultivo fueron:

Cuadro 4 Medios de cultivo utilizados en el proceso de aislamiento y adaptación

TRATAMIENTO	MEDIO	REFERENCIA
A	SDA	(Sosa, Sánchez, Morales , & Cruz, 2006)
B	Czapek	(Noval, Oria , Casadesus, & Gómez, 1999)
C	MS	(Mckendrick, 2000) (Cevallos, 2012)

Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Se realizaron 3 repeticiones, evaluando el crecimiento y la viabilidad a los 21 días, en un registro previamente elaborado (Anexo 2).

Se seleccionaron como tratamientos de adaptación los medios de cultivo que presentaron micorrizas en el proceso de caracterización taxonómica.

3.4.6 Evaluación del crecimiento

Los hongos caracterizados con el género de interés, fueron subcultivados en el medio de cultivo de la fase de adaptación, en contenedores de plástico con 3 repeticiones. En esta fase se evaluó la velocidad de crecimiento mediante el análisis de características macroscópicas del micelio (coloración, textura, tamaño, morfología y presencia de esclerocios). Para el registro de datos se elaboró una tabla (Anexo 3).

Los datos fueron registrados cada 72 horas por el lapso de 21 días, para analizar los cambios morfológicos presentados en el período de maduración, utilizando códigos establecidos por las 3 primeras letras del género y de la especie.

3.4.7 Conservación

Los hongos aislados caracterizados como género-forma *Rhizoctonia* y adaptados al medio de cultivo, fueron sometidos a 4 metodologías de conservación (Anexo 4), con la finalidad de seleccionar el método óptimo para mantener la viabilidad fúngica. Los métodos evaluados fueron: refrigeración, conservación en aceite mineral, conservación en discos y liofilización, siendo sometidos a pruebas de viabilidad al transcurrir 60 días.

3.4.7.1 Refrigeración

Las micorrizas se inocularon en cajas petri de plástico que contenían 15 ml. de medio de adaptación específico, mediante la metodología de punción en el centro del contenedor. Fueron incubadas por un periodo de 7 días, posterior al cual, se empacaron en fundas plásticas transparentes de forma individual, codificadas y almacenadas en refrigeración a 5°C. Este proceso se realizó por duplicado.

3.4.7.2 Conservación en aceite mineral

El micelio micorrízico fue inoculado en tubos de ensayo que contenían 10 ml. de medio de cultivo específico a la adaptación, dispensados en plano inclinado (flauta). A los 4 días de incubación a 26ºC., la biomasa miceliar fue cubierta con aceite mineral estéril, éstos fueron almacenados en refrigeración a 5ºC. El proceso se realizó por triplicado.

3.4.7.3 Conservación en discos

La conservación en discos de papel filtro se realizó a partir de una suspensión miceliar por cada micorriza, obtenida de la extracción de biomasa (cultivo puro) en tubos de ensayo con 10 ml. de agua destilada estéril que se agitaron por el lapso de 3 minutos. A cada suspensión miceliar, se agregó 16 discos de papel filtro absorbente estéril de 5 mm. de diámetro agitando constantemente durante 2 minutos con la ayuda de un vórtex. Los discos fueron sembrados en contenedores plástico con 25 ml. de medio de adaptación específico, incubados y almacenados. A los 7 días se retiraron los discos del medio, se colocaron en tubos eppendorf estériles, y fueron refrigerados a 5°C. Este proceso se realizó por duplicado.

3.4.7.4 Liofilización

El proceso de liofilización partió del aumento de biomasa miceliar obtenida mediante el cultivo en medios líquidos (SDB y MS). En frascos boehco, se prepararon medios líquidos adicionados con 15 $g.L^{-1}$ de sacarosa, que fueron dispensados 30 ml. en botellas de vidrio transparentes con tapa, y autoclavados a 121ºC. por 30 minutos.

En cámara de flujo laminar, con el uso de un asa de platino se inoculó micelio de un cultivo puro, en cada frasco con el medio líquido específico a la adaptación. Los frascos inoculados, fueron colocados en un shaker con agitación constante a 80 rpm., por un período de 14 días, posteriormente en condiciones de esterilidad, se transfirió la biomasa generada a viales de vidrio de 20 ml. sellados con tapones de goma para su liofilización.

Las muestras fueron transportadas en un recipiente de plástico con tapa hermética al Instituto Agropecuario Superior Andino (IASA, Sangolquí) donde se precongelaron por un sistema de Freeze Dry System (Labconco Shell Freezer Temp) por el lapso de 1 hora a -50°C. Se introdujeron las muestras precongeladas en el liofilizador CRYODOS TELSTAR Modelo Cryodos-80, para remover el agua por sublimación mediante vacío por el lapso de 24 horas (Anexo 5). Una vez concluido el proceso, los viales fueron sellados con tapones de goma al vacío, e identificados con el código de la especie, tratamiento y fecha de liofilización. Este proceso se realizó por duplicado.

3.5 Evaluación de las metodologías de conservación

Se realizó la evaluación de viabilidad, pureza y estabilidad morfológica de las micorrizas viables, conservadas en congelación, aceite y discos, mediante el análisis de 4 subcultivos por aislado y metodología, a los 60 días. El proceso de liofilización, no se sometió a evaluación por los altos requerimientos tecnológicos y la capacidad de mantener la viabilidad a largo plazo.

3.5.1 Evaluación de conservación en refrigeración

Se tomó 1 repetición de cada especie de micorrizas al azar (que se encontraban en refrigeración a 5ºC.), en condiciones de esterilidad; con el uso de un asa, se sembró micelio en contenedores con medio nutritivo específico a la adaptación. Los medios fueron incubados a 26ºC. por un lapso de 5 días.

3.5.2 Evaluación de conservación en aceite mineral

Se tomaron 2 tubos de ensayo de cada especie de hongos micorrízicos al azar, conservados en refrigeración (5ºC.); en cámara de flujo se retiró el aceite mineral del cultivo miceliar y con ayuda de una asa, se tomó una muestra de micelio para sembrar en contenedores de plástico con medio nutritivo y fueron incubados a 26ºC. por el lapso de 5 días.

3.5.3 Metodología utilizada en la evaluación de conservación en discos

Se tomó un tubo eppendorf de cada especie micorrízica al azar, mantenidos en refrigeración (5ºC.). En condiciones de esterilidad con ayuda de una pinza metálica se tomaron 6 discos de cada micorriza aislada, para ser sembrados en contenedores de plástico e incubados a 26ºC. por el lapso de 5 días.

3.6 Elaboración de un biofertilizante a base de micorrizas

3.6.1 Evaluación fisiológica de micorrizas

Las pruebas fisiológicas utilizadas en la presente investigación se basan en la capacidad de los hongos para degradar ciertos compuestos como celulosa, almidón y grenetina en diferentes rutas metabólicas para convertirlos en unidades más simples asimilables por las plantas. Las micorrizas viables fueron sometidas a pruebas cualitativas de degradación por duplicado.

3.6.1.1 Degradación de celulosa

La prueba de degradación de celulosa, se basa en usar como soporte celulósico un disco de papel filtro de 5 cm. de diámetro, este fue sumergido en una suspensión miceliar por cada micorriza (obtenida en la metodología descrita para la conservación en discos) y sembrado en un contenedor con 15 ml. de medio específico de adaptación. Al mes se procedió a retirar el disco del medio con ayuda de una pinza para evaluar la disgregación del papel disco. Se registró como resultados positivos la **disgregación** (desunión de las partes del disco de papel filtro) de manera observable, que al extraerlo del medio de cultivo se rompía fácilmente.

3.6.1.2 Degradación de grenetina

Para el desarrollo de la prueba de grenetina (proteína de gelatina compuesta por colágeno), se elaboraron medios líquidos SDB, y MS adicionados con 120 $g.L^{-1}$ de

gelatina. Según la metodología de Carranza (2006), se disolvió la gelatina en 900 ml. de agua destilada. Se esterilizaron vía autoclave la solución de gelatina y medios líquidos por separado, para ser dispensados en contenedores de plástico en relación 1:1, obteniendo un volumen de 30 ml. por contenedor. Se tomó como resultado positivo, la licuefacción del medio alrededor y bajo el micelio.

3.6.1.3 Degradación de almidón

La degradación de almidón fue realizada según la metodología de Carranza (2006). En los medios SDA y MS se agregaron 2 $g.L^{-1}$ de almidón soluble, siendo dispensados en contenedores de plástico, en condiciones de esterilidad. Después de 3 semanas de incubación a 26ºC., los contenedores se inundaron con 20 ml. de una solución de yodo al 4% por el lapso de 3 minutos, el líquido se eliminó para observar cambios en la coloración del micelio. Si el hongo degradó el almidón o produjo amilasa se observó una zona pigmentada de color púrpura en el micelio al adicionar la solución de Yodo, sino mantendrá una coloración normal a su desarrollo.
Para la elaboración del biofertilizante, las micorrizas aisladas de las especies de orquídeas, fueron seleccionadas partiendo de los análisis de correlación de los resultados obtenidos en las pruebas fisiológicas realizadas que presentaron mayor degradación de compuestos, para la elaboración del biofertilizante.

3.6.2 Elaboración de biofertilizante

La biomasa de las micorrizas de orquídeas seleccionadas en función de las pruebas de degradación de compuestos se incrementó, mediante su cultivo en medio líquido; posterior a esto, en cámara de flujo laminar, con el uso de pinzas metálicas, se retiró la biomasa del medio nutritivo, para ser lavada con agua destilada estéril y almacenada en cajas petri de vidrio, incubándose a 37ºC. por un período de 14 días, para eliminar restos de agua. Según la metodología de Molina (2012), se utilizaron concentraciones de micelio al 1% para elaborar 2 tipos de biofertilizantes (Anexo 6).

3.6.2.1 Biofertilizante líquido

A los 14 días, con la biomasa sólida y seca, se procedió a realizar una solución al 1% p/p, de la siguiente manera:

En condiciones asépticas, se homogenizó 1 g. de micelio seco en 99 g. de solución estéril NaCl 0,99 % USP, por el lapso de 2 minutos para obtener una mezcla uniforme, almacenándose en refrigeración a 5ºC. Se realizaron 6 observaciones cada 5 días durante un mes, para evaluar la pureza y supervivencia del hongo en el sustrato.

3.6.2.2 Biofertilizante sólido

Para la elaboración del biofertilizante sólido, se utilizó como soporte estéril, sustrato de *Sphagnum*. Se mezclaron 2 g. de micelio seco 198 g. de sustrato, con un homogenizador de cuchillas a 160 rpm. , por el lapso de 20 minutos. Se empacaron 100 g. en 2 contenedores de plástico y 100 g. en 2 macetas por cada micorriza seleccionada en degradación de compuestos; se mantuvieron en condiciones ambientales normales (temperatura de 21ºC., 6 horas de luz), en un sitio cubierto y aislado, durante 30 días. Las muestras fueron hidratadas con 50 ml. de agua destilada estéril en cada evaluación debido a que el sustrato mantenía la humedad.

3.7 Unidades experimentales y variables utilizadas en la investigación

Las unidades experimentales y las variables utilizadas en el proceso de investigación, se detallan en el Cuadro 5.

Cuadro 5 Unidades experimentales y variables utilizadas en el presente estudio

Objetivo	Actividad	Unidad experimental	Número de repeticiones	Variables
1. Colectar e identificar 6 especies de orquídeas nativas de Ecuador para la utilización de sus raíces.	Identificación de las especies de orquídeas	Una planta por especie colectada en los sectores geográficos (Cuadro 2).	1 repetición x 6 especies = 6 muestras identificadas	**Hábito:** Terrestres, Epífitas. **Morfología de hojas:** alternas, dísticas o rara vez opuestas o verticiladas, algunas veces todas basales, simples y enteras. **Eje de crecimiento:** Monopodial y simpodial. **Morfología de flores:** Específica para cada especie en caso de presentarla.
2. Aislar y caracterizar macroscópica y microscópicamente micorrizas con fines de conservación, evaluando el crecimiento y adaptación en 3 medios de cultivo	Siembra y aislamiento de secciones de raíces por planta	Un contenedor de plástico transparente redondo de 8,6 cm. de diámetro, con 25 ml. de medio de cultivo, con 4 secciones de 0,25 cm. de material vegetal de la misma especie.	3 repeticiones x 3 tratamientos x 6 especies = 54 contenedores sembrados	**Tiempo de aparición:** Lapso de tiempo, medido en días, desde la siembra hasta la presencia del micelio. **Coloración:** Tonalidad del micelio, observada desde el reverso del contenedor. **Textura:** esponjoso y algodonoso. **Tamaño:** Área de desarrollo miceliar en cm^2, medido el largo y el ancho del micelio con un calibrador. **Morfología:** radial (cuando la biomasa presenta un crecimiento circular al inóculo) y ramificada (cuando la biomasa presenta un crecimiento irregular y con diversas prolongaciones al lugar del inóculo).
	Evaluación del crecimiento utilizando el método de punción central	Un contenedor de plástico transparente redondo, de 8,6 cm. de diámetro, con 25 ml. de medio de cultivo en el que las micorrizas presentaron adaptación.	3 repeticiones x 6 especies =18 contenedores sembrados	**Coloración del micelio:** Tonalidades del micelio en la etapa de maduración vistas del reverso del contenedor. **Textura:** algodonosa y esponjosa. **Tamaño:** Área miceliar, medida en cm^2. **Morfología:** Radial y ramificada. **Presencia de esclerocios:** Masa compacta de micelio endurecido que se desarrolla en forma de conglomerado.
3. Seleccionar la metodología óptima de conservación para micorrizas, mediante pruebas de viabilidad.	Conservación por congelación	Una caja petri de plástico con 15 ml. de medio nutritivo, específico para cada aislado.	4 repeticiones x 6 aislado = 24 muestras	**Viabilidad del morfotipo:** Regeneración en el primer subcultivo, formando micelio típico en medio de cultivo o no. **Pureza:** Cuando únicamente se regeneraba micelio típico del aislamiento evaluado. **Estabilidad Morfológica:** Cuando sus características macroscópicas observadas corresponden a la morfología inicial.
	Conservación en aceite mineral	Un Tubo de ensayo con 10 ml. de medio de cultivo en plano inclinado (flauta), inoculado con micelio	4 repeticiones x 6 aislado = 24 tubos sembrados	
	Conservación en discos	Un tubo eppendorf con 8 discos de papel filtro (5 mm. de diámetro), impregnados de una solución de micelio	2 repeticiones x 8 discos x 6 aislado = 96 discos sembrados	

Objetivo	Actividad	Unidad experimental	Número de repeticiones	Variables
	Liofilización	Viales de vidrio con 1 g. de micelio sólido	4 repeticiones x 6 aislados = 24 frascos liofilizados	No evaluado
4. Seleccionar una o varias micorrizas mediante procesos fisiológicos para la elaboración de un biofertilizante potencialmente útil en futuros ensayos de rusticación de orquídeas.	Degradación de compuestos	**Celulosa:** Un contenedor plástico con 15 ml. de medio de cultivo, específico para cada hongo, en donde se colocó un disco de papel filtro con un diámetro de 5 cm. empapado en una solución miceliar.	2 repeticiones x 6 aislados x 3 pruebas = 36 muestras	**Disgregación:** Desunión de las partes del disco de papel filtro, usando la siguiente escala **0** Ningún cambio **1** Disgregación leve del disco. **2** Disgregación de la mitad del disco. **3** Disgregación de más de la mitad del disco.
		Grenetina: Un contenedor plástico con15 ml. de medio de cultivo y 15 ml. de solución de gelatina (2 g por contenedor) , específico para cada hongo		**Solidificación del medio:** Capacidad del medio proporcionada por la gelatina que no permite alteraciones como la licuefacción **0** Ningún cambio. **1** Disminución leve de la dureza. **2** Disminución de dureza. **3** Perdida de la dureza del medio.
		Almidón: Un contenedor plástico con 30 ml. de medio de cultivo, específico para cada hongo con 2 $g.L^{-1}$ de almidón soluble.		La muestra será positiva si apareció una zona pigmentada de color púrpura que tomó el micelio al adicionar la solución de Yodo, y negativa cuando mantiene una coloración normal a su desarrollo, tanto en el medio como el micelio.
	Elaboración del biofertilizante	**Biofertilizante líquido:** Un rociador de 500 ml. con 100 ml. de solución de micelio seco 1% en NaCl (0,9%)	2 repeticiones	Evaluación de pureza y supervivencia del hongo. **Pureza:** Desarrollo específico del micelio micorrízico en función de la coloración del hongo utilizado. **Supervivencia del hongo en el sustrato:** crecimiento del micelio en el biofertilizante observado de manera visual.
		Biofertilizante sólido: Una maceta con 50 g. de micelio seco 1% en sustrato de *Sphagnum*	2 repeticiones	

Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

3.8 Análisis de Componentes Principales basado en una Matriz de Correlación

Es uno de los procedimientos más frecuentes en las caracterizaciones morfológicas y también una de las metodologías multivariadas más difundidas desde su planteamiento por Pearson; aunque su uso posterior fue generalizado por Hottelling. El propósito fundamental del ACP es reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos dentro de una nueva combinación lineal de nuevas variables (o componentes principales) con la capacidad de retener toda la variabilidad de las variables originales. En la práctica de la caracterización, el ACP reordena a las muestras de interés en términos de una combinación de los valores de las variables o componentes principales no correlacionados. Las 2 formas comunes de obtener este análisis es partiendo de una matriz de datos estandarizados o bien sin estandarizar, a partir de la matriz de correlación o bien de una matriz de varianzas y covarianzas, respectivamente. Las matrices de la mayoría de caracterizaciones morfológicas, se forman mediante la utilización de diversos caracteres con diferentes escalas de medida, por lo que es recomendable el cálculo de los componentes utilizando la matriz de datos estandarizados, también conocida como la matriz de correlación de las variables originales (Chávez & Sevilla, 2003) .

El análisis de componentes principales es una técnica matemática que no requiere la suposición de normalidad multivariante de los datos, aunque si esto se cumpliera se puede dar una interpretación más profunda de dichos componentes (Marín, 2010).

El análisis de componentes principales fue utilizado para evaluar el desarrollo morfológico de las características más relevantes de los morfotipos aislados de orquídeas poniendo énfasis en características útiles para la conservación y desarrollo de biofertilizantes; también fue utilizado como base para la selección de morfotipos con alta capacidad fisiológica de degradación de compuestos (almidón, grenetina y celulosa).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Colección e identificación de 6 especies de orquídeas nativas de Ecuador

De las muestras radiculares de 40 especies de orquídeas colectadas, 15 presentaron hongos asociados a la biota fúngica, de las cuales 8 presentaron hongos simbiontes de interés, siendo únicamente identificadas 6 especies de orquídeas con aislados viables. De las 6 especies 3 se encontraban en proceso de floración, lo que permitió identificarlas taxonómicamente hasta especie, como: *Prostechea aemula, Epidendrum nocturnum* y *Oncidium klotzchianum*. Mientras que las 3 restantes al no encontrarse en etapa de floración fueron descritas taxonómicamente hasta género de acuerdo a características morfológicas en *Pleurothallis* sp., *Epìdendrum* sp. y *Stelis* sp. 1.

El Cuadro 6 muestra las variables específicas que permitieron determinar las especies, en donde el código 1585 fue identificado como *Prostechea aemula* al presentar un hábito epífito con un eje de crecimiento simpodial, hojas lanceoladas y flores paniculadas con pétalos y sépalos libres; fue colectada en el Recinto Las Playas en Cotopaxi a 595 msnm., por lo que se clasificó dentro de la región Costa, ya que según Dodson & Escobar (2003) la región Costa se ubica en un rango determinado de altitud entre 500 a 900 msnm.

La especie codificada con el número 1946 fue identificada como *Epidendrum nocturnum* al presentar un hábito epífito con un eje de crecimiento monopodial, hojas ovaladas, verticiladas y flor única apical de color blanco; fue colectada en el Sector Valle de Intag, Imbabura a 1010 msnm., por lo que se la clasificó dentro de la región Sierra.

Cuadro 6 Identificación taxonómica de 8 especies de la Familia *Orchidaceae*

Código Colección *	Código de orquídea	Hábito	Eje de crecimiento	Hoja	Flor	Sector	Clasificación	Altitud (msnm.)	Coordenadas
1585	*Prostechea aemula****	Epífita	Simpodial	Lanceoladas	Paniculada, con pétalos y sépalos libres	Recinto Las Playas (Cotopaxi)	Costa	595	0º45` S, 79º08` O
1946	*Epidendrum nocturnum****	Epífita	Monopodial	Ovaladas, verticiladas	Única apical, blanca	Valle de Intag (Imbabura)	Sierra	1010	0º20` N, 78º32` O
1987	*Oncidium klotzschianum****	Epífita	Simpodial	En forma de vainas	Amarilla con manchas cafés	Playas del Rosario (Bolívar)	Sierra	1200	1º8`11`` S, 79º11`22`` O
2037	*Stelis* sp. 1***	Epífita	Monopodial	Ovaladas	Ausente	Recinto Copal (Morona Santiago)	Oriente	1255	2º42`55`` S, 78º21`28`` O
2054	*Pleurothallis* sp.***	Epífita	Monopodial	Delgadas lanceoladas	Ausente	Recinto Copal (Morona Santiago)	Oriente	1300	2º42`55`` S, 78º21`28`` O
2265	*Epidendrum* sp.***	Epífita	Monopodial	Ovaladas, verticiladas	Ausente	Pondoa (Tungurahua)	Sierra	2200	1º25`49`` S, 78º26`37`` O
2067	*Stelis* sp. 2**	Epífita	Monopodial	Ovaladas	Ausente	Morona Santiago (La Delicia)	Oriente	-----	---------
2114	Morfoespecie**	Epífita	------	Largas	Presencia de yema floral	Morona Santiago (La Delicia)	Oriente	950	2º50`23``S, 78º15` O

Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

* M. Cerna. Autorización de investigación científica Nº007-IC-FLO-DNB-2012 (Anexo 7). **Identificadas en Cruz y Cárdenas, 2012. ***Especies con aislados viables.

La especie codificada con el número 1987 fue identificada como *Oncidium klotzschianum* al presentar un hábito epífito con un eje de crecimiento simpodial, hojas en forma de vainas y flor amarilla con manchas de color café; fue colectada en el Sector Playas del Rosario en Bolívar a 1200 msnm., por lo que se la clasificó dentro de la región Sierra.

La especie codificada con el número 2037 fue identificada como *Stelis* sp. 1 al presentar un hábito epífito con un eje de crecimiento monopodial, hojas ovaladas y no se determinó la especie por la ausencia de flor; fue colectada en el Recinto Copal en Morona Santiago a 1255 msnm. por lo que se la clasificó dentro de la región Oriente.

La especie codificada con el número 2054 fue identificada como *Pleurothallis* sp. al presentar un hábito epífito con un eje de crecimiento monopodial, hojas delgadas, lanceoladas y no se determinó la especie por la ausencia de flor; fue colectada en el Recinto Copal en Morona Santiago a 1300 msnm. por lo que se la clasificó dentro de la región Oriente.

La especie codificada con el número 2265 fue identificada como *Epidendrum* sp. al presentar un hábito epífito con un eje de crecimiento monopodial, hojas ovaladas, verticiladas y no se determinó la especie por la ausencia de flor; fue colectada en Pondoa en Tungurahua a 2200 msnm. por lo que se la clasificó dentro de la región Sierra.

Los códigos 2067 y 2119, fueron descritos e identificados en la investigación realizada por Cárdenas y Cruz (2012), colectadas en Morona Santiago y siendo establecidas como *Stelis* sp. 2 y Morfoespecie, respectivamente siendo éstas descartadas al no presentar aislados viables.

Las 6 especies de orquídeas identificadas, que presentaron aislados viables, fueron clasificadas de acuerdo a los rangos de altitud (msnm.) en 3 regiones: sierra, costa y oriente; donde 3 especies fueron colectadas en la región Sierra, 2 en la región Oriente y 1 en la región Costa.

Partiendo de las 6 especies identificadas se determina que la actividad simbiótica es mayor en zonas húmedas y frías, al obtener el 83% de las 5 especies colonizadas localizadas en las regiones Oriente y Sierra; mientras que la actividad es menor en zonas secas y cálidas, con un 17% de 1 especie colonizada localizada en la región Costa, lo que corrobora la investigación de Beltrán (2010) en donde menciona que las regiones inciden en la fenología de la colonización (relación que existe entre los factores climáticos y la colonización de micorrizas en orquídeas) existiendo mayor colonización micorrízica en zonas húmedas y frías en comparación con zonas secas y cálidas.

El total de las especies epífitas estudiadas presentaron simbiontes del género-forma *Rhizoctonia* (Cuadro 6), lo que apoya la evidencia que las orquídeas epífitas están colonizadas por micorrizas tanto como las orquídeas terrestres, esto corrobora lo mencionado por Rivas, Warner & Bermúdez (1998) quienes mencionan que en la mayoría de especies epífitas la infección es necesaria para la germinación de las semillas, al utilizar 12 especies tanto de orquídeas terrestres como epífitas; de la misma manera Suárez y otros (2006) utilizaron 20 especies epífitas de orquídeas y concluyeron que la mayoría de los individuos epífitos utilizados en su investigación presentaron una densa colonización.

El Cuadro 6 reporta que 4 de las 6 plantas muestreadas presentaron eje de crecimiento monopodial lo que podría incidir directamente en patrones de colonización, ya que al carecer de pseudobulbos, la raíz debe cumplir las funciones de absorción, almacenamiento de agua y sales minerales, por lo que se observa mayor simbiosis en este tipo de especies al presentar un solo ápice vegetativo de manera vertical y menor número de hojas, mientras que las especies con crecimiento simpodial presentan menor colonización debido a la presencia de pseudobulbos como fuente y almacenamiento de nutrientes, obteniendo únicamente 2 especies con este eje de crecimiento, como lo menciona Beltrán (2010).

4.2 Aislamiento y caracterización macroscópica y microscópica de micorrizas

4.2.1 Identificación de hongos aislados

En la fase de aislamiento, a partir de muestras de raíces de 15 especies originales de orquídeas, sembradas en diferentes medios, se obtuvo un total de 16 hongos, que se clasificaron como patógenos, biocontroladores o simbióticos (Cuadro 7).

Cuadro 7 Aislamientos de hongos clasificados como patógenos, biocontroladores o simbiontes en raíces de 15 especies de orquídeas

Código M. Cerna	Especie de orquídea	Hongo aislado	Clasificación	Referencia
1633	*Odontoglosum halii**	*Penicillium* sp. 1	Patógeno	(Folgueras & Herrera, 2006)
1957	*Oncidium klotzschianum**	*Penicillium* sp. 2	Patógeno	
2093	*Mormodes* sp.**	*Trichoderma* sp.	Biocontrolador	(Montealegre, y otros, 2007)
2272	*Pleurothallis* sp.3.*	*Trichoderma* sp.	Biocontrolador	
1546	*Pleurothallis* sp.2.*	*Fusarium* sp. 1	Patógeno	(Morales & Rodríguez, 2006)
2181	*Stelis* sp.3.*	*Fusarium* sp. 2	Patógeno	
2173	*Oncidium* sp.*	*Fusarium* sp. 3	Patógeno	
1585	*Prostechea aemula****	*Fusarium* sp. 4	Patógeno	
		Género-forma *Rhizoctonia*	Simbionte	(Otero & Bayman, 2009)
1946	*Epidendrum nocturnum****	Género-forma *Rhizoctonia*	Simbionte	
1987	*Oncidium klotzschianum****	Género-forma *Rhizoctonia*	Simbionte	
2037	*Stelis* sp. 1***	Género-forma *Rhizoctonia*	Simbionte	
2054	*Pleurothallis* sp.***	Género-forma *Rhizoctonia*	Simbionte	
2265	*Epidendrum* sp.***	Género-forma *Rhizoctonia*	Simbionte	
2114	Morfoespecie 2**	Género-forma *Rhizoctonia*	Simbionte	
2067	*Stelis* sp.2**	Género-forma *Rhizoctonia*	Simbionte	

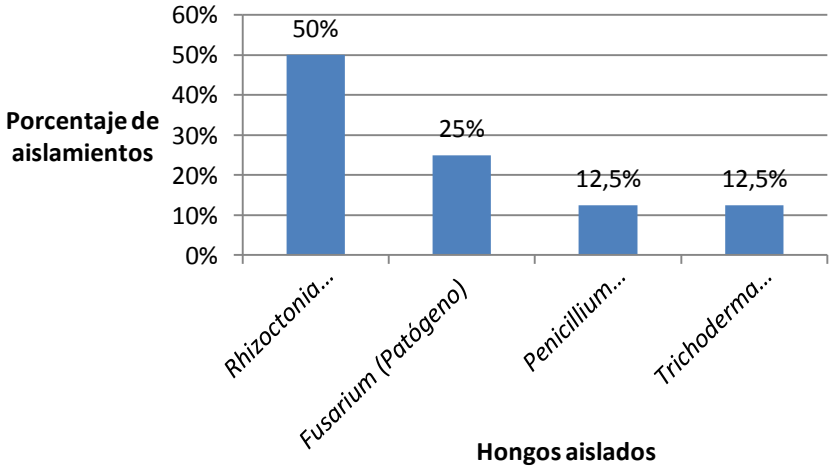
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.
* Identificadas por Cerna, 2013.
** Identificadas por Cárdenas y Cruz, 2012.
*** Identificadas por Cerna, Hoyos y Rodríguez, 2013.

Del total de 16 hongos aislados y caracterizados con el especialista Abraham Oleas; se encontró el género *Fusarium* en 4 especies de orquídeas, *Penicillium* en 2, *Trichoderma* en 2 y *Rhizoctonia* en 8. También se observó que *Prostechea aemula* presentó variedad de biota fúngica al aislar tanto *Fusarium* (patógeno) como *Rhizoctonia* (simbionte). La clasificación de patógeno se sustenta de acuerdo a estudios con diversos hongos de *Fusarium* (Morales & Rodríguez, 2006) y *Penicillium* (Folgueras & Herrera, 2006), donde se detalla la generación de signos y síntomas patológicos que afectan el desarrollo y crecimiento de varias especies vegetales.

Trichoderma fue clasificado como biocontrolador ya que según el estudio de Montealegre y otros (2007), se estableció la efectividad en el control de signos y síntomas por fitopátogenos como *Rhizoctonia solani*. *Rhizoctonia* se clasificó como simbionte, según lo establecido por Otero y Bayman (2009) donde mencionan que todas las orquídeas requieren una asociación micorrícica, principalmente con hongos Basidiomicetos de dicho género-forma.

Entre los hongos identificados, el género-forma *Rhizoctonia* fue el de mayor presencia al obtener un 50% del total de los aislados (8 simbiontes), mientras que en los hongos clasificados como patógenos se determinó que el género preponderante fue *Fusarium* con una presencia del 25% en 4 aislamientos, mientras que *Penicillium* obtuvo el 12,5% en 2 aislados, y el género *Trichoderma* como biocontrolador con un porcentaje del 12,5%, en 2 aislados (Figura 5).

Figura 5 Porcentaje de hongos aislados clasificados como simbiontes, patógenos o biocontroladores



Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

A continuación se describen los hongos patógenos y biocontroladores obtenidos en raíces de orquídeas y su caracterización tanto macroscópica como microscópica de acuerdo a los aislados en sus respectivos tratamientos (Figura 6-13). Los hongos fueron identificados mediante el uso de claves taxonómicas del libro Barnett & Hunter (2003).

Características macroscópicas y microscópicas del género *Fusarium*

Fusarium sp. 1 aislado en la especie 1546 (*Pleurothallis* sp. 2)

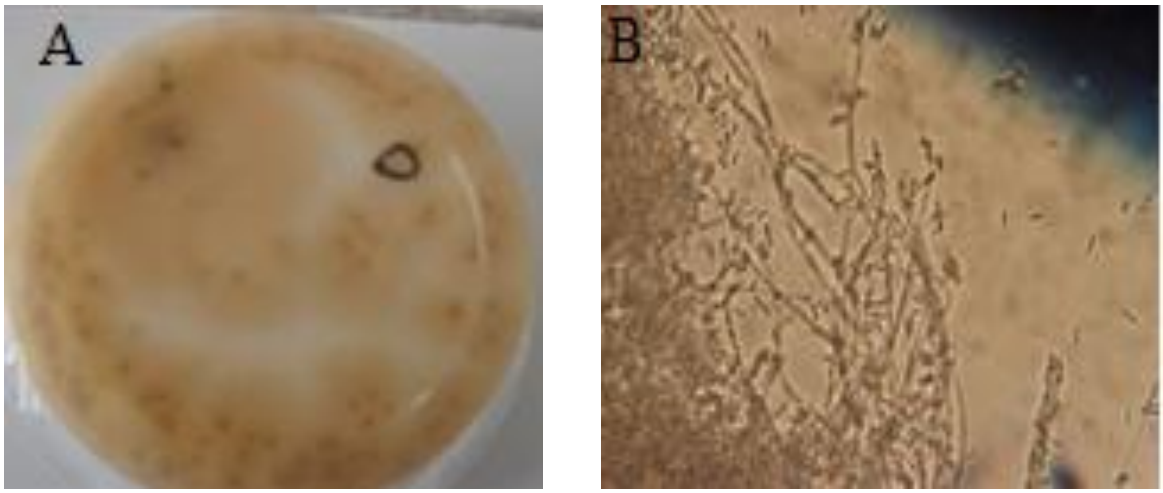
Medio de aislamiento: MS (Tratamiento C).

Vista Macroscópica: Micelio esponjoso de color naranja, con crecimiento ramificado y rápido de 2,7 cm. de diámetro a los 6 días (Figura 6A).

Vista microscópica: Presencia de conidios de forma ovalada (Figura 6B).

Clasificación: Patógeno.

Figura 6 Vista macroscópica y microscópica de *Fusarium* sp. 1 en *Pleurothallis* sp. 2



A. Vista macroscópica. B. Vista microscópica 40X.
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Fusarium sp. 3 aislado de la especie 2173 (*Oncidium* sp.)

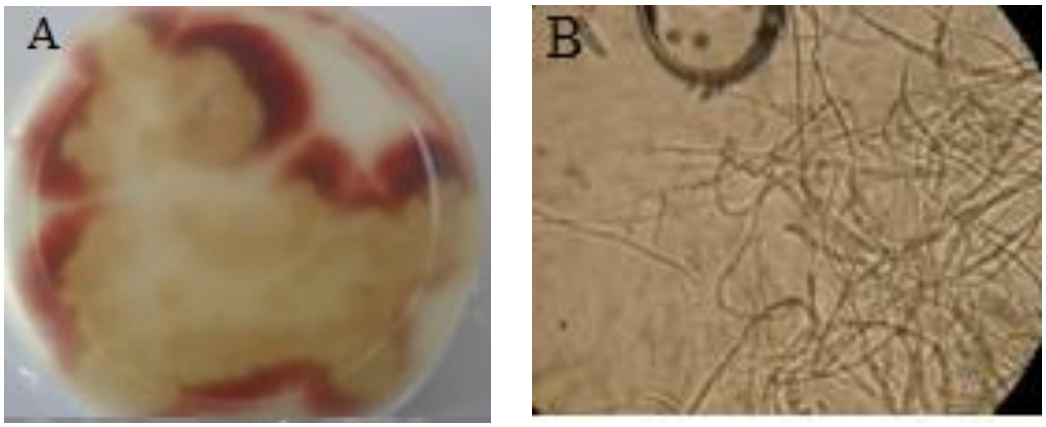
Medio de aislamiento: MS (Tratamiento C).

Vista Macroscópica: Micelio esponjoso de color rojo en los bordes y amarillo en la parte central, crecimiento rápido de 2,1 cm. de diámetro a los 6 días (Figura 7A).

Vista microscópica: Hifas hialinas no septadas, con microconidias unicelulares en forma ovalada (Figura 7B).

Clasificación: Patógeno.

Figura 7 Vista macroscópica y microscópica de *Fusarium* sp. 3 en *Oncidium* sp.



A. Vista macroscópica. B. Vista microscópica 40X.
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Fusarium sp. 2 aislado de la especie 2181 (*Stelis* sp. 3)

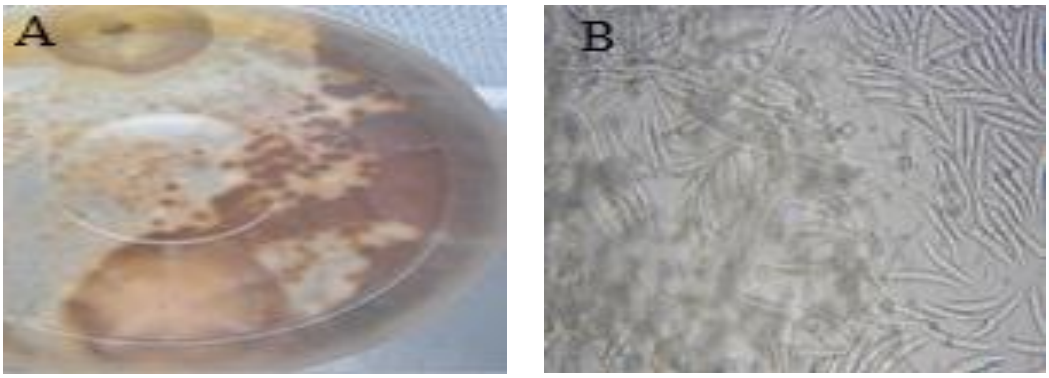
Medio de aislamiento: SDA (Tratamiento A).

Vista Macroscópica: Micelio algodonoso de coloración rojiza parda, con crecimiento radial y rápido de 2 cm. de diámetro a los 6 días (Figura 8A).

Vista microscópica: Presencia de macroconidias multicelulares septadas de forma fusiforme con células apicales alargadas (Figura 8B).

Clasificación: Patógeno.

Figura 8 Vista macroscópica y microscópica de *Fusarium* sp. 2 en *Stelis* sp. 3



A. Vista macroscópica. B. Vista microscópica 40X.
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Fusarium sp. 4 aislado de la especie 1585 (*Prostechea aemula*)

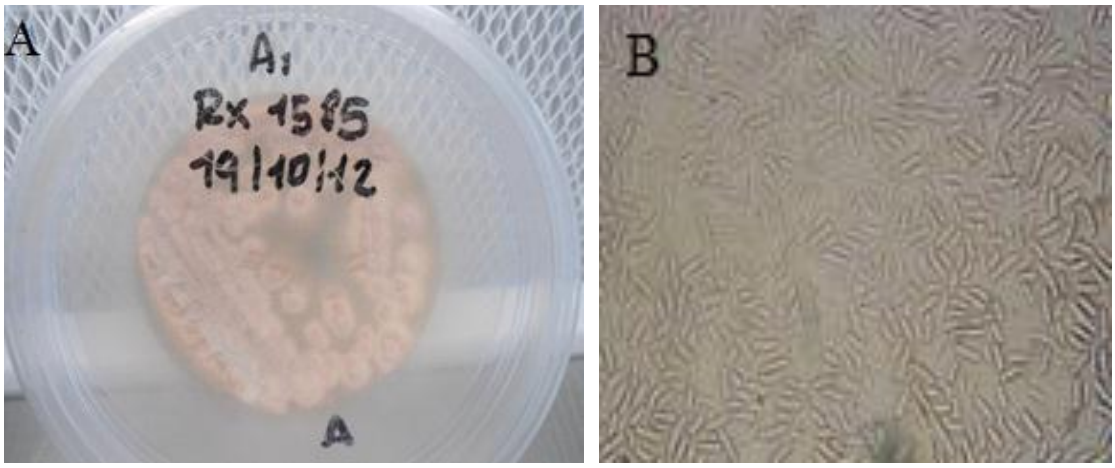
Medio de aislamiento: SDA (Tratamiento A).

Vista Macroscópica: Micelio algodonoso de coloración rosa, con crecimiento radial y rápido de 2,3 cm. de diámetro a los 6 días. Presenta una zona lateral a manera de estroma (micelio asociado en forma de matriz fluida) (Figura 9A).

Vista microscópica: Presenta una gran cantidad de microconidias unicelulares de forma ovoide con base redonda (Figura 9B).

Clasificación: Patógeno.

Figura 9 Vista macroscópica y microscópica de *Fusarium* sp. 4 en *Prostechea aemula*



A. Vista macroscópica. B. Vista microscópica 40X.
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Los 4 hongos aislados e identificados como *Fusarium* presentaron características macroscópicas como crecimiento rápido con un promedio de 2,3 cm. de diámetro a los 6 días, de textura esponjosa y algodonosa de forma radial y ramificada con coloraciones naranja, rojiza, amarilla y rosa; mientras que las características microscópicas incluyeron la presencia de micro y macroconidias de forma ovalada con base redonda, pudiendo ser uni y multicelulares respectivamente.

Las características visualizadas fueron de gran importancia para la identificación de los aislados dentro del género *Fusarium*, tal como se detalla en Monzón & Rodríguez (2001) la morfología y pigmentación de la colonia, son características habitualmente útiles para la identificación dentro de este género ya que se establece como

características macroscópicas primarias un crecimiento rápido con micelio esponjoso o algodonoso de tonalidades: blanca, crema, naranja, rojiza, rosa y púrpura, dependiendo de los diferentes medios de cultivo utilizados.

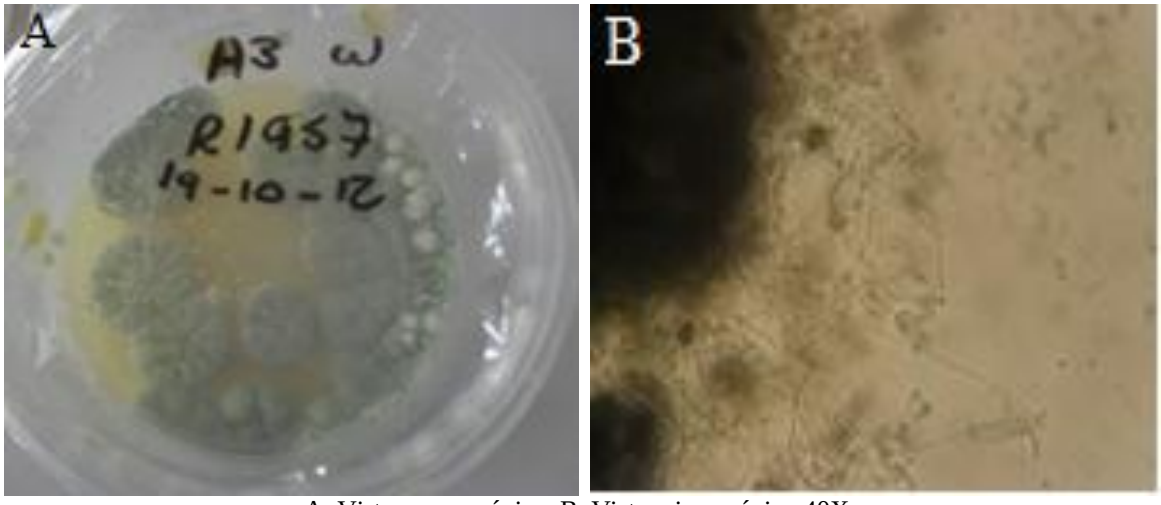
Según Carrillo (2003) las caracteríticas microscópicas útiles para su identificación son el desarrollo de macro y microconidiascon forma ovoide, fusiforme o elipsoidal que pueden ser uni o multicelulares, características microscópicas identificadas en todos los aislados de la presente investigación.

Características macroscópicas y microscópicas del género *Penicillium*

Penicillium sp. 2 aislado de la especie 1957 (*Oncidium klotzschianum*)

Medio de aislamiento: Czapek y MS (Tratamiento B y C).
Vista Macroscópica: Micelio de color verde en la parte superior, amarillo en la parte posterior, algodonoso, con exudados cristalinos (Figura 10A).
Vista microscópica: Presencia de esporas circulares y conidioforos en racimo (Figura 10B).
Clasificación: Patógeno.

Figura 10 Vista macroscópica y microscópica de *Penicllium* sp. 2 en *Oncidium klotzschianum*



A. Vista macroscópica. B. Vista microscópica 40X.
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Penicillium sp. 1 aislado de la especie 1633 (*Odontoglosum halii*)

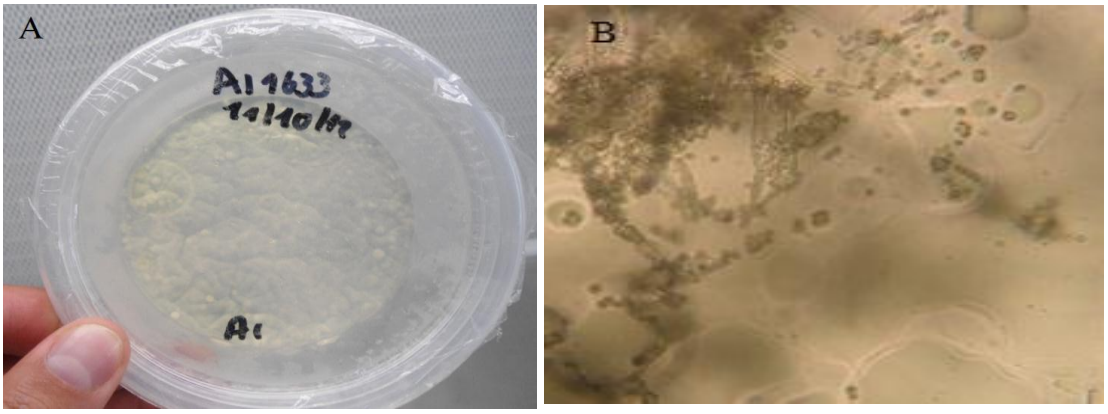
Medios de aislamiento: SDA y MS (Tratamiento A y C).

Vista Macroscópica: Micelio inicialmente blanco que al madurar toma una tonalidad verdosa, es algodonoso con un crecimiento radial (Figura 11A).

Vista microscópica: Hongo filamentoso, con conidióforo hialino septado y triverticilado, con 2 ramificaciones que da lugar a cadenas de esporas esféricas (Figura 11B).

Clasificación: Patógeno.

Figura 11 Vista macroscópica y microscópica de *Penicillium* sp. 1 en *Odontoglosum halii*



A. Vista macroscópica. B. Vista microscópica 40X.
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Los aislados del género *Penicillium* presentaron una tonalidad blanca que al madurar se torna verdoso, con un crecimiento radial, de textura algodonosa y con desarrollo de exudados cristalinos. Mientras que su morfología microscópica, los hongos se caracterizaron por ser filamentosos con conidioforos hialinos, septados y triverticilados, con 2 ramificaciones que dan lugar a cadenas de esporas esféricas.

Las características macroscópicas y microscópicas detalladas anteriormente fueron esenciales para la caracterización de *Penicillium*; al comparar las características microscópicas obtenidas con estudios realizados por Gómez (1950), se determinó que los aislados de este género son inconfundibles por las formas de pincel o escoba que ofrecen sus aparatos conidianos, los cuales se forman en los extremos de hifas fértiles, llamadas conidióforos (portadoras de conidios) que se desarrollan como

ramas del micelio, divididas en células, y a menudo con ramas laterales. Mientras que las características macroscópicas obtenidas en el desarrollo de *Penicillium* se igualan con lo mencionado por Tangarife (2011), donde las colonias de *Penicillium* se desarrollaron de formas planas, aterciopeladas, pulverulentas y de textura lanosa o algodonosa con un crecimiento rápido que inicialmente presentaban una coloración blanca que al madurar se torna verde azul, verde gris, verde oliva o amarillo.

Características macroscópicas y microscópicas del género *Penicillium*

Trichoderma sp. aislado de la especie 2272 (*Pleurothallis* sp. 3)

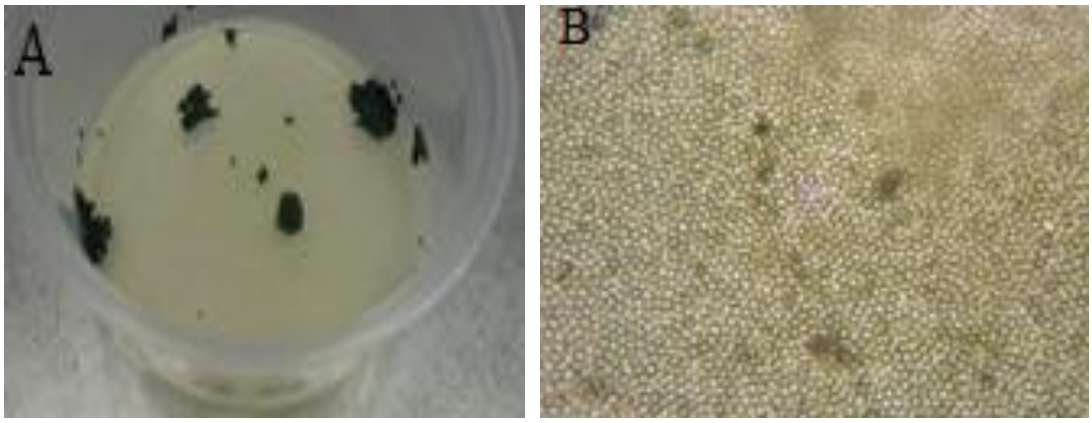
Medio de aislamiento: MS (Tratamiento C).

Vista Macroscópica: Micelio de color verde intenso, formando tipos de conglomerados irregulares en el medio de cultivo (Figura 12A).

Vista microscópica: Presencia de esporas o conidias circulares (Figura 12A).

Clasificación: Biocontrolador.

Figura 12 Vista macroscópica y microscópica de *Trichoderma* sp. en *Pleurothallis* sp. 3



A. Vista macroscópica. B. Vista microscópica 40X.
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Trichoderma sp. aislado de la especie 2093 (*Mormodes* sp.)

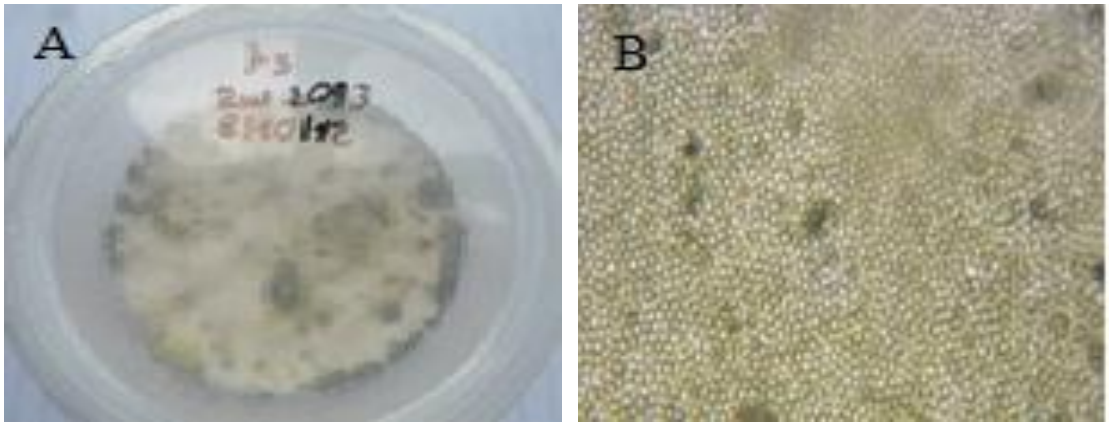
Medio de aislamiento: SDA y Czapek (Tratamiento A y B).

Vista Macroscópica: Micelio inicialmente blanco y algodonoso que gradualmente se torna verdoso con formación de conglomerados de color verde oscuro (Figura 13A).

Vista microscópica: Presenta una gran cantidad de esporas o conidias en forma ovoide (Figura 13B).

Clasificación: Biocontrolador.

Figura 13 Vista macroscópica y microscópica de *Trichoderma* sp. en *Mormodes* sp.



A. Vista macroscópica. B. Vista microscópica 40X.
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Las colonias de *Trichoderma* aisladas presentaron coloración inicialmente blanca con crecimiento radial, de textura ligeramente algodonosa, que al madurar toma una tonalidad verde oscura con formación de conglomerados irregulares; mientras que de forma microscópica se caracterizó únicamente por el desarrollo de gran cantidad de conidias en forma ovoide específicas a este género, características corroboradas por Hernández (2013), donde los aislados de *Trichoderma* se caracterizaron mediante la identificación de gran cantidad de conidias ovoides (esporas). De la misma manera Pineda y otros (2013), establecen que las características macroscópicas de los aislados de *Trichoderma* se basan en un micelio de coloración inicialmente blanca que al madurar se torna de color verde olivo con textura algodonosa y la presencia de conglomerados sólidos (agregados de conidios) y exudados hialinos, igual a las características observadas en el desarrollo de los aislados del presente estudio.

El Cuadro 7 indica la variedad de biota fúngica al obtener el aislamiento de 8 hongos pertenecientes a los géneros *Penicillium, Fusarium* y *Trichoderma* en las raíces de 8 especies de orquídeas, corroborando la investigación realizada por Noval, Oria, Casadesus & Gómez (1999), la cual menciona que en 3 especies de orquídeas se presentaron diversidad de hongos, entre ellos *Aspergillus, Ciadosporium, Trichoderma, Penicillium, Acremonium, Micelia sterilia* y *Fusarium*, mostrando de esta manera que existe una gran variedad de biota fúngica en raíces de orquídeas.

4.2.2 Caracterización del género-forma *Rhizoctonia*

La identificación se obtuvo mediante claves taxonómicas de Barnett & Hunter (2003), donde se clasificaron como hongos simbiontes a los 8 aislados y caracterizados como pertenecientes al género-forma *Rhizoctonia* (Cuadro 7), debido a su morfología macroscópica y microscópica (Figuras 14-21), aseverando de esta manera lo propuesto por Mosquera y otros (2010) en donde establecen que la simbiosis generada en las orquídeas se caracteriza porque la mayoría de los hongos participantes son miembros de *Rhizoctonia*. La caracterización se realizó en cuanto a género, ya que la identificación a nivel de especies dentro del género-forma es compleja debido a la presencia de escasos caracteres morfológicos que presentan sus aislados, siendo únicamente distinguibles por sus estructuras sexuales, cabe recalcar que raramente se producen dichas estructuras en medio de cultivo (González, 2008), por lo que sería recomendable identificar la especie exacta por técnicas de sistemática molecular (PCR) (Mosquera, Bayman & Otero, 2010). Se clasificaron a los 8 aislados pertenecientes al género-forma *Rhizoctonia*, 6 dentro del género anamorfo *Rhizoctonia,* y 2 afines a *Cerathoriza* y *Waitea.*

Vista macroscópica y microscópica de *Rhizoctonia* sp. 1 aislado de *Pleurothallis* sp.

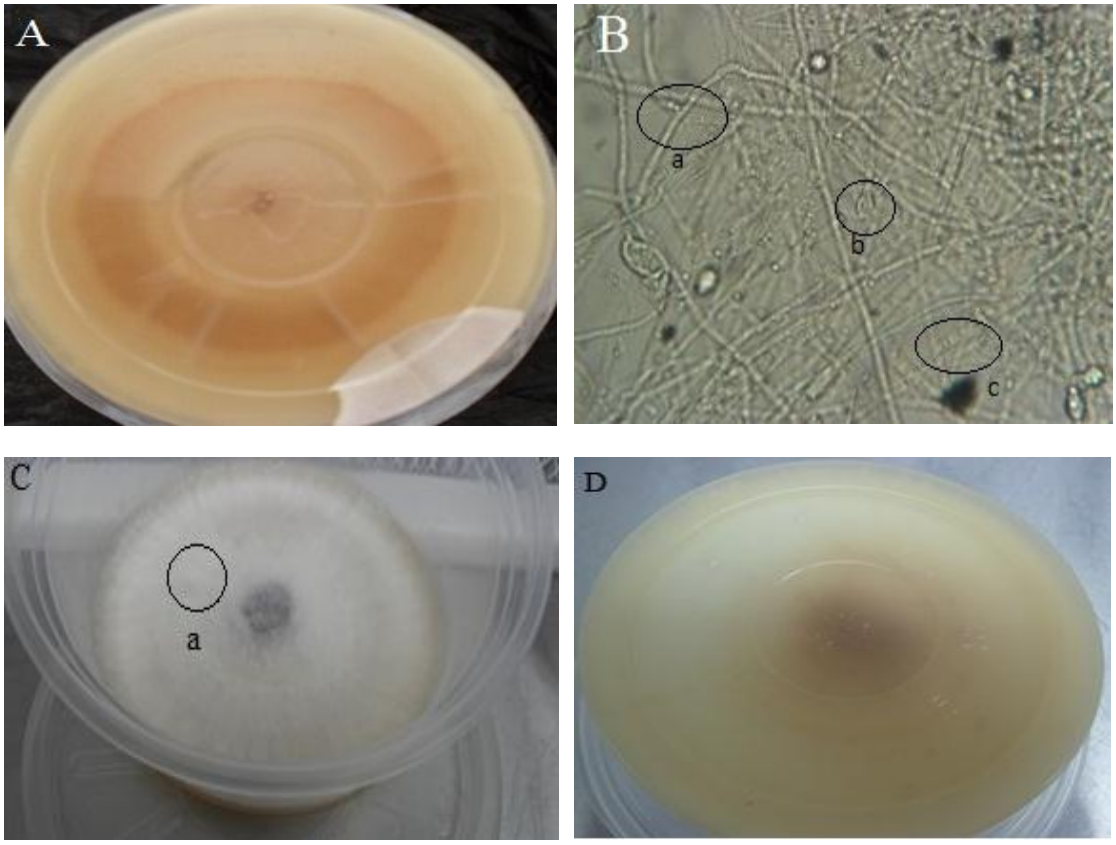
Medio de Adaptación: SDA (Tratamiento A).

Descripción macroscópica: Hongo esponjoso de color blanco en la parte superior con centro rojo, y crema en la parte posterior, con crecimiento ramificado (Figura 14A).

Descripción microscópica: Fusión de hifas gruesas formando ángulos de 45º y 90º, septadas, con presencia de microesclerocios (Figura 14B).

Crecimiento en PDA: Micelio blanco con centro pardo en la parte superior, crema en la parte inferior, con presencia de conglomerados (Figura 14 C, D).

Figura 14 Micelio e hifas de la micorriza aislada de *Pleurothallis* sp. a los 30 días de evaluación



A. Vista macroscópica. B. Vista microscópica 40x. a. hifas en ángulo recto. b. microesclerocio. c. hifas septadas. C. Crecimiento PDA. a. conglomerado. D. Reverso crecimiento PDA. Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Vista macroscópica y microscópica de *Rhizoctonia* sp. 2 aislado de *Epidendrum nocturnum*

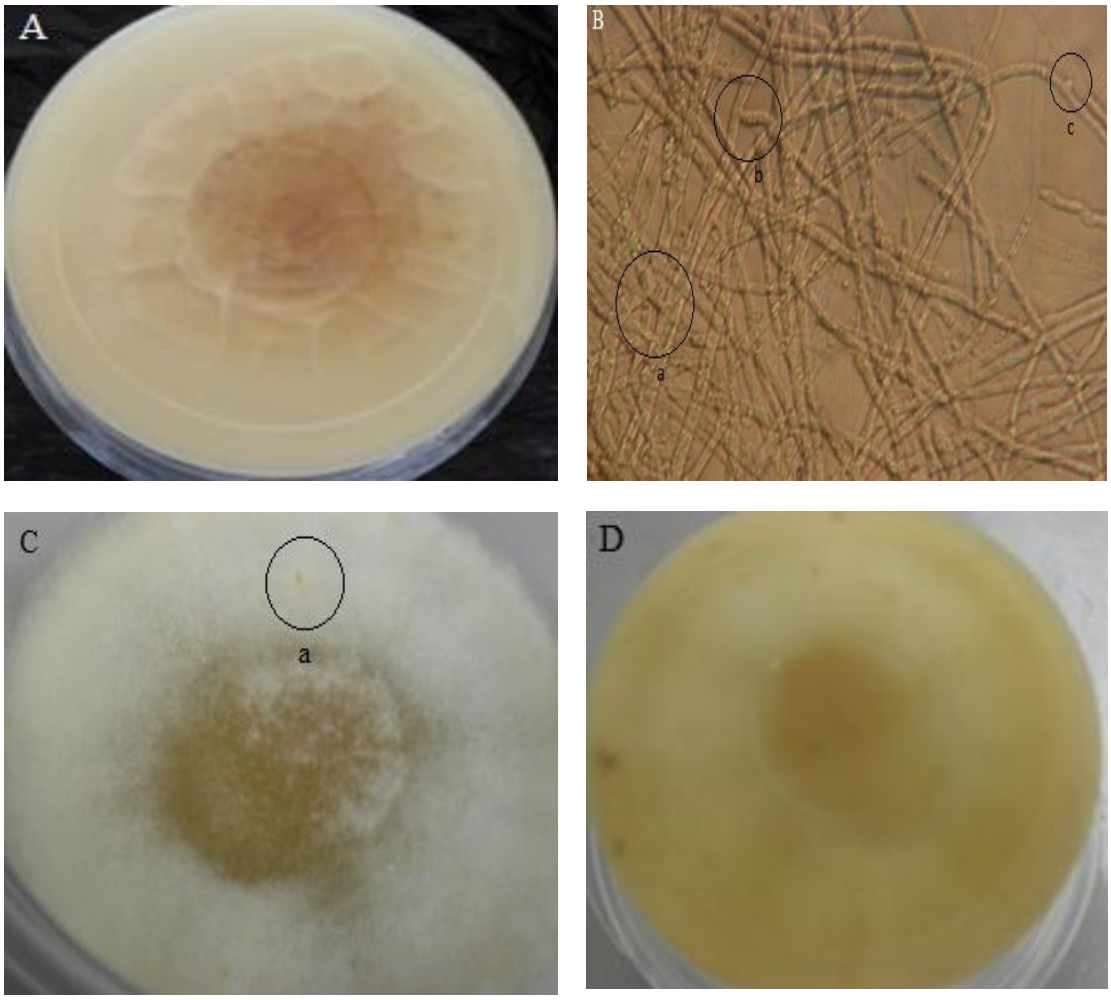
Medio de Adaptación: SDA (Tratamiento A).

Descripción macroscópica: Hongo esponjoso de color blanco en la parte superior y marrón en la parte inferior, con crecimiento ramificado (Figura 15A).

Descripción microscópica: Fusión de hifas septadas, gruesas y alargadas, con ramificaciones en ángulos de 45º y 90º, presentando constricción denominada clamp, y ausencia de esporas (Figura 15B).

Crecimiento en PDA: Micelio blanco en la parte superior y crema en la parte inferior, que presenta esclerocios (Figura 15C, D).

Figura 15 Micelio e hifas de la micorriza aislada de *Epidendrum nocturnum* a los 30 días de evaluación



A. Vista macroscópica. B. Vista microscópica 40x. a. Hifas gruesas septadas. b. Ángulo recto. c. Clamp. C. Crecimiento en PDA. a. Esclerocio. D. Reverso crecimiento en PDA.
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Vista macroscópica y microscópica de *Rhizoctonia* sp. 3 aislado de *Oncidium klotzchianum*

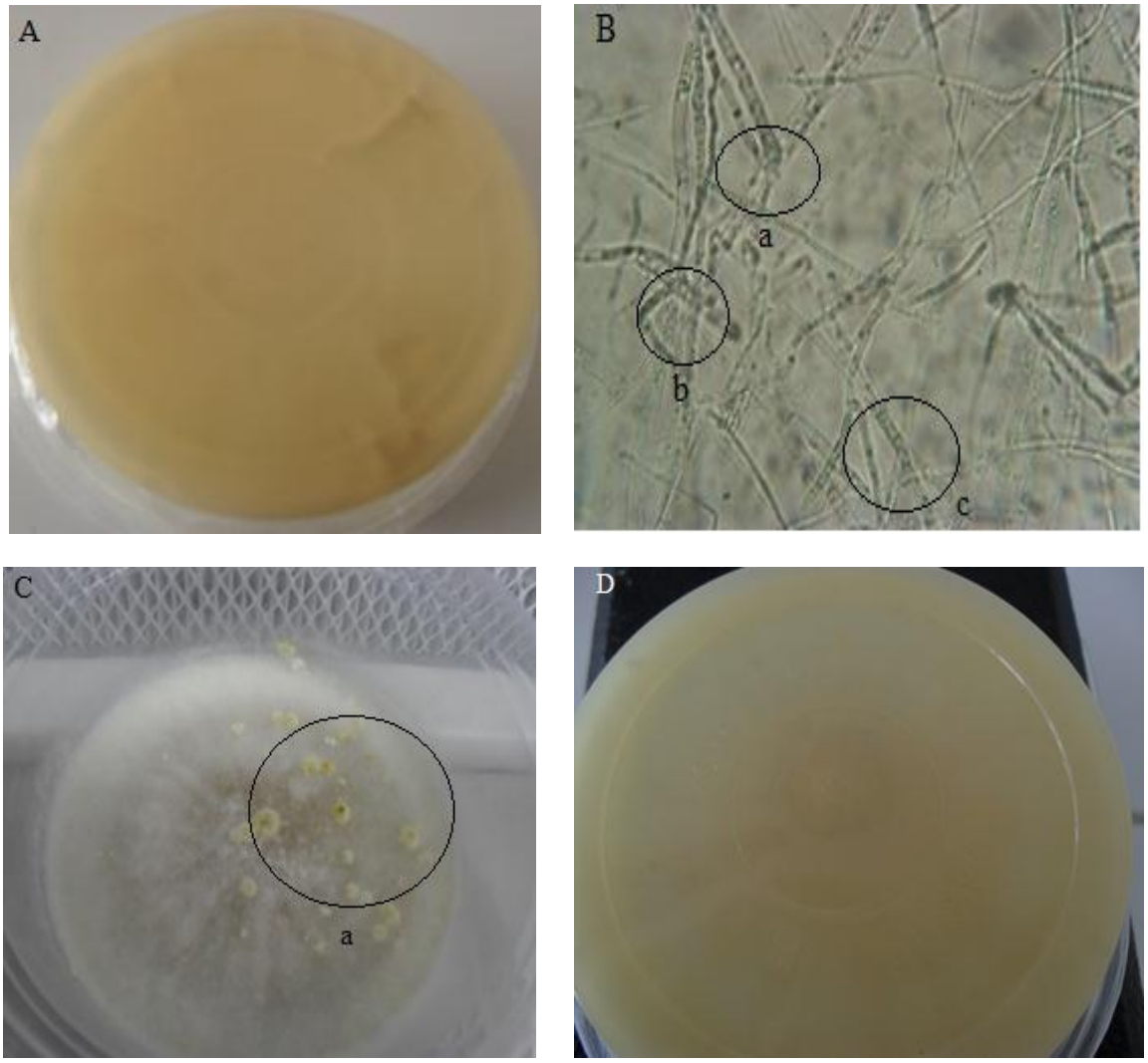
Medio de Adaptación: SDA (Tratamiento A).

Descripción macroscópica: Hongo esponjoso de color blanco en la parte superior, crema en la parte inferior, con crecimiento ramificado (Figura 16A).

Descripción microscópica: Fusión de hifas gruesas formando ángulos de 45º y 90º, septadas y ausencia de esporas (Figura 16B).

Crecimiento en PDA: Micelio de color blanco en la parte superior, crema en la parte inferior, con presencia de esclerocios amarillos de forma regular (Figura 16C, D).

Figura 16 Micelio e hifas de la micorriza aislada de *Oncidium klotzchianum* a los 30 días de evaluación



A. Vista macroscópica . B. Vista microscópica 40x. a. Hifas en ángulo recto. b. Hifas gruesas c. Septos. C. Crecimiento en PDA. a. esclerocios. D. Reverso crecimiento en PDA. Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Vista macroscópica y microscópica de *Waitea* sp. aislado de *Epidendrum* sp.

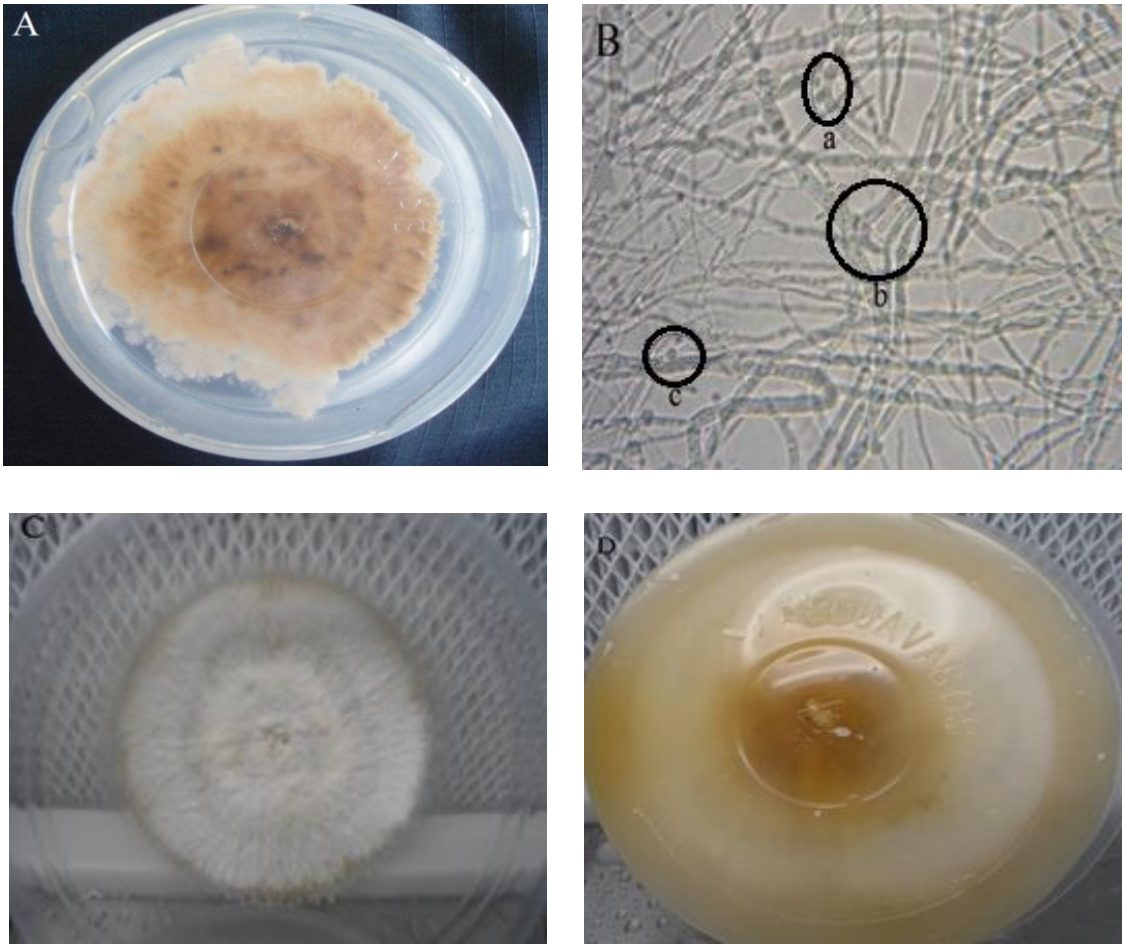
Medio de adaptación: MS (Tratamiento C).

Descripción macroscópica: Micelio hialino algodonoso de color blanco marrón en la parte superior y marrón en la parte inferior, con crecimiento ramificado. Desarrolló esclerocios sólidos uniformes (Figura 17A).

Descripción microscópica: Hifas gruesas, largas, y septadas formando ramificaciones en ángulos de 45º y 90º. Presenta una ligera constricción entre la hifa principal y secundaria (clamp). Ausencia de esporas. Afín al género *Waitea* (anamorfo) por presencia de basidios (Figura 17B).

Crecimiento en PDA: Micelio algodonoso de color blanco en la parte superior y de color beige marrón en la parte inferior (Figura 17C, D).

Figura 17 Micelio e hifas de la micorriza aislada de *Epidendrum* sp. a los 30 días de evaluación



A. Vista macroscópica. B. Vista microscópica 40x. a. Ramificación en ángulo recto, b. clamp, c. basidio. C. Crecimiento en PDA. D. Reverso crecimiento en PDA.
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Vista macroscópica y microscópica de *Cerathoriza* sp. aislado de *Stelis* sp. 1

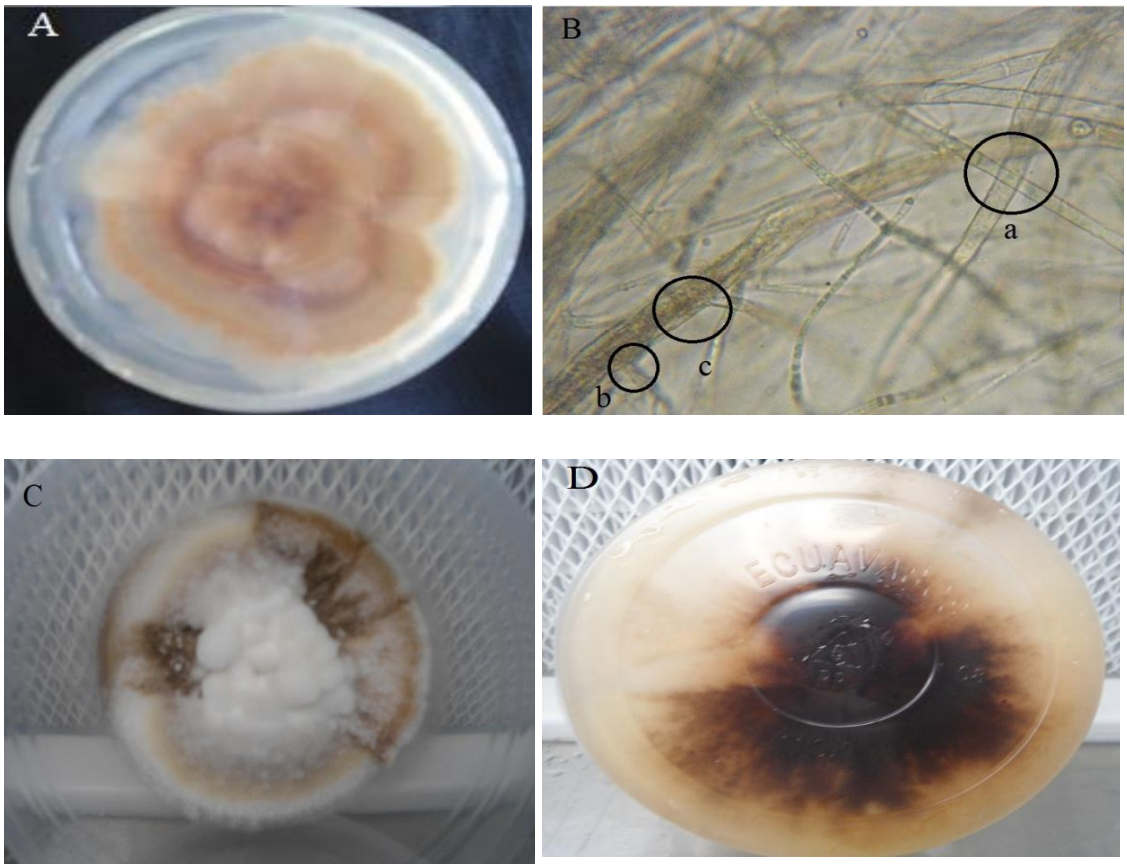
Medio de adaptación: MS (Tratamiento C).

Descripción macroscópica: Micelio hialino algodonoso de color blanco marrón en la parte superior y marrón en la parte inferior con crecimiento radial formando halos concéntricos. Abundante micelio aéreo (Figura 18A).

Descripción microscópica: Hifas largas delgadas y gruesas con septos de coloración café, con septos formando ramificaciones en ángulos de 45º y 90º. Excelente capacidad de anastomosar, ausencia de esporas, afín al género *Cerathoriza* (anamorfo) (Figura 18B).

Crecimiento en PDA: Micelio algodonoso con coloración blanca marrón que se torna marrón oscuro a los 21 días, abundante micelio aéreo que se desarrolla a manera de halos concéntricos (Figura 18C, D).

Figura 18 Micelio e hifas de la micorriza aislada de *Stelis* sp. 1 a los 30 días de evaluación



A. Vista macroscópica. B. Vista microscópica 40x. a. Hifas largas gruesas y delgadas. b. Ramificación en recto. c. Anastomosis a fin al género *Cerathoriza*. . C. Crecimiento en PDA. D. Reverso crecimiento en PDA.
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Vista macroscópica y microscópica de *Rhizoctonia* sp. 4 aislado de *Prostechea aemula*

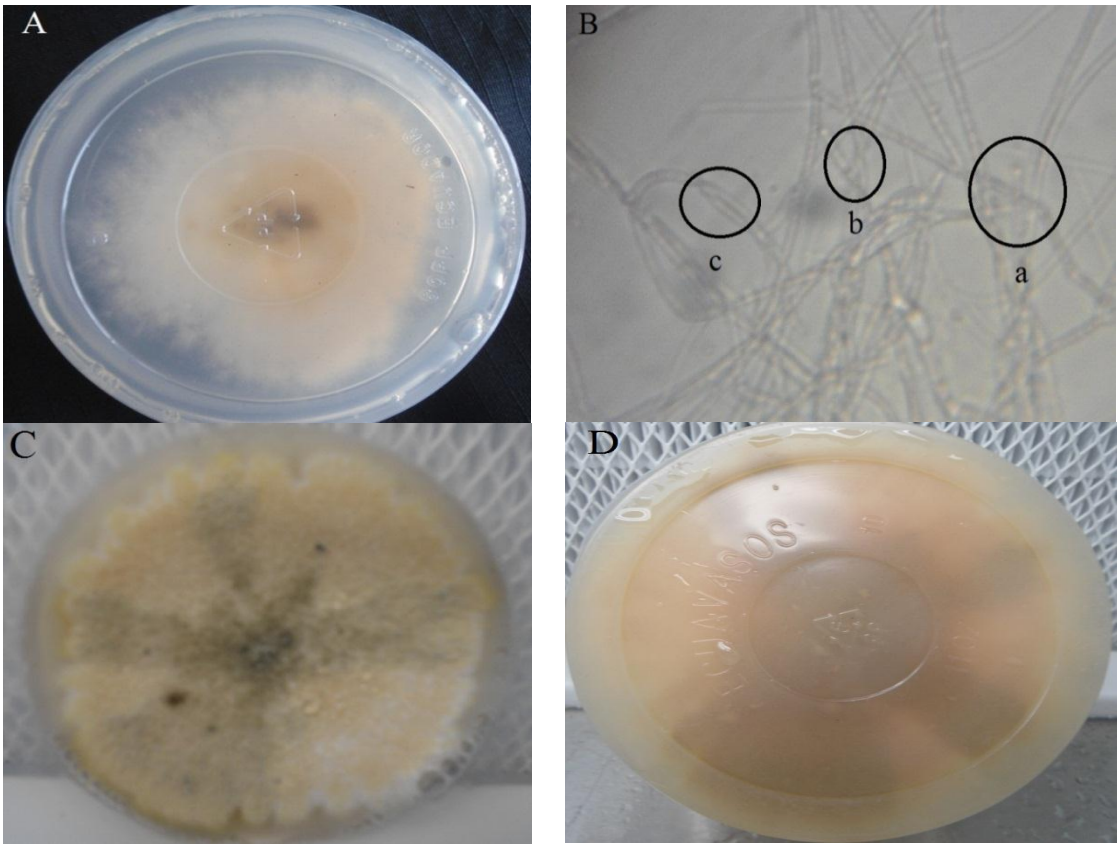
Medio de adaptación: MS (Tratamiento C).

Descripción macroscópica: Micelio hialino, esponjoso, de color blanco en la parte superior y coloración crema en la parte inferior, con crecimiento ramificado (Figura 19A).

Descripción microscópica: Hifas largas, anchas y septadas, formando ramificaciones en ángulos de 45º y 90º. Presenta una conexión a manera de grapa o hifa vegetativa y sin esporas (Figura 19B).

Crecimiento en PDA: Micelio radial, ligeramente algodonoso de crecimiento rápido, de color marrón verdoso en la parte superior y crema rosáceo en el parte inferior (Figura 19 C, D).

Figura 19 Micelio e hifas de la micorriza aislada de *Prostechea aemula* a los 30 días de evaluación



A. Vista macroscópica. B. Vista microscópica 40x. a. Hifas largas anchas y septadas. b. Ramificación en recto. c. Hifa vegetativa. C. Crecimiento en PDA. D. Reverso crecimiento en PDA.
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Vista macroscópica y microscópica de *Rhizoctonia* sp. 5 aislado de *Stelis* sp. 2

Medio de adaptación: SDA (Tratamiento A).

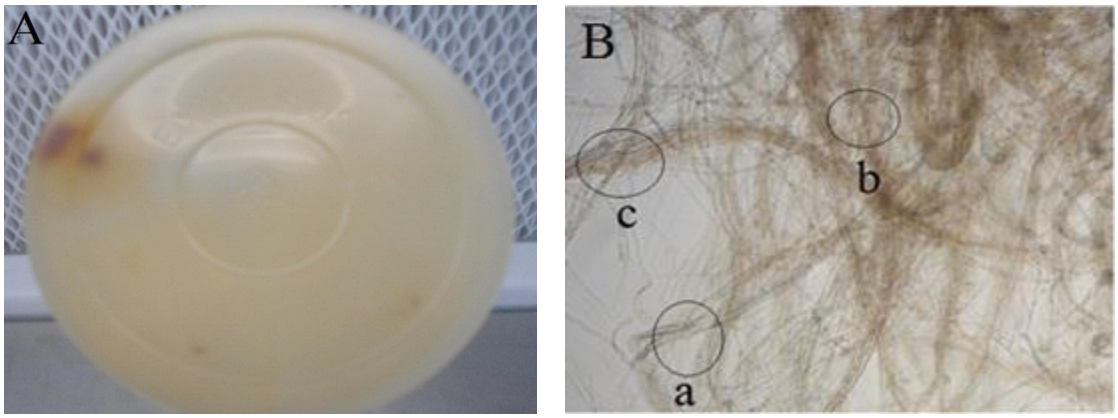
Descripción macroscópica: Micelio de crecimiento ramificado, blanco en la parte superior y crema-marrón en la parte inferior, de textura esponjosa (Figura 20A).

Descripción microscópica: Hifas largas, septadas y formando ramificaciones en ángulos de 45º y 90º. Con capacidad de formar anastomosis (Figura 20B).

Crecimiento en PDA: no viable.

El hongo perdió su viabilidad en el proceso de subcultivo ya que no se regeneró en ninguna de sus repeticiones.

Figura 20 Micelio e hifas de la micorriza aislada de *Stelis* sp. 2 a los 30 días de evaluación



A. Vista macroscópica. B. Vista microscópica 40x. a. Hifas cortas, delgadas y septadas. b. Ramificaciones en ángulos de 45º y 90º. c. Anastomosis.
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Vista macroscópica y microscópica de *Rhizoctonia* sp. 6 aislado de la Morfoespecie 1

Medio de adaptación: SDA (Tratamiento A).

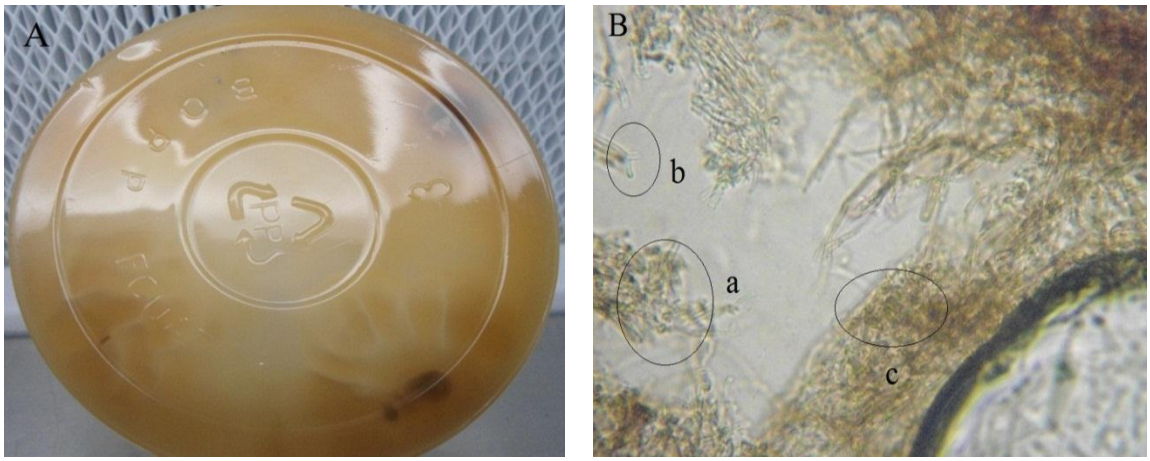
Descripción macroscópica: Micelio blanco en la parte superior y marrón en la parte inferior de textura esponjosa y crecimiento ramificado (Figura 21A).

Descripción microscópica: Hifas cortas, delgadas, septadas, formando ramificaciones en ángulos de 45º y 90º. Con capacidad de formar anastomosis. (Figura 21B).

Crecimiento en PDA: no viable.

El hongo perdió su viabilidad en el proceso de subcultivo ya que no se regeneró en ninguna de sus repeticiones.

Figura 21 Micelio e hifas de la micorriza aislada de la Morfoespecie 1 a los 30 días de evaluación



A. Vista macroscópica. B. Vista microscópica 40x. a. Hifas cortas, delgadas y septadas. b. Ramificaciones en ángulos de 45º y 90º. c. Anastomosis.
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

En lo que respecta a los simbiontes de interés se obtuvieron 8 aislados con características correspondientes al género-forma *Rhizoctonia;* sin embargo, 2 perdieron su viabilidad en el proceso de subcultivo, por lo que se continuó el estudio con 6 morfotipos; apoyados en la investigación realizada por Mosquera y otros (2010) se comprueba que en medios de cultivo artificiales, algunos hongos micorrízicos de orquídeas pierden viabilidad después de su aislamiento debido a la ausencia de estructuras de resistencia (microesclerocios y esclerocios) y por la baja viabilidad del hongo en el segmento de la raíz utilizado en el proceso de aislamiento.

El crecimiento en PDA se realizó con la finalidad de comparar el desarrollo de los aislados obtenidos con los de Athipunyakom y otros (2004), a partir de las características morfológicas tanto macroscópicas como microscópicas, se obtuvieron 8 morfotipos del género-forma *Rhizoctonia,* 2 de éstos incluidos dentro de los géneros anamorfos *Waitea* (Figura 17) por la presencia de hifas gruesas, largas con presencia de basidios, y *Cerathoriza* por desarrollo de anastomosis perfecta (Figura 18) descritos teóricamente en investigaciones anteriores como hongos micorrízicos orquidioides (Mosquera y otros, 2010).

El Cuadro 8 muestra las características macroscópicas y microscópicas específicas evaluadas en el proceso de maduración (30 días) de los morfotipos aislados de 8 especies de orquídeas.

Cuadro 8 Características específicas del género-forma *Rhizoctonia* presentes en los simbiontes aislados en raíces de 8 especies de orquídeas a los 30 días de evaluación

Especie de Orquídeas	Género anamorfo	Esporas	Constricción hifas 45 y 90º	Anastomosis	Color	Estructuras de resistencia
Epidendrum sp.	*Waitea* sp.	NO	SI	Fusión de hifas	Marrón	Esclerocio
Stelis sp. 1	*Cerathoriza* sp.	NO	SI	Perfecta	Marrón	Esclerocio y microesclerocio
Prostechea aemula	*Rhizoctonia* sp. 4	NO	SI	Fusión de hifas	Crema	Esclerocio
Stelis sp. 2*	*Rhizoctonia sp. 5*	NO	SI	Perfecta	Marrón	Sin desarrollo
Morfoespecie 1*	*Rhizoctonia* sp. 6	NO	SI	Perfecta	Crema	Sin desarrollo
Epidendrum nocturnum	*Rhizoctonia sp. 2*	NO	SI	Fusión de hifas	Crema	Esclerocio
Oncidium klotzchianum	*Rhizoctonia sp. 3*	NO	SI	Fusión de hifas	Crema	Esclerocio
Pleurothallis sp.	*Rhizoctonia sp. 1*	NO	SI	Fusión de hifas	Pardo	Microesclerocio

Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.
. *Cruz y Cárdenas, 2012.

De los 8 aislados del género-forma *Rhizoctonia* evaluados, se determinó que el 100% no presentaron esporas en medios de cultivos artificiales, según González (2008) es una característica básica; a la vez los 8 morfotipos aislados presentaron constricciones de hifas, un septo en la hifa secundaria cerca al punto de ramificación y ramificaciones en ángulo de 45º y 90º, características identificadas en descripciones microscópicas realizadas por Ordóñez y otros (2012), donde establecen las mencionadas características como específicas para el género-forma *Rhizoctonia*. De la misma manera, se observó en las micorrizas *Waitea* sp. y *Rhizoctonia* sp. 2 aisladas de *Epidendrum* sp. y *Epidendrum nocturnum* respectivamente, la presencia de una ligera constricción en el punto de unión entre la hifa principal y secundaria, característica para identificar al género-forma *Rhizoctonia* en los aislados obtenidos por Beltrán (2010), donde dicha constricción es denominada clamp, por lo que se presume que estas estructuras son características de los hongos simbiontes asociados al género *Epidendrum*. En cuanto a la característica de anastomosis, que es una

expresión de incompatibilidad o compatibilidad somática hifal, los aislados *Cerathoriza* sp., *Rhizoctonia* sp. 6 y *Rhizoctonia* sp. 5 pertenecientes a *Stelis* sp. 1, Morfoespecie 1 y *Stelis* sp. 2 respectivamente, presentaron una fusión perfecta, en la cual se observa una unión de pared celular y membrana citoplasmática, mientras que los aislados *Waitea* sp., *Rhizoctonia* sp. 2, *Rhizoctonia* sp. 3 *Rhizoctonia* sp. 1 pertenecientes a *Epidendrum* sp., *Epidendrum nocturnum*, *Oncidium klotzchianum* y *Pleurothallis* sp. respectivamente, presentaron una fusión de hifas o fusión imperfecta y finalmente el aislado *Rhizoctonia* sp. 4 perteneciente a *Prostechea aemula* con una ausencia total de esta expresión tal como lo detalla González (2008) en características hifales de grupos de anastomosis.

De la descripción macroscópica de los 8 morfotipos aislados a los 30 días, se observa que inicialmente los hongos presentaron una coloración blanca en su etapa juvenil (3 días) hasta su etapa de maduración (30 días) donde 4 presentaron una tonalidad crema, 3 marrón y 1 parda, datos que corroboran la inclusión dentro del género de interés ya que las características vegetativas son similares a las de Warcup & Talbot (1980), como la pigmentación del micelio en tonalidades de color blanco en su estado juvenil y amarillo, crema, pardo, marrón en colonias pasados los 20 días.

De las 8 micorrizas, 6 presentaron estructuras de resistencia que van desde microesclerocios (células microscópicas globosas e irregulares que contienen abundantes reservas de alimento y funcionan como propágulos infectivos de larga vida en el suelo) hasta esclerocios (micelio sólido a manera de conglomerado), al igual que González (2008) describe como característica macroscópica esencial para el género-forma *Rhizoctonia*, la producción de esclerocios de textura uniforme y micelio asociado a raíces de las plantas. Los aislados *Rhizoctonia* sp. 5 y *Rhizoctonia* sp. 6 de las especies *Stelis* sp. 2 y Morfoespecie 1 respectivamente, perdieron su viabilidad al carecer en su morfología macroscópica y microscópica, de estructuras de resistencia, esto se debe a la baja capacidad del hongo de adaptarse a un medio artificial y la ausencia de su hospedero, factores limitantes para el amplio desarrollo de sus estructuras fisiológicas (Mosquera, Bayman & Otero, 2010).

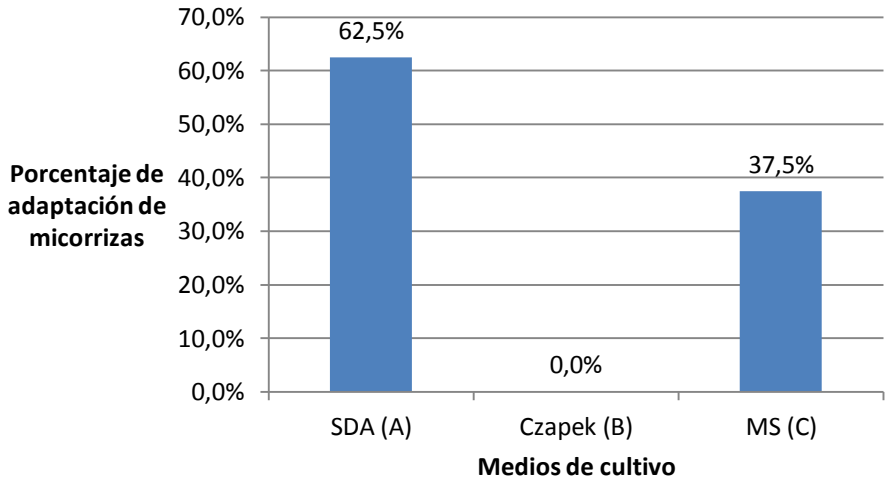
Las micorrizas aisladas de *Epidendrum* sp. y *Stelis* sp. 1 fueron clasificadas dentro de los géneros anamorfos *Waitea* y *Ceratorhiza* respectivamente, al comparar las

características macroscópicas y microscópicas de los mismos en medio PDA con los obtenidos por Athipunyakom y otros (2004). El aislado afín a *Waitea* presentó un micelio algodonoso de color blanco en la parte superior y beige marrón en la parte inferior con crecimiento radial y en su estructura microscópica, hifas ramificadas, septadas con una estructura semejante a un basidio (Figura 17); mientras que el aislado afín a *Ceratorhiza* presentó un micelio algodonoso de coloración marrón oscuro y abundante micelio aéreo que se desarrolla a manera de halos concéntricos, y en su estructura microscópica presenta hifas septadas hialinas con una anastomosis perfecta (Figura 18), características macroscópicas y microscópicas similares a las obtenidas en los morfotipos aislados por Athipunyakom y otros (2004). Por lo tanto, los aislados de las especies *Epidendrum* sp. y *Stelis* sp. 1, presentaron afinidad en cuanto al crecimiento en medio de cultivo y caracterización celular, para ser ubicados dentro de dichos géneros anamorfos; sin embargo, deberán ser determinados molecularmente para corroborar totalmente esta afirmación.

4.2.3 Adaptación a los medios de cultivo

Los resultados se expresaron en porcentaje de los aislamientos específicos al género-forma *Rhizoctonia* de acuerdo al medio de cultivo en el que se adaptaron (Figura 22), es decir un total de 8 morfotipos aislados.

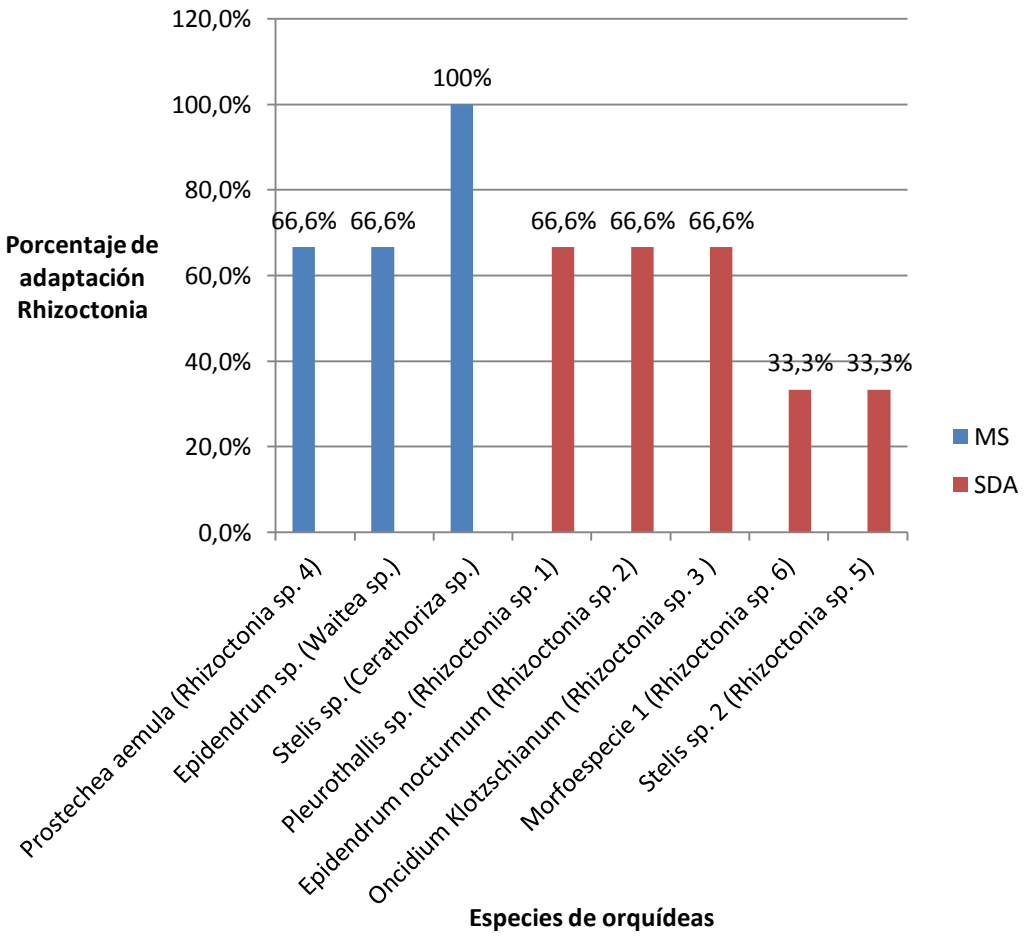
Figura 22 Porcentaje de adaptación de 8 micorrizas en 3 medios de cultivo en el período de maduración (30 días)



Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Del total de 8 micorrizas pertenecientes al género-forma *Rhizoctonia*, 5 fueron aisladas en el medio de cultivo SDA (Tratamiento A) lo que representa un porcentaje de adaptación del 62,5%, mientras que 3 fueron aisladas en el medio MS (Tratamiento C) con un 37,5% de adaptación y en lo que respecta al medio de cultivo Czapek (Tratamiento B) no se obtuvo aislamiento alguno.

Figura 23 Porcentaje de adaptación del género-forma *Rhizoctonia* aislado en 8 especies de orquídeas de acuerdo a sus 3 repeticiones en medios de cultivo SDA y MS



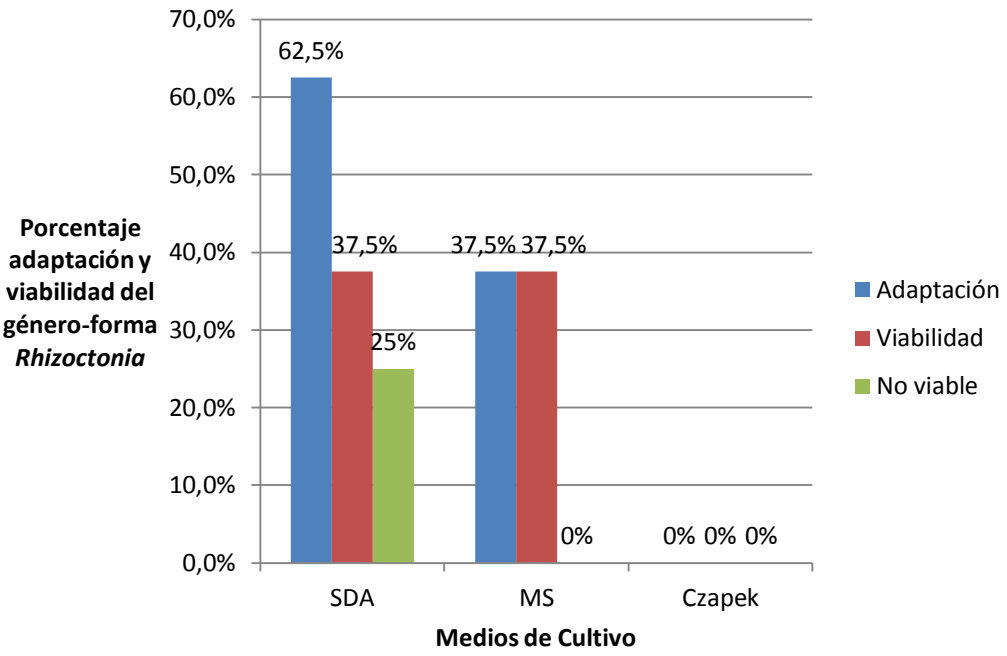
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

De acuerdo a los aislamientos obtenidos en los medios de cultivo (Figura 23), la micorriza de *Cerathoriza* sp. alcanzó el mayor porcentaje de adaptación (100%), ya que apareció en las 3 repeticiones del medio MS (Tratamiento C), seguido de las micorrizas de *Rhizoctonia* sp. 4 y *Waitea* sp. en el mismo medio de cultivo y *Rhizoctonia* sp. 1, *Rhizoctonia* sp. 2 y *Rhizoctonia* sp. 3 en el medio SDA (Tratamiento A) con un porcentaje de adaptación del 66,6% en sus repeticiones; y

finalmente las micorrizas de *Rhizoctonia* sp. 5 y *Rhizoctonia* sp. 6 presentaron un porcentaje de adaptación del 33,3%, es decir apareció en 1 de 3 repeticiones en el medio SDA (Tratamiento A).

Se realizó un análisis de adaptación y viabilidad de los 8 morfotipos aislados en los medios de cultivo SDA y MS, determinando el porcentaje generado (Figura 24).

Figura 24 Porcentaje de adaptación y viabilidad del género-forma *Rhizoctonia* en medios de cultivo SDA, MS y Czapek



Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Con respecto a los medios, SDA (Tratamiento A) obtuvo un 62,5% de adaptación, con un total de 5 morfotipos, en contraste con el medio MS (Tratamiento C), que presentó 37,5% de adaptación en sus 3 aislados. En cuanto a viabilidad se calculó el porcentaje de los 6 morfotipos que no perecieron al subcultivo, mostrando con esto un porcentaje del 37,5% tanto para el medio SDA (Tratamiento A) como para MS (Tratamiento C) y el 25% de los 2 morfotipos sin viabilidad aislados en el medio SDA (Figura 24).

El medio de cultivo SDA es el más adecuado en etapas de aislamiento y adaptación, sin embargo no les confiere a las micorrizas la capacidad de permanecer viables en el

tiempo ya que el 25% de sus aislamientos perdieron su viabilidad, mientras que MS es un medio con menor adaptación al obtener 37,5% de adaptación; sin embargo, no presentó ninguna especie de micorriza con pérdida de viabilidad.

Con respecto al medio Czapek (Tratamiento B) se puede deducir que no es un medio adecuado para el aislamiento de hongos simbiontes orquideoides, ya que partiendo de la siembra de 3 zonas diferentes (basal, intermedia y apical), no generó ningún aislado, en comparación a los medios SDA y MS (tratamientos A y C) de los cuales se obtuvieron varios aislados; concordando con Otero y Bayman (2006) que reportan que algunos hongos de raíces de orquídeas no crecen en medios artificiales ya que los componentes nutricionales no son los necesarios para su aislamiento.

El bajo porcentaje de adaptación de micorrizas en los medios de cultivo (37,5%) probablemente fue debido a la utilización de 9 segmentos obtenidos de 3 zonas de raíces por especie de orquídeas, colectados y sembrados de manera aleatoria en 3 medios nutritivos y por triplicado, ya que según Beltrán (2010), determinó como factor para un mayor éxito en el aislamiento de micorrizas, la viabilidad de los hongos en el segmento de raíz sembrado, de la misma manera Cruz (2007), señala que la baja cantidad de aislamientos en los medios nutritivos se debe a diversos factores en los que destacan la desintegración de hifas en la raíz de orquídea para la obtención de nutrientes, y los patrones de colonización fúngica, que son los potencialmente responsables de la infección micorrízica irregular a lo largo de las raíces; de igual manera el bajo porcentaje puede deberse a que existe mayor índice de colonización en zonas radiculares cerca al ápice y menor cerca al cormo (basal), ya que algunas orquídeas pueden encontrarse densamente colonizadas y otras no presentar colonización incluso en una misma planta (Beltrán, 2010).

4.2.4 Evaluación del crecimiento

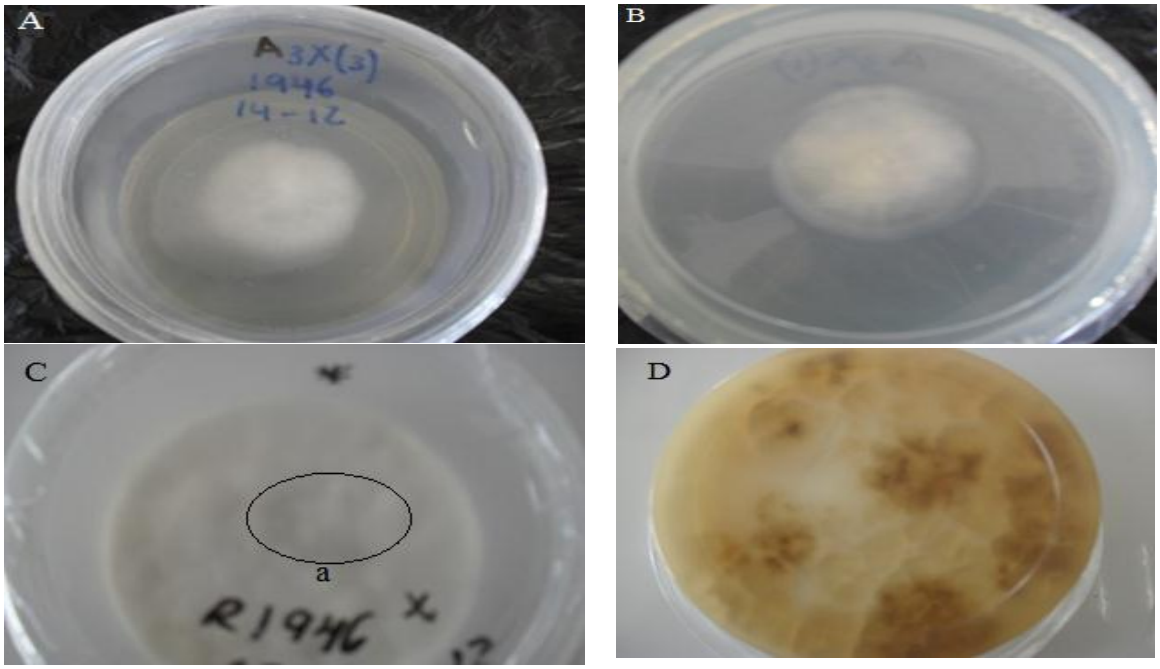
Se realizó la evaluación de crecimiento de 6 aislados viables de *Epidendrum nocturnum*, *Pleurothallis* sp., *Oncidium klotzchianum*, *Epidendrum* sp., *Stelis* sp. 1 y *Prostechea aemula*, analizando las características macroscópicas que mostraron en la etapa juvenil (6 días) y en su etapa madura (21 días) (Figuras 25-30).

Crecimiento de *Rhizoctonia* sp. 2 aislada de *Epidendrum nocturnum* en el medio SDA (Tratamiento A)

Etapa juvenil: Micelio esponjoso de coloración blanca y crecimiento ramificado, área de 46,08 cm^2 (Figura 25A, B).

Etapa madura: Micelio esponjoso formando conglomerados, de coloración marrón y crecimiento ramificado, área de 72,25 cm^2 (Figura 25C, D).

Figura 25 Crecimiento a los 6 y 21 días del aislado de *Epidendrum nocturnum*



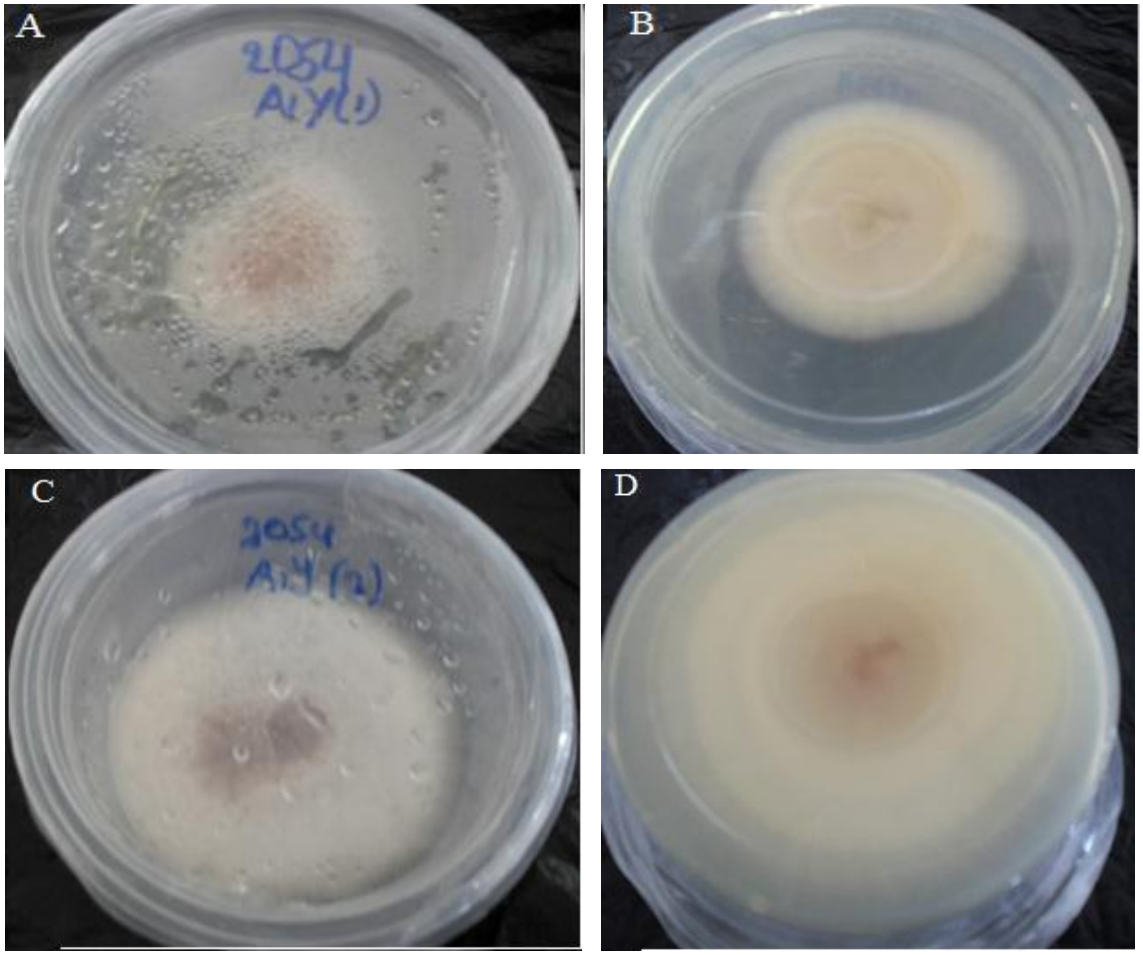
A. Vista superior del micelio a los 6 días. B. Vista inferior del micelio a los 6 días. C. Vista superior del micelio a los 21 días. a. Conglomerado. D. Vista inferior del micelio a los 21 días.
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Crecimiento de *Rhizoctonia* sp. 1 aislada de *Pleurothallis* sp. en el medio SDA (Tratamiento A)

Etapa juvenil: Micelio esponjoso con crecimiento ramificado, de color blanco con centro pardo en la parte superior y crema en la parte inferior; área de 26,4 cm^2 (Figura 26A, B).

Etapa madura: Micelio esponjoso con crecimiento ramificado, blanco con centro pardo en la parte superior y marrón en la parte inferior; área de 72,25 cm^2 (Figura 26C, D).

Figura 26 Crecimiento a los 6 y 21 días del aislado de *Pleurothallis* sp.



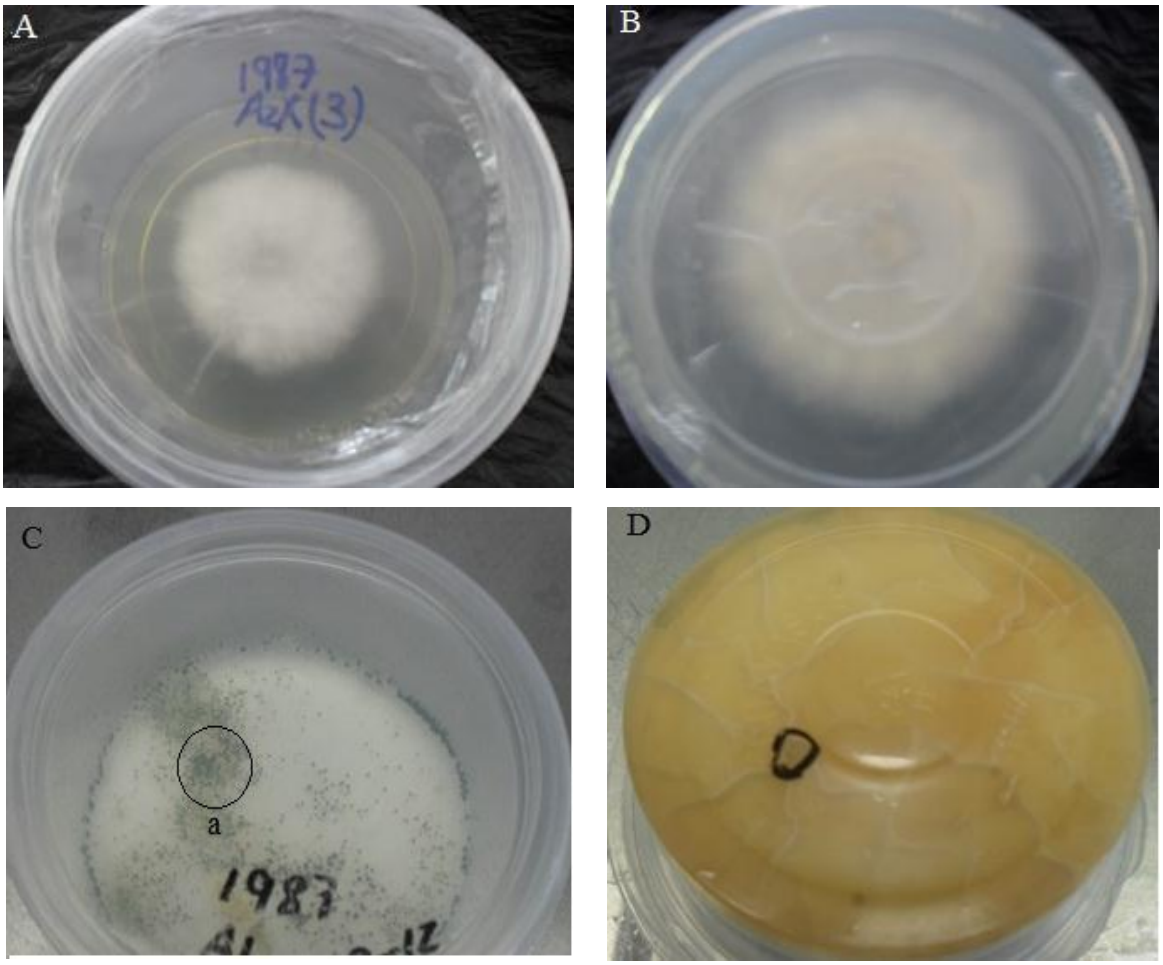
A. Vista superior del micelio a los 6 días. B. Vista inferior del micelio a los 6 días. C. Vista superior del micelio a los 21 días. D. Vista inferior del micelio a los 21 días.
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Crecimiento de *Rhizoctonia* sp. 3 aislada de *Oncidium klotzchianum* en el medio SDA (Tratamiento A)

Etapa juvenil: Micelio esponjoso con crecimiento ramificado de coloración blanca; área de 20,21 cm^2 (Figura 27A, B).

Etapa madura: Micelio esponjoso de coloración crema con crecimiento ramificado, presentando esclerocios de color verde; área de 72,25 cm^2a los 21 días de desarrollo (Figura 27C, D).

Figura 27 Crecimiento a los 6 y 21 días del aislado de *Oncidium klotzchianum*



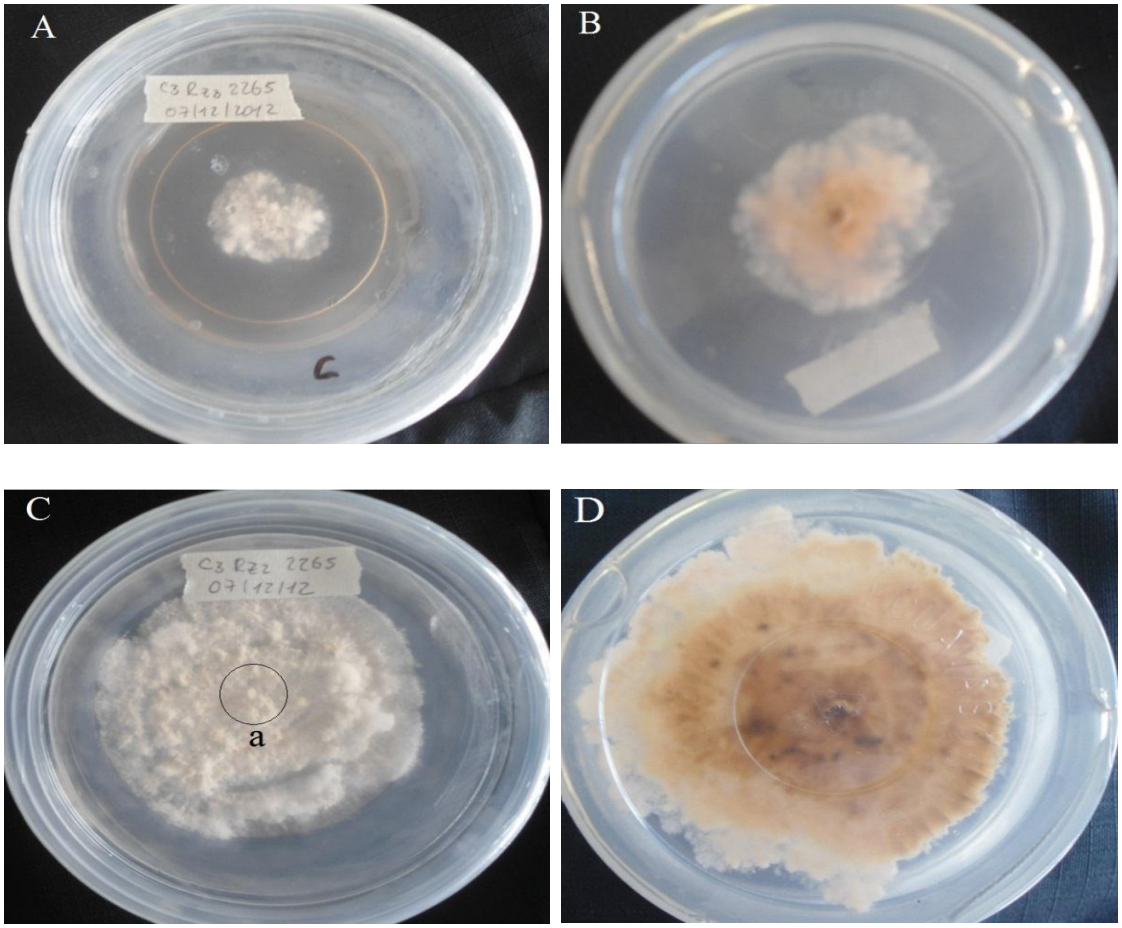
A. Vista superior del micelio a los 6 días. B. Vista inferior del micelio a los 6 días. C. Vista superior del micelio a los 21 días. a. Esclerocio. D. Vista inferior del micelio a los 21 días.
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Crecimiento del género anamorfo *Waitea* sp. aislado de *Epidendrum* sp. en el medio MS (Tratamiento C)

Etapa juvenil: Micelio algodonoso con crecimiento ramificado, de color blanco en la parte superior y crema en la parte inferior. Con una área de 11,1 cm^2 a los 6 días de desarrollo (Figura 28A, B).

Etapa madura: Micelio algodonoso con crecimiento ramificado, de coloración marrón en la parte inferior. Abundante masa miceliar, formando conglomerados sólidos que a los 12 días se desarrollan a manera de esclerocios regulares. Con un área de 65,45 cm^2 a los 21 días de desarrollo (Figura 28C, D).

Figura 28 Crecimiento a los 6 y 21 días del aislado de *Epidendrum* sp.



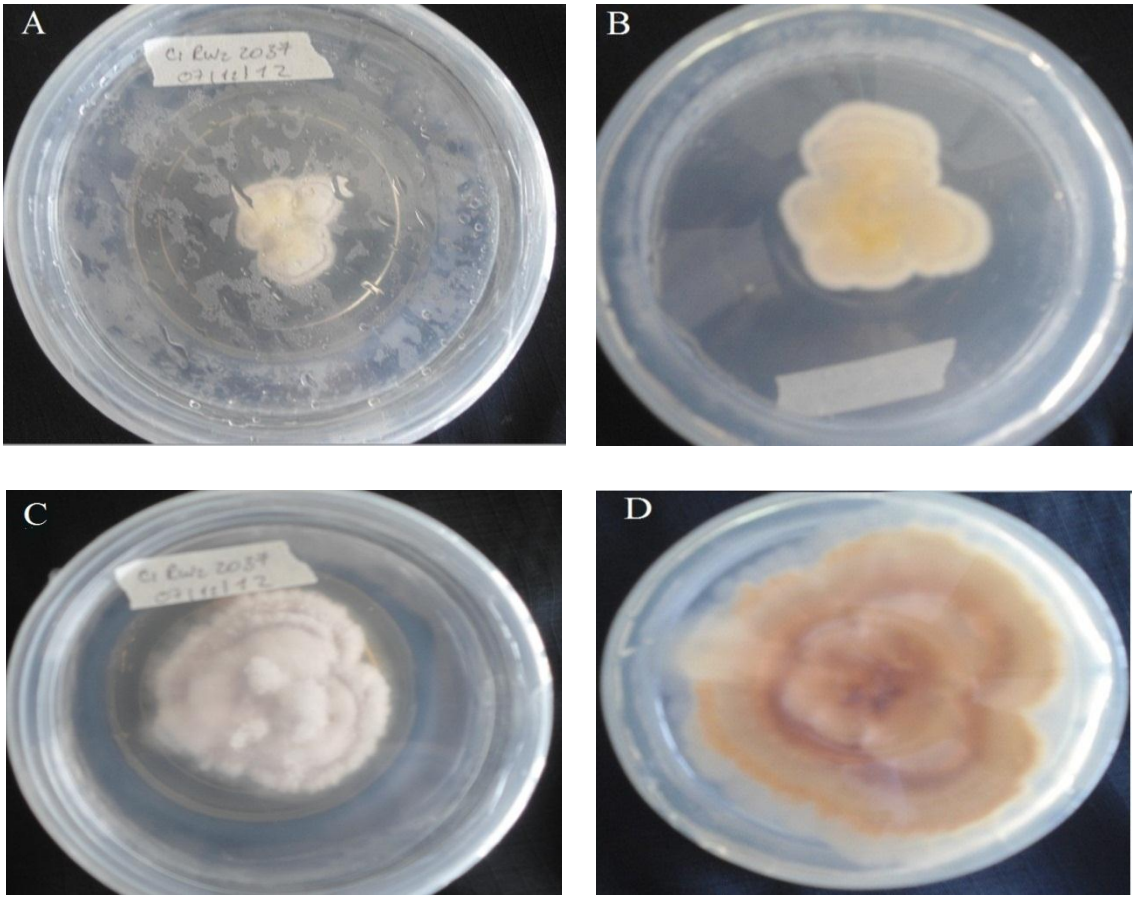
A. Vista superior del micelio a los 6 días. B. Vista inferior del micelio a los 6 días. C. Vista superior del micelio a los 21 días. a. Esclerocios. D. Vista inferior del micelio a los 21 días.
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Crecimiento del género anamorfo *Cerathoriza* sp. aislado de *Stelis* sp. 1 en medio MS (Tratamiento C)

Etapa juvenil: Micelio algodonoso con crecimiento radial de color blanco en la parte superior y crema en el inferior. Con una área de 10,2 cm^2 a los 6 días de evaluación (Figura 29A, B).

Etapa madura: Micelio algodonoso con crecimiento radial formando zonas concéntricas, de coloración marrón en la parte inferior. Presentó exuberante masa miceliar aérea que se desarrolló a manera de conglomerados sólidos uniformes o esclerocios, alcanzando un área de 61,32 cm^2 a los 21 días (Figura 29C, D).

Figura 29 Crecimiento a los 6 y 21 días del aislado de *Stelis* sp. 1



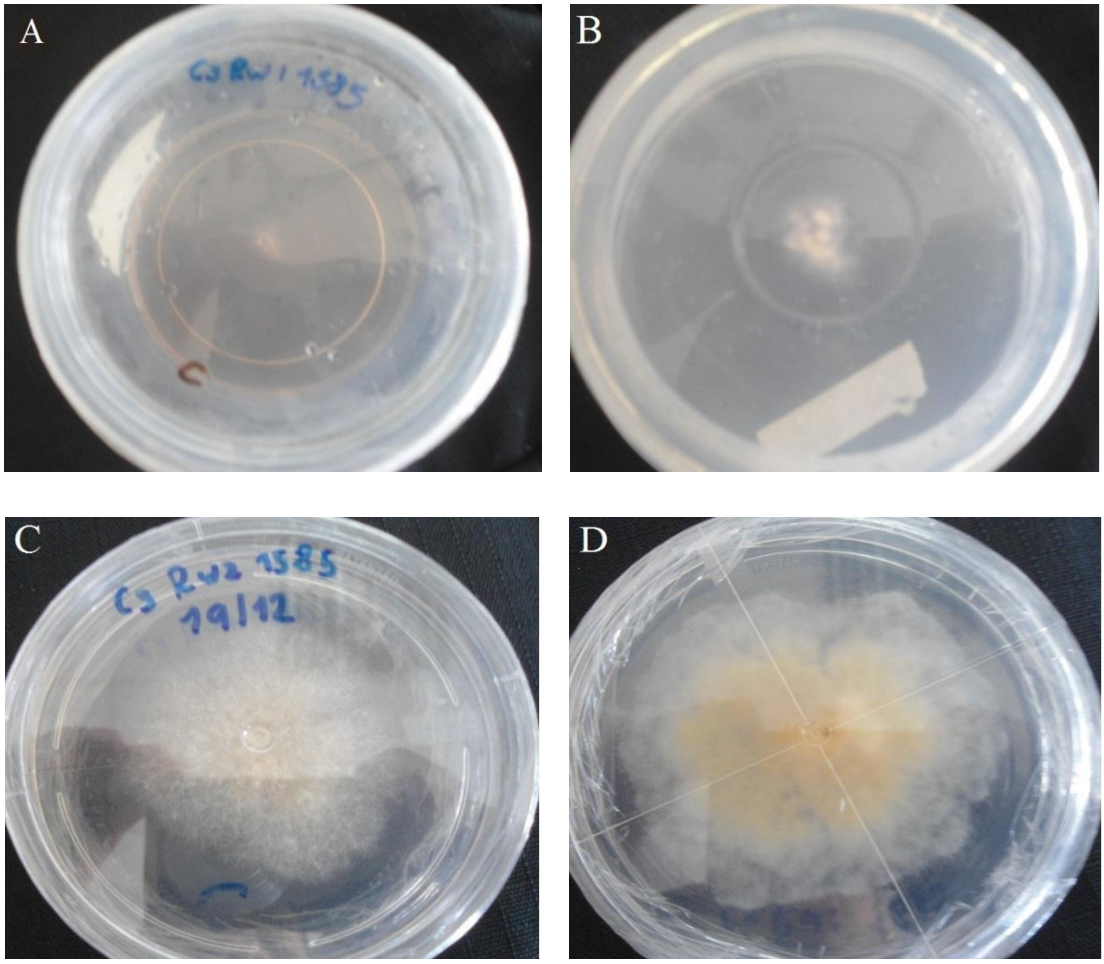
A. Vista superior del micelio a los 6 días. B. Vista inferior del micelio a los 6 días. C. Vista superior del micelio a los 21 días. D. Vista inferior del micelio a los 21 días.
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Crecimiento de *Rhizoctonia* sp. 4 aislado de *Prostechea aemula* en medio MS (Tratamiento C)

Etapa juvenil: Micelio blanco en la parte superior y crema en la parte inferior, de crecimiento ramificado y de textura algodonosa. Con una área de 2,21 cm^2 a los 6 días de evaluación (Figura 30A, B).

Etapa madura: Micelio de coloración crema de textura esponjosa y crecimiento ramificado con poca biomasa. A los 21 días presenta un área de crecimiento de 60,83 cm^2 con pequeños conglomerados sólidos (Figura 30C, D).

Figura 30 Crecimiento a los 6 y 21 días del aislado de *Prostechea aemula*



A. Vista superior del micelio a los 6 días. B. Vista inferior o del micelio a los 6 días. C. Vista superior del micelio a los 21 días. D. Vista inferior del micelio a los 21 días.
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

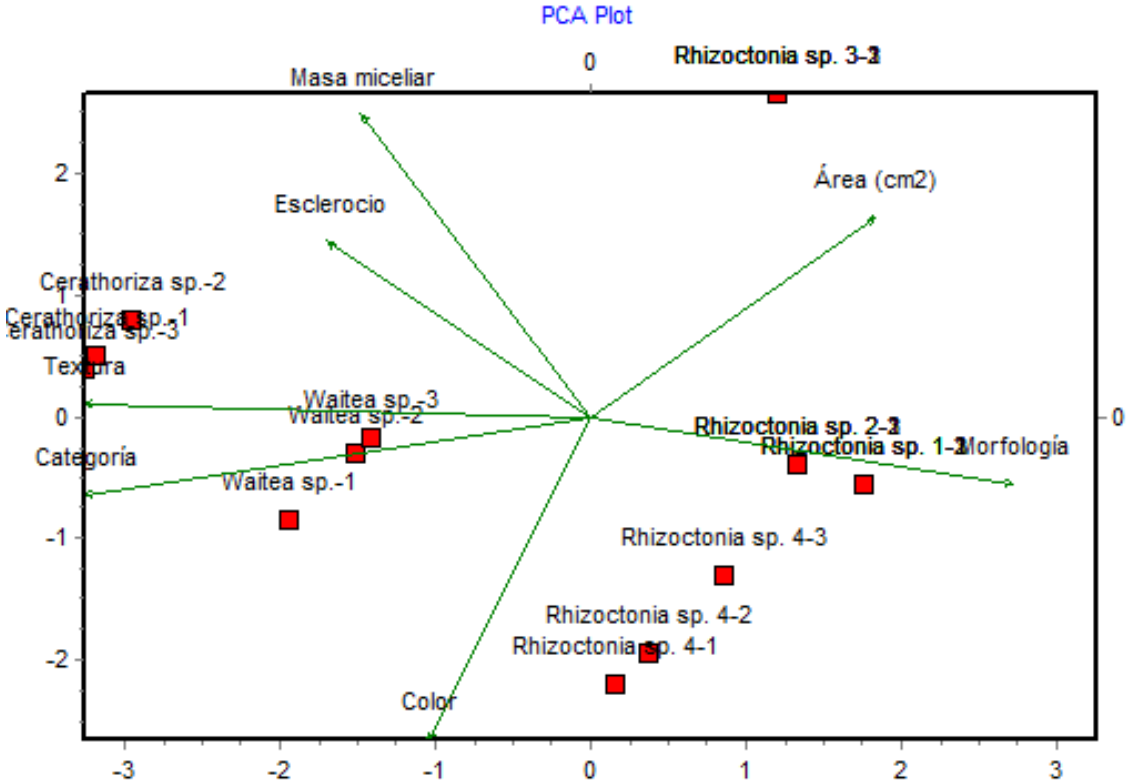
Se evaluaron las características macroscópicas de mayor relevancia de las 3 repeticiones de los 6 aislados viables de micorrizas al término de 21 días de la inoculación (Cuadro 9), con la finalidad de visualizar los cambios morfológicos obtenidos, para esto se realizó un Análisis de Componentes Principales (Yánez, P. com. pers.) basado en una matriz de correlación (Figura 31).

Cuadro 9 Registro de características macroscópicas de los subcultivos de 6 micorrizas viables en 3 repeticiones, a los 21 días de inoculación

Código orquídea	Identificación tentativa	Color	Textura	Área (cm^2)	Morfología	Masa miceliar	Esclerocio	Categoría
Episp-1	*Waitea* sp.	4	10	40,81	10	2	10	3
Episp-2	*Waitea* sp.	4	10	60,68	10	2	10	3
Episp-3	*Waitea* sp.	4	10	65,45	10	2	10	3
Stesp-1	*Cerathoriza* sp.	4	10	51,68	5	3	10	3
Stesp-2	*Cerathoriza* sp.	4	10	62,32	5	3	10	3
Stesp-3	*Cerathoriza* sp.	4	10	48,24	5	3	10	3
Proaem-1	*Rhizoctonia* sp. 4	4	5	28,6	10	1	5	2
Proaem-2	*Rhizoctonia* sp. 4	4	5	38,28	10	1	5	2
Proaem-3	*Rhizoctonia* sp. 4	4	5	60,83	10	1	5	2
Oncklo-1	*Rhizoctonia* sp. 3	3	5	72,25	10	3	10	1
Oncklo-2	*Rhizoctonia* sp. 3	3	5	72,25	10	3	10	1
Oncklo-3	*Rhizoctonia* sp. 3	3	5	72,25	10	3	10	1
Epinoc-1	*Rhizoctonia* sp. 2	4	5	72,25	10	1	10	1
Epinoc-2	*Rhizoctonia* sp. 2	4	5	72,25	10	1	10	1
Epinoc-3	*Rhizoctonia* sp. 2	4	5	72,25	10	1	10	1
Plesp-1	*Rhizoctonia* sp. 1	4	5	72,25	10	2	0	1
Plesp-2	*Rhizoctonia* sp. 1	4	5	72,25	10	2	0	1
Plesp-3	*Rhizoctonia* sp. 1	4	5	72,25	10	2	0	1

Coloración: 3 crema, 4 marrón. Textura: 5 esponjosa, 10 algodonosa. Morfología: 5 radial, 10 ramificada. Esclerocios: 0 ausencia, 5 conglomerados, 10 masa compacta. Categoría: 1 Presencia de características generales afines al género-forma *Rhizoctonia*, 2 Presencia de características específicas a *Rhizoctonia* y 3 Características afines a anamorfos de *Rhizoctonia*, *Waitea* y *Cerathoriza.*
Códigos: Epinoc *Epidendrum nocturnum*, Plesp *Pleurothallis* sp., Oncklo *Oncidium klotzchianum*, Stesp *Stelis* sp. 1, Episp *Epidendrum* sp., Proaem *Prostechea aemula.*
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Figura 31 Plano de ordenamiento de los géneros de *Rhizoctonia* sp., *Cerathoriza* sp. y *Waitea* sp., aisladas de 6 especies de orquídeas con 3 repeticiones a los 21 días del experimento en función de las características anatómicas.



Método: Análisis de componentes principales basado en una matriz de correlación a partir del Cuadro 9.
Porcentajes de absorción: F1=45,3%; F2=27,6%
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

El plano de ordenamiento muestra las características evaluadas en un lapso de maduración de 21 días; nótense como vectores las características anatómicas de las micorrizas, tales como: textura, masa miceliar y esclerocios, por ejemplo. Se puede observar que las características con mayor relevancia, presentaron los aislados de *Stelis* sp. 1 y *Epidendrum* sp. los cuales corresponden a *Cerathoriza* sp. y *Waitea* sp. respectivamente, se basan en un desarrollo con morfología radial (zona de menor valor de la variable morfología) que genera un crecimiento con mayor masa miceliar, de textura algodonosa, lo que facilita el desarrollo de esclerocios rápidamente, asegurando con esto una mayor viabilidad de las micorrizas en el tiempo y confiriéndoles a éstos la capacidad de generar una relación simbiótica con raíces de orquídeas; esto corrobora lo propuesto por Durán y otros (2007), que los esclerocios al entrar en contacto con el suelo o sustratos, teniendo las condiciones de humedad y

temperatura adecuada, se desarrollan de manera algodonosa, lo que les permite penetrar en las raíces formando masas circulares de hifas, produciendo de esta manera la relación simbiótica en forma de pelotones.

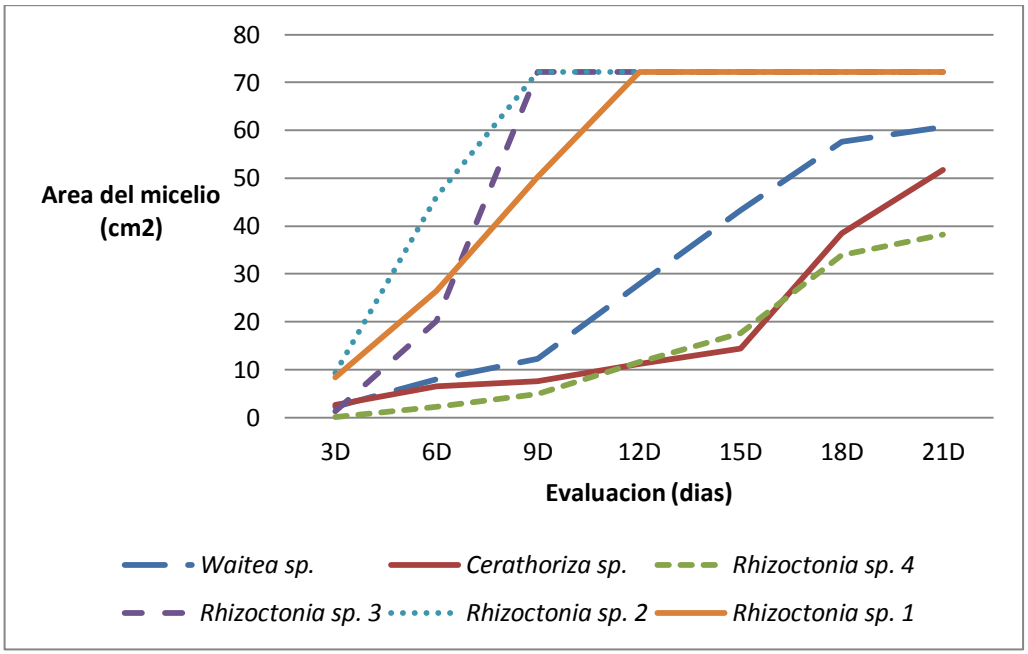
De la misma manera, Ordoñez (2012) menciona que los pelotones forman redes de hifas o micelios externos, los cuales tienen acceso a abundantes fuentes de carbono en el suelo para ser asimilados y transportados a la orquídea; estos hongos tienen la capacidad de obtener fotosintatos a partir de asociaciones existentes con otras plantas cercanas, y dotar de nutrientes a las orquídeas. Por tales aseveraciones, *Waitea* sp. y *Cerathoriza* sp. mostraron mayor afinidad a los vectores de interés, textura, masa miceliar y esclerocios, por lo cual se recomiendan como los más adecuados para el uso en germinación simbiótica y posterior generación de biomasa para una posible comercialización.

Mientras que los aislados de las especies *Epidendrum nocturnum***,** *Prostechea aemula, Oncidium klotzchianum* y *Pleurothallis* sp. correspondientes a *Rhizoctonia* sp. 2, sp. 4, sp. 3 y sp. 1 respectivamente, presentaron un mayor crecimiento longitudinal debido a su morfología ramificada con menor producción de masa miceliar, generando un lento desarrollo de estructuras de resistencia (zona de mayor valor de morfología) que afectaría en el establecimiento de una simbiosis.

4.2.4.1 Curva de crecimiento

Se procedió a realizar curvas de crecimiento de las 6 micorrizas viables a partir de los datos registrados cada 3 días, por el transcurso de 21 días (Figura 32), utilizando las medianas de crecimiento.

Figura 32 Curva de crecimiento de 6 hongos viables del género-forma *Rhizoctonia* aislados de especies de orquídeas



Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

La curva de crecimiento (Figura 32) se realizó a partir de los medios en las que las micorrizas fueron aisladas, cabe destacar que para esto se determinó el crecimiento en 2 medios: SDA (Tratamiento A) fue para *Rhizoctonia* sp. 3, *Rhizoctonia* sp. 2 y *Rhizoctonia* sp. 1 aislados de *Oncidium klotzchianum*, *Epidendrum nocturnum* y *Pleurothallis* sp. respectivamente, mientras que el medio MS (Tratamiento C) fue para *Waitea* sp., *Cerathoriza* sp. y *Rhizoctonia* sp. 4, aisladas de *Epidendrum* sp., *Stelis* sp. 1 y *Prostechea aemula* respectivamente, lo que determinó una clara diferencia en las curvas de crecimiento establecidas, ya que en el medio SDA (A), las micorrizas aislados presentaron un mayor crecimiento miceliar longitudinal (Figuras 25-27) llegando a su punto máximo de crecimiento en el contenedor con un área de 72,25 cm^2 en períodos desde 9 días para *Rhizoctonia* sp. 3, y *Rhizoctonia* sp. 2 y a los 12 días para *Rhizoctonia* sp. 1. En comparación con los aislados en el medio MS (Tratamiento C), que presentaron un menor crecimiento miceliar de manera longitudinal con un área de 60,68 cm^2 para *Waitea* sp., 51,68 cm^2 para *Cerathoriza* sp. y 38,28 cm^2 para *Rhizoctonia* sp. 4 (Figuras 28-30) a los 21 días, confiriéndoles desarrollo de micelio aéreo y facilitando la formación de estructuras de resistencia; por lo cual el medio SDA sirvió para observar un rápido crecimiento horizontal a los

9 y 12 días de las micorrizas, mientras el medio MS sirvió para la formación de micelio y estructuras de resistencia.

Otro punto a considerar es el período de incubación inicial al que fueron sometidos que fue de 26ºC. por 3 días según la metodología descrita por Zhu y otros, (2008); esto podría ser un factor estimulante para *Rhizoctonia* sp. 3, *Rhizoctonia* sp. 2 y *Rhizoctonia* sp. 1, que presentaron un crecimiento acelerado, ya que a los 3 días se observó mayor área miceliar, en comparación con *Rhizoctonia* sp. 1, *Cerathoriza* sp. y *Waitea* sp. en el medio MS con un área de crecimiento de 0,12 cm^2, 2,28 cm^2 y 2,66 cm^2, respectivamente. Según Becton y otros, (2010) estos últimos posiblemente requieran una incubación más prolongada y una temperatura inferior para obtener un crecimiento óptimo. Esto se puede contrastar, ya que *Rhizoctonia* sp. 2 y *Rhizoctonia* sp. 1 tuvieron una fase de crecimiento rápida a los 3 días posterior al período de incubación, mientras que el resto de morfotipos tuvo que pasar por una fase de adaptación desde su inoculación hasta su crecimiento en períodos de 6 días para *Rhizoctonia* sp. 3, 9 días para *Waitea* sp. y, *Rhizoctonia* sp. 4 y 15 días para *Cerathoriza* sp. y así poder iniciar su crecimiento rápido. Por lo tanto, la elección del medio nutritivo radica en el objetivo, es decir, si se desea un acelerado crecimiento longitudinal se debe usar SDA (Tratamiento A), mientras que si se desea generación de gran cantidad de masa miceliar se debe sembrar en MS (Tratamiento C).

4.3 Selección de la metodología óptima de conservación para micorrizas, mediante pruebas de viabilidad.

Las metodologías de conservación en aceite, discos y refrigeración fueron sometidas a pruebas de viabilidad a los 60 días, para la selección de la metodología óptima mediante análisis de viabilidad, pureza y estabilidad morfológica de las muestras previamente conservadas (Cuadro 10).

Cuadro 10 Porcentaje de viabilidad, pureza y estabilidad morfológica de las metodologías de conservación analizadas en 6 micorrizas orquideales

Metodología de conservación	Micorriza aislada a partir de:	Género-forma *Rhizoctonia*	Viabilidad (%)	Pureza (%)	Estabilidad morfológica (%)
Refrigeración	*Epidendrum* sp.	*Waitea sp.*	100%	100%	100%
	Stelis sp. 1	*Cerathoriza* sp.	100%	100%	100%
	Prostechea aemula	*Rhizoctonia* sp. 4	100%	100%	100%
	Epidendrum nocturnum	*Rhizoctonia* sp. 2	100%	100%	100%
	Oncidium klotzchianum	*Rhizoctonia* sp. 3	100%	100%	100%
	Pleurothallis sp.	*Rhizoctonia* sp. 1	100%	100%	100%
Aceite	*Epidendrum* sp.	*Waitea sp.*	100%	100%	100%
	Stelis sp. 1	*Cerathoriza* sp.	100%	100%	100%
	Prostechea aemula	*Rhizoctonia* sp. 4	100%	100%	100%
	Epidendrum nocturnum	*Rhizoctonia* sp. 2	100%	100%	100%
	Oncidium klotzchianum	*Rhizoctonia* sp. 3	100%	100%	100%
	Pleurothallis sp.	*Rhizoctonia* sp. 1	100%	100%	100%
Discos	*Epidendrum* sp.	*Waitea sp.*	100%	100%	100%
	Stelis sp. 1	*Cerathoriza* sp.	100%	100%	100%
	Prostechea aemula	*Rhizoctonia* sp. 4	100%	100%	100%
	Epidendrum nocturnum	*Rhizoctonia* sp. 2	0%	0%	0%
	Oncidium klotzchianum	*Rhizoctonia* sp. 3	50%	50%	50%
	Pleurothallis sp.	*Rhizoctonia* sp. 1	0%	0%	0%

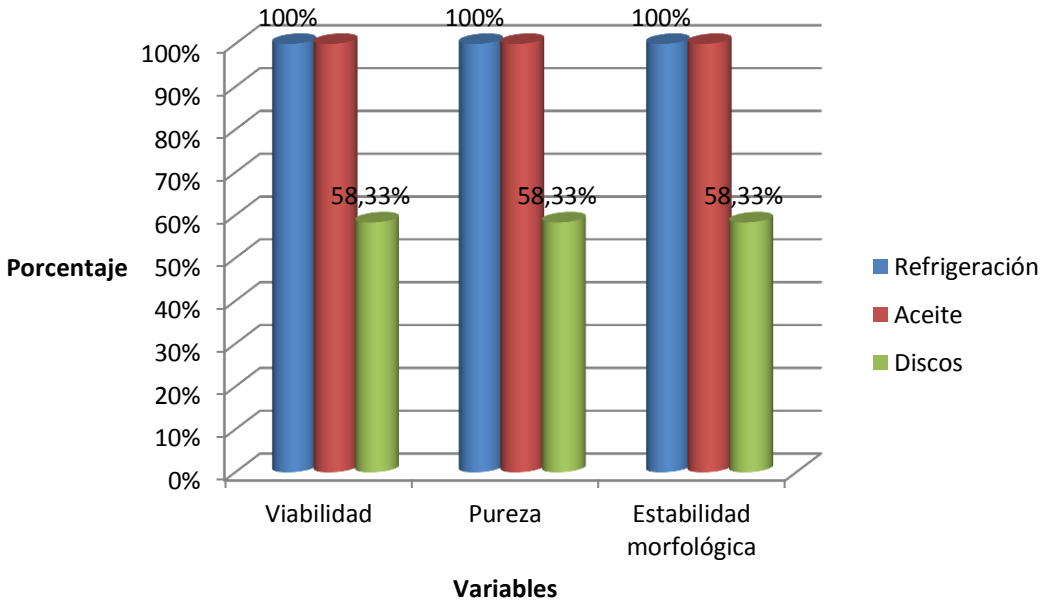
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Se pudo determinar que la conservación en refrigeración y aceite proporcionó a todos los aislados viabilidad, pureza y estabilidad morfológica del 100% a los 60 días; debido a la presencia y desarrollo de micelio morfológicamente idéntico al original con pureza o ausencia de contaminación (Cuadro 10).

La conservación en discos proporcionó viabilidad, pureza y estabilidad morfológica del 100% únicamente en *Waitea sp.*, *Cerathoriza* sp. y *Rhizoctonia* sp. 4; mientras

que *Rhizoctonia* sp. 3 presentó un 50%, y finalmente *Rhizoctonia* sp. 1 y *Rhizoctonia* sp. 2 perdieron su viabilidad en la conservación por esta metodología, por lo cual no se registró estabilidad morfológica y pureza, al no observar microorganismo alguno. Los resultados se expresan en porcentajes (Figura 33) del total de las repeticiones en función de las variables.

Figura 33 Porcentaje de viabilidad, pureza y estabilidad morfológica en metodologías de refrigeración, aceite y discos a los 60 días



Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Al analizar las variables tanto en conservación en aceite como en refrigeración para los 6 aislados se presentó total viabilidad, pureza y estabilidad morfológica a los 60 días, mientras que la metodología de discos obtuvo un porcentaje de 58,33% en las 3 variables registradas. Cabe recalcar que *Rhizoctonia* sp. 2 y *Rhizoctonia* sp. 1 no presentaron ningún crecimiento en esta metodología, mientras que *Rhizoctonia* sp. 3 únicamente se desarrolló en 2 de 4 repeticiones. La conservación en discos no generó viabilidad en *Rhizoctonia* sp. 2 y *Rhizoctonia* sp. 1 debido a la baja cantidad de inóculo en los discos dado por su diámetro de 5mm. en comparación a la cantidad de inóculo que se puede almacenar en las otras metodologías (Ángel, 2006), rasgos que se pueden comparar con la textura de las micorrizas que no generaron viabilidad en discos, que siendo esponjosos presentan una baja cantidad de micelio, lo que a la vez

dificulta su viabilidad al ser pertenecientes al género-forma *Rhizoctonia* y no presentar estructuras reproductivas (esporas). Cabe recalcar que *Rhizoctonia* sp. 2 y *Rhizoctonia* sp. 1 perdieron su viabilidad en la conservación en discos debido a la ausencia de estructuras de resistencia (esclerocios) en el corto período de crecimiento al que fueron sometidos (7días), ya que estas especies necesitan mayor tiempo de crecimiento para desarrollar dichas estructuras, en comparación al resto de aislados. Al igual que Ángel (2006), se recomienda realizar estudios de viabilidad en discos almacenando con ellos estructuras de resistencia.

Otro punto a considerar en la efectividad de las metodologías de refrigeración, aceite y discos, es la permanencia del micelio en su medio de crecimiento; en las metodologías de aceite y refrigeración, el micelio permaneció sobre el medio, únicamente disminuyendo su metabolismo por la baja cantidad de oxígeno y temperatura (5ºC.) a los que fueron sometidos. En lo que respecta a la conservación en discos, el metabolismo fue afectado abruptamente al retirar los discos con micelio del medio de crecimiento y almacenarlos a baja temperatura, lo que se reflejó directamente en la pérdida de un 41,67 % de la viabilidad de los 6 morfotipos por la metodología de conservación en discos.

Los resultados obtenidos en este estudio determinaron que los métodos de conservación para hongos miceliares, presentan una alta efectividad en metodologías de refrigeración y aceite a corto plazo, al igual que Ángel (2006), se recomienda estas metodologías a formas no esporuladas o estrictamente miceliares, utilizadas en pequeñas colecciones, en donde la criopreservación y la liofilización no resultan económicas.

En lo correspondiente a la metodología de liofilización, es un método de conservación muy costoso y con altos requerimientos tecnológicos, que paraliza el crecimiento celular por el proceso de sublimación del medio del cultivo, manteniendo su viabilidad, garantizando así una máxima estabilidad genética a largo plazo. Se recomienda que las pruebas de viabilidad sean realizadas, en un período no menor a 3 años (Burguet y otros, 2012), razón por la cual, el método de liofilización no se sometió a pruebas de viabilidad, encontrándose los aislados almacenados en refrigeración, formando una colección de cepas, disponibles en CIVABI.

4.4 Selección de una o varias micorrizas para la elaboración de un biofertilizante

4.4.1 Pruebas de degradación de compuestos

Las pruebas de degradación de compuestos se realizaron con la finalidad de determinar una medida de la actividad enzimática que presentaron los aislados, por tal motivo se realizaron pruebas enzimáticas de degradación de celulosa, almidón y grenetina, estableciendo como resultado la intensidad cualitativa de degradación de compuestos en escalas de valores que van desde 0 hasta 3, siendo 0 sin degradación, 1= 25% de degradación, 2= 50% degradación y 3= más del 80% de degradación (Cuadro 11).

Cuadro 11 Valor promedio de degradación de compuestos en 6 micorrizas aisladas de orquídeas nativas

Código de orquídea	Género-forma *Rhizoctonia*	Celulosa	Grenetina	Almidón	Promedio
Epidendrum sp.	*Waitea* sp.	3	3	2	2,67
Stelis sp. 1	*Cerathoriza* sp.	2	3	3	2,67
Oncidium klotzchianum	*Rhizoctonia* sp. 3	3	2	2	2,33
Prostechea aemula	*Rhizoctonia* sp. 4	1	2	1	1,33
Epidendrum nocturnum	*Rhizoctonia* sp. 2	0	2	0	0,67
Pleurothallis sp.	*Rhizoctonia* sp. 1	1	0	0	0,33
Promedio		1,67	2	1,33	

0 sin degradación, 1= 25% de degradación, 2= 50% degradación y 3= más del 80% de degradación.
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

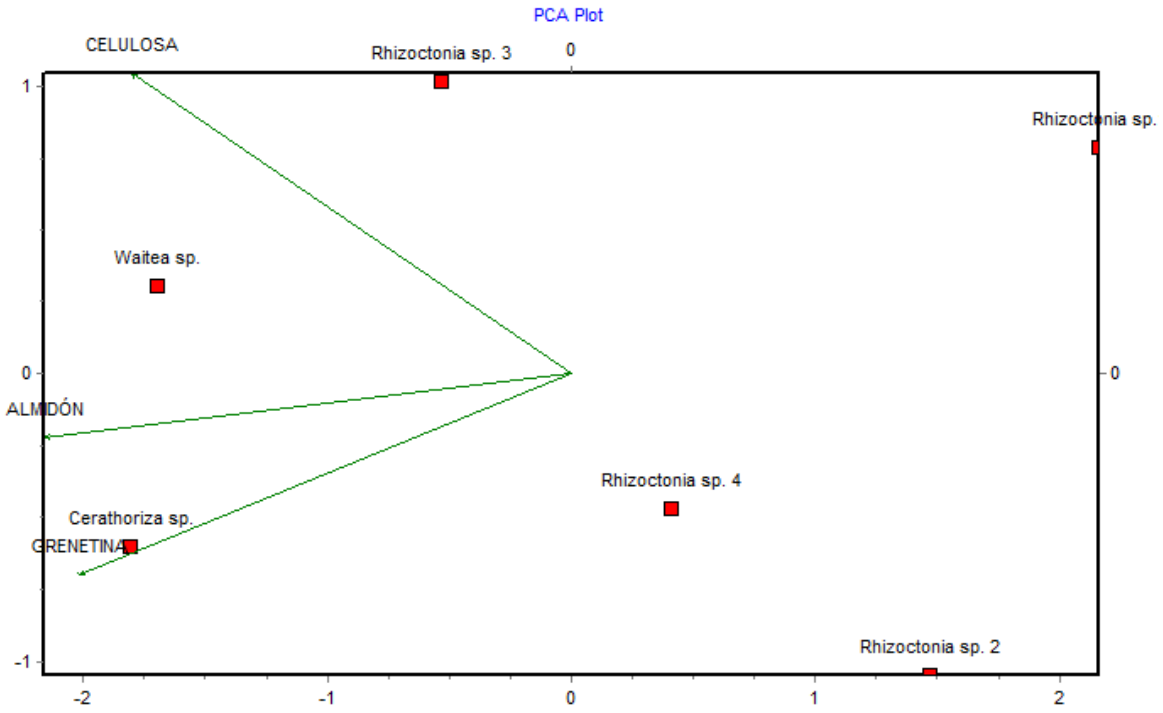
En lo referente a pruebas de degradación, *Waitea* sp. presentó alta degradación de celulosa y grenetina (3), con una mediana capacidad de degradar de almidón (2) presentando un promedio de degradación de 2,67 (Figura 35); *Cerathoriza* sp. presentó alta degradación de grenetina y almidón (3) con mediana capacidad de degradar celulosa (2) presentando un promedio de degradación de 2,67 (Figura 36); *Rhizoctonia* sp. 3 presentó una alta degradación de celulosa (3) y mediana capacidad de degradar almidón y grenetina (2) presentando un promedio de degradación de

2,33; *Rhizoctonia* sp. 4 presentó una mediana capacidad de degradar grenetina (2) y una baja degradación de almidón y celulosa (1) presentando un promedio de degradación de 1,33; *Rhizoctonia* sp. 2 presentó una mediana capacidad de degradar grenetina (2) sin capacidad de degradar celulosa y almidón (0) presentando un promedio de degradación de 0,67, y finalmente *Rhizoctonia* sp. 1 presentó una baja capacidad de degradar celulosa (1) sin capacidad de degradación de almidón y grenetina (0) presentando un promedio de degradación de 0,33.

Se determinó que la mayoría de los aislados tienden a degradar con mayor capacidad, grenetina, ya que 5 micorrizas (*Rhizoctonia* sp. 3, *Rhizoctonia* sp. 2, *Waitea* sp., *Cerathoriza* sp. y *Rhizoctonia* sp. 4) presentaron una media y alta capacidad de degradar este compuesto, posiblemente debido a una gran actividad enzimática de las proteasas con un promedio de 2. En lo correspondiente a la degradación de celulosa, las micorrizas presentaron una actividad media de degradación con un promedio de 1,67 producida por enzimas celulasas y una baja actividad de las enzimas amilolíticas (degradadoras de almidón) con un promedio de 1,33 en 4 aislados.

La importancia de establecer la actividad enzimática en base a celulasas, amilasas y proteasas de los hongos radica en la capacidad de éstos para desdoblar compuestos en metabolitos más simples disponibles para la orquídea, siendo transportados mediante la interacción con los pelotones intracelulares y facilitando la absorción de dichos nutrientes, funcionando como un suministro continuo de carbohidratos y nitratos útiles (Ordóñez y otros, 2012 y Rivas y otros, 1998) principalmente en las primeras etapas del desarrollo vegetal y a la vez en su fase adulta, al obtener nutrientes en solución y compuestos orgánicos cuando la planta digiere las hifas (Rivas y otros, 1998); dentro de este contexto, se aplicó un Análisis de Componentes Principales (Figura 34) basado en una matriz de correlación a partir de datos de degradación (Cuadro 11) para determinar la selección y el uso de las micorrizas en el proceso de elaboración de un biofertilizante.

Figura 34 Plano de ordenamiento de 6 micorrizas afines a los géneros *Rhizoctonia* sp., *Waitea* sp. y *Cerathoriza* sp. de acuerdo a la capacidad de degradar compuestos (celulosa, almidón, grenetina)



Método: Análisis de componentes principales basado en una matriz de correlación. Datos crudos: Cuadro 11.
Porcentaje de absorción: F1= 77,6%; F2=18,3%.
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

La figura 34 indica que *Waitea* sp. y *Cerathoriza* sp. presentaron una mayor capacidad de degradación de almidón, grenetina y celulosa en el medio de cultivo al mostrar gran afinidad a los vectores de interés, por lo tanto existe una mayor actividad de enzimas proteolíticas, celulíticas y amilolíticas en ellas (Figura 35 y 36) que favorece en el desdoblamiento de estos compuestos en metabolitos más simples, asimilables para las orquídeas.

En lo que respecta a la micorriza *Rhizoctonia* sp. 3 presentó alta actividad celulolítica y una mediana capacidad degradativa de almidón y grenetina (Cuadro 11) localizándose en la zona intermedia de los vectores (Figura 34), mientras que *Rhizoctonia* sp. 4, *Rhizoctonia* sp. 2 y *Rhizoctonia* sp. 1 se ubicaron en la zona de menor valor de las variables (Figura 34) al presentar una baja o nula capacidad de degradación de celulosa, almidón y grenetina (Cuadro 11) con lo que se determinó que no son aptas para la elaboración de un biofertilizante.

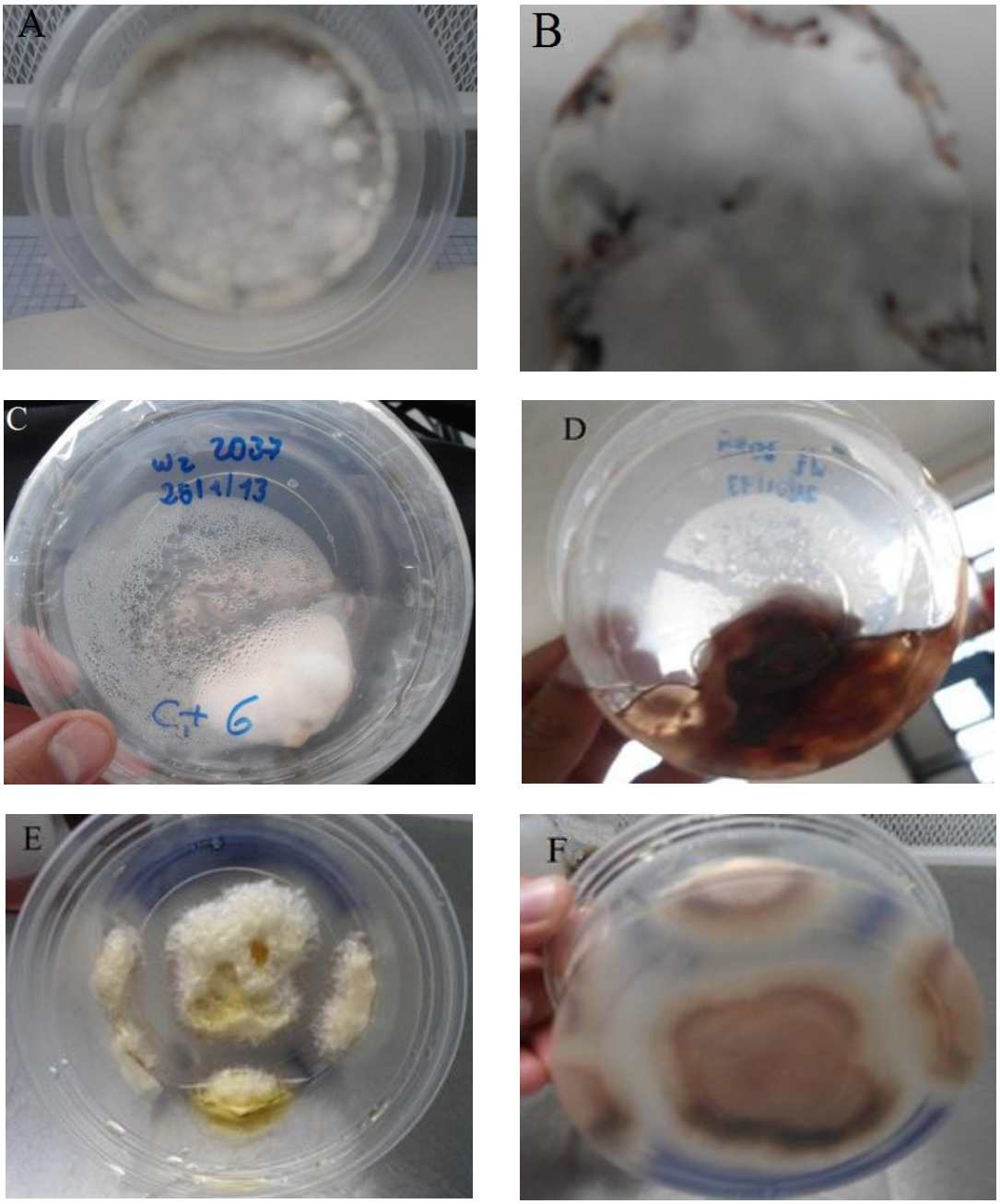
Se puede determinar que *Waitea* sp. (Figura 35) y *Cerathoriza* sp. (Figura 36) presentaron un promedio de 2,67 en las pruebas fisiológicas, en lo que se detalla para *Waitea* sp. presentó una alta actividad de enzimas celulolíticas y proteolíticas, con mediana actividad en cuanto a enzimas amilolíticas, mientras que *Cerathoriza* sp. presentó alta capacidad de degradación en lo que concierne a actividad por enzimas proteolíticas y amilolíticas, así como medianamente positiva en cuanto a la capacidad celulolítica.

La similitud en la capacidad proteolítica puede estar dada como un prerrequisito de la simbiosis para la explotación selectiva de fuentes de carbono y nitrógeno orgánico, de acuerdo a la especie con la que se encuentra asociada (Carranza, 2006), mientras que en lo referente a la degradación de celulosa, *Waitea* sp. presentó una alta degradación de celulosa (3) producida por la actividad de enzimas celulasas, que le confiere la capacidad de descomponer restos vegetales como fuente de nutrimentos (Sánchez, 1987), útiles en la nutrición de las orquídeas.

Figura 35 Imágenes de las pruebas fisiológicas de degradación de compuestos efectuadas por la micorriza *Waitea* sp. aislada de *Epidendrum* sp.

A. Micelio en medio que contiene celulosa. B. Degradación de celulosa positiva (baja consistencia del papel filtro, pérdida de la estructura). C y D. Reacción positiva a degradación de grenetina (licuefacción del medio). E. Halo púrpura observable en el micelio (positivo para degradación de almidón).
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Figura 36 Imágenes de las pruebas fisiológicas de degradación de compuestos efectuadas por la micorriza *Cerathoriza* sp. aislada de *Stelis* sp. 1



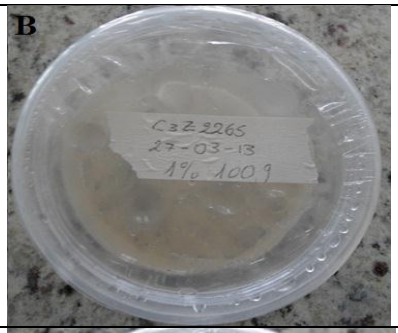
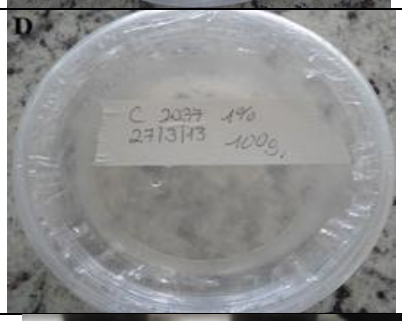
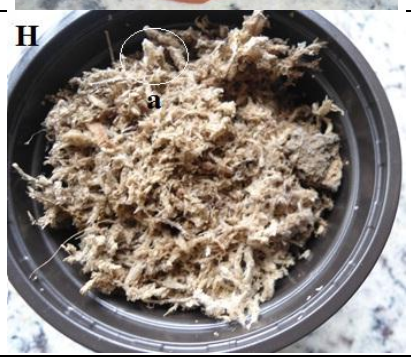
A. Micelio en medio que contiene celulosa. B. Degradación de celulosa positiva (baja consistencia del papel filtro y pérdida del diámetro). C y D. Reacción positiva a degradación de grenetina (licuefacción del medio). E. Medio desteñido del color púrpura, positivo para degradación de almidón y coloración del micelio.
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

4.4.2 Elaboración de biofertilizante

Se observaron cambios en cuanto a pureza o desarrollo del micelio micorrízico únicamente en función de la coloración del hongo utilizado y capacidad de

supervivencia del hongo en el sustrato o crecimiento del micelio en el biofertilizante observado en el lapso de 30 días (Cuadro 12).

Figura 37 Evaluación de los biofertilizantes elaborados

Biofertilizante	Género anamorfo	Evaluación a los 5 días de elaboración	Evaluación a los 30 días de elaboración
Líquido	*Waitea* sp.		
	Cerathoriza sp.		
Sólido	*Waitea* sp.		
	Cerathoriza sp.		

A. Elaboración biofertilizante líquido *Waitea* sp. B. Biofertilizante líquido *Waitea* sp. a los 30 días de evaluación. C. Elaboración biofertilizante líquido *Cerathoriza* sp. D. Biofertilizante líquido *Cerathoriza* sp. a los 30 días de evaluación. E. Elaboración biofertilizante sólido *Waitea* sp. F. Biofertilizante sólido *Waitea* sp. a los 30 días de evaluación. a. Presencia de micelio en el sustrato. G. Elaboración biofertilizante sólido *Cerathoriza* sp. H. Biofertilizante sólido *Cerathoriza* sp. a los 30 días de evaluación. a. Presencia de micelio en el sustrato.
Elaborado por Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez.

Se elaboraron 2 tipos de biofertilizantes con los géneros anamorfos *Waitea* y *Ceratorhiza* aislados de *Epidendrum* sp. y *Stelis* sp. 1 respectivamente, seleccionados por su mayor capacidad de degradación de compuestos. El biofertilizante líquido (Figura 37: A-D) se elaboró por la facilidad en cuanto a manejo, aplicación en plántulas de orquídeas *ex vitro* y almacenamiento a bajas temperaturas (5ºC.), para su conservación, ya que en el lapso de 30 días éste presentó entera homogeneidad y pureza, sin aumento visible de la biomasa miceliar para los 2 géneros anamorfos. Mientras, que el biofertilizante sólido (Figura 37: E-H) permitió observar el crecimiento y supervivencia del micelio en el sustrato (*Sphagnum*), características que fueron visualizadas al igual que Strasburger (2004) y Molina (2012) en la supervivencia del micelio en un lapso de 21 días. Los géneros anamorfos *Waitea* y *Ceratorhiza* desarrollaron externamente hifas de micelio de pocos centímetros de coloración blanca y textura algodonosa en el transcurso de 15 días para *Ceratorhiza* sp. y 20 días para *Waitea* sp. con características propias a los micelios originales, ratificando con esto la supervivencia de los hongos en concentración de micelio al 1% utilizado en la elaboración de los biofertilizantes.

Cabe mencionar la importancia del aumento de humedad relativa dada por los riegos realizados cada 5 días con 50ml. de agua destilada estéril, al favorecer el crecimiento externo de micelio en el sustrato, corroborando al igual que Allen (1991) quien establece que las hifas se extienden para alcanzar, a mayor distancia, fuentes de alimentos y sobretodo de agua, lo que se traduce en una mayor eficiencia del micelio para localizar y absorber nutrientes, implicando un efecto altamente beneficioso contra el estrés hídrico y el desarrollo en orquídeas.

CONCLUSIONES

- ✓ De las muestras radiculares de 40 especies de orquídeas colectadas, 15 presentaron hongos asociados a la biota fúngica, de las cuales en 8 especies se aislaron hongos simbiontes de interés, siendo únicamente identificadas las 6 especies de orquídeas con aislados viables. Éstas 6 con un hábito de crecimiento epifito, de las cuales 4 presentaron crecimiento monopodial y 2 desarrollo simpodial, donde 3 pertenecen a la región Sierra, 2 a la región Oriente y 1 a la región Costa. Las especies de orquídeas hospederas fueron: *Prostechea aemula, Epidendrum nocturnum* y *Oncidium klotzchianum*, y las restantes se las identificó como: *Epidendrum* sp., *Stelis* sp. y *Pleurothallis* sp.

- ✓ Se aisló un total de 16 hongos propios de la biota fúngica de las orquídeas, siendo 8 simbiontes del género-forma *Rhizoctonia* con un porcentaje del 50%; 6 patógenos identificados, 4 como *Fusarium* con un porcentaje de 25% y 2 *Penicillium* con un porcentaje del 12,5%. Además, 2 biocontroladores clasificados dentro del género *Trichoderma* con un porcentaje del 12,5%.

- ✓ Los 8 aislados pertenecientes al género-forma *Rhizoctonia,* con sus géneros anamorfos *Cerathoriza, Rhizoctonia* y *Waitea,* se caracterizaron macroscópicamente por presentar en su etapa juvenil coloración blanca que se torna crema, parda o marrón en su etapa adulta, con crecimiento radial o ramificado, de textura algodonosa o esponjosa y presencia de esclerocios regulares; microscópicamente por presentar hifas alargadas y septadas, formando ramificaciones en ángulos de 45º y 90º, en algunas ocasiones anastomosadas y con ausencia de esporas. Cabe recalcar que las micorrizas aisladas de *Epidendrum* sp. y *Stelis* sp. 1, fueron identificadas como afines a los géneros anamorfos *Waitea y Ceratorhiza* respectivamente, mientras que las restantes se las identificó dentro del género anamorfo *Rhizoctonia.* Además, los aislados de las especies *Stelis* sp. 2 y Morfoespecie 1, perdieron su viabilidad en el proceso de subcultivo debido a la baja capacidad de desarrollar estructuras de resistencia, con lo cual únicamente se analizaron las 6 micorrizas viables.

- ✓ El medio de cultivo evaluado para micorrizas que presentó el mayor porcentaje de adaptación fue SDA con 62,5% obtenido de 5 micorrizas aisladas, en comparación con el medio MS con un 37,5% de adaptación en 3 micorrizas. Con respecto a viabilidad los 2 medios presentaron 37,5% de hongos viables; siendo SDA útil en etapa de aislamiento y MS ideal para el mantenimiento de viabilidad de las micorrizas en el tiempo, en contraste con el medio Czapek, que no adecuado para el aislamiento de hongos simbiontes.

- ✓ Los micorrizas *Rhizoctonia* sp. 3, *Rhizoctonia* sp. 2 llegaron a su punto máximo de crecimiento (72,25 cm^2) en el contenedor a los 9 días y *Rhizoctonia* sp. 1 a los 12 días, mientras que *Waitea* sp., *Cerathoriza* sp. y *Rhizoctonia* sp. 4 no superaron los 61 cm^2 a los 21 días, debido al tratamiento en el que fueron desarrollados, por ello, se concluyó que el medio de cultivo influye directamente en el desarrollo de las características macroscópicas, ya que el medio SDA, brinda un desarrollo rápido con mayor crecimiento longitudinal y menor textura, mientras que el medio MS, favorece un desarrollo lento con crecimiento de micelio aéreo y mayor textura, permitiendo el desarrollo de estructuras de resistencia en menor tiempo.

- ✓ Las metodologías óptimas para conservación, en función de la evaluación de las variables planteadas, al transcurrir 60 días fueron refrigeración y conservación en aceite, al presentar una viabilidad, pureza y estabilidad morfológica del 100% en las 6 micorrizas, a diferencia del 58,33% de viabilidad, pureza y estabilidad morfológica obtenido por la metodología de conservación en discos.

- ✓ Las micorrizas de los géneros anamorfos *Waitea* aislada de *Epidendrum* sp. y *Cerathoriza* aislada de *Stelis* sp. 1 presentaron mayor capacidad de degradación de compuestos con un promedio de 2,67 dentro de una escala de 0 a 3, obteniendo para *Waitea* 3,3,2 y para *Cerathoriza* 2,3,3 en degradación de celulosa, almidón y grenetina respectivamente.

- ✓ Se realizaron 2 tipos de biofertilizantes: uno sólido en *Sphagnum* y otro líquido en NaCl (0,9% USP), en donde las micorrizas *Waitea* sp. y *Cerathoriza* sp., permanecieron viables en el transcurso de 30 días, al observarse el crecimiento de masa miceliar algodonosa de coloración blanca, específica a la micorriza inoculada.

RECOMENDACIONES

- ✓ En lo que se refiere a la identificación de las orquídeas hasta especie, se recomienda mantenerlas hasta su etapa de floración. Es a la vez importante enfocarse en un género de orquídeas, estableciendo de igual manera la variedad de microorganismos existentes en un mismo género en una o varias regiones.

- ✓ Con respecto al aislamiento de hongos, se recomienda medir patrones de colonización en las especies mediante la identificación de zonas con mayor porcentaje de infección y el uso de pelotones para el aislamiento de micorrizas, teniendo en cuenta que un pelotón puede contener uno o varios hongos.

- ✓ En lo concerniente al sistema de caracterización de los hongos para incluirlos dentro del género-forma *Rhizoctonia* constituye un problema debido a la ausencia de estructuras sexuales en medios artificiales, por lo que se recomienda realizar estudios moleculares para ubicarlos dentro de las especies que correspondan.

- ✓ En lo referente a medios de cultivo, se recomienda SDA y MS para el aislamiento de micorrizas a través de raíces de orquídeas siendo útiles en la evaluación de su desarrollo, crecimiento y conservación de los aislados pertenecientes al género-forma *Rhizoctonia*.

- ✓ Se recomienda el medio MS para obtener un mayor desarrollo de biomasa y una formación de estructuras de resistencia (esclerocios), características útiles para comercialización y desarrollo de biopreparados; cabe recalcar que MS es el medio nutritivo universalmente utilizado en la micropropagación de orquídeas proporcionándole una vital importancia al realizar ensayos de germinación simbiótica *in vitro* y determinar la relación simbiótica entre los morfotipos en cuanto al género de orquídeas aisladas.

- ✓ Se recomienda conservar micorrizas u hongos miceliares de formas no esporuladas utilizando metodologías de refrigeración y aceite para el mantenimiento de colecciones de cepas, siendo metodologías que presentan mayor porcentaje de pureza, viabilidad y estabilidad morfológica con un bajo costo y fácil manipulación, estableciendo períodos de evaluación que garanticen la viabilidad del hongo en el tiempo.

- ✓ Se recomienda usar las micorrizas *Waitea* sp. y *Cerathoriza* sp. en la elaboración de biopreparados útiles en germinación simbiótica de orquídeas y adaptación de las mismas en sustratos *ex vitro*, evaluando el desarrollo que genera la simbiosis en las orquídeas, para establecer su mecanismo de acción y aplicarlo a gran escala.

- ✓ Se recomienda utilizar los biofertilizantes propuestos en la presente investigación, en germinación simbiótica de orquídeas y adaptación a sustrato *ex vitro*, por su facilidad de manejo, conservación y elaboración al demostrar la supervivencia del hongo y el posible desarrollo de simbiosis.

LISTA DE REFERENCIAS

Acuña, A. (20 de Noviembre de 2010). *El género Prosthechea: Un viejo nombre resucita.* Recuperado el 3 de Mayo de 2013, de www.ticorquideas.com

ADESPER (Agrupación para el desarrollo sostenible y la promoción del empleo rural). (2007). *Conservación hongos*. Recuperado el 28 de Febrero de 2013, de http://www.adesper.com

Aguilar, J., & González, D. (2011). Las micorrizas, nuestras aliadas ocultas. *La fertilidad de la tierra*(17), 9-13.

Aguirre, J., Irizar, M., Durán , A., Grajeda , O., Peña , M., Loredo, C., & Gutiérrez, A. (2009). *Instituto Nacional de investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias (INIFAP)*. Recuperado el 2 de Marzo de 2013, de Los Biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México, Chiapas: http://www.redsicta.org/

Alarcón, A., & Ferrera, R. (2000). Biofertilizantes: importancia y utilización en la agricultura. *Agricultura Técnica en México, 26*(2), 191-203.

Allen, M. (1991). *The Ecology of Mycorrhizae.* Nueva York: Cambridge University Press.

Ángel, D. (22 de Agosto de 2006). Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos levaduriformes en el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana. *Tésis en Microbiólogía industrial*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.

Asociación Costaricense de Orquideología. (Octubre de 2010). *Ticorquídeas.* Recuperado el 2 de Agosto 2013, de www.ticorquideas.com

Athipunyakom, P., Manoch, L., & Piluek, C. (2004). Isolation and identification of mycorrhizal fungi from eleven terrestrial orchids. *Kasetsart Journal Natural Science*, 216-228.

Ávila, I. (2012). *Programa de la materia optativa: Biología de la conservación de Orchidaceae I*. Recuperado el 5 de Mayo de 2013, de bios.biologia.umich.mx

Barnett, H., & Hunter, B. (2003). *Ilustrated Genera of Imperfect Fungi.* Minessota: Prentice-Hall.

Becton, Dickinson and Company. (2010). *BD Sabouraud GC Agar / CHROMagar Candida Medium (Biplate)*. Recuperado el 5 de Junio de 2013, de http://www.bd.com/

Beltrán, M. (2010). Aislamiento y caracterización de hongos micorrícicos asociados a orquídeas terrestres del género Bletia (Orchidaceae) en la reserva Natural Barranca del Cupatitzio, del Mpio. de Uruapán, Michoacán. *Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas*. México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Bernal, G., & Morales, R. (2006). Micorrizas: Importancia, producción e investigación en el Ecuador. *Centro de publicaciones Massgráficos*.

Caballero, J. (2010). *Uso de biofertilizantes en la agricultura nacional*. Recuperado el 15 de Marzo de 2013, de http://www.invdes.com.mx

Campo, F., Sanz, S., & Hernández, L. (2006). *Módulo de cultivo in vitro de explantos de tabaco*. Recuperado el 20 de Diciembre de 2012, de Universidad Autonoma de Madrid: http://www.uam.es

Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. Recuperado el 4 de Diciembre de 2012, de http://cipotato.org

Cárdenas , N., & Cruz, A. (2012). Colección de germoplasma de especies de la Familia Orchidaceae del cantón Santiago de Méndez-Morona Santiago. *Tesis en Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales*. Quito: Universidad Politécnica Salesiana.

Carranza, Z. (2006). Selección e identificación de especies de hongos ectomicorrizógenos del Estado de Hidalgo más competentes en medios de cultivo sólidos. *Tesis de Ingeniería Agroindustrial*. México: Universidad Autonóma del Estado de Hidalgo.

Carrasco, V. (2010). Aspectos Ecofisiológicos de la raíz de Pinus pseudostrobus y P. patula Y y Especies ectomicorrícicas comestibles de Hebeloma spp. y Laccaria spp. *Tesis de Maestría en Ciencias*. Texcoco, México: Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas.

Carrillo, L. (2003). *Los hongos de los alimentos y forrajes.* Salta: Universidad Nacional de Salta.

Carrillo, L. (2003). *Microbiología Agrícola: Apéndice/ Guía de trabajos prácticos*. Recuperado el 24 de Marzo de 2013, de www.unsa.edu.ar

Castillo, C. (2004). Efectividad de actinomicetos aislados de la rizósfera de papa sobre Rhizoctonia solani Kühn in vitro. *Revista Mexicana de Fitopatología, 22*(2), 2002-2007.

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 Biología*. Loja, Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja.

Chávez, J., & Sevilla, R. (2003). *Fundamentos genéticos y socioeconómicos para analizar la agrobiodiversidad en la región de Uyacali.* Cali: Biodiversity International.

CIAT (Centro internacional de Agricultura Tropical). (1980). *Técnicas para el aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos del fríjol (Phaseolus vulgaris L.); guía de estudio para ser usada como complemento de la unidad audiotutorial sobre el mismo tema*. Recuperado el 24 de Febrero de 2013, de http://books.google.com.ec/

Cruz, J. (2007). Colonización micorrícica y diversidad de hongos micorrízicos de algunas especies de orquídeas epífitas tropicales en el Sureste de Chiapas, México. *Tesis de Maestría en Ciencias*. Montecillo, México: Institución de enseñanza e investigación en Ciencias Agrícolas.

Cubas, P. (2007). *Hongos*. Recuperado el 17 de Diciembre de 2012, de http://www.aulados.net

Cullina, W. (2004). *Understanding orchids: An Uncomplicated Guide To Growing The World's Most Exotic Plants.* New York: Houghton Mifflin Company.

Dávila, L., Ramos, C., & Rosales, C. (2009). Multiplicación de hongos micorrízicos arbusculares MA nativos de cultivo de cacao (Theobroma cacao) en maíz (Zea mays) bajo distintos tratamientos agronómicos. *Tesis de Licenciatura en Ciencias naturales y educación ambiental*. Valledupar: Universidad Popular del César.

Davoli, M. (s.f.). *Elicriso*. Recuperado el 4 de Mayo de 2013, de http://www.elicriso.it

Dodson, C., & Escobar, R. (2003). *Native Ecuadorian Orchid, Volumen 1.* Medellín: Colina.

Durán, C., Rivero, M., & Seemann, P. (2007). Identificación de endomicorrizas en la orquídea nativa Gavilea araucana (Phil)Correa. *Agro Sur, 35*(2), 68.

En-Ecuador.com. (s.f.). *Provincias del Ecuador*. Recuperado el 15 de Febrero de 2013, de http://www.en-ecuador.com

Fernández, K. (2010). Micorrización in vitro e in vivo de plántulas de papa (Solanum tuberosum var. Alfa). *Cultivos tropicales, 31*(2), 21.

Folgueras, M., & Herrera, L. (2006). Relación de hongos patógenos y asociados a la pudrición seca de la malanga del género Xanthosoma. *Centro agrícola, 33*(1), 21-25.

Franco, J. (2008). *Efectos beneficiosos de las micorrizas sobre las plantas*. Recuperado el 28 de Noviembre de 2012, de http://www.bioscripts.net

Gilchrist, L., Fuentes, C., Martínez, R., López, R., Singh, M., & García, A. (2005). *Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada*. México: CIMMYT.

Gómez, J. (1950). *Clave determinativa de las especies del género Penicillium*. Recuperado el 10 de Junio de 2013, de http://digitum.um.es/

González, M. (2008). Aspectos de sitemática y biología del género Rhizoctonia. *Fitosanidad, 12*(3), 148.

Google Earth. (2013). Programa Informático. *Sistema de Información Geográfica*.

Guzman, S., & Farías, J. (2005). Biología y regulación molecular de la micorriza arbuscular. *Red de revistas científicas de América Latina y el Caribe, 9*(2), 17-31.

Hernández, F. (2008). *Proyecto Promep UNPA-01-08*. Recuperado el 10 de Junio de 2013, de http://www.unpa.edu.mx

Jijón, C., & Navarrete, H. (2009). *Ecuador País de Orquídeas, Provincia de Pichincha T Santo Domingo de los Tsáchilas.* Quito: José Lara.

Luisa, E., Toledo, P., & Ravelo, P. (2010). *Los biofertilizantes a base de Hongos. Una alternativa para un modelo agrícola conservacionista en el Valle de San Andrés*. Recuperado el 12 de Marzo de 2013, de http://www.ecoportal.net

Marín, J. (2010). *Tema 3: Análisis de componentes principales.* Recuperado el 4 de Junio de 2013, de http://halweb.uc3m.es

Mateos, P. (2004). *Mantenimiento y conservación de microorganismos industriales*. Recuperado el 3 de Marzo de 2013, de http://darwin.usal.es

Mckendrick, S. (2000). *Manual para la germinación in vitro de orquídeas*. Recuperado el 29 de Marzo de 2013, de http://www.ceiba.org

Medina, J. (2010). *Patronato para la Investigación, Fomento y Sanidad Vegetal*. Recuperado el 2 de Febrero de 2013, de Micorriza Inifap (Instituo Nacional de Investigaciones forestales agrícolas y pecuarias): http://www.pifsv.org.mx

Molina, F. (2012). Aislamiento, caracterización y efecto de la inoculación de endomicorrizas orquideales sobre dos especies híbridas en el noroccidente de Pichincha (Mindo y Pacto). *Tesis de Ingeniería Agropecuaria*. Sangolquí: ESPE-IASA.

Montealegre, J., Valderrama, L., Sánchez, S., Herrera, R., Besoain, X., & Pérez, L. (2007). *Utilización de mutantes de Trichoderma harzianum (Rifai) para el control de Rhizoctonia solani (Khun) en tomate (Lycopersicon esculentum Mill.)*. Recuperado el 19 de Abril de 2013, de http://www.tesis.uchile.cl

Monzón, A., & Rodríguez, L. (2001). *Infecciones causadas por el género Fusarium*. Recuperado el 8 de Mayo de 2013, de http://www.siemc.org

Morales, M. (2009). Los biofertilizantes. Una alternativa productiva, económica y sustentable. *Procuraduría Agraria*, 103.

Morales, V., & Rodríguez, M. (2006). Hongos endófitos en plantaciones de mango ”Haden” de la planicie de Maracaibo, Venezuela. *Facultad Agronómica LUZ, 23*(3), 273-283.

Mosquera, A., Bayman, P., & Otero, J. (2010). Ceratobasidium como hongo micorrrícico de orquídeas en Colombia. *Red de revistas científicas de América Latina y el Caribe, 59*(3), 317.

Munguía, P., Gómez, S., & Olalde, V. (2008). *Aislamiento de hongos micorrícicos de raíz de orquídeas originarias del Soconusco, Chiapas*. Recuperado el 24 de Febrero de 2013, de Universidad Autónoma de Querétaro: http://www.uaq.mx/

Noval, B., Oria , A., Casadesus, L., & Gómez, M. (1999). Aislamiento, caracterización e inoculación con endomicorrizas orquideales en especies de orquídeas. *Chupiango, Serie Horticultura, 5*(2), 142-152.

Ordóñez, N., Diez, M., & Otero , J. (2012). La vainilla y los hongos formadores de micorrizas. *Orquideología, 29*(1), 62-63.

Otero, J., & Bayman, P. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epifitas. *Redalyc, 58*(4), 270-276.

Otero, J., Ackerman, J., & Bayman, P. (2002). Diversity and host specificity of endophytic rhizoctonia-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany, 89*(11), 1852- 1858.

Paredes, E. (2012). Determinación de los protocolos para cultivo in-vitro de las especies Epidendrum schistochilum y Oncidium cultratum. *Tesis de Ingeniería en Biotecnología*. Quito, Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana.

Pereira, O., Megumi, M., Lima, C., & Montandon, C. (2005). Aislamiento e identificación de hongos micorrícicos Rhizoctonia asociados con tres especies de orquídeas epífitas neotropicales en Brasil. *Revista Brasileña de la Ciencia del Suelo, 29*(2), 1-6.

Pérez, J. (2005). *Sapos, mariposas y orquídeas en la línea equinoccial.* Quito: Trama.

Pineda, M., Pineda , D., Labarca, L., Ulacio, D., & Casassa, A. (2011). *Aislamiento e Identificación de Trichoderma harzianum en el bosque seco tropical, sur de lago de Maracaibo*. Recuperado el 10 de Junio de 2013, de http://www.revfacagronluz.org.ve

Placencia, M. (2010). *Efecto de dos fitohormonas en la fase de introducción de la orquídea Epidendrum sp. bajo condiciones in vitro.* Ibarra: Tesis Universidad Técnica del Norte, Facultad de Ingenierías en Ciencias Agropecuarias.

Radio Turismo Ecuador. (18 de Enero de 2013). Recuperado el 10 de Febrero de 2013, de Ecuador, destino para la observación de orquídeas: http://radioturismoecuador.com

Ramírez, C. (2012). *Los biofertilizantes en la agricultura*. Recuperado el 2 de Junio de 2013, de http://www.cosustenta.com

Rivas, M., Warner, J., & Bermúdez, M. (1998). Presencia de micorrizas en orquídeas de un jardín botánico neotropical. *Revista de Biología Tropical, 46*(2), 211-216.

Robles, J. (2004). *Comprobación del efecto del aumento de la dósis génica (genes pcbc y pende) en Penicillium chrysogenum sobre la producción de penicilina g en fermentación líquida y sólida*. Recuperado el 8 de Diciembre de 2012, de http://148.206.53.231

Rollke, F. (2010). *Orquídeas.* Barcelona: Hispano Europea.

Roura, A. (Febrero de 2010). Aplicación de la técnica de encapsulación-deshidratación en la crioconservación de protocormos de Oncidium stenotis. *Tesis de Ingeniería en Biotecnología*. Sangolquí, Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército.

Salas, E. (2004). *Las Micorrizas y su importancia para el manejo y conservación de los arboles del trópico*. Recuperado el 2 de Diciembre de 2012, de http://www.una.ac.cr

Sánchez, C. (1987). Descomposición fúngica de la celulosa en un pastizal de la Pampa deprimida. *Ciencia del suelo, 5*(2), 135-139.

Serrano, P. (2007). Germinación de semilla de orquídea (Cattleya maxima) mediante propagación in vitro. *Tesis Ingeniería Agronómica*. Machala, Ecuador: Universidad Técnica de Machala.

Setas. (17 de Febrero de 2013). *Cepas hongos en papel filtro*. Recuperado el 26 de Febrero de 2013, de http://setas.org

Solano, R. (1999). Flora de Veracruz. *Instituto de Ecologia, Fascículo 113*, 1-2.

Sosa, T., Sánchez, J., Morales , E., & Cruz, F. (2006). Interacción micorrizas arbusculares- Trichoderma harzianum (Moniliaceae) y efectos sobre el crecimiento de Brachiaria decumbens (Poaceae). *Acta Biológica Colombiana, 11*(1).

Strasburger, E. (2004). *Tratado de Botánica* (35 ed.). Barcelona: Omega.

Suárez, J., Weib, M., Abele, A., Garnica, S., Oberwinkler, F., & Kottke, I. (2006). Diverse tullasneloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycol Res, 110*, 1257-1270.

Suquilanda, V. (1995). *Agricultura orgánica, alternativa tecnológica del futuro.* Quito: Fundagro.

Tangarife, V. (2011). *Penicillium sp.* Recuperado el 10 de Junio de 2013, de http://aprendeenlinea.udea.edu.co

Travieso, R. (14 de Diciembre de 2012). Producción del Hongo Ectomicorrícico Suillus luteus (Linnaeusex Fries) Gray en Reactor Agitado. *Tesis de Ingeniería civil en biotecnología*. Concepción, Chile: Universidad San Sebastián.

Universidad de Hamburgo. (1999). *Familia Orchidaceae*. Recuperado el 8 de Diciembre de 2012, de http://www.biologie.uni-hamburg.de

Universidad de Oviedo. (2012). Recuperado el 8 de Noviembre de 2012, de Prácticas de biotecnología vegetal: http://ocv.uniovi.es

Vacacela, V. (2012). Tipos de micorrizas. *Tesis de Maestría en Agroecología y Agricultura Sostenible*. Chile: Universidad de Pinar del Río “Hermanos Saíz Montes de Oca".

Vallejo, A. (10 de Febrero de 2009). Orquídeas. *Diario el Hoy*, pág. 1.

Velasco, P. (2007). Manejo comunitario y propuesta de conservación de orquídeas en Peribuela, cantón Cotacachi, provincia de Imbabura. *Tesis de Ingeniería en Recursos Naturales Renovables*. Ibarra, Ecuador: Universidad Técnica del Norte.

Villegas, M., & Cifuentes, J. (2004). Las micorrizas en la evolución de las plantas. *Revista de la cultura científica de la UNAM, 73*, 30-36.

Warcup, J., & Talbot, P. (1980). Perfect estates of Rhizoctonias associated with orchids. *New Phytologist, 66*, 631-641.

Zhu, G., Yu, Z., Gui, Y., & Liu, Z. (2008). A novel technique for isolating orchid mycorrhizal fungi, Fungal Diversity. *Fungal Diversity, 33*, 123-137.

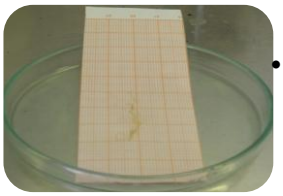
ANEXOS

Anexo 1 Proceso de desinfección de muestras radiculares

- Preparación cámara de flujo

- Lavado y desinfección de raíces

- Desinfección con solución de megacilina



- Cortes segmentos de raíz 25mm.

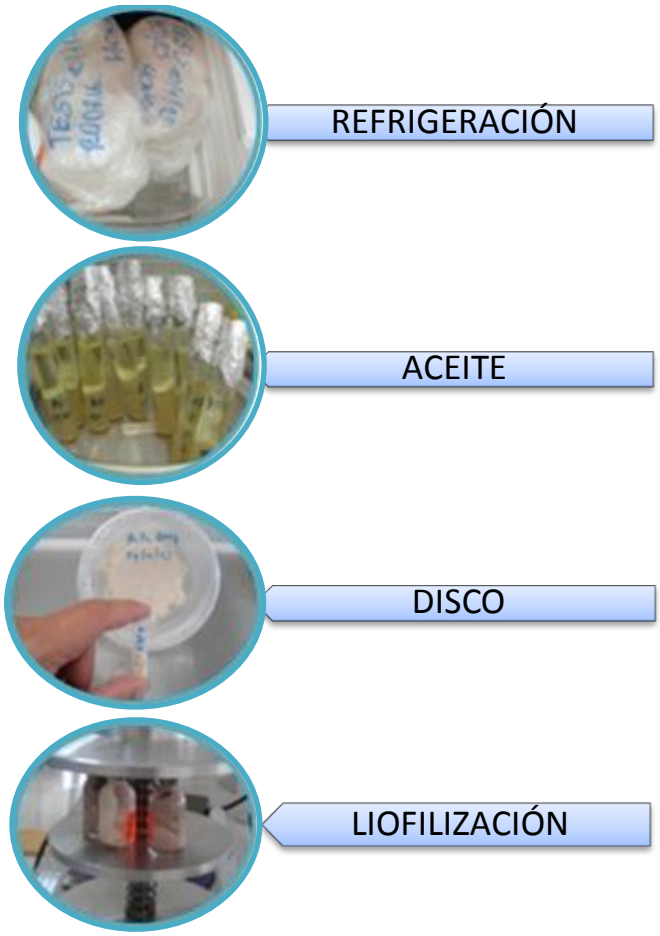
Anexo 2 Registro de adaptación de micorrizas en 3 medios nutritivos

Tratamiento	Repetición	Código de especie	Presencia
A			
B			
C			

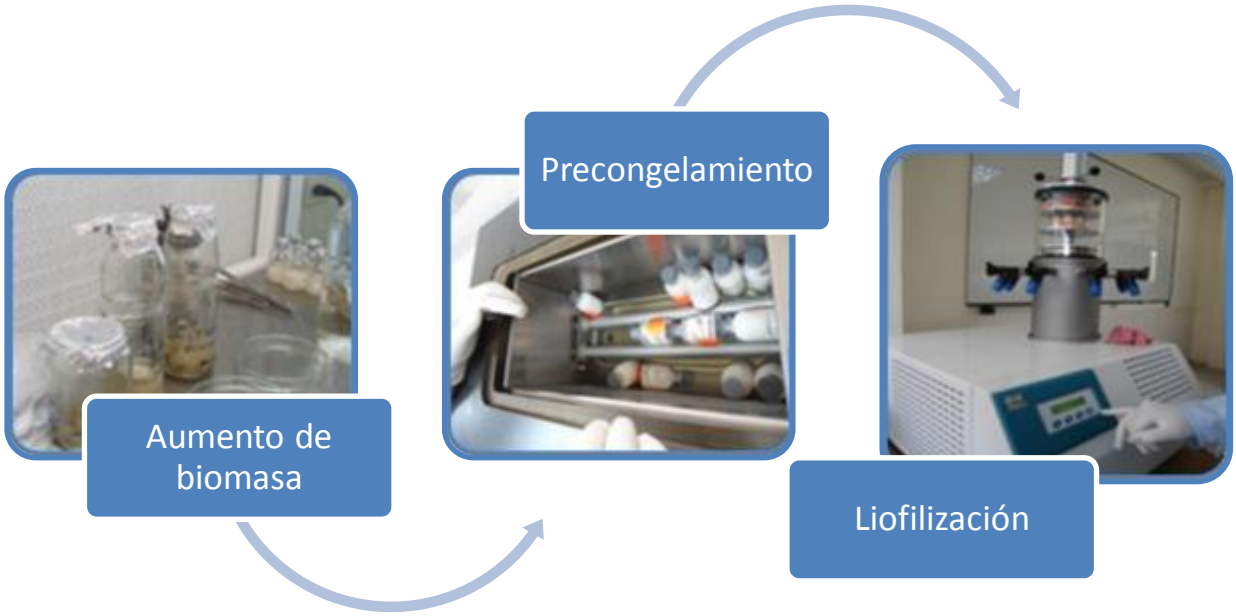
Anexo 3 Registro de evaluación de crecimiento de micorrizas

Código	Tiempo Aparición	Coloración micelio	Textura	Tamaño (cm^2)	Morfología	Masa Miceliar	Esclerocios

Anexo 4 Conservación de micorrizas



Anexo 5 Proceso de liofilización



Anexo 6 Proceso de elaboración de biofertilizantes

Aumento de biomasa

Extracción de biomasa

Biomasa lavada para período de secado

ELABORACIÓN

Biofertilizante solido

Biofertilizante liquido

Anexo 7 Autorización de investigación científica

Ministerio del Ambiente

AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTIFICA

N° 007-IC-FLO-DNB-2012

FLORA x FAUNA

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere La Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre autoriza a Luis Ricardo Hoyos Carrera, Documento de Identidad No. 1721922613 y Andrea Daniela Rodríguez Cabrera, Documento de Identidad No.1721894481 de nacionalidad ecuatoriana, para que lleve a cabo la investigación **"AISLAMIENTO DE HONGOS MICORRICICOS PRESENTES EN SEIS ESPECIES DE ORQUIDEAS NATIVAS DEL ECUADOR PARA LA ELABORACIÓN DE BIOFERTILIZANTE DESTINADO A LA UTILIZACIÓN EN EL PROCESO DE RUSTICACIÓN DE ORQUIDEAS".**

De acuerdo a las siguientes especificaciones:

1. Solicitud de: Ricardo Hoyos y Daniela Rodríguez. Egresados de la Universidad Politécnica Salesiana.
2. Valoración Técnica: Gabriela Montoya
3. Auspicio de Institución Científica Extranjera: Ninguna
4. Auspicio Institución Científica Nacional: Universidad Politécnica Salesiana
5. Contraparte del Ministerio del Ambiente: Coordinadores de Patrimonio Natural y Responsables de Vida Silvestre de las Direcciones Provinciales establecidas en la parte posterior de esta Autorización.
6. Complementos Autorizados de la Investigación: 6.1 Colección de Muestras Botánicas: Elementos constitutivos: raíces de la familia Orchidaceae y hongos
7. Duración: noviembre de 2012 hasta 29 de noviembre de 2013.
8. Obligaciones del investigador: SE COMPROMETE A DEPOSITAR DUPLICADOS DE LAS COLECCIONES DE ESTA INVESTIGACIÓN EN UNA UNIDAD DE MANEJO AUTORIZADA POR EL MINISTERIO DEL AMBIENTE: MUSEO QCNE HERBARIO NACIONAL DEL ECUADOR; ENTREGAR 2 (DOS) COPIAS DEL INFORME FINAL, 1 (UNA) COPIA A CADA UNA DE LAS DIRECCIONES PROVINCIALES DONDE REALIZÓ LA INVESTIGACIÓN, IMPRESO Y DIGITAL EN FORMATO PDF: ENTREGAR LA LOCALIZACIÓN EXACTA DE LOS ESPECIMENES COLECTADOS U OBSERVADOS, UNA COPIA DE LAS FOTOGRAFÍAS QUE FORMEN PARTE DE LA INVESTIGACIÓN EN FORMATO PDF AL MINISTERIO DEL AMBIENTE Y CUMPLIR CON TODOS LOS REQUERIMIENTOS ESTABLECIDOS POR NUMERALES DE ESTA AUTORIZACIÓN. EL PLAZO DE ENTREGA DEL INFORME VENCE EL 29 DE NOVIEMBRE DE 2013.
9. Del cumplimiento de las obligaciones dispuestas en el párrafo anterior se responsabiliza a:

   Luis Ricardo Hoyos Carrera y Andrea Daniela Rodríguez Cabrera

ISABEL ENDARA

Directora Nacional de Biodiversidad

GM 27/11/12

CC: Cordinadores de Patrimonio Natural

Responsables de vida silvestre

OBLIGACIONES Y CONDICIONES PARA LA VIGENCIA DE ESTA AUTORIZACIÓN

10. ESTA AUTROIZACIÓN ES EMITIDA BAJO LOS TÉRMINOS APROBADOS EN LA PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN POR TANTO NO HABILITA EXPORTACIÓN O MOVILIZACIÓN DE FLORA SIN EL CORRESPONDIENTE PERMISO.

11. SE AUTORIZA LA INVESTIGACIÓN EN LAS PROVINCIAS BAJO LA JURISDICCIÓN DE LAS DIRECCIONES PROVINCIALES QUE SE RESALTAN A CONTINUACIÓN: MORONA SANTIAGO: Cantón Santiago, Parroquia Méndez, Recinto Copal; CHIMBORAZO: Vía Guamote Macas; PICHINCHA: Cantón Aloag; COTOPAXI: Cantones: La Maná, Pujilí, Parroquia: Pilaló, Vía Quevedo; BOLÍVAR: Recinto Las Playas, Las Carmelas; IMBABURA: Valle de Intag; CUENCA; LOJA: Carretera Cuenca Loja, Sector San Lucas.

12. SE AUTORIZA LA COLECCIÓN DE MUESTRAS BOTANICAS, Colección de Muestras Botánicas: Elementos constitutivos: raíces de la familia Orchidaceae CON EL PROPÓSITO DE:

i. Colectar elementos constitutivos de especímenes de la familia Orchidaceae- Raíces.

ii. Identificar y Aislar seis Hongos presentes en raíces de la familia Orchidaceae

iii. Realizar criocongelación, desecación y conservación para obtención de cepas aisladas.

13. SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE LOS SIGUIENTES MATERIALES Y/O EQUIPO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA INVESTIGACIÓN

MATERIALES	**EQUIPO**
Bisturís	Microscopios
Cajas Petris	Cámara de Flujo Laminar
Pipetas	Agitador magnético
Matraces Erlenmeyer	Balanza analítica
Pinzas	Microondas
pH metro	Refrigerador
Tubos Eppendorf	Estufa
Sabourand dextroce agar	Homogenizador de cuchillas
Czapeck	
Murashigue	
Skoog	

14. LAS MUESTRAS PRODUCTO DE ESTA DEBERAN SER CATALOGADAS POR INDIVIDUO DESDE EL NÚMERO 000-007-IC-FLO-DNB-2012 hasta 240- 007-IC-FLO-DNB-2012.

15. LOS INDIVIDUOS QUE SE DESTINEN PARA LA COLECCIÓN EN ESTA INVESTIGACIÓN, DEBERAN SER PRESERVADOS, CURADOS Y DEPOSITADOS EN LA UNIDAD DE MANEJO AUTORIZADA POR EL MINISTERIO DEL AMBIENTE, DE ACUERDO A LO ESPECIFICADO EN EL NUMERAL 8 DE ESTA AUTORIZACIÓN, QUIEN CERTIFICARÁ EL INGRESO DE SU COLECCIÓN.

16. EL CUPO ASIGNADO PARA COLECTAR MUESTRAS BOTÁNICAS: ELEMENTOS CONSTITUTIVOS: RAÍCES Y HONGOS EN ESTA INVESTIGACIÓN ES: 240 ESPECÍMENES, BASADOS EN LO ESPECIFICADO EN LA PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN SEGÚN DOCUMENTO FECHA: DMQ a, 9 de noviembre de 2012.

17. EN EL CASO DE ENCONTRARSE NUEVAS ESPECIES, DEBERÁ NOTIFICARSE A LA DIRECCIÓN NACIONAL DE BIODIVERSIDAD LA DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE ADJUNTANDO LA RESPECTIVA PUBLICACIÓN. LOS ESPECÍMENES TIPO DEBERÁN DEPOSITARCE EN LA UNIDAD DE MANEJO AUTORIZADA POR EL MINISTERIO DEL AMBIENTE DE ACUERDO A LO ESPECIFICADO EN EL NUMERAL 8 DE ESTA AUTORIZACIÓN.

18. NO SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE ARMAS DE FUEGO, EXPLOSIVOS O SUSTANCIAS VENENOSAS COMO METODOLOGÍA EN ESTA INVESTIGACIÓN

19. LOS RESULTADOS DE ESTA INVESTIGACIÓN DEBERAN SER ENTREGADOS AL MINSITERIO DEL AMBIENTE CONFORME LO ESTABLECE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL VIGENTE.

20. NINGÚN ESPÉCIMEN PRODUCTO DE ESTA INVESTIGACIÓN PODRA SER UTILIZADO PARA USO COMERCIAL O COMO MATERIAL PARA MANEJO INSITU/EXSITU, SIN LA CORRESPONDIENTE AUTORIZACIÓN DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE.

21. ESTAS MUESTRAS NO PODRÁN SER UTILIZADAS EN CUALQUIER ACTIVIDAD DE BIOPROSPECCIÓN NI ACCESO A RECURSO GENÉTICO SIN LA CORRESPONDIENTE AUTORIZACIÓN DEL MINSITERIO DEL AMBIENTE.

22. PARA EL INGRESO A ÁREAS DE PROPIEDAD PRIVADA LOS INVESTIGADORES DEBERAN CONTAR CON LA AUTORIZACIÓN DEL RESPECTIVO PROPIETARIO.

23. PARA LA MOVILIZACIÓN DE TODOS LOS EJEMPLARES COLECTADOS EN ESTA AUTORIZACIÓN EL INVESTIGADOR, DEBERA CONTAR CON LA RESPECTIVA ORDEN DE MOVILIZACIÓN EMITIDA POR LAS DIRECCIONES PROVINCIALES DEL MINSITERIO DEL AMBIENTE.

24. ESTA AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA PODRÁ SER RENOVADA ANUALMENTE PREVIO AL CUMPLIMIENTO DE LAS OBLIGACIONES CONTRAIDAS POR EL INVESTIGADOR, ENTREGA Y APROBACIÓN DE INFORMES PARCIALES O FINALES EN LAS FECHAS INDICADAS.

25. SE SOLICITARÁ PRÓRROGA QUINCE DÍAS ANTES DE LA FECHA DE VENCIMIENTO QUE INDICA ESTE DOCUMENTO.

26. EL REGISTROD E LA LOCALIZACIÓN EXACTA DE LOS ESPECÍMENES COLECTADOS U OBSERVADOS ASÍ COMO FOTOGRAFÍAS, INFORME PARCIAL O FINAL DEBERÁ SER ENTREGADO EN FORMATO DIGITAL PDF, PARA SU INGRESO AL SISTEMA DE INFORMACIÓN DEL MINSITERIOD ELA MBIENTE(INCLUYENDO INFORMACIÓN SOBRE LAS COORDENADAS GEOGRÁFICAS) Y PARA LA PÁGINA WEB DEL MINISTERIO DELA MBIENTE.

27. TODO USO INDEBIDO DE ESTA AUTORIZACIÓN ASÍ COMO EL INCUMPLIMIENTO DE ASPECTOS LEGALES, ADMINISTRATIVOS O TÉCNICOS ESTABLECIDOS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS DE ACUERDO A LA CODIFICACIÓN A LA LEY FORESTAL Y DE CONSERVACIÓN DE ÁREAS NATURALES Y VIDA SILVESTRE Y AL TEXTO UNIFICADO DE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL SECUNDARIA Y DEMAS NORMATIVA PERTINENTE.

28. TASA POR AUTORIZACIÓN: 20 VEINTE DÓLARES DEPOSITADOS EN LA CUENTA 0010000785 CON PAPELETA No 5582476.