

UCUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Ingeniería Agronómica

Evaluación de tiempo y la temperatura de almacenamiento en la conservación de *Ceratobasidium* sp. y su efecto sobre la viabilidad y actividad promotora de la germinación en orquídeas *Epidendrum* sp.

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

Autores:

Lucía Jacqueline Pino Quito

CI: 0302701719

Correo electrónico: jacqueline.pino28@gmail.com

Johnny Daniel Yumbra León

CI: 0302675111

Correo electrónico: danielyumbraleon@gmail.com

Directora:

Blga. Denisse Fabiola Peña Tapia

CI: 0102501889

Cuenca, Ecuador

03-octubre-2022

Resumen

Las relaciones simbióticas que se establecen entre orquídeas y hongos micorrízicos han sido estudiadas y reportadas por varios autores, quedando claro el importante rol que éstos hongos cumplen durante el proceso de germinación de las orquídeas y por lo tanto su importancia en la conservación de éste grupo de plantas, es por ello necesario incluir también, estrategias de conservación de los hongos micorrízicos asociados a orquídeas, que permitan desarrollar estrategias de conservación más integrales. En este trabajo nos planteamos dos preguntas: 1) cual es el efecto del tiempo y los métodos de conservación evaluados, en la viabilidad del hongo *Ceratobasidium* sp. y 2) cuál es el efecto de los tratamientos de conservación del hongo en su capacidad para promover la germinación simbiótica en semillas de *Epidendrum* sp. Los resultados de los ensayos establecidos para contestar estas preguntas evidenciaron viabilidad del hongo en todos los tratamientos de conservación por un tiempo de hasta 33 meses y mostraron un efecto significativo entre el hongo conservado en los diferentes tratamientos y el “hongo fresco” (previamente expuesto a la simbiosis y recién aislado de la planta), siendo este último el que destacó con los porcentajes de germinación más altos registrados en semillas de *Epidendrum* sp. Este trabajo presenta la eficiencia del método de conservación de *Ceratobasidium* sp. mediante encapsulación en perlas de alginato, y la importancia de las interacciones bióticas y abióticas del hongo para mejorar la eficiencia en la germinación simbiótica de *Epidendrum* sp.

Palabras claves: Orquídeas. Hongos micorrízicos. Medio de cultivo. Semillas.

Abstract

The symbiotic relationships established between orchids and mycorrhizal fungi have been studied and reported by several authors, making clear the important role that these fungi play during the germination process of orchids and therefore their importance in the conservation of this group of plants, it is also necessary to include conservation strategies for mycorrhizal fungi associated with orchids, which allow the development of more comprehensive conservation strategies. In this work we ask ourselves two questions: 1) what is the effect of time and the conservation methods evaluated, on the viability of the fungus *Ceratobasidium* sp. and 2) what is the effect of fungal conservation treatments on their ability to promote symbiotic germination in *Epidendrum* sp. The results of the tests established to answer these questions showed the viability of the fungus in all the conservation treatments for a period of up to 33 months and showed a significant effect between the fungus preserved in the different treatments and the "fresh fungus" (previously exposed to the symbiosis and recently isolated from the plant), the latter being the one that stood out with the highest germination percentages recorded in seeds of *Epidendrum* sp. This work presents the efficiency of the conservation method of *Ceratobasidium* sp. by encapsulation in alginate beads, and the importance of the biotic and abiotic interactions of the fungus to improve the efficiency in the symbiotic germination of *Epidendrum* sp.

Keywords: Orchids. Mycorrhizal fungi. Culture medium. Seeds.

Índice de contenido

Resumen.....	2
Abstract.....	3
Índice de contenido	4
Índice de Tablas	7
Índice de Figuras.....	8
Índice de Anexos.....	10
Agradecimientos	15
Dedicatoria	16
1. Introducción	17
2. Justificación	18
3. Objetivos.....	19
3.1 Objetivo General.....	19
3.2 Objetivos Específicos.....	19
4. Revisión Bibliográfica.....	19
4.1 Los hongos micorrízicos	19
4.1.1 Hongo micorrízico del género <i>Ceratobasidium</i>	19
4.2 Conservación de hongos micorrízicos.....	20
4.2.1 Conservación de hongos micorrízicos encapsulados en perlas de alginato	20
4.3 Diferentes tiempos y temperaturas en la conservación de hongos micorrízicos	21
4.4 Viabilidad de hongos micorrízicos conservados.....	22
5. Materiales y Métodos	22
5.1 Área de estudio.....	22
5.2 Materiales	22
5.3 Métodos	23
5.3.1 Objetivo específico 1 Determinar la viabilidad del hongo <i>Ceratobasidium</i> sp. encapsulado en perlas de alginato y conservado a 4,-20 y -80°C luego de 3, 9 y 33 meses.	23
5.3.1.1 Elaboración de encapsulados de <i>Ceratobasidium</i> sp. en perlas de alginato	23

5.3.2 Objetivo específico 2: Evaluar la actividad promotora de la germinación del hongo <i>Ceratobasidium sp.</i> encapsulado en perlas de alginato y conservado a 4,-20 y -80°C luego de 3, 9 y 33 meses.	23
5.3.2.1 Aislamiento de <i>Ceratobasidium sp.</i> a partir de plantas inoculadas para obtener el hongo fresco	23
5.3.2.2 Evaluación de la viabilidad de las semillas <i>Epidendrum sp.</i>	24
5.3.2.3 Desinfección y siembra de las semillas	24
5.3.2.4 Establecimiento del ensayo de germinación simbiótica	25
5.3.3 Diseño experimental	27
6. Resultados	28
6.1 Prueba de viabilidad.....	28
6.2 Objetivo específico 1 Determinar la viabilidad del hongo <i>Ceratobasidium sp.</i> encapsulado en perlas de alginato y conservado a 4°C, -20°C y -80°C luego de 3, 9 y 33 meses.	29
6.2.1 Ensayo 1 (3 meses de almacenamiento)	29
6.2.2 Ensayo 2 (9 meses de almacenamiento)	31
6.2.3 Ensayo 3 (33 meses de almacenamiento)	33
6.3 Objetivo específico 2: Evaluar la actividad promotora de la germinación del hongo <i>Ceratobasidium sp.</i> encapsulado en perlas de alginato y conservado a 4°C, -20°C y -80°C luego de 3, 9 y 33 meses.	35
6.3.1 Ensayo 1 (3 meses de almacenamiento)	35
6.3.2 Ensayo 2 (9 meses de almacenamiento)	37
6.3.3 Ensayo 3 (33 meses de almacenamiento)	39
7. Discusión	41
7.1 Objetivo específico 1: Determinar la viabilidad del hongo <i>Ceratobasidium sp.</i> encapsulado en perlas de alginato y conservado a 4,-20 y -80°C luego de 3, 9 y 33 meses.	41
7.2 Objetivo específico 2: Evaluar la actividad promotora de la germinación del hongo <i>Ceratobasidium sp.</i> encapsulado en perlas de alginato y conservado a 4,-20 y -80 °C luego de 3, 9 y 33 meses.	43
8. Conclusiones	44
9. Recomendaciones	45
10. Referencias Bibliográficas	46

11. Anexos 54

Índice de Tablas

Tabla 1. Estados de desarrollo de semillas de orquídeas.	27
Tabla 2. Estados de desarrollo de la semilla (%) a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento. (HF) hongo <i>Ceratobasidium</i> sp. fresco. (AA) medio de cultivo avena agar, control negativo. (MS) medio de cultivo Murashige & Skoog, control positivo.	41

Índice de Figuras

Figura 1. Representación gráfica de ensayos para sus diferentes tiempos de almacenamiento. Medio Murashige & Skoog (MS).....	26
Figura 2. Escala de crecimiento utilizada para evaluar la germinación de las semillas; aparición de la primera hoja verdadera (a). Barra de escala= 1mm (Zettler & Hofer, 1998).....	27
Figura 3. Semillas teñidas por la prueba de Tetrazolio al 1%.....	28
Figura 4. Crecimiento del hongo <i>Ceratobasidium sp.</i> después de 3 meses de almacenamiento a diferentes temperaturas luego de 5 y 8 días.....	29
Figura 5. Crecimiento de micelio del hongo <i>Ceratobasidium sp.</i> encapsulado en perlas de alginato después de 5 y 8 días de la siembra a diferentes temperaturas luego de 3 meses de almacenamiento.	31
Figura 6. Crecimiento del hongo <i>Ceratobasidium sp.</i> después de 9 meses de almacenamiento a diferentes temperaturas luego de 5 y 8 días.....	31
Figura 7. Crecimiento de micelio del hongo <i>Ceratobasidium sp.</i> encapsulado en perlas de alginato a los 5 y 8 días de la siembra a diferentes temperaturas luego de 9 meses de almacenamiento..	33
Figura 8. Crecimiento del hongo <i>Ceratobasidium sp.</i> después de 33 meses de almacenamiento a diferentes temperaturas luego de 5 y 8 días.....	33
Figura 9. Crecimiento de micelio del hongo <i>Ceratobasidium sp.</i> encapsulado en perlas de alginato después de 5 y 8 días de la siembra a diferentes temperaturas luego de 33 meses de almacenamiento.....	35
Figura 10. Germinación de semillas de <i>Epidendrum sp.</i> luego de 8 semanas de la siembra a diferentes tratamientos durante 3 meses.....	35
Figura 11. Germinación de semillas de orquídea <i>Epidendrum sp.</i> bajo diferentes tratamientos: hongo <i>Ceratobasidium sp.</i> encapsulado en perlas de alginato conservado a 4°C, -20°C y -80°C durante 3 meses.	37
Figura 12. Germinación de semillas de <i>Epidendrum sp.</i> luego de 8 semanas de la siembra a diferentes tratamientos durante 9 meses.....	37
Figura 13. Germinación de semillas de orquídea <i>Epidendrum sp.</i> bajo diferentes tratamientos: hongo <i>Ceratobasidium sp.</i> encapsulado en perlas de alginato conservado a 4°C, -20°C y -80°C durante 9 meses.	39
Figura 14. Germinación de semillas de <i>Epidendrum sp.</i> luego de 8 semanas de la siembra a diferentes tratamientos durante 33 meses.....	39

Figura 15. Germinación de semillas de orquídea *Epidendrum sp.* bajo diferentes tratamientos: hongo *Ceratobasidium sp.* encapsulado en perlas de alginato conservado a 4°C, -20°C y -80°C durante 33 meses 40

Índice de Anexos

Anexo 1. Elaboración de encapsulados de <i>Ceratobasidium sp.</i> en perlas de alginato.....	54
Anexo 2. Aislamiento de <i>Ceratobasidium sp.</i> a partir de plantas inoculadas para obtener el hongo fresco.	55
Anexo 3. Evaluación de la viabilidad de las semillas <i>Epidendrum sp.</i>	56
Anexo 4. Establecimiento del ensayo de germinación.	56
Anexo 5. Ensayos de germinación a 3 meses y a diferentes tratamientos A. 4°C B. -20°C C. -80°C D. Hongo Fresco E. Control negativo (AA) F. Control positivo (MS).	57
Anexo 6. Ensayos de germinación a 9 meses y a diferentes tratamientos A. 4°C B. -20°C C. -80°C D. Hongo Fresco E. Control negativo (AA) F. Control positivo (MS).	58
Anexo 7. Ensayos de germinación a 33 meses y a diferentes tratamientos A. 4°C B. -20°C C. -80°C D. Hongo Fresco E. Control negativo (AA) F. Control positivo (MS).	59
Anexo 8. Resultados del ANOVA del crecimiento micelar y de la prueba de Tukey del hongo <i>Ceratobasidium sp.</i> conservado a 3 meses de almacenamiento a diferentes temperaturas, luego de 5 y 8 días de la siembra.	60
Anexo 9. Resultados del ANOVA del crecimiento micelar y de la prueba de Tukey del hongo <i>Ceratobasidium sp.</i> conservado a 9 meses de almacenamiento a diferentes temperaturas, luego de 5 y 8 días de la siembra.	61
Anexo 10. Resultados del ANOVA del crecimiento micelar y de la prueba de Tukey del hongo <i>Ceratobasidium sp.</i> conservado a 33 meses de almacenamiento a diferentes temperaturas, luego de 5 y 8 días de la siembra.	62
Anexo 11. Resultados del ANOVA de germinación y de la prueba de Tukey del hongo <i>Ceratobasidium sp.</i> conservado a 3 meses a diferentes tratamientos.	63
Anexo 12. Resultados del ANOVA de germinación y de la prueba de Tukey del hongo <i>Ceratobasidium sp.</i> conservado a 9 meses a diferentes tratamientos.	63
Anexo 13. Resultados del ANOVA de germinación y de la prueba de Tukey del hongo <i>Ceratobasidium sp.</i> conservado a 33 meses a diferentes tratamientos.	64

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Lucía Jacqueline Pino Quito en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de tiempo y la temperatura de almacenamiento en la conservación de *Ceratobasidium* sp. y su efecto sobre la viabilidad y actividad promotora de la germinación en orquídeas *Epidendrum* sp.", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 3 de octubre del 2022



Lucía Jacqueline Pino Quito

C.I: 0302701719

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Johnny Daniel Yumbla León en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de tiempo y la temperatura de almacenamiento en la conservación de *Ceratobasidium* sp. y su efecto sobre la viabilidad y actividad promotora de la germinación en orquídeas *Epidendrum* sp.", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 3 de octubre del 2022



Johnny Daniel Yumbla León

C.I: 0302675111

Cláusula de Propiedad Intelectual

Lucía Jacqueline Pino Quito, autora del trabajo de titulación "Evaluación de tiempo y la temperatura de almacenamiento en la conservación de *Ceratobasidium* sp. y su efecto sobre la viabilidad y actividad promotora de la germinación en orquídeas *Epidendrum* sp.", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 03 de octubre del 2022



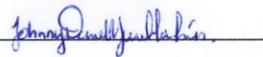
Lucía Jacqueline Pino Quito

C.I: 0302701719

Cláusula de Propiedad Intelectual

Johnny Daniel Yumbra León, autor del trabajo de titulación "Evaluación de tiempo y la temperatura de almacenamiento en la conservación de *Ceratobasidium* sp. y su efecto sobre la viabilidad y actividad promotora de la germinación en orquídeas *Epidendrum* sp.", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 03 de octubre del 2022



Johnny Daniel Yumbra León

C.I: 0302675111

Agradecimientos

De manera muy especial agradecemos primero a Dios por darnos salud, y por guiar nuestros caminos para poder seguir adelante con firmeza y perseverancia.

A nuestros queridos padres por apoyarnos siempre durante nuestra formación académica para culminar este proceso de formación académica y seguir adelante ante las adversidades de la vida.

A nuestra directora de tesis Denisse Peña por brindarnos su apoyo, conocimientos y orientación en el desarrollo y culminación del presente proyecto de titulación.

A Diana Curillo por su apoyo, predisposición y conocimientos compartidos en el laboratorio y sobre todo ser una guía en el desarrollo de esta investigación.

A nuestros profesores, compañeros y amigos que nos han acompañado en esta larga travesía, fue un gusto y un placer haberlos conocidos y trabajado con Uds. en el transcurso de la carrera.

Jacqueline & Daniel

Dedicatoria

Este logro lo dedicamos de manera muy especial a nuestros padres que siempre estuvieron en todo momento para nosotros, quienes siempre serán un pilar fundamental en toda nuestra vida, brindándonos su amor y apoyo incondicional en todo momento, nos inculcaron todos los valores que forman parte de nuestra persona y nos heredaron algo invaluable que es la educación, además nos demostraron que a pesar de las dificultades que se nos presenten, luchando podemos alcanzar nuestros sueños.

A todos nuestros hermanos, familiares y seres queridos que nos han motivado y brindado su apoyo para cumplir con esta meta y que no será la única gracias a ellos.

Jacqueline & Daniel

1. Introducción

La existencia de los microorganismos en los diferentes ecosistemas ha determinado el balance en el funcionamiento de las complejas relaciones simbióticas (Olalde & Aguilera, 1998). Según Martínez & Pugnaire (2009), los microorganismos son elementales para la nutrición y desarrollo de las plantas, además de participar de manera activa en el ciclo del carbono, nitrógeno y fósforo (Van der Heijden et al., 2015). Un ejemplo son los hongos endófitos, que son los responsables de la simbiosis con las orquídeas, lo cual garantiza el crecimiento y desarrollo de las plántulas, aumentando su diversidad y permanencia (Sommerville et al., 2008).

Los hongos endófitos son importantes por el papel que desenvuelven dentro del reino vegetal, estos organismos proveen estímulos, ayudan a la asimilación de nutrientes y ayudan a la defensa de las plantas frente a patógenos (Ordoñez et al., 2012). En orquídeas la mayoría de estos hongos son identificados como hongos micorrízicos y pertenecen al género *Rhizoctonia* (Mosquera et al., 2010). Estos hongos ayudan a las orquídeas de manera específica en el suministro de agua y disponibilidad de nutrientes, siendo vitales para promover la germinación y desarrollo de la semilla (Hoang et al., 2017), ya que las orquídeas generan millones de semillas, que poseen embriones superficiales y con escasa reserva de nutrientes, en consecuencia, solo del 2 al 3% germinan en la naturaleza (Luan, 2006; Xiang et al., 2015).

Según Zi et al. (2014), el principal medio de conservación para las orquídeas es la semilla, gracias a esto la diversidad genética se mantiene entre especies, sin embargo, el desarrollo de las orquídeas en cultivo mejora con la presencia de un hongo compatible (Hadley, 1989), ya que aumenta de manera significativa la viabilidad de la orquídea huésped (Pacheco et al., 2017). Uno de los métodos de conservación *ex situ* de germoplasma de orquídeas y hongos es el almacenamiento prolongado a bajas temperaturas (Jiang et al., 2017). Este es un método a bajo costo, que evita la depredación y el deterioro de las estructuras celulares que comúnmente suceden en condiciones naturales (Wood et al., 2000).

Los hongos pertenecientes a grupos de simbiosis de orquídeas suelen ser conservados en medios de cultivo, sin embargo, este método es susceptible a la contaminación y a las mutaciones tanto morfológicas como fisiológicas (Ordoñez et al., 2016). El método de crioconservación en nitrógeno líquido es una opción, sin embargo, resulta ser un método que exige mucho trabajo y altos costos (Ercole et al., 2013). Según Homolka (2014), el método de encapsulación previo al almacenamiento para la conservación a bajas temperaturas, genera varios beneficios, como el mínimo requerimiento de espacio y mantenimiento reducido (Yooyongwech et al., 2019), además, presenta durabilidad en el material genético

conservado y una resistencia al estrés por alteración de factores bióticos y abióticos (Vemmer & Patel, 2013).

De acuerdo con Pérez et al. (2017), en el Ecuador se concentra la mayor diversidad de especies de orquídeas a nivel mundial, pese a de ello, solo López et al. (2021) han reportado la encapsulación de *Ceratobasidium sp.* como un método apropiado para su conservación e inoculación en condiciones de invernadero luego de 22 meses de almacenamiento, en diferentes condiciones.

2. Justificación

Las interacciones existentes entre las plantas epífitas y terrestres con los microorganismos son de vital importancia para estabilizar y conservar los ecosistemas multi especies (Kottke et al., 2013). Los hongos micorrízicos son una herramienta importante para la germinación, crecimiento y desarrollo de las orquídeas, siendo importante identificar hongos específicos para cada especie, ya que su interacción es beneficiosa al momento de estimular la germinación (Hoyos & Rodríguez, 2013). Mosquera et al. (2010), señala que *Ceratobasidium* es uno de los hongos presentes en la mayoría de orquídeas analizadas y que este podría ser un hongo micorrízico importante para una amplia diversidad de orquídeas, no solo en epífitas si no de cualquier otro hábitat.

Las investigaciones que se centran en la conservación de hongos micorrízicos de orquídeas y evaluación de la germinación simbiótica proporcionarán herramientas para dar alternativas de conservación de especies en peligro, de esta manera se establece una base para entender los requisitos de germinación y propagación de orquídeas (Durán et al., 2019). Sin embargo, algunos métodos para la conservación de hongos resultan laboriosos y otros más simples como el recultivo periódico de hongos, se ha asociado con la pérdida de su capacidad simbiótica (Bernard, 1909; Alexander & Hadley, 1983).

Datta et al. (1999), mencionan que se han ideado varios métodos en cuanto al almacenamiento del germoplasma de hongos, pero que a su vez resultan ser mucho más complejos, laboriosos y costosos para un uso rutinario en la conservación (Batty et al., 2001).

El propósito de nuestra investigación fue evaluar el efecto de la conservación de *Ceratobasidium sp.* encapsulado en perlas de alginato a diferentes temperaturas y períodos de tiempo, sobre su viabilidad y actividad promotora de la germinación en semillas de la orquídea *Epidendrum sp.*

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Evaluar el tiempo y la temperatura de almacenamiento en la conservación de *Ceratobasidium* sp. y su efecto sobre la viabilidad y actividad promotora de la germinación en orquídeas *Epidendrum* sp.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar la viabilidad del hongo *Ceratobasidium* sp. encapsulado en perlas de alginato y conservado a 4°C, -20°C y -80°C luego de 3, 9 y 33 meses.
- Evaluar la actividad promotora de la germinación del hongo *Ceratobasidium* sp. encapsulado en perlas de alginato y conservado a 4°C, -20°C y -80°C luego de 3, 9 y 33 meses.

4. Revisión Bibliográfica

4.1 Los hongos micorrízicos

Las micorrizas son asociaciones que se establecen entre los hongos y las raíces de las plantas, en el caso de las orquídeas son muy importantes para ayudar en su germinación, debido a que éstas plantas poseen semillas con embriones superficiales y escasas reservas nutricionales (Xiang et al., 2015), las semillas de orquídeas se producen por grandes cantidades, sin embargo, solo un 2-3% germinan en condiciones naturales (Luan, 2006), ya que la asociación micorrízica es fundamental para el desarrollo de plántulas (Bermeo & Sari, 2018).

Los hongos pueden influir en la diversidad y composición vegetal (Velasco & Pepe, 2008), debido a que influyen en la regulación de los ciclos del carbono, las propiedades biológicas, químicas y físicas del suelo, esenciales para el mantenimiento y crecimiento (Kottke & Suarez, 2009). Las asociaciones micorrízicas tiene un efecto positivo en las orquídeas y en las distintas especies con las que formen la asociación, influyendo en su supervivencia y mejorando el crecimiento radical y la altura de las plantas (Bermeo & Sari, 2018).

4.1.1 Hongo micorrízico del género *Ceratobasidium*

Ceratobasidium es un género de hongos perteneciente al orden *Cantharellales*. Este género también conserva características del basidiomiceto *Rhizoctonia*, las especies que son anamorfos de *Ceratobasidium* se colocan en el género *Ceratorhiza* (Pereira et al., 2003). Algunas especies son saprotróficos, pero también son facultativos patógenos vegetales, causando una serie de enfermedades de cultivos de importancia comercial (Ogoshi, 1987). Algunos también son endomicorrízicos asociados a orquídeas (Rogers, 1935).

Las especies de *Ceratobasidium* son principalmente saprotróficos que se encuentran en el suelo y producen cuerpos frutales en tallos muertos y restos de plantas, algunos se desarrollan en hojas y tallos, varias especies se han aislado de orquídeas (Snech et al., 1991) y su distribución parece ser cosmopolita (Roberts, 1999).

Ceratobasidium se caracteriza por ser un grupo de parásitos oportunistas de las plantas, que causan varias enfermedades de importancia económica, tales como: *Ceratobasidium cereale*, causa la mancha ocular aguda en cereales (Murray & Burpee, 1984); *Ceratobasidium oryzae-sativae*, causa la mancha agregada de la vaina de arroz (Lanoiselet et al., 2007); y *Ceratobasidium noxium*, causa de kole roga o podredumbre negra de café (Roberts, 1999).

Sin embargo, *Ceratobasidium* es uno de los hongos micorrízicos presentes en la familia *Orchidaceae*, con una amplia diversidad y una gran amplitud de nichos ecológicos (Mosquera et al., 2010), en algunos casos son considerados como especies parásitas, en otros como saprófitas (Dearnaley, 2007), e incluso se reporta en asociaciones ectomicorrízicas, siendo un grupo clave para estudios que experimenten los alcances de estos hongos en la conservación de las orquídeas, por esta razón se ha priorizado la conservación de los hongos micorrízicos y con ello las relaciones benéficas hongo y planta (Otero et al., 2007).

4.2 Conservación de hongos micorrízicos

La conservación de la diversidad biológica requiere de la instrumentación de acciones que contemplen las diferentes causas actuales del deterioro y aprovechen las alternativas prácticas para el desarrollo (Ulloa, 1999). Los hongos micorrízicos utilizados en la germinación simbiótica, deben ser conservados. En la actualidad, los hongos juegan un papel importante con respecto al correcto funcionamiento de los ecosistemas naturales, es por esto que es de vital importancia su conservación, ya que existen especies asociadas a otros organismos que en ocasiones se encuentran amenazados (ADESPER, 2007).

Para el éxito de una conservación de hongos micorrízicos se debe tomar en cuenta el proceso metabólico del hongo y los cambios degenerativos normales que ocurren en las células. Es por esto que se han propuesto varias alternativas de conservación, las mismas que van acorde al hongo que se quiere conservar (Ángel, 2004).

4.2.1 Conservación de hongos micorrízicos encapsulados en perlas de alginato

La encapsulación es un proceso mediante la gelificación iónica de alginato de sodio (López et al., 2021). Según Lalaymia et al. (2012) mencionan que las perlas de

alginato proporcionan permeabilidad, para que pueda existir un intercambio osmótico necesario durante la criopreservación de propágulos de hongos como lo son el micelio y las esporas. De acuerdo con la estructura de propagación que contenga la cápsula o esfera de alginato, este procedimiento se puede considerar como la elaboración de una "semilla sintética" del organismo en cuestión (Flores, 2010).

Según Álvarez (2012), el método de almacenamiento de hongos micorrízicos por medio de perlas de alginato, al ser un medio no soluble en agua o en humedad, genera una ventaja, ya que reduce la germinación al momento de transportarlas y almacenarlas, estas perlas solo se pueden disolver cuando las mismas se encuentran en contacto con un medio de cultivo, suelos o soluciones ácidas, lo que resulta ventajoso al momento de almacenar hongos por períodos de tiempo prolongados, siempre y cuando se le presten las condiciones adecuadas (Álvarez, 2012).

El protocolo de encapsulación-deshidratación presenta un gran potencial, es recomendado como una herramienta de conservación, debido a que el material vegetal tiene una alta tasa de supervivencia, generalmente acompañada de una recuperación del crecimiento rápida y directa (Engelmann, 2004). Los hongos encapsulados pueden resultar útiles también para poder inocular sitios que ayudan a mejorar la población o restaurar sitios en los cuales los hongos micorrízicos se han perdido por completo (Sommerville et al., 2008). Según Engelmann (2004), se ha informado que el material vegetal almacenado de esta manera tiene una alta tasa de supervivencia, generalmente acompañada de una recuperación del crecimiento rápida y directa.

4.3 Diferentes tiempos y temperaturas en la conservación de hongos micorrízicos

El método de conservación por temperaturas de refrigeración es una metodología recomendada para formas no esporuladas o estrictamente micelares, ya que ayudan a disminuir el metabolismo debido a la baja cantidad de oxígeno y temperatura (Hoyos & Rodríguez, 2013). Este método de refrigeración consiste en mantener el medio de cultivo a una temperatura entre 4 y 10 °C, con la finalidad de inhibir los procesos metabólicos del hongo por las condiciones adversas en su desarrollo, por tanto, consumirá una baja cantidad de nutrientes del medio de cultivo (CIAT, 1980).

Este método de conservación puede incorporar la encapsulación simultánea de semilla de orquídea y simbionte de hongos en una perla de alginato de sodio. Estas perlas separadas pueden sobrevivir con un almacenamiento a -196°C durante 30 días, con altos niveles de viabilidad tanto en la semilla como en el hongo (Wood et

al., 2000). Ya que esto tiene la ventaja adicional de que se puede utilizar como fuente directa de inóculo. (Medina y Serrano, 2012).

En estudios adicionales, Kuszala et al. (2001), probaron la supervivencia de 20 aislamientos de hongos por 6 y 18 meses en diferentes condiciones de almacenamiento temperatura ambiente, +18, -24, +4, -18, -80 °C y en nitrógeno líquido luego de su liofilización. Observaron que la esporulación fue eficaz para todos los aislamientos almacenados a todas las temperaturas. Por lo tanto, ambos métodos propuestos garantizaron una reserva de respaldo y una fuente de suministro alternativa para iniciar cultivos, que se puede aplicar a una amplia gama de aislamientos (Declerck et al., 2005).

4.4 Viabilidad de hongos micorrízicos conservados

Según Daniels y Trappe (1980), la viabilidad celular se va perdiendo con respecto al tiempo y a las condiciones ambientales como temperatura y humedad relativa. La viabilidad celular influye sobre la germinación tanto de las semillas como de esporas de hongos micorrízicos arbusculares y sobre la capacidad de colonización de estas últimas (Daniels & Trappe, 1980). La viabilidad y el porcentaje de germinación tanto de semillas como de esporas de hongos son conceptos diferentes ya que, semillas o esporas viables (vivas) pueden germinar o no dependiendo de las condiciones externas como temperatura, humedad y oxigenación del suelo, entre otros factores (Daniels & Trappe, 1980).

Püschel et al. (2019), reportan que la infectividad del inóculo de hongos micorrízicos generalmente disminuye con el tiempo, y que las condiciones de almacenamiento en turba afectan fuertemente la duración de la infectividad y por ello, la composición y la dosis del inóculo tiene un impacto en el resultado final de la micorrización.

5. Materiales y Métodos

5.1 Área de estudio

El área de estudio se encuentra ubicada en la provincia del Azuay en el cantón Cuenca en el Laboratorio de Propagación *in vitro* de Plantas del campus Yanuncay de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.

5.2 Materiales

Se trabajó en el Laboratorio de propagación *in vitro* de plantas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, donde se contó con los materiales y equipos necesarios.

5.3 Métodos

5.3.1 Objetivo específico 1 Determinar la viabilidad del hongo *Ceratobasidium sp.* encapsulado en perlas de alginato y conservado a 4, -20 y -80°C luego de 3, 9 y 33 meses.

5.3.1.1 Elaboración de encapsulados de *Ceratobasidium sp.* en perlas de alginato

La cepa del hongo *Ceratobasidium sp.* se tomó de la colección de microorganismos asociados a orquídeas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, Azuay – Ecuador. Siguiendo el protocolo de López et al. (2021), se realizaron refrescamientos del hongo en medio Agar Papa Dextrosa (PDA) tomando 0,25cm² (0,5 x 0,5 cm) de micelio, se sembró en cajas Petri que contenían el mismo medio, luego de 10 días, se recalentó el micelio de media caja Petri de 90 mm y se colocó en 5 ml de alginato de sodio (3% peso/volumen) previamente esterilizado en autoclave.

La mezcla del micelio en la solución de alginato fue homogenizada en agitador magnético por 1 hora a 300 rpm y se colocó en una micropipeta para ser goteada en una solución de cloruro de calcio (100 mM), las perlas formadas se mantuvieron en agitación por 10 minutos a 100 rpm. Una vez formadas las perlas, se sometieron a un proceso de ósmosis para la deshidratación en sacarosa (0,75 M) durante 22 horas a 130 rpm (López et al., 2021).

Posterior, las perlas fueron conservadas a 3 diferentes temperaturas: 4°C, -20°C, -80°C durante 3 meses. Las perlas evaluadas luego de 9 y 33 meses fueron encapsuladas previamente por personal del laboratorio siguiendo el mismo protocolo y se conservaron en las mismas condiciones. Luego del tiempo establecido de conservación, por cada temperatura y tiempo de almacenamiento se sembraron 3 perlas de manera individual en cajas Petri de 90 mm que contenía medio PDA previamente elaborado y esterilizado en autoclave. Se evaluó la viabilidad del hongo con relación a la variable: diámetro del crecimiento circular del hongo luego de 5 y 8 días de la siembra (López et al., 2021).

5.3.2 Objetivo específico 2: Evaluar la actividad promotora de la germinación del hongo *Ceratobasidium sp.* encapsulado en perlas de alginato y conservado a 4, -20 y -80°C luego de 3, 9 y 33 meses.

5.3.2.1 Aislamiento de *Ceratobasidium sp.* a partir de plantas inoculadas para obtener el hongo fresco

Con el fin de contar con un hongo que no ha sido tomado directamente de los tratamientos de conservación, previamente se aisló *Ceratobasidium sp.* a partir de plantas de orquídeas que fueron previamente inoculadas con encapsulados de *Ceratobasidium sp.*, este procedimiento se realizó en condiciones *ex vitro* en sustrato estéril para inducir la simbiosis, además, dicho hongo fue previamente

identificado mediante técnicas moleculares (PCR). A partir de estas plantas, que para el momento del ensayo tenían 6 meses inoculadas, se colectaron segmentos de raíz, éstos fueron desinfectados y sembrados en medio de aislamiento de hongos (FMI, por sus siglas en inglés) y a partir del micelio que se desarrolló se sembraron nuevas placas del aislado en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA). Estas placas del micelio recién aislado se usaron para el ensayo como un tratamiento para la comparación de un hongo fresco (en simbiosis) frente a los hongos conservados.

5.3.2.2 Evaluación de la viabilidad de las semillas *Epidendrum sp.*

La prueba de viabilidad en semillas de *Epidendrum sp.* se realizó de acuerdo al protocolo de Lemay et al., (2015). Las semillas fueron colocadas en suspensión en solución de hipoclorito de sodio al 1% (volumen/volumen) acondicionado con 0,1% (volumen/volumen) de Tween 20 durante 10 minutos, se realizaron 3 enjuagues con agua destilada, posteriormente, se eliminó el agua y se añadió cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio al 1% (masa/volumen, pH=7) y se colocó a temperatura ambiente durante 24 horas en oscuridad. Finalmente, se eliminó el exceso de reactivo y se colocaron las semillas en una caja Petri para la observación y conteo mediante un estereomicroscopio. Las semillas teñidas de rojo son consideradas viables y en base al conteo de las semillas teñidas y no teñidas se obtuvo un porcentaje de viabilidad.

5.3.2.3 Desinfección y siembra de las semillas

Las semillas fueron desinfectadas en la cabina de flujo laminar, siguiendo el protocolo modificado de Salazar et al. (2020) que consiste en:

Depositar las semillas en una jeringa estéril de 5 ml de capacidad, colocando previamente un pequeño segmento de algodón estéril en la base de la aguja para evitar la pérdida de las semillas durante la desinfección, preparar: 5 ml de Cloro 0,5%, como solución desinfectante y succionar con la jeringa (que contiene la semilla) la solución desinfectante y mantenerla en agitación por 1 minuto, finalmente desechar la solución desinfectante y realizar tres enjuagues con agua destilada estéril. Para facilitar la siembra la jeringa se llenó nuevamente con agua destilada estéril.

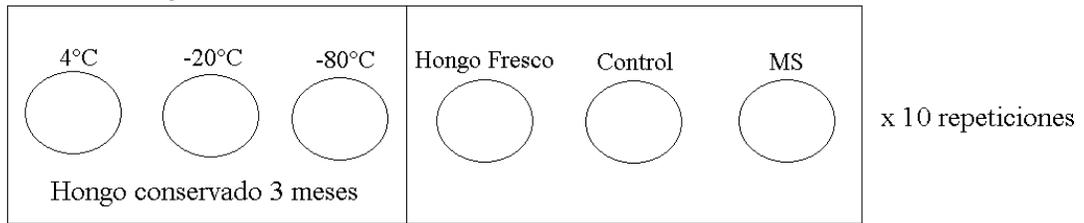
A partir de la jeringa que contenía las semillas desinfectadas en suspensión, se retiró la aguja y se dejó caer una gota de la suspensión que contiene las semillas desinfectadas sobre el medio de cultivo avena agar, previamente elaborado y esterilizado (López et al., 2021). El número de semillas sembradas fue variable y es por ello que estas fueron contabilizadas luego de la siembra (usando un estereomicroscopio).

5.3.2.4 Establecimiento del ensayo de germinación simbiótica

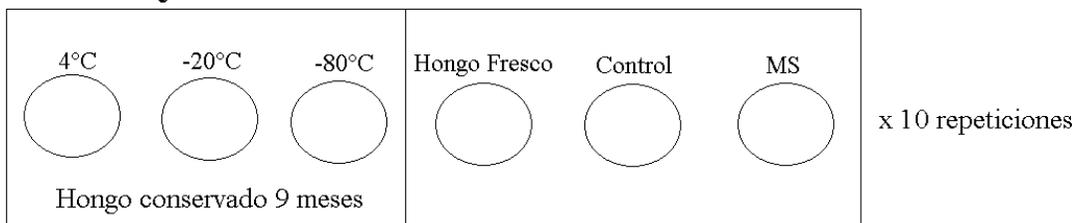
Se sembraron semillas de *Epidendrum* sp. en cajas Petri que contenían medio de cultivo avena agar + un segmento del micelio del hongo obtenido a partir de los encapsulados regenerados por cada tratamiento de conservación y tiempo de almacenamiento, es decir, por 3 meses (4, -20, -80°C), 9 meses (4, -20, -80°C) y 33 meses (4, -20, -80°C) una caja con semillas sin hongo se sembró también en medio de cultivo avena-agar como tratamiento control, adicionalmente se sembró una caja Petri con el mismo medio de cultivo + un segmento del “hongo fresco” (*Ceratobasidium* sp. aislado y cultivado recientemente de las orquídeas previamente inoculadas) y finalmente, se incluyó también la siembra de semillas en una caja con medio Murashige & Skoog (MS) como un control positivo de la germinación de las semillas y para una comparación entre el efecto del hongo y de un medio de cultivo rico en sacarosa. Se realizaron 10 repeticiones por cada periodo de almacenamiento y temperatura cómo se indica en la Figura 1. Se utilizaron 60 cajas Petri para cada ensayo, en total se usaron 180, todos los tratamientos se mantuvieron en completa oscuridad y para la toma de datos fueron expuestos a la luz.

Todos los materiales y medios fueron esterilizados en autoclave antes de su uso y tanto el encapsulado, así como la siembra de los ensayos se realizaron en cabina de flujo laminar.

Ensayo 1: 3 meses de almacenamiento



Ensayo 2: 9 meses de almacenamiento



Ensayo 3: 33 meses de almacenamiento

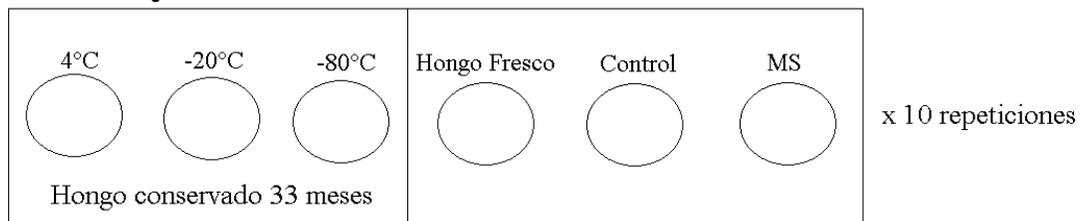


Figura 1. Representación gráfica de ensayos para sus diferentes tiempos de almacenamiento. Medio Murashige & Skoog (MS).

La actividad promotora de la germinación del hongo se evaluó en base al porcentaje de germinación de las semillas luego de 8 semanas de la siembra, para cada tratamiento se contaron el número de semillas germinadas y no germinadas, de esta manera se obtuvieron los porcentajes de germinación en relación al número total de semillas sembradas por caja Petri que constituyeron el 100%. Se consideraron semillas germinadas aquellas que alcanzaron el estado de desarrollo 1, es decir hasta que la cubierta de la semilla se rompió por el agrandamiento del embrión, usando la escala de crecimiento de 0 a 5 según la descripción de (Zettler & Hofer, 1998).

Tabla 1. Estados de desarrollo de semillas de orquídeas.

Estados	Descripción morfológica
0	Sin germinación, tegumento intacto.
1	Cubierta de la semilla rota por el agrandamiento del embrión.
2	Ruptura de testa, embrión globular, presencia de rizoides.
3	Brote visible (protomeristemas).
4	Primera hoja emergiendo del brote.
5	Alargamiento de la primera hoja y desarrollo posterior.

Adaptado de Zettler y Hofer (1998); Johnson et al (2007).

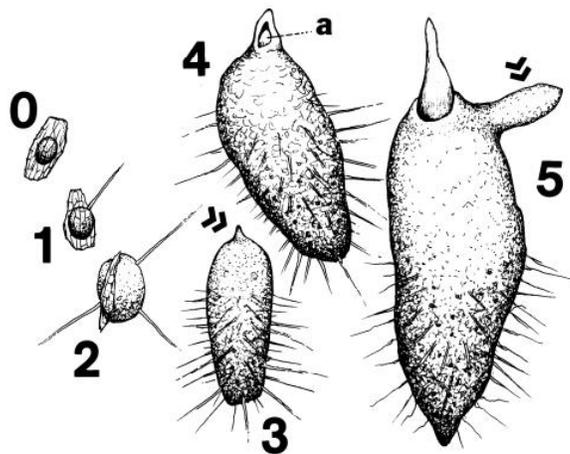


Figura 2. Escala de crecimiento utilizada para evaluar la germinación de las semillas; aparición de la primera hoja verdadera (a). Barra de escala= 1mm (Zettler & Hofer, 1998).

5.3.3 Diseño experimental

Para cumplir con los objetivos del proyecto se implementaron 3 ensayos de acuerdo al tiempo de almacenamiento (3, 9 y 33 meses), luego, para cada ensayo se aplicó una prueba estadística de tipo inferencial con un diseño experimental completamente al azar con 6 tratamientos (4°C, -20°C, -80°C, hongo fresco, control sin hongo, medio MS) y 10 repeticiones para cada tratamiento. La unidad experimental a medir fue cada caja Petri con la semilla de orquídea y el hongo *Ceratobasidium sp.* luego de su conservación.

En cuanto a la parte estadística, según las variables para cada objetivo se verificaron los datos mediante el análisis de homogeneidad de varianzas y de normalidad de los datos, luego de la verificación, se realizó un test ANOVA unidireccional y complemento de ello se aplicó una prueba de Tukey. Para cumplir con el primer objetivo específico se analizó el crecimiento en diámetro circular del hongo (variable dependiente) con relación a las diferentes temperaturas de almacenamiento (variable independiente), este análisis se realizó para cada ensayo del tiempo de almacenamiento (3, 9 y 33 meses) para la obtención de los resultados. Así mismo, para cumplir con el segundo objetivo específico planteado se analizó el porcentaje de germinación de las semillas (variable dependiente) con relación a las diferentes temperaturas de almacenamiento (variable independiente), este análisis se realizó para cada ensayo del tiempo de almacenamiento (3, 9 y 33 meses) para la obtención de los resultados.

6. Resultados

6.1 Prueba de viabilidad

Los resultados obtenidos con la prueba de tetrazolio se obtuvo un porcentaje de viabilidad del 97% de las semillas de *Epidendrum* sp.



Figura 3. Semillas teñidas por la prueba de Tetrazolio al 1%.

6.2 Objetivo específico 1 Determinar la viabilidad del hongo *Ceratobasidium sp.* encapsulado en perlas de alginato y conservado a 4°C, -20°C y -80°C luego de 3, 9 y 33 meses.

6.2.1 Ensayo 1 (3 meses de almacenamiento)

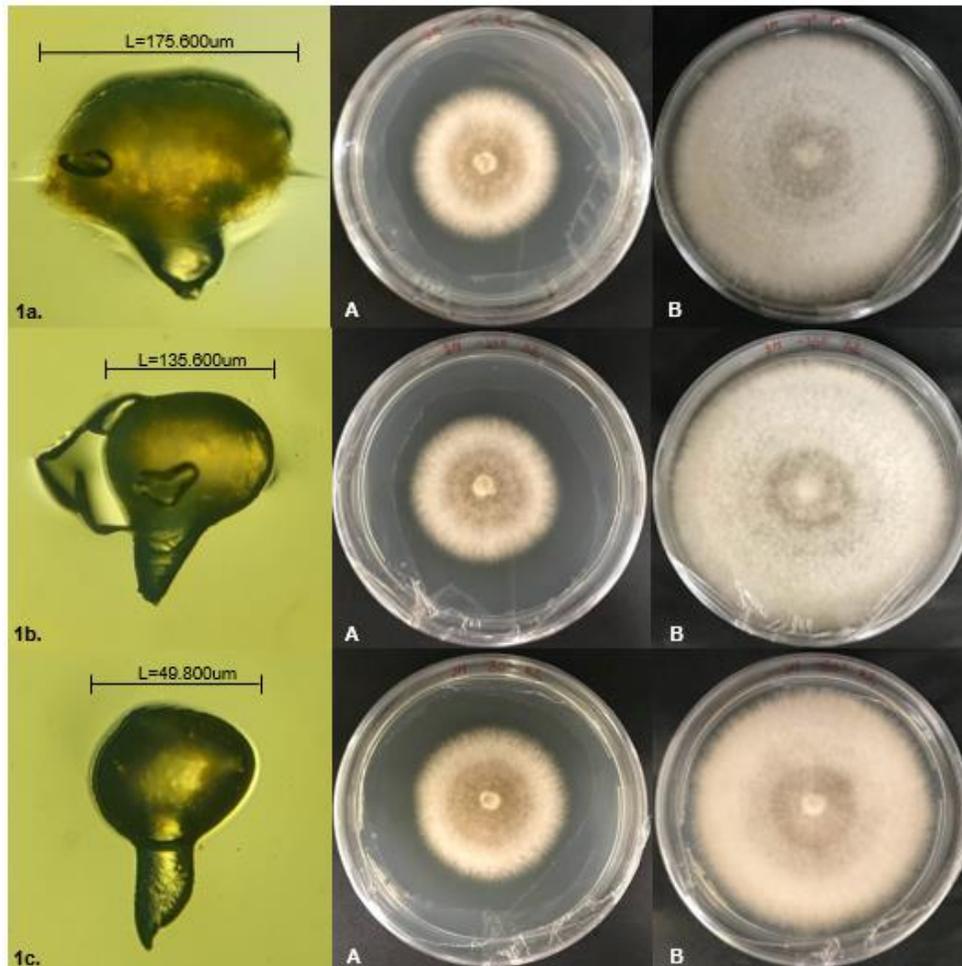


Figura 4. Crecimiento del hongo *Ceratobasidium sp.* después de 3 meses de almacenamiento a diferentes temperaturas. **1a.** Temperatura de almacenamiento a 4°C luego de 5 días (**A**) y 8 días (**B**) de la siembra (Longitud de la perla =175,600 μm). **1b.** Temperatura de almacenamiento a -20°C luego de 5 días (**A**) y 8 días (**B**) de la siembra (Longitud de la perla =135,600 μm). **1c.** Temperatura de almacenamiento a -80°C luego de 5 días (**A**) y 8 días (**B**) de la siembra (Longitud de la perla =49,800 μm).

El crecimiento de micelio de hongo *Ceratobasidium sp.* (Figura 4) luego de 5 días de la siembra no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,01$) con referencia a las temperaturas de almacenamiento (4°C, -20°C y -80°C) (Anexo 8). Sin embargo, el máximo desarrollo micelial corresponde a las temperaturas de almacenamiento de 4°C y -80°C, que demostraron los mismos resultados con un

valor promedio de crecimiento de 4,77 cm (n=3), seguidos por el tratamiento de conservación de hongo a -20°C con un valor promedio de crecimiento de 4,30 cm (n=3).

Con respecto al crecimiento del hongo a los 8 días tampoco se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,01$) con referencia a las temperaturas de almacenamiento (4°C, -20°C y -80°C) (Anexo 8). Sin embargo, el máximo valor de desarrollo micelial se presentó en la temperatura de almacenamiento de 4°C con un valor promedio de 8,23 cm (n=3), seguido por el hongo conservado a -20°C con un valor promedio de desarrollo micelar de 7,83 cm (n=3), finalmente, tenemos al hongo conservado a -80°C con un valor promedio de desarrollo micelar de 7,80 cm (n=3) (Figura 5).

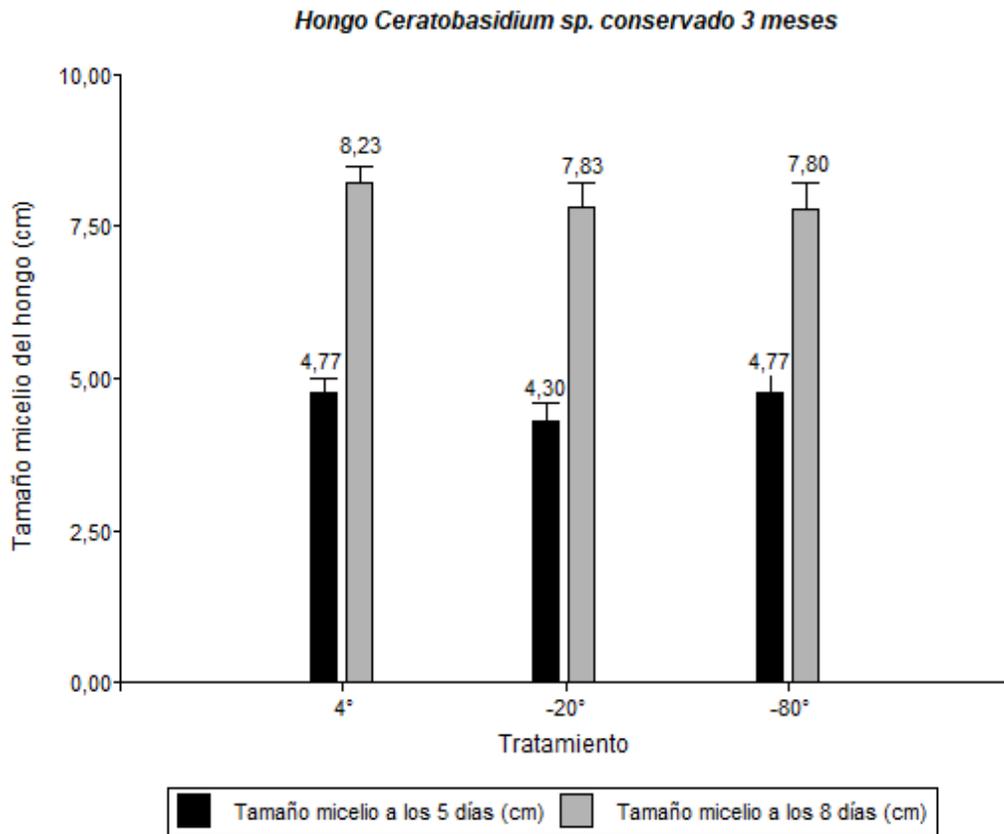


Figura 5. Crecimiento de micelio del hongo *Ceratobasidium* sp. encapsulado en perlas de alginato después de 5 y 8 días de la siembra a diferentes temperaturas luego de 3 meses de almacenamiento. Se aplicó un ANOVA unidireccional y una prueba complementaria de Tukey para diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Las barras representan la media \pm error estándar (n=3).

6.2.2 Ensayo 2 (9 meses de almacenamiento)

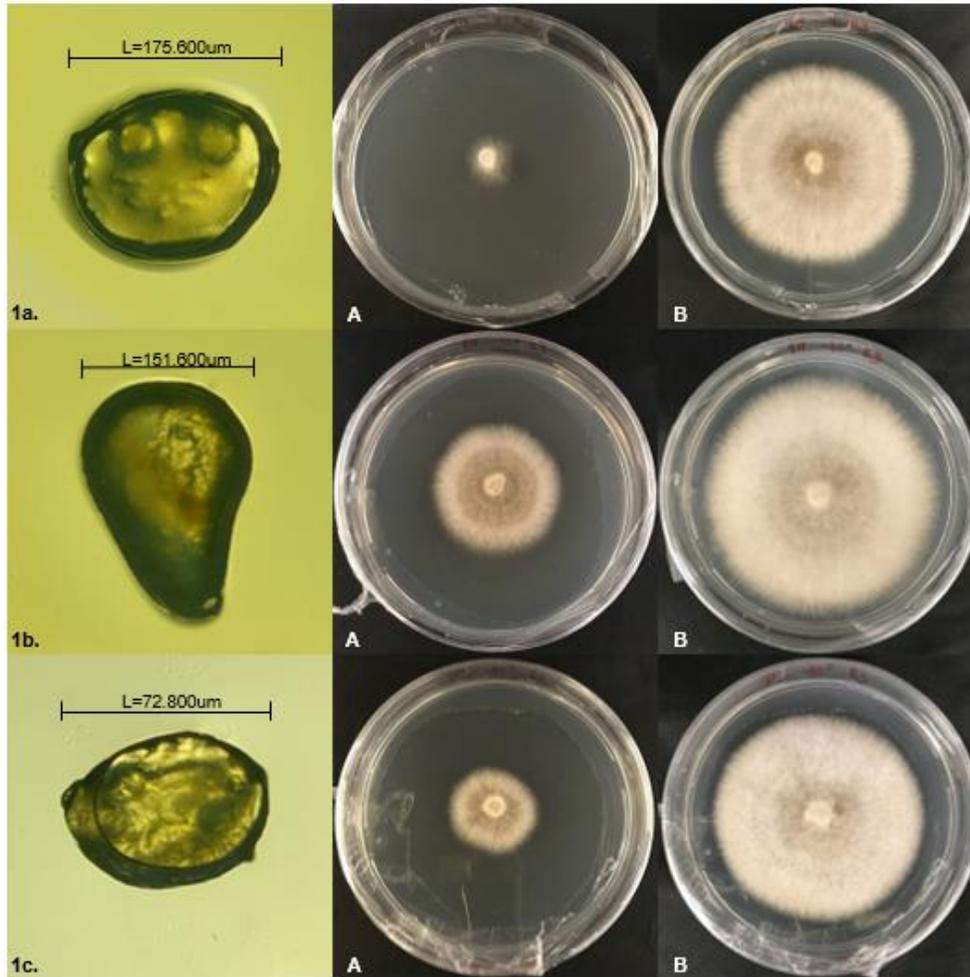


Figura 6. Crecimiento del hongo *Ceratobasidium* sp. después de 9 meses de almacenamiento a diferentes temperaturas. **1a.** Temperatura de almacenamiento a 4°C luego de 5 días (**A**) y 8 días (**B**) de la siembra (Longitud de la perla =175,600 μ m). **1b.** Temperatura de almacenamiento a -20°C luego de 5 días (**A**) y 8 días (**B**) de la siembra (Longitud de la perla =151,600 μ m). **1c.** Temperatura de almacenamiento a -80°C luego de 5 días (**A**) y 8 días (**B**) de la siembra (Longitud de la perla =72,800 μ m).

El crecimiento de micelio de hongo *Ceratobasidium* sp. (Figura 6) luego de 5 días de la siembra no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p>0,01$) para las temperaturas de almacenamiento (4°C , -20°C y -80°C) (Anexo 9). No obstante, el máximo crecimiento micelial se registró a -80°C con un valor de 3,47 cm ($n=3$), seguido por el conservado a -20°C con un valor promedio de 3,30 cm ($n=3$), y finalmente, 4°C con un valor promedio de desarrollo micelar de 0,63 cm ($n=3$) (Figura 6).

Así mismo, Con respecto al crecimiento del hongo a los 8 días no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,01$) con referencia a las temperaturas de almacenamiento (4°C , -20°C y -80°C) (Anexo 9). El máximo crecimiento del hongo luego de 8 días de la siembra, se repite a una temperatura de almacenamiento de -80°C con un valor de 7,20 cm ($n=3$), luego tenemos al hongo conservado a -20°C con un valor promedio de desarrollo micelar de 7,00 cm ($n=3$), finalmente, tenemos al hongo conservado a 4°C con un valor promedio de desarrollo micelar de 4,00 cm ($n=3$) (Figura 7).

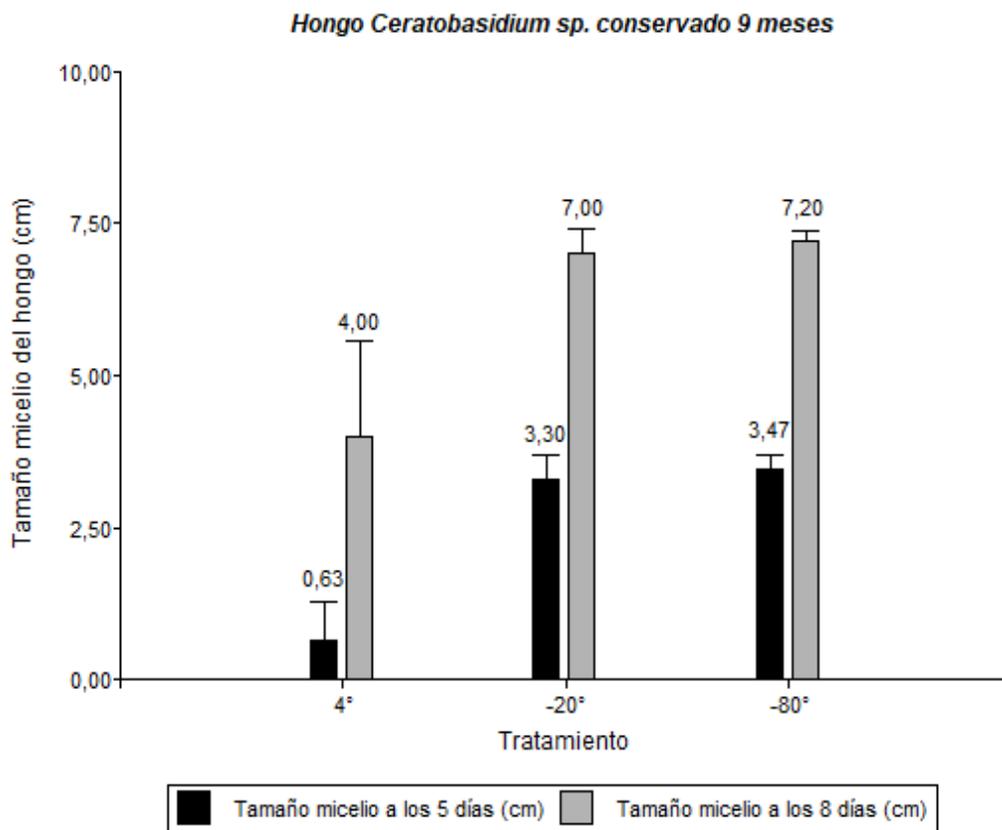


Figura 7. Crecimiento de micelio del hongo *Ceratobasidium* sp. encapsulado en perlas de alginato a los 5 y 8 días de la siembra a diferentes temperaturas luego de 9 meses de almacenamiento. Se aplicó un ANOVA unidireccional y una prueba complementaria de Tukey para diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Las barras representan la media \pm error estándar (n=3).

6.2.3 Ensayo 3 (33 meses de almacenamiento)

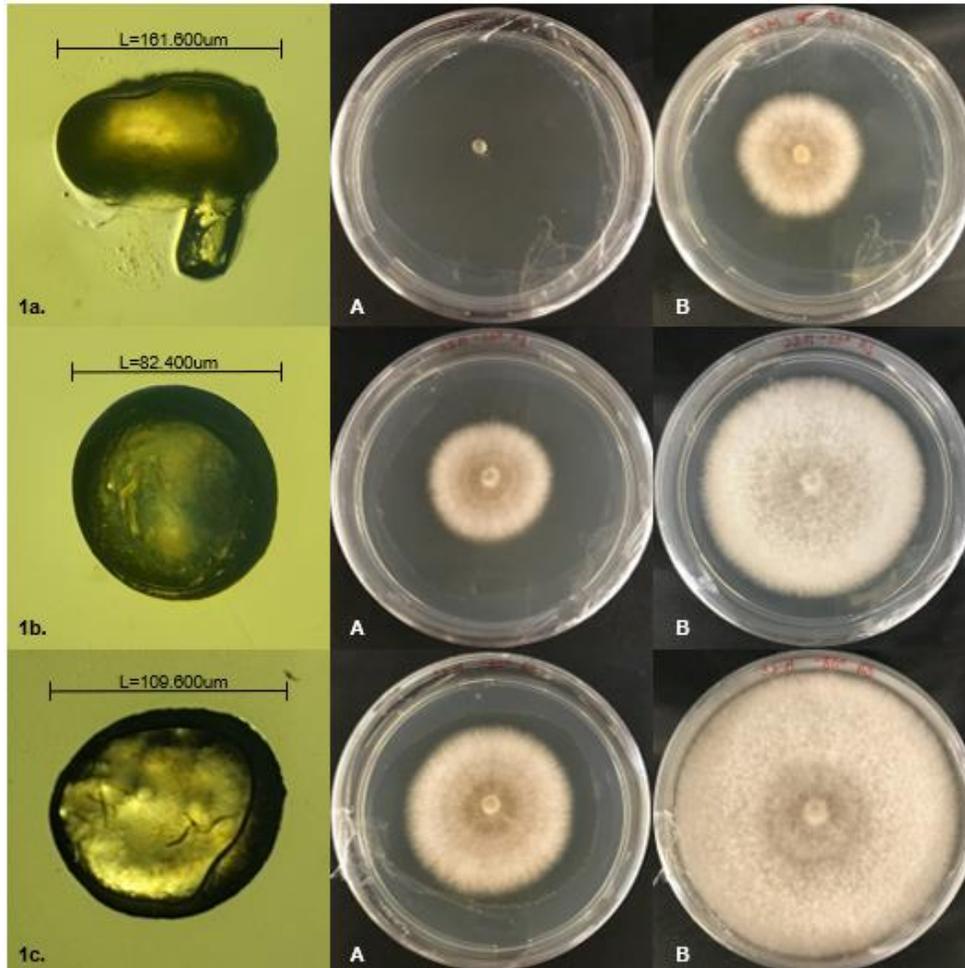


Figura 8. Crecimiento del hongo *Ceratobasidium* sp. después de 33 meses de almacenamiento a diferentes temperaturas. **1a.** Temperatura de almacenamiento a 4°C luego de 5 días (A) y 8 días (B) de la siembra (Longitud de la perla =161,600 um). **1b.** Temperatura de almacenamiento a -20°C luego de 5 días (A) y 8 días (B) de la siembra (Longitud de la perla =82,400 um). **1c.** Temperatura de almacenamiento a -80°C luego de 5 días (A) y 8 días (B) de la siembra (Longitud de la perla =109,600 um).

Luego de 5 días de la siembra se registraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) (Anexo 10), entre el crecimiento del micelio del hongo conservado a -20°C y -80°C respecto a las conservadas a 4°C (Figura 8). Luego de los 5 primeros días el máximo crecimiento micelar se registró a -80°C con un valor de 5,57 cm ($n=3$), seguido del valor registrado a -20°C con un promedio de 4,80 cm ($n=3$), mientras que, a 4°C no se presentó desarrollo micelar luego de los 5 primeros días después de la siembra ($n=3$) (Figura 9).

De igual manera, el desarrollo de micelio de hongo *Ceratobasidium* sp. luego de 8 días de la siembra presentó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$), siendo las temperaturas de almacenamiento de -20°C y -80°C estadísticamente diferentes al desarrollo micelar del hongo bajo temperaturas de almacenamiento de 4°C (Anexo 10). El máximo crecimiento del hongo luego de 8 días de la siembra, se repite a una temperatura de almacenamiento de -80°C con un valor de 8,50 cm ($n=3$), luego tenemos al hongo conservado a -20°C con un valor promedio de desarrollo micelar de 7,67 cm ($n=3$), finalmente, tenemos al hongo conservado a 4°C con un valor promedio de desarrollo micelar de 1,40 cm ($n=3$). Lo que sugiere que para una conservación adecuada de los encapsulados de *Ceratobasidium* sp. mediante perlas de alginato durante un periodo de 33 meses la temperatura sugerida es -80°C (Figura 9).

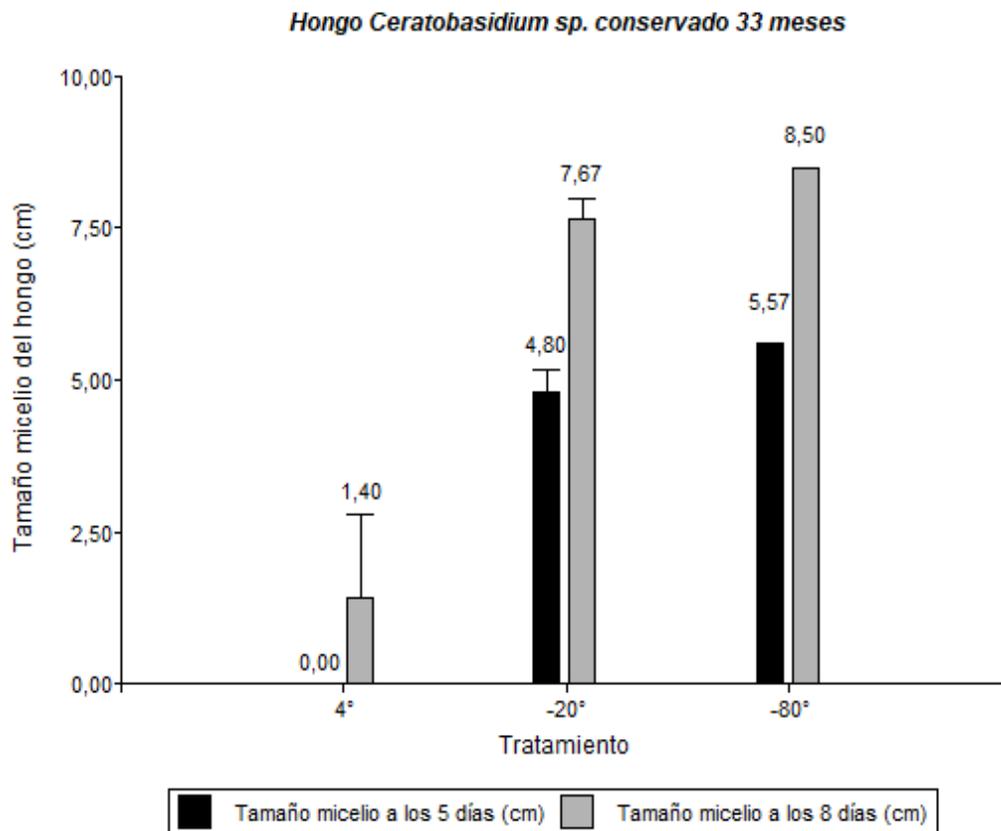


Figura 9. Crecimiento de micelio del hongo *Ceratobasidium* sp. encapsulado en perlas de alginato después de 5 y 8 días de la siembra a diferentes temperaturas luego de 33 meses de almacenamiento. Se aplicó un ANOVA unidireccional y una prueba complementaria de Tukey para diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Las barras representan la media \pm error estándar (n=3).

6.3 Objetivo específico 2: Evaluar la actividad promotora de la germinación del hongo *Ceratobasidium* sp. encapsulado en perlas de alginato y conservado a 4°C, -20°C y -80°C luego de 3, 9 y 33 meses.

6.3.1 Ensayo 1 (3 meses de almacenamiento)

La semilla presentó un efecto positivo frente a todos los tratamientos y refleja los resultados de la prueba de viabilidad (Figura 10).

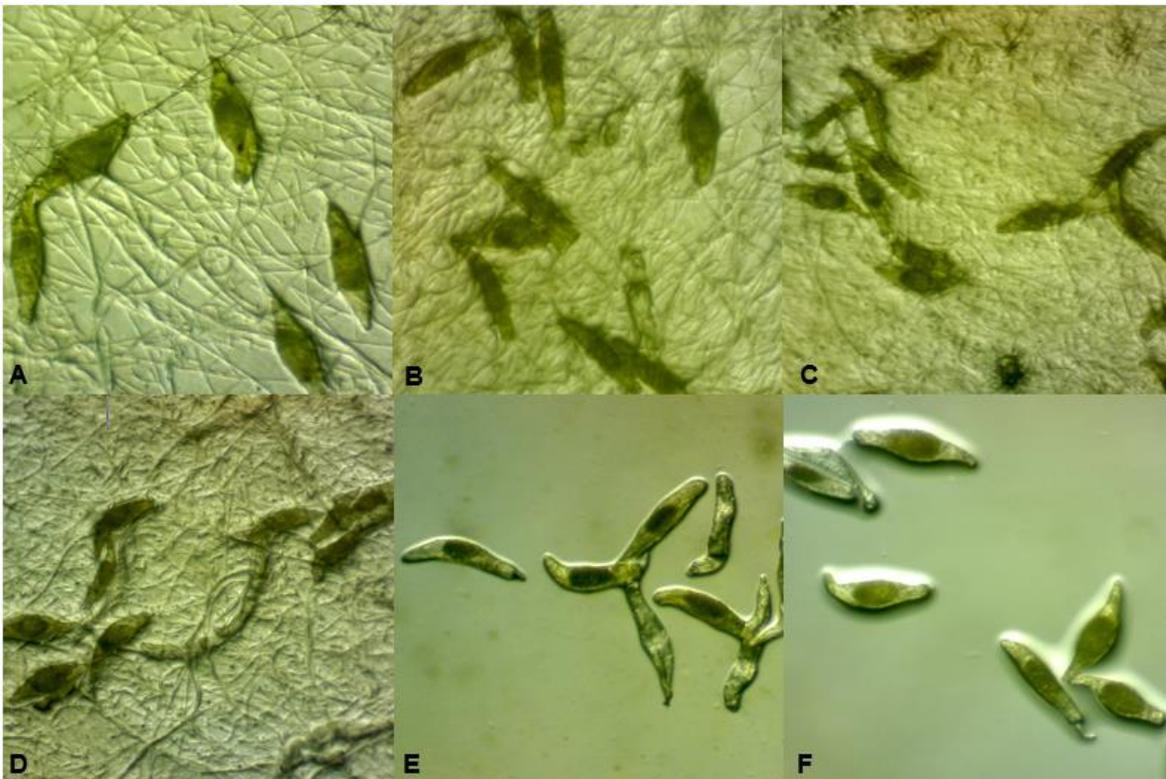


Figura 10. Germinación de semillas de *Epidendrum* sp. luego de 8 semanas de la siembra a diferentes tratamientos. **A.** Semillas con *Ceratobasidium* sp. conservado a 4°C durante 3 meses. **B.** Semillas con *Ceratobasidium* sp. conservado a -20°C durante 3 meses. **C.** Semillas con *Ceratobasidium* sp. conservado a -80°C durante 3 meses **D.** Semillas con *Ceratobasidium* sp. tratamiento hongo fresco (HF). **E.** Semillas en medio avena-agar, control sin hongo (AA). **F.** Semillas en medio Murashige & Skoog (MS).

Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,0001$), el tratamiento control positivo (MS) fue el que mayor porcentaje de germinación presentó con 36,54% (n=10), seguido por el 31,72%

(n=10) del tratamiento “hongo fresco” y el 28,14% (n=10) de germinación en el tratamiento a 4°C, pese a que los porcentajes de germinación entre estos tres tratamientos fueron diferentes, según la prueba de Tukey obtenida, éstos comparten cierta similitud estadística entre ellos, sin embargo, el tratamiento “hongo fresco” también comparte similitud con el resto de tratamientos a excepción del tratamiento control (AA) que presentó los porcentajes más bajos (22,42%) (n=10) y estadísticamente es diferente al tratamiento “hongo fresco”, no obstante, el tratamiento control es estadísticamente comparable con los tratamientos 4°C, -80 y -20°C (Anexo 11). La figura 11 ilustra los resultados obtenidos, donde podemos observar un efecto favorable del hongo fresco en comparación con el tratamiento control, efecto estadísticamente comparable al que se obtiene al sembrar las semillas en un medio rico en sacarosa.

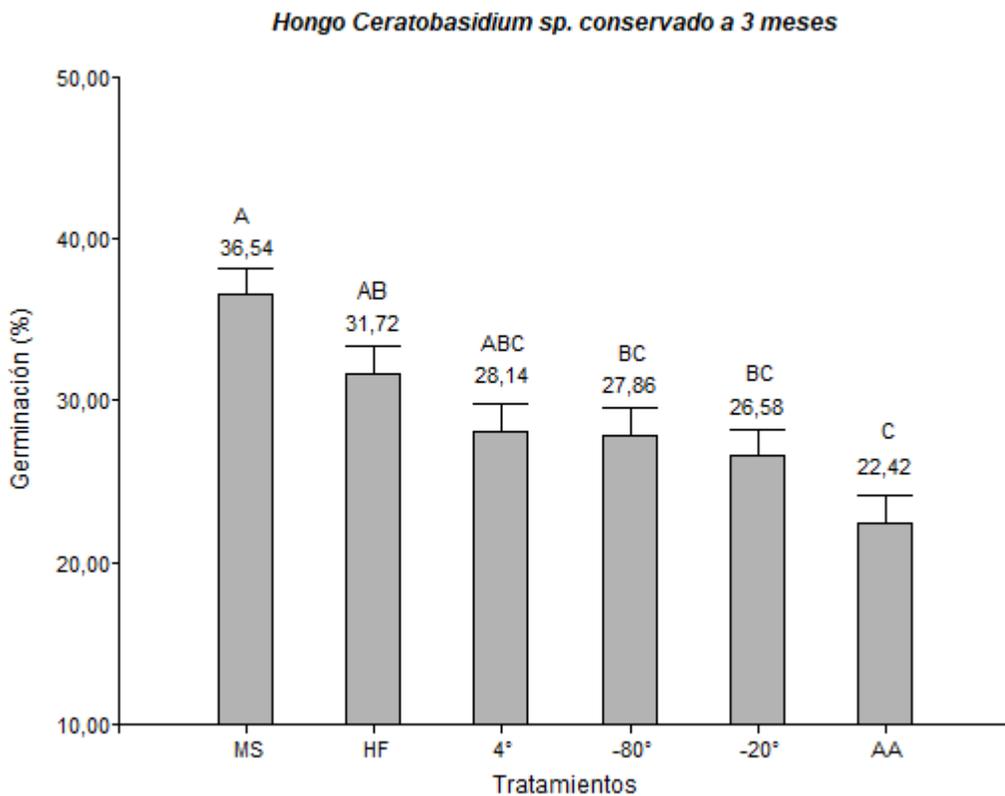


Figura 11. Germinación de semillas de orquídea *Epidendrum sp.* bajo diferentes tratamientos: hongo *Ceratobasidium sp.* encapsulado en perlas de alginato conservado a 4°C, -20°C y -80°C durante 3 meses. Hongo fresco (HF). Control (AA). Murashige & Skoog (MS). Se aplicó un ANOVA unidireccional y una prueba complementaria de Tukey para diferenciar estadísticamente a los tratamientos, cada letra representa los diferentes rangos. Las barras representan la media \pm error estándar (n=10).

6.3.2 Ensayo 2 (9 meses de almacenamiento)

La semilla presentó un efecto positivo frente a todos los tratamientos y refleja los resultados de la prueba de viabilidad (Figura 12).

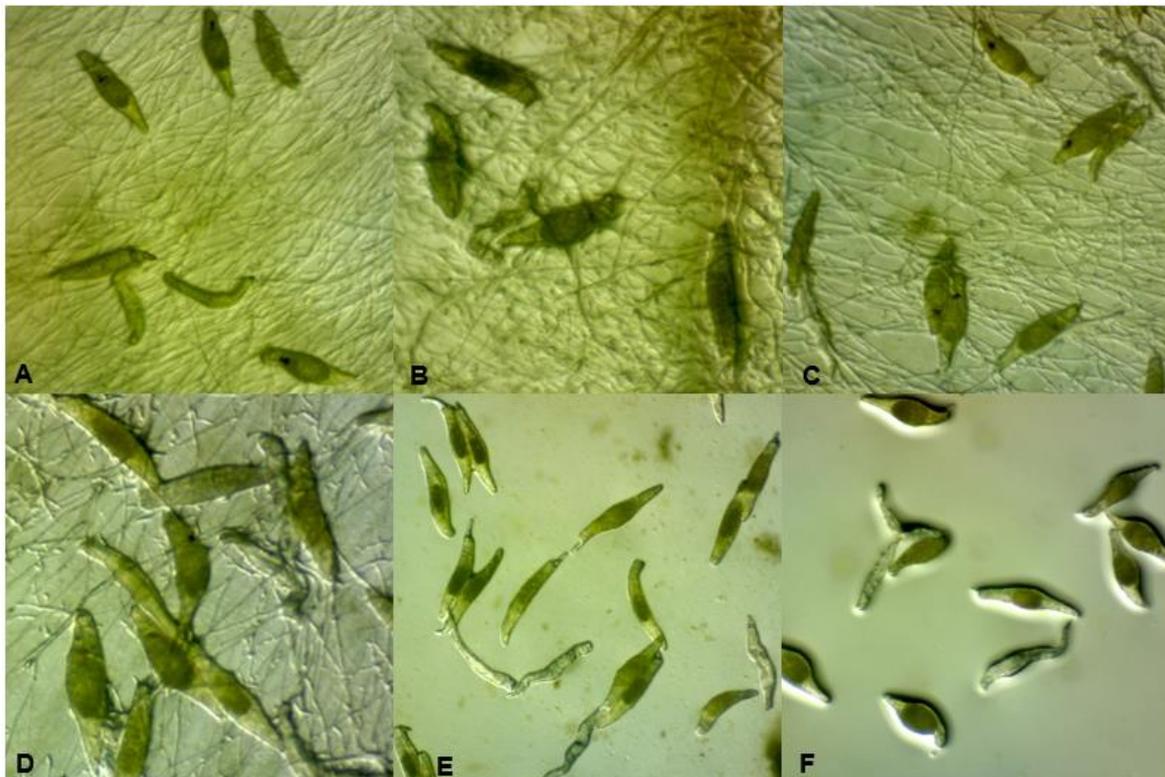


Figura 12. Germinación de semillas de *Epidendrum sp.* luego de 8 semanas de la siembra a diferentes tratamientos. **A.** Semillas con *Ceratobasidium sp.* conservado a 4°C durante 9 meses. **B.** Semillas con *Ceratobasidium sp.* conservado a -20°C durante 9 meses. **C.** Semillas con *Ceratobasidium sp.* conservado a -80°C durante 9 meses **D.** Semillas con *Ceratobasidium sp.* tratamiento hongo fresco (HF). **E.** Semillas en medio avena-agar, control sin hongo (AA). **F.** Semillas en medio Murashige & Skoog (MS).

Los resultados obtenidos en la implementación de este ensayo presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0,0001$) (Anexo 12). El tratamiento que destacó en este ensayo fue HF con un porcentaje de 43,45 % de germinación (n=10), seguido del control positivo (MS) con un porcentaje de 41,66 % de germinación (n=10), según la prueba de Tukey obtenida, cabe recalcar

que tanto HF como MS no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p>0,01$). Por otra parte, los valores de porcentaje de germinación del resto de tratamientos: conservación a 4°C, -20°C, -80°C y control negativo (AA) no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p>0,01$). El tratamiento conservación a 4°C presentó un porcentaje de germinación ($n=10$), seguido por el tratamiento de conservación a -80°C con 29,29 % de germinación ($n=10$), y el control negativo (AA) con un porcentaje de germinación ($n=10$). Finalmente, el tratamiento que presentó el menor porcentaje de germinación fue la conservación a -20°C con un valor de 27,53 % de germinación ($n=10$), aún más bajos que un control negativo (AA) (Figura 13), sin embargo, estadísticamente similar al compararlo con los tratamientos 4°C, -80°C y control negativo (AA).

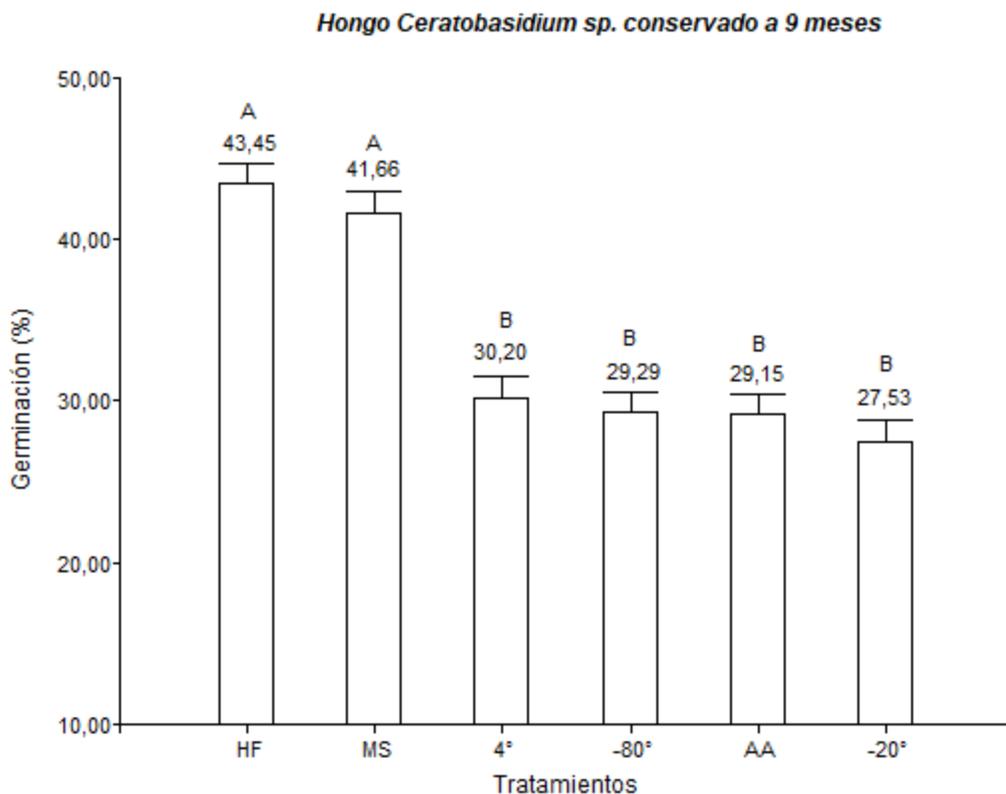


Figura 13. Germinación de semillas de orquídea *Epidendrum sp.* bajo diferentes tratamientos: hongo *Ceratobasidium sp.* encapsulado en perlas de alginato conservado a 4°C, -20°C y -80°C durante 9 meses. Hongo fresco (HF). Control (AA). Murashige & Skoog (MS). Se aplicó un ANOVA unidireccional y una prueba complementaria de Tukey para diferenciar estadísticamente a los tratamientos, cada letra representa los diferentes rangos. Las barras representan la media \pm error estándar (n=10).

6.3.3 Ensayo 3 (33 meses de almacenamiento)

La semilla presentó un efecto positivo frente a todos los tratamientos y refleja los resultados de la prueba de viabilidad (Figura 14).

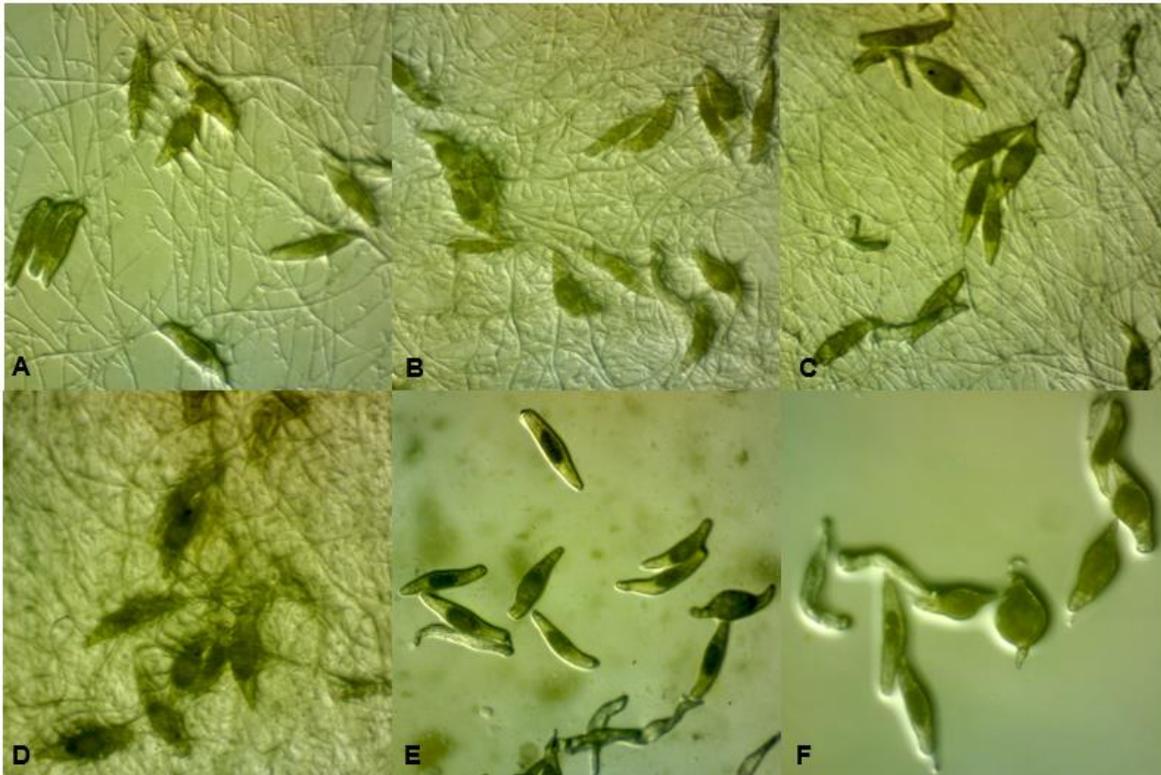


Figura 14. Germinación de semillas de *Epidendrum sp.* luego de 8 semanas de la siembra a diferentes tratamientos. **A.** Semillas con *Ceratobasidium sp.* conservado a 4°C durante 33 meses. **B.** Semillas con *Ceratobasidium sp.* conservado a -20°C durante 33 meses. **C.** Semillas con *Ceratobasidium sp.* conservado a -80°C durante 33 meses **D.** Semillas con *Ceratobasidium sp.* tratamiento hongo fresco (HF). **E.** Semillas en medio avena-agar, control sin hongo (AA). **F.** Semillas en medio Murashige & Skoog (MS).

Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,0001$) (Anexo 13). El tratamiento que destacó en este ensayo fue el control positivo (MS) con un porcentaje de 42,66 % de germinación (n=10), seguido del tratamiento HF con un porcentaje de 39,41 % de germinación (n=10), según la prueba de Tukey obtenida, los tratamientos HF como MS no presentaron

diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p > 0,01$). De la misma manera, los valores de porcentaje de germinación del resto de tratamientos: conservación a 4°C, -20°C, -80°C y control negativo (AA) no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p > 0,01$), sin embargo, el tratamiento que presentó el valor más bajo de germinación fue el control (AA) con el 27,62 % (n=10) (Figura 15).

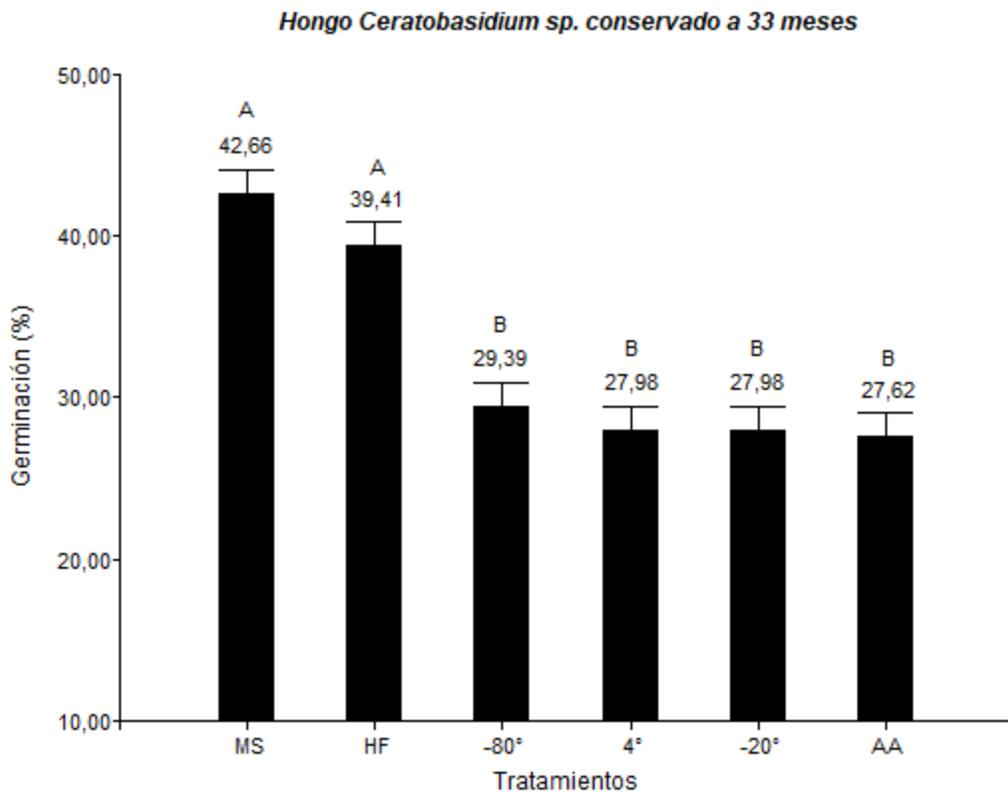


Figura 15. Germinación de semillas de orquídea *Epidendrum* sp. bajo diferentes tratamientos: hongo *Ceratobasidium* sp. encapsulado en perlas de alginato conservado a 4°C, -20°C y -80°C durante 33 meses. Hongo fresco (HF). Control (AA). Murashige & Skoog (MS). Se aplicó un ANOVA unidireccional y una prueba complementaria de Tukey para diferenciar estadísticamente a los tratamientos, cada letra representa los diferentes rangos. Las barras representan la media \pm error estándar (n=10).

Tabla 2. Estados de desarrollo de la semilla (%) a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento. (HF) hongo *Ceratobasidium* sp. fresco. (AA) medio de cultivo avena agar, control negativo. (MS) medio de cultivo Murashige & Skoog, control positivo.

Tratamientos	Estado de desarrollo de la semilla (%)		
	Estado 0	Estado 1	Estado 2
3 meses			
4° C	71,86	28,14	0
-20° C	73,42	26,58	0
-80° C	72,14	27,86	0
HF	68,28	31,72	0
AA	77,58	22,42	0
MS	63,46	36,39	0,15
9 meses			
4° C	69,80	30,20	0
-20° C	72,47	27,53	0
-80° C	70,71	29,29	0
HF	56,55	43,45	0
AA	70,73	29,28	0
MS	58,25	41,36	0,39
33 meses			
4° C	72,02	27,98	0
-20° C	72,02	27,98	0
-80° C	70,61	29,39	0
HF	60,59	39,41	0
AA	72,38	27,62	0
MS	57,34	42,33	0,33

7. Discusión

7.1 Objetivo específico 1: Determinar la viabilidad del hongo *Ceratobasidium* sp. encapsulado en perlas de alginato y conservado a 4, -20 y -80°C luego de 3, 9 y 33 meses.

El hongo se reactivó en todas las temperaturas y tiempos de almacenamiento, con lo que se pudo comprobar su viabilidad, en el caso de los ensayos almacenados por 3 y 9 meses, los tratamientos dentro de cada tiempo de almacenamiento no fueron estadísticamente diferentes entre sí. Por el contrario, en el ensayo de almacenamiento por 33 meses, los tratamientos a -20 y -80°C, fueron

estadísticamente diferentes superando en crecimiento al tratamiento de almacenamiento a 4°C lo que se asemeja a los resultados presentados por López et al. (2021) quienes reportan reducción en el vigor de crecimiento del hongo almacenado a 4°C, aunque por un tiempo más prolongado. En el caso específico del almacenamiento a 4°C por 33 meses, el crecimiento podría verse reducido por un efecto conjunto de la temperatura y el doble encapsulamiento ya que estas cepas se obtuvieron del refrescamiento de hongos previamente encapsulados, sin embargo, solo redujeron su vigor de crecimiento inicial, pero fueron viables. Ordóñez (2017), este autor señala que la encapsulación con perlas de alginato del hongo *Ceratobasidium* sp. y su almacenamiento a 4°C durante 3 meses permitió su reactivación, luego de 2 semanas de la siembra en medio PDA. CIAT (1980), recomiendan el uso de temperaturas de refrigeración entre 4 °C y 10 °C, ya que registraron viabilidad de los hongos (*Rhizopus* sp, *Chaetomium* sp, *Alternaria* sp y *Pythium* sp) luego de 60 días de conservación, debido a la inhibición de los procesos metabólicos de los hongos.

Por su parte, Pinzón et al. (2009), conservaron los hongos fitopatógenos *Colletotrichum* y *Fusarium* a -80 °C durante 5 meses, reportando una variación en la viabilidad probablemente debido a la fase de adaptación de las células frente a las condiciones medioambientales, lo mismo sucede con los resultados de Batty et al. (2001), quienes conservaron hongos micorrízicos de orquídeas a -196 °C en nitrógeno líquido y experimentaron una breve fase de retraso por la recuperación del daño causado durante la congelación y descongelación. En nuestro trabajo, la sacarosa usada durante el secado de las perlas de alginato de sodio brinda una fuente de alimento rápido para los hongos encapsulados (Sommerville et al., 2008), lo que justifica la ausencia de este tipo de variaciones en la viabilidad del hongo, también se observó que la sacarosa acelera el desarrollo del micelio durante los primeros 8 días (López et al., 2021).

Lalaymia et al. (2013), aplicaron un almacenamiento a 4°C en propágulos de hongos micorrízicos arbusculares producidos in vivo y encapsulados en perlas de alginato, antes de la aplicación en el campo, reportando que la viabilidad e infectividad del propágulo disminuyó luego de 20 meses de almacenamiento, de igual manera, Plenchette y Strullu (2003), mencionan que con el hongo *Glomus intrarradices* que fue encapsulado en perlas de alginato y almacenado a 4 °C tuvo una infectividad reducida después de 62 meses de almacenamiento. Contrario a esto, estudios de Mugnier y Mosse (1987) encontraron que el almacenamiento de hongos cultivados in vivo de *Glomus mosseae* bajo soluciones salinas saturadas a 4 °C mantuvo la viabilidad durante al menos 4 años.

López et al. (2021), agregan que las temperaturas de almacenamiento de 4°C hasta por 6 meses y de -20°C y -80°C hasta por 22 meses no tuvieron efectos significativos en la viabilidad de *Ceratobasidium* sp. encapsulado en perlas de alginato, lo que concuerda con nuestros resultados e indica que la viabilidad del hongo no se pierde a -20°C y -80°C hasta por 33 meses (López et al., 2021). Lalaymia et al., (2012), mencionan que la duración del almacenamiento a -130°C después de 1 mes de encapsulación y secado del hongo *Rhizophagus* sp.

no afectó su viabilidad, pese a que nuestro experimento no fue igual, concuerda con los resultados al usar temperaturas bajas (-80°C) para la conservación.

7.2 Objetivo específico 2: Evaluar la actividad promotora de la germinación del hongo *Ceratobasidium sp.* encapsulado en perlas de alginato y conservado a 4,-20 y -80 °C luego de 3, 9 y 33 meses.

En todos los ensayos, a los 3, 9 y 33 meses, se observó un patrón similar en donde el hongo fresco destacó con los porcentajes de germinación más altos y estadísticamente diferentes a los demás tratamientos de conservación a excepción del tratamiento en medio MS, con el cual se mostró similar en todos los ensayos. A los 9 y 33 meses, los resultados fueron muy claros, sin embargo, cuando los hongos se almacenaron por 3 meses, los resultados obtenidos a 4°C se agruparon dentro del mismo rango estadístico que el del hongo fresco y el MS, éstos resultados se explican posiblemente por la reactivación previa de los hongos durante su multiplicación para la obtención del micelio previo a la encapsulación, y que en el caso de la conservación a 4°C, produjo solo una reducción y no una detención del metabolismo como probablemente ocurrió en los tratamientos a -20 y -80°C. No obstante, es importante mencionar que el resultado obtenido a 4°C también fue estadísticamente similar al resto de tratamientos con menor germinación que la del Hongo fresco y el MS. En general, los resultados concuerdan con Sommerville et al. (2008), quienes encapsularon semilla con el hongo *Pterostylis saxicola*, correspondiente a una especie de *Ceratobasidium*, y los conservaron durante 6 meses a temperaturas de 4°C, -18°C y -196 °C sin presentar efectos significativos en la germinación, sin embargo, los mismos autores reportan que el potencial de germinación al parecer estaba ligeramente reducido en las perlas conservadas a 4°C. Por el contrario, Wood et al. (2000), afirman que el almacenamiento de *Ceratobasidium cornigerum* a -20°C en tan sólo 30 días, redujo la viabilidad y germinación de hongos de manera crítica, esto contrasta con los resultados obtenidos, ya que a pesar de registrarse una reducción en la actividad promotora de la germinación en comparación con la del hongo fresco en todos los ensayos, la germinación se ve favorecida con la presencia del hongo aunque no se evidencian diferencias estadísticas con el tratamiento control ($p>0,01$). En el trabajo de Wood et al. (2000), posiblemente la encapsulación conjunta de la semilla y el hongo pudo influir en la viabilidad de la semilla (López et al., 2021).

Sommerville et al. (2008), demostraron que las semillas de orquídea y el hongo encapsulados pueden almacenarse durante un periodo de 6 meses a temperaturas de -18°C y -196 °C, sin pérdida de viabilidad y la germinación dependía de manera primordial del mantenimiento de la viabilidad del hongo. Sin embargo, los resultados de esta investigación demostraron que es posible la encapsulación del hongo (sin la semilla) durante 33 meses, pese a existir una disminución de la actividad promotora del hongo, en comparación con un hongo fresco, la viabilidad de este no se ve afectada, además, el uso únicamente del hongo encapsulado podría ser más conveniente ya que ayudaría a la conservación de varias especies de orquídeas y no se enfocaría únicamente a una sola especie (López et al., 2021).

En el estudio de Zettler y Dvorak (2021), utilizaron un método de conservación que consistió en el recultivo prolongado por 20 años, con refrescamientos cada 3 y 6 meses, obteniendo así un porcentaje de germinación de semillas de *Spiranthes cernua* del 33,7% con el hongo *Tulasnella calospora*, los resultados de nuestro estudio sugieren que inducir una simbiosis previa a la utilización del hongo, podría mejorar los resultados de la germinación simbiótica, sin embargo implican más trabajo, al momento de aislarlo nuevamente, sin embargo, la germinación simbiótica *in vitro* podría ser una alternativa viable y de fácil manejo para mantener al hongo activo.

Los resultados demostraron que la encapsulación en alginato podría ser un método exitoso para la conservación de *Ceratobasidium* sp. durante periodos de tiempo de hasta 33 meses y de acuerdo con López et al. (2021), existe la posibilidad de un almacenamiento por periodos más prolongados. Kim et al. (2019), aseguran que el almacenamiento a temperatura ambiente luego de 6 meses no es recomendable debido a que la viabilidad del hongo disminuye de manera significativa y que para periodos de tiempo más largos se pierde completamente la viabilidad del mismo, por consiguiente, es importante tomar en cuenta la temperatura de almacenamiento ya que este factor es la clave para el éxito de la conservación de hongos micorrízicos.

La conservación de hongos micorrízicos mediante el protocolo de encapsulación-deshidratación puede ser de importancia para inocular lugares donde se pretenda mejorar o restaurar la población de orquídeas, también podría aplicarse a otros hongos de interés y se ha recomendado como una estrategia importante para el desarrollo de investigaciones de inoculación de hongos a gran escala y para el mantenimiento de grandes colecciones (Plenchette & Strullu 2003). Se demostró de esta manera que el método de encapsulación no solo es efectivo como una forma de conservar la viabilidad del hongo, sino que además conserva la capacidad simbiótica (Sommerville et al., 2008). Finalmente, la conservación por encapsulados de alginato es de fácil manejo dentro de laboratorio, debido a que no requiere de gran espacio para trabajarlos, transportarlos o almacenarlos, el protocolo es fácil de implementar, pese al uso de equipos específicos para la encapsulación, estos no son esenciales y se puede realizar con tipo de pipeta estándar de laboratorio (Plenchette & Strullu 2003).

8. Conclusiones

En conclusión, nuestra investigación demuestra la viabilidad del hongo *Ceratobasidium* sp. encapsulado en perlas de alginato hasta por 33 meses en las tres temperaturas de almacenamiento (4, -20 y -80°C), a 4°C durante 3 meses se registró un mayor crecimiento, posiblemente por la reactivación previa y solo reducción del metabolismo, así mismo, esto demuestra la importancia de las interacciones bióticas y abióticas en la actividad promotora de la germinación de este hongo.

En el caso de los ensayos de 9 y 33 meses, la temperatura presentó mayor vigor en el crecimiento, fue la de -80°C , sin que las diferencias sean significativas entre las temperaturas demostrando así que la viabilidad del crecimiento micelial del hongo se mantiene al conservarlo en perlas de alginato a cualquiera de las temperaturas evaluadas y hasta por 33 meses, sin embargo, el crecimiento más vigoroso se observó en los hongos conservados a -80°C .

El efecto promotor de la germinación, en todos los casos fue superior en el tratamiento en el que se usó el hongo fresco (HF), en comparación con el resto de tratamientos, y en todos los tiempos de conservación, siendo el tratamiento HF comparable al tratamiento con el medio rico en sacarosa (MS), lo que evidencia un efecto positivo de la interacción planta-hongo previo a su inoculación en la germinación simbiótica de *Epidendrum* sp.

9. Recomendaciones

Es recomendable realizar una comparación en la viabilidad (crecimiento micelial) de hongos conservados frente a un hongo fresco para obtener resultados más claros con respecto a su viabilidad.

Para futuros estudios se recomienda extender el tiempo de evaluación en cuanto a la germinación debido a que así las semillas puedan lograr alcanzar otros estados de germinación.

Sería adecuado realizar un estudio similar con distintos géneros de orquídeas y sus simbiontes con el fin de enriquecer los datos de conservación y germinación de acuerdo con cada especie.

Se recomienda realizar estudios en combinación de hongos de otras especies de orquídeas.

10. Referencias Bibliográficas

- ADESPER. Agrupación para el desarrollo sostenible y la promoción del empleo rural. (2007). *Conservación hongos*.
- Alexander, C. & Hadley, G. (1983). Variation in symbiotic activity of *Rhizoctonia* isolates from *Goodyera repens* mycorrhizas. *Transactions of the British Mycological Society*, 80(1), 99-106.
- Álvarez, C. (2012). Identificación y caracterización bioquímica, morfológica y molecular de microorganismos cultivables asociados a la rizosfera y al sustrato de plantas de vainilla. Maestría en Ciencias geomorfología y suelos. *Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín*.
- Ángel, D. (2006). Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de grado en Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. *Facultad de Ciencias. Bogotá, DC*.
- Batty, A., Dixon, K., Brundrett, M., & Sivasithamparam, K. (2001). Long-term storage of mycorrhizal fungi and seed as a tool for the conservation of endangered Western Australian terrestrial orchids. *Australian Journal of Botany*, 49 (5), 619-628.
- Bermeo, C. & Sari, F. (2018). Simbiosis Hongo – Micorriza como factor promotor de la germinación en semillas de orquídeas del género *Epidendrum* . *Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Químicas. Cuenca*
- Bernard, N. (1909). L'evolution dans la symbiose des orchideés et leu champi gnons commensaux. *Ann Sci Nat Paris* 9: 1–196.
- Bezerra, C., Lima, R., Lazera, M., Wanke, B., Borba, C. (2006). Viability and molecular authentication of *Coccidioides immitis* strains from Culture Collection of the Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39 (3): 241-244.

- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). (1980). Técnicas para el aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cali-Colombia*.
- Daniels, B. A. and Trappe J. M. (1980) Factors affecting spore germination of the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus epigaeus*. *Mycologia*. 72: 457-471.
- Datta, K., Kanjilal B., & De Sarker, D. (1999). Artificial seed technology: development of a protocol in *Geodorum densiflorum* (Lam) Schltr. *Current Science* 76, 1142–1145
- Dearnaley, J. (2007). Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza* 17, 475–486.
- Declerck, S., Séguin, S., & Dalpé, Y. (2005). The monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi as a tool for germplasm collections. *In vitro culture of mycorrhizas* (pp. 17-30). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Douds, D., & Schenck, N. (1990). Cryopreservation of spores of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 115:667–674
- Durán, M., Caroca, R., Jahreis, K., Narvaez, M., Ansaloni, R., & Cazar, M. (2019). The mycorrhizal fungi *Ceratobasidium* sp. and *Sebacina vermifera* promote seed germination and seedling development of the terrestrial orchid *Epidendrum secundum* Jacq. *South African Journal of Botany*, 125, 54-61.
- Engelmann, F, (2004). Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. Plant 40, 427-433.
- Ercole, E., Rodda, M., Molinatti, M., Voyron, S., Perotto, S. & Girlanda, M. (2013). Cryopreservation of orchid mycorrhizal fungi: A tool for the conservation of endangered species. *Journal of microbiological methods*, 93 (2), 134-137.
- Flores, O. (2010). Determinación de iones Ca^{++} mediante el método de espectroscopía de absorción atómica (EAA) en cápsulas de alginato. Tesis

de pregrado. *Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Químicas, Orizaba, Veracruz.*

- García, M., Zúñiga, M., & Uruburu, F. (1991). Métodos directos de medida del crecimiento microbiano. *Alimentaria*, (225), 31-34.
- Hadley, G. (1989). The role of mycorrhizae in orchid propagation. *North American native terrestrial orchid propagation and production*. (Ed. CE Sawyers) pp, 15-24.
- Hoang, N., Kane, M., Radcliffe, E., Zettler, L. & Richardson, L. (2017). Comparative seed germination and seedling development of the ghost orchid, *Dendrophylax lindenii* (Orchidaceae), and molecular identification of its mycorrhizal fungus from South Florida. *Annals of botany*, 119(3), 379-393.
- Homolka, L. (2014). Preservation of live cultures of basidiomycetes-Recent methods. *Fungal Biology*, 118(2), 107–125.
- Hoyos, L. & Rodríguez, A. (2013). Aislamiento de micorrízicas en seis especies de orquídeas nativas del Ecuador para la elaboración de un biofertilizante potencialmente útil en rusticación de orquídeas. *Universidad politécnica salesiana*, 1-131.
- Jiang, H., Chen, M. & Lee, Y. (2017). In vitro germination and low-temperature seed storage of *Cypripedium lentiginosum* P.J.Cribb & S.C.Chen, a rare and endangered lady's slipper orchid. *Scientia Horticulturae*, 225, 471–479.
- Johnson, T., Stewart, S., Dutra, D., Kane, M. & Richardson, L. (2007). Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae)—preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. *Plant cell, Tissue and organ culture*, 90(3), 313-323.
- Kim, J., Lee, M., Kim, S., Lee, S., Park, S., Baek, S., Gasmi, L., Shin, T. & Kim, J. (2019). Longterm storage stability of *Beauveria bassiana* ERL836 granules as fungal biopesticide. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 22(2), 537–542.
- Kottke, I. & Suárez, J. P. (2009). Mutualistic, root-inhabiting fungi of orchids identification and functional types. In Proc. Second Scientific Conf. on Andean

Orchids (eds A. M. Pridgeon & J. P. Suárez), pp. 84–99. Loja, Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja. (ISBN 978-9942- 00-502).

Kottke, I., Setaro, S., Haug, I., Herrera, P., Cruz, D., Fries, A., & Suárez, J. P. (2013). Mycorrhiza networks promote biodiversity and stabilize the tropical mountain rainforest ecosystem: perspectives for understanding complex communities. In *Ecosystem services, biodiversity and environmental change in a tropical mountain ecosystem of south Ecuador* (pp. 187-203). Springer, Berlin, Heidelberg.

Kuszala, C., Gianinazzi, S., Gianinazzi, V. (2001). Storage conditions for the long-term survival of AM fungal propagules in wet sieved soil fractions. *Symbiosis* 30:287–299.

Lalaymia, I., Cranenbrouck, S., Draye, X., & Declerck, S. (2012). Preservation at ultra-low temperature of in vitro cultured arbuscular mycorrhizal fungi via encapsulation–drying. *Fungal biology*, 116 (10), 1032-1041.

Lanoiselet, V., Cother, E., & Ash, G. (2007). Mancha de vaina agregada y mancha de vaina de arroz. *Protección de cultivos*. 26 (6): 799–808.

Lemay, M., De Vriendt, L., Pellerin, S., & Poulin, M. (2015). Ex situ germination as a method for seed viability assessment in a peatland orchid, *Platanthera blephariglottis*. *American Journal of Botany*, 102(3), 390-395.

López, Q., Castro, C., Curillo, D., Chica, E., Portilla, J. & Peña, D. (2021). Viability and infectivity of *Ceratobasidium* encapsulated in alginate beads under different storage conditions. *Lankesteriana*, 333-340.

Luan, V. (2006). In vitro germination capacity and plan recovery of some native and easy orchids. 20(21), 175-177.

Martínez, L. & Pugnaire, F. (2009). Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Algunos ejemplos en los ecosistemas semiáridos. *Ecosistemas*, 18(2).

- Medina, M. & Serrano, M. (2012). Crioconservación: herramienta para la conservación ex situ de material vegetal. *Cuadernos de Biodiversidad*. N. 38. ISSN 1575-5495, pp. 9-12.
- Mosquera, A., Bayman, P. & Otero, J. (2010). *Ceratobasidium* como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia. Universidad Nacional de Colombia, 1-11.
- Mugnier, J. & Mosse, B. (1987) Spore germination and viability of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae*. *Trans Br Mycol Soc* 88:411–413.
- Murray, D., & Burpee, L. (1984). *Ceratobasidium cereale* sp.nov., el teleomorfo de *Rhizoctonia cerealis*. *Transacciones de la British Mycological Society*. 82: 170–172.
- Nadarajan, J. Mansor, M. Krishnapillary, B. Staines, H. Benson, E. & Harding, K. (2008). Critical vitrification steps towards survival of *Garcinia hombroniana* (*Clusiaceae*) shoot tips after cryopreservation. *CryoLetters* 29, 95-110.
- Ogoshi, A. (1987). Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Annual review of phytopathology*, 25(1), 125-143.
- Olalde, V. & Aguilera, L. (1998). Microorganismos y biodiversidad. *Terra*, 16(3), 289-292.
- Ordóñez, A. (2017). Desarrollo de un prototipo de producto bio-estimulante para el crecimiento de orquídeas basado en hongos micorrízicos. Loja-Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja-Área Biológica y Biomédica.
- Ordoñez, L., Pillacela, D., Salazar, J. & Peña, D. (2016). Especificidad del hongo micorrízico (*Rhizoctonia* sp.) en *Phalaenopsis* sp., *Cymbidium* sp., *Trichoceros antenifer*, *Oncidium excavatum*, y *Cyrtochilum* sp. *Maskana*, Vol 7, No. 1, 2016.
- Ordóñez, N., Otero, J. & Díez, M. (2012). Orchid endophytes and their effect on growth in *Vanilla planifolia* Andrews. *Acta Agronómica*, 61(3), 282-290.

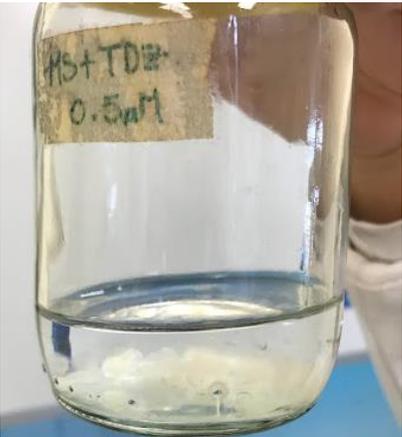
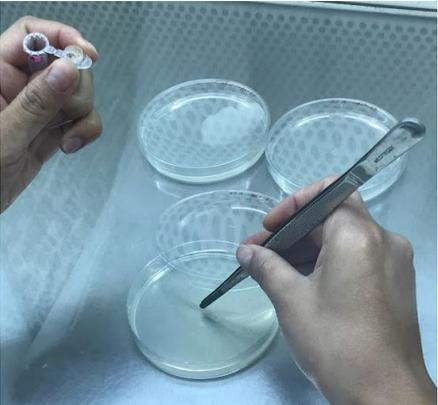
- Otero, J., Ackerman, J., & Bayman, P. (2007). Diversity and host specificity of endophytic Rhizoctonia-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*, 89 (11), 1852-1858.
- Pacheco, A., Ruíz, E., Ballina, S. & Alvarado, J. (2017). Does polymer-based encapsulation enhance performance of plant growth promoting microorganisms? A meta-analysis view. *Agrociencia*, 51(2), 173–187.
- Panizo, M., Reviákina, V., Montes, W. & González, G. (2005). Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 25 (1).
- Pereira, O., Rollemberg, C., Borges, A., Matsuoka, K. & Kasuya, M. (2003). *Epulorhiza epiphytica* sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. *Mycoscience* 44:153 - 155.
- Pérez, O., Chomicki, G., Condamine, F., Karremans, A., Bogarín, D., Matzke, N., Silvestro, D. & Antonelli, A. (2017). Recent origin and rapid speciation of Neotropical orchids in the world's richest plant biodiversity hotspot. *New Phytologist*, 215(2).
- Pinzón, Y., Bustamante, S. & Buitrago, G. (2009). Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 8-18.
- Plenchette, C. & Strullu, D. (2003) Long-term viability and infectivity of intraradical forms of *Glomus intraradices* vesicles encapsulated in alginate beads. *Mycol Res* 107:614–616.
- Püschel, D., Kolaříková, Z., Šmilauer, P., & Rydlova, J. (2019). Survival and long-term infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in peat-based substrates stored under different temperature regimes. *Applied Soil Ecology*, 140, 98-107.
- Roberts, P. (1999). Hongos formadores de Rhizoctonia. *Real Jardín Botánico*. 239.
- Rodríguez, C., Del Valle, E. & Galán, M. (2011). Development of a new technique to generate microcapsules from the breakup of non-Newtonian highly viscous fluid jets. *AIChE Journal*, 57(12), 3436–3447.

- Rogers, D. (1935). Notas sobre los basidiomicetos inferiores. *Estudios de Historia Natural de la Universidad de Iowa*. 17:34–43.
- Sakari, A. (2000). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm*. *Current Research Progress and Application*, Engelmann F, et al. (eds). JIRCAS, Tsukuba, Japan and IPGRI, Rome. pp 1-8.
- Sakari, A. Hirai, D. & Niino, T. (2008). *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*, Reed B (ed), Springer, New York. pp. 33-57.
- Salazar, J., Pomavilla, M., Pollard, A., Chica, E., & Peña, D. (2020). Endophytic fungi associated with roots of epiphytic orchids in two Andean forests in Southern Ecuador and their role in germination. *Lankesteriana*, 37-47.
- Sánchez, L. & Corrales, L. (2005). Congelación bacteriana: factores que intervienen en el proceso. *Nova* 3 (3): 109-113.
- Santos, M., Trufem, S. & De Oliveira, P. (2005). Sexual reproduction in subcultures of *Absidia blakesleeana* after years of preservation under mineral oil. *Revista Iberoamericana de Micología* 22: 174-176.
- Snech B., Burpee, L. & Ogoshi, A. (1991). Identification of *Rhizoctonia* Species. *The American Phytopathological Society*, 133. St. Paul, Minnesota, USA.
- Sommerville, K., Siemon, J., Wood, C. & Offord, C. (2008). Simultaneous encapsulation of seed and mycorrhizal fungi for long-term storage and propagation of terrestrial orchids. *Australian Journal of Botany*, 56(7), 609-615.
- Strullu, D. & Plenchette, C. (1991) The entrapment of *Glomus* sp. in alginate beads and their use as root inoculum. *Mycol Res* 95: 1194–1196.
- Ulloa, B. (1999). Micorrización en la conservación de los bosques. *Ciencia ergo-sum*, 6(2), 159-164
- UNESCO. (2017). Nomenclatura internacional de UNESCO para los campos de Ciencia y Tecnología. UNESCO.

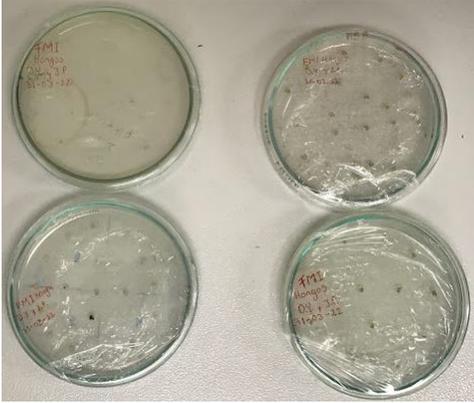
- Van der Heijden, M., Martin, F., Selosse, M. & Sanders, I. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: The past, the present, and the future. *New Phytologist*, 205, 1406–1423.
- Velasco, L., & Pepe, B. (2008). Orquídeas del Parque Natural Sierra de Grazalema. *Junta de Andalucía*, 1-12.
- Vemmer, M. & Patel, A. V. (2013). Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biological Control*, 67(3), 380–389.
- Wood, C., Pritchard, H. & Miller, A. (2000). Simultaneous preservation of orchid seed and its fungal symbiont using encapsulation-dehydration is dependent on moisture content and storage temperature. *Cryo Letters* 21. 125–136.
- Xiang, X., Gai, X., Liu, Q., Hart, M. & Guo, S. (2015). Mycorrhizal fungal diversity and community composition in a lithophytic and epiphytic orchid. 25, 289-296.
- Yooyongwech, S., Cha-Um, S., Tisarum, R., Therawitaya, C., Samphumphung, T., Aumtong, S., Kingkaew, J. & Phisalaphong, M. (2019). Influence of different encapsulation types of arbuscular mycorrhizal fungi on physiological adaptation and growth promotion of maize (*Zea mays* L.) subjected to water deficit. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(1), 213–220.
- Zettler, L. & Hofer, C. (1998). Propagation of the little club-spur orchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications. *Environmental and Experimental Botany*, 39(3), 189-195.
- Zi, X., Sheng, C., Goodale, U., Shao, S. & Gao, J. (2014). In situ seed baiting to isolate germination-enhancing fungi for an epiphytic orchid, *Dendrobium aphyllum* (Orchidaceae). *Mycorrhiza*, 24(7), 487-499.

11. Anexos

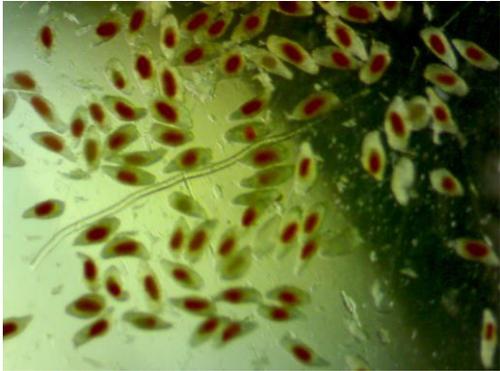
Anexo 1. Elaboración de encapsulados de *Ceratobasidium sp.* en perlas de alginato.

1.- Mezcla homogenizada en agitador magnético.	2.- Proceso de osmosis para la deshidratación en sacarosa.
	
3.- Siembra de las perlas de alginato en cajas Petri que contenía medio PDA.	4.- Fotografía bajo estereomicroscopio de una perla de alginato.
	

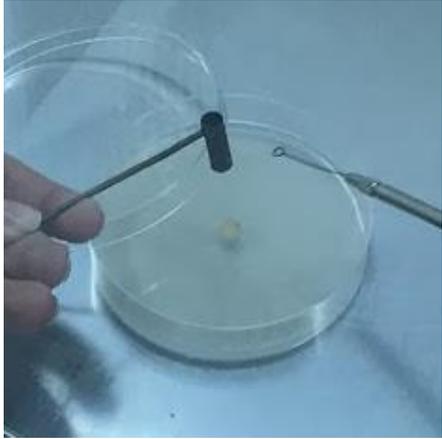
Anexo 2. Aislamiento de *Ceratobasidium* sp. a partir de plantas inoculadas para obtener el hongo fresco.

<p>1.- Obtención del hongo fresco mediante segmentos de raíz de orquídea <i>Epidendrum</i> sp.</p>	<p>2.- Segmentos sembrados en medio de cultivo de aislamiento de hongos.</p>
	
<p>3.- A partir del micelio que se desarrolló se sembraron nuevas placas del aislado en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA).</p>	<p>4.- Identificación bajo estereomicroscopio del micelio de <i>Ceratobasidium</i> sp. teñido con azul de metileno.</p>
	

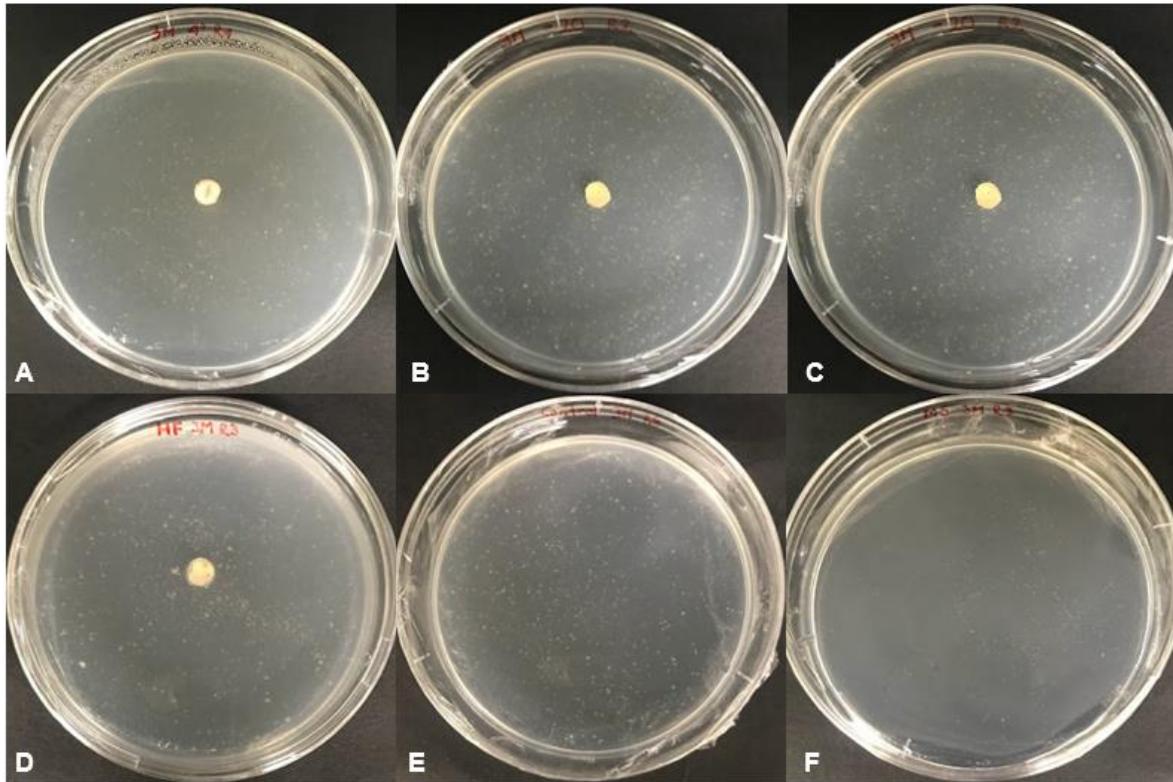
Anexo 3. Evaluación de la viabilidad de las semillas *Epidendrum* sp.

1.- Prueba de viabilidad de las semillas en sales de tetrazolio al 1%.	2.- Semillas teñidas de rojo son consideradas viables.
	

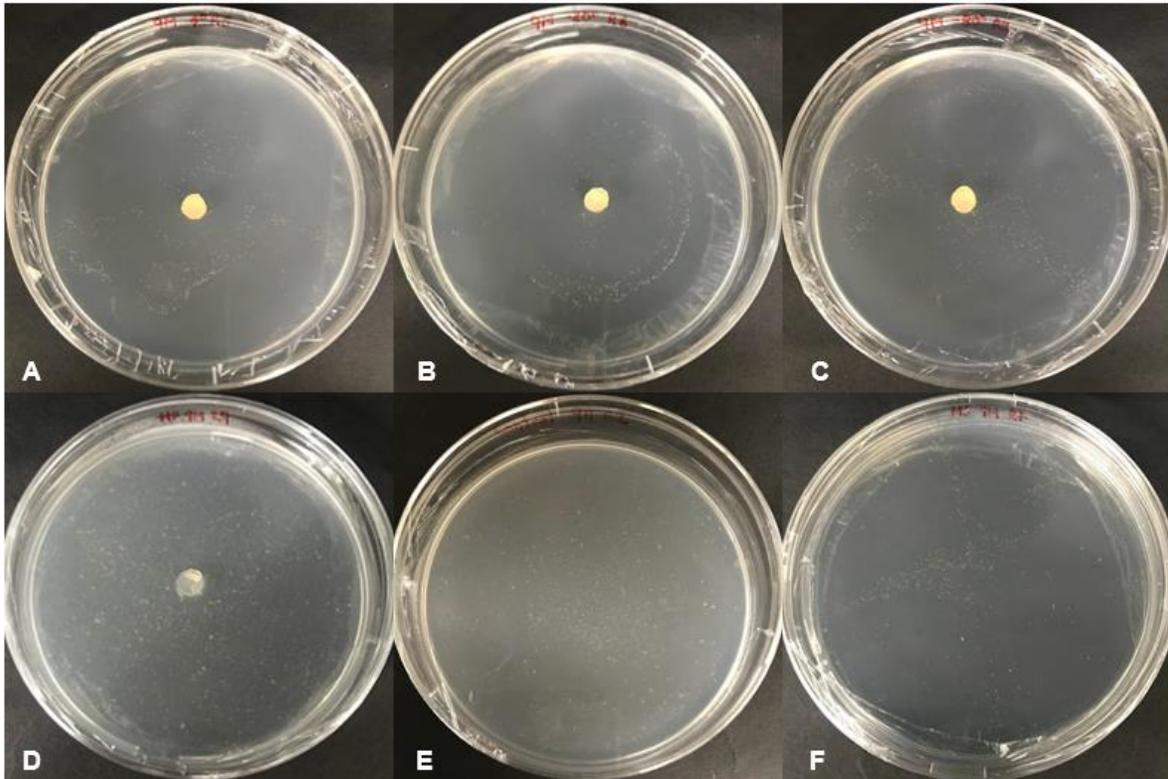
Anexo 4. Establecimiento del ensayo de germinación.

1.- Siembra de semillas de <i>Epidendrum</i> sp. en cajas Petri que contenían medio de cultivo avena agar y medio de Murashige & Skoog (MS).	2.- Siembra de un segmento del micelio del hongo obtenidos a partir de los encapsulados almacenados a diferentes tiempos y temperaturas.
	

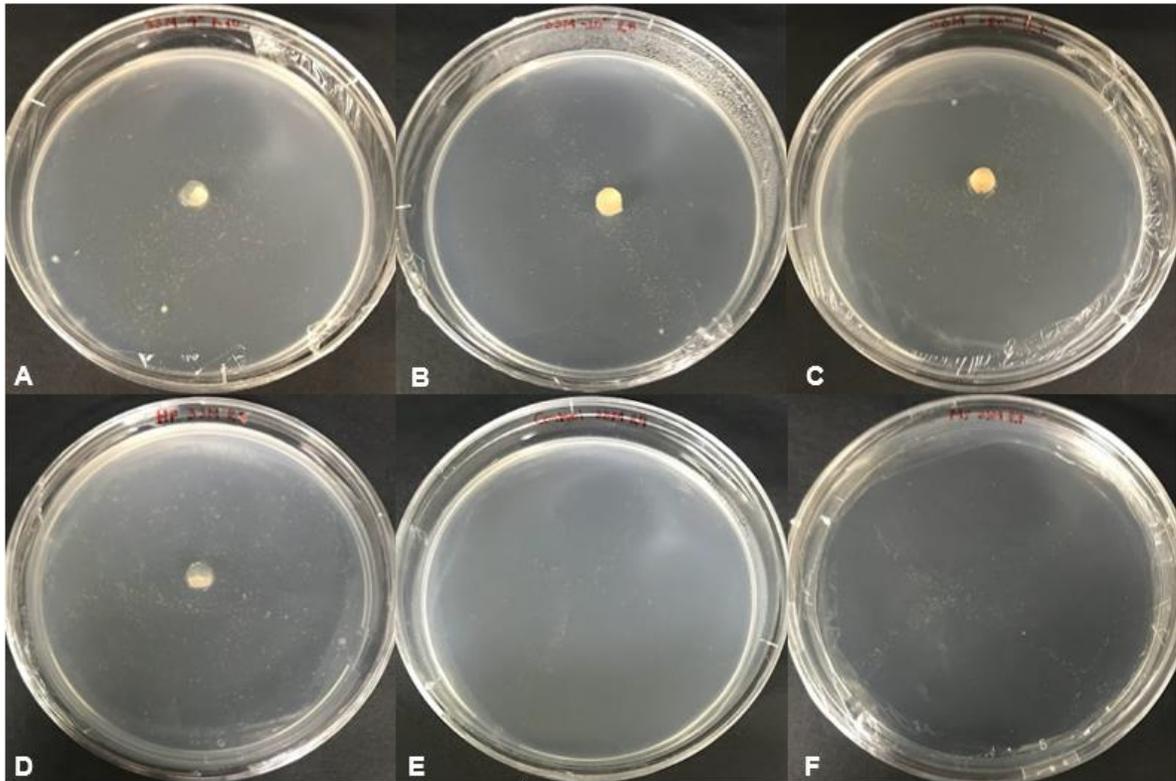
Anexo 5. Ensayos de germinación a 3 meses y a diferentes tratamientos **A.** 4°C **B.** -20°C **C.** -80°C **D.** Hongo Fresco **E.** Control negativo (AA) **F.** Control positivo (MS).



Anexo 6. Ensayos de germinación a 9 meses y a diferentes tratamientos **A.** 4°C **B.** -20°C **C.** -80°C **D.** Hongo Fresco **E.** Control negativo (AA) **F.** Control positivo (MS).



Anexo 7. Ensayos de germinación a 33 meses y a diferentes tratamientos **A.** 4°C **B.** -20°C **C.** -80°C **D.** Hongo Fresco **E.** Control negativo (AA) **F.** Control positivo (MS).



Anexo 8. Resultados del ANOVA del crecimiento micelar y de la prueba de Tukey del hongo *Ceratobasidium* sp. conservado a 3 meses de almacenamiento a diferentes temperaturas, luego de 5 y 8 días de la siembra.

Análisis de la varianza						
Tamaño micelio a los 5 días (cm)						
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV		
Tamaño micelio a los 5 día..	9	0,24	0,00	10,30		
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	0,44	2	0,22	0,97	0,4330	
Tratamiento	0,44	2	0,22	0,97	0,4330	
Error	1,35	6	0,23			
Total	1,79	8				
Test:Tukey Alfa=0,01 DMS=1,73582						
Error: 0,2256 gl: 6						
Tratamiento	Medias	n	E.E.			
-80°	4,77	3	0,27 A			
4°	4,77	3	0,27 A			
-20°	4,30	3	0,27 A			
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,01)						
Tamaño micelio a los 8 días (cm)						
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV		
Tamaño micelio a los 8 día..	9	0,13	0,00	7,97		
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	0,35	2	0,17	0,43	0,6669	
Tratamiento	0,35	2	0,17	0,43	0,6669	
Error	2,41	6	0,40			
Total	2,76	8				
Test:Tukey Alfa=0,01 DMS=2,31799						
Error: 0,4022 gl: 6						
Tratamiento	Medias	n	E.E.			
4°	8,23	3	0,37 A			
-20°	7,83	3	0,37 A			
-80°	7,80	3	0,37 A			
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,01)						

Anexo 9. Resultados del ANOVA del crecimiento micelar y de la prueba de Tukey del hongo *Ceratobasidium* sp. conservado a 9 meses de almacenamiento a diferentes temperaturas, luego de 5 y 8 días de la siembra.

Análisis de la varianza					
Tamaño micelio a los 5 días (cm)					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Tamaño micelio a los 5 día..	9	0,80	0,74	31,81	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	15,17	2	7,58	12,32	0,0075
Tratamiento	15,17	2	7,58	12,32	0,0075
Error	3,69	6	0,62		
Total	18,86	8			
Test:Tukey Alfa=0,01 DMS=2,86755					
Error: 0,6156 gl: 6					
Tratamiento	Medias	n	E.E.		
-80°	3,47	3	0,45	A	
-20°	3,30	3	0,45	A	
4°	0,63	3	0,45	A	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,01)					
Tamaño micelio a los 8 días (cm)					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Tamaño micelio a los 8 día..	9	0,55	0,40	26,70	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	19,28	2	9,64	3,67	0,0908
Tratamiento	19,28	2	9,64	3,67	0,0908
Error	15,74	6	2,62		
Total	35,02	8			
Test:Tukey Alfa=0,01 DMS=5,91977					
Error: 2,6233 gl: 6					
Tratamiento	Medias	n	E.E.		
-80°	7,20	3	0,94	A	
-20°	7,00	3	0,94	A	
4°	4,00	3	0,94	A	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,01)					

Anexo 10. Resultados del ANOVA del crecimiento micelar y de la prueba de Tukey del hongo *Ceratobasidium* sp. conservado a 33 meses de almacenamiento a diferentes temperaturas, luego de 5 y 8 días de la siembra.

Análisis de la varianza						
Tamaño micelio a los 5 días (cm)						
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV		
Tamaño micelio a los 5 día..	9	0,98	0,98	11,00		
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	54,62	2	27,31	189,05	<0,0001	
Tratamiento	54,62	2	27,31	189,05	<0,0001	
Error	0,87	6	0,14			
Total	55,48	8				
Test:Tukey Alfa=0,01 DMS=1,38908						
Error: 0,1444 gl: 6						
Tratamiento	Medias	n	E.E.			
-80°	5,57	3	0,22	A		
-20°	4,80	3	0,22	A		
4°	0,00	3	0,22	B		
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,01)						
Tamaño micelio a los 8 días (cm)						
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV		
Tamaño micelio a los 8 día..	9	0,88	0,84	24,58		
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	90,38	2	45,19	21,82	0,0018	
Tratamiento	90,38	2	45,19	21,82	0,0018	
Error	12,43	6	2,07			
Total	102,80	8				
Test:Tukey Alfa=0,01 DMS=5,25993						
Error: 2,0711 gl: 6						
Tratamiento	Medias	n	E.E.			
-80°	8,50	3	0,83	A		
-20°	7,67	3	0,83	A		
4°	1,40	3	0,83	B		
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,01)						

Anexo 11. Resultados del ANOVA de germinación y de la prueba de Tukey del hongo *Ceratobasidium* sp. conversado a 3 meses a diferentes tratamientos.

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Germinación (%)	60	0,43	0,37	18,53	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1152,30	5	230,46	8,05	<0,0001
Tratamientos	1152,30	5	230,46	8,05	<0,0001
Error	1546,71	54	28,64		
Total	2699,02	59			

Test: Tukey Alfa=0,01 DMS=8,49314
 Error: 28,6429 gl: 54

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
MS	36,54	10	1,69	A
HF	31,72	10	1,69	A B
4°	28,14	10	1,69	A B C
-80°	27,86	10	1,69	B C
-20°	26,58	10	1,69	B C
AA	22,42	10	1,69	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,01)

Anexo 12. Resultados del ANOVA de germinación y de la prueba de Tukey del hongo *Ceratobasidium* sp. conversado a 9 meses a diferentes tratamientos.

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Germinación (%)	60	0,74	0,71	12,10	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2486,03	5	497,21	30,18	<0,0001
Tratamientos	2486,03	5	497,21	30,18	<0,0001
Error	889,77	54	16,48		
Total	3375,80	59			

Test: Tukey Alfa=0,01 DMS=6,44172
 Error: 16,4772 gl: 54

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
HF	43,45	10	1,28	A
MS	41,66	10	1,28	A
4°	30,20	10	1,28	B
-80°	29,29	10	1,28	B
AA	29,15	10	1,28	B
-20°	27,53	10	1,28	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,01)

Anexo 13. Resultados del ANOVA de germinación y de la prueba de Tukey del hongo *Ceratobasidium* sp. conversado a 33 meses a diferentes tratamientos.

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Germinación (%)	60	0,66	0,62	14,38	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2253,17	5	450,63	20,61	<0,0001
Tratamientos	2253,17	5	450,63	20,61	<0,0001
Error	1180,48	54	21,86		
Total	3433,65	59			
Test: Tukey Alfa=0,01 DMS=7,41981					
Error: 21,8608 gl: 54					
Tratamientos	Medias	n	E.E.		
MS	42,66	10	1,48	A	
HF	39,41	10	1,48	A	
-80°	29,39	10	1,48	B	
4°	27,98	10	1,48	B	
-20°	27,98	10	1,48	B	
AA	27,62	10	1,48	B	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,01)					