ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

IASA – I

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE ENDOMICORRIZAS ORQUIDEALES SOBRE DOS ESPECIES HÍBRIDAS EN EL NOROCCIDENTE DE PICHINCHA (MINDO Y PACTO)

FRANCISCO ANTONIO MOLINA SEGOVIA

INFORME DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO AGROPECUARIO

SANGOLQUÍ – ECUADOR

2012

EXTRACTO

Los hongos que forman micorrizas con orquídeas, generalmente son saprófitos independientes o parásitos destructores de otros cultivos, representados principalmente por el género *Rhizoctonia* (Smith, 1963, citado por Oria, 1996; Rasmussen, 1992), lo que evidencia la estrecha especificidad de esta relación. Por estas razones, es importante la búsqueda de tecnologías que aseguren una producción estable de orquídeas, tanto de forma artificial debido a su lenta propagación, como de forma natural, aportándole todas las condiciones de crecimiento necesarias, donde el establecimiento de los biofertilizantes juega un factor importante en la obtención de plantas vigorosas. Se estableció un diseño de bloques completamente al azar en un análisis grupal donde los grupos constituyen las especies y dentro de cada grupo se tiene las inoculaciones con endomicorrizas y el testigo. Las unidades experimentales fueron conformadas cada una por 5 plántulas. Las variables a medir fueron: altura (h), Numero de hojas (H), Aparecimiento de nuevos brotes (B). Los tratamientos que respondieron mejor a las inoculaciones fueron T2 *Masdevallia scitula*, 2 aplicaciones y T5 *Masdevallia coccinea*, 2 aplicaciones, los cuales presentaron mayores % en las variables medidas a comparación de los tratamientos T3 y T6 que fueron los testigos. Los promedios generales de la altura de planta de las orquídeas se fueron incrementando desde 13.96 cm. hasta alcanzar un promedio de 15.07. Los promedios generales del número de hojas de las orquídeas, se fueron incrementando de 9.41 hasta lograr un promedio de 15.57. Los promedios generales del número de brotes fueron muy bajos y se encuentran enmarcados entre 0.72 a 1.11. Luego de analizar todas las variables se determinó la funcionalidad de las endomicorrizas en mejorar el desarrollo de las orquídeas, disminuyendo los costos de producción.

ABSTRACT

Mycorrhizal fungi which form on orchids, are generally independent saprophytes or destructive parasites from other crops, mainly represented by the genus *Rhizoctonia* (Smith, 1963, quoted by Oria, 1996, Rasmussen, 1992), which demonstrates the close specificity which in this relationship. For these reasons, it is important to search for technologies that ensure a stable production of orchids, both artificially due to their slow propagation, and naturally. These technologies must bring together all the necessary conditions and as such the establishment of bio-fertilizers plays an important factor in obtaining vigorous plants. A completely random block design was established for group analysis where the groups were the species and within each group there were the inoculations with endomicorrizas as well as the control. The experimental units were formed with 5 orchid seedlings each. The variables measured were: height (h), number of leaves (H) Appearance of new shoots (B). The treatments that responded better to the inoculations were T2 *Masdevallia scitula*, 2 applications and T5 *Masdevallia coccinea*, 2 applications, both of which showed higher percentages in the variables measured compared with treatments T3 and T6 which were the controls. The overall average height of the orchids was increased from 13.96 cm. to an average of 15.07. The overall mean number of leaves of the orchids was increased from 9.41 to an average of 15.57. The overall average number of new shoots was very low, between 0.72 to 1.11. After analyzing all the variables, the functionality of endomycorrhizae in improving the development of orchids was determined--lowering production costs.

CERTIFICACIÓN

Dr. Carlos Cárdenas Ing. Abraham Oleas

Certifican:

Que el trabajo titulado "AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE ENDOMICORRIZAS ORQUIDEALES SOBRE DOS ESPECIES HÍBRIDAS EN EL NOROCCIDENTE DE PICHINCHA" (MINDO Y PACTO), realizado por MOLINA SEGOVIA FRANCISCO ANTONIO, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a MOLINA SEGOVIA FRANCISCO ANTONIO que lo entregue a la Ing. PATRICIA FALCONÍ, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

El Prado, 21 de marzo del 2012

Dr. CARLOS CARDENAS
DIRECTOR

Ing. ABRAHAM OLEAS
CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

FRANCISCO ANTONIO MOLINA SEGOVIA

Declaro que:

El proyecto de grado denominado "AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE ENDOMICORRIZAS ORQUIDEALES SOBRE DOS ESPECIES HÍBRIDAS EN EL NOROCCIDENTE DE PICHINCHA" (MINDO Y PACTO), ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

El Prado, 21 de marzo del 2012

_____

FRANCISCO ANTONIO MOLINA SEGOVIA

AUTORIZACIÓN

Yo, FRANCISCO ANTONIO MOLINA SEGOVIA

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo "AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE ENDOMICORRIZAS ORQUIDEALES SOBRE DOS ESPECIES HÍBRIDAS EN EL NOROCCIDENTE DE PICHINCHA" (MINDO Y PACTO), cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

El Prado, 21 de marzo del 2011

_____

FRANCISCO ANTONIO MOLINA SEGOVIA

DEDICATORIA

Esta tesis quiero dedicar a mis padres, a mis hermanas, a mi sobrina, a mi querida Laurita, a mi novia Sandry y a todas las personas que me han brindado su apoyo durante este largo camino.

Francisco Molina

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, que me ha dado fortaleza para terminar una etapa más en mi vida, a mis padres por su apoyo incondicional, a mi novia por todo el soporte durante la elaboración de la tesis, a Floare que creyeron en este proyecto, a mi director, codirector, al Lic. Taco, a mis amigos y al IASA.

Francisco Molina

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

FRANCISCO ANTONIO MOLINA SEGOVIA

DIRECTORA DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Ing. PATRICIA FALCONÍ

DELEGADO UNIDAD DE ADMISIÓN Y REGISTRO

Abg. CARLOS OROZCO B.

El Prado, 21 de marzo del 2012

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN 1

OBJETIVOS 2

2.1. OBJETIVO GENERAL 2

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 2

REVISIÓN DE LITERATURA 3

3.1. MICORRIZAS 3

3.1.1 Micorriza en Orquídeas 4
3.1.2 Beneficios de los Hongos Micorrízicos 5
3.1.3 Aspectos Fisiológicos de la Simbiosis 7
3.1.4 Tipos de Micorrizas 18
3.1.5 Endomicorrizas 22
3.1.6 Ectomicorrizas 26
3.1.7. Otros Tipos de Micorrizas 28

3.2 MORFOLOGÍA DE LAS PLANTAS VASCULARES 31

3.2.1. Anatomía de la Raíz 31
3.2.2 Rizodermis 32
3.2.3 Velamen 34
3.2.4 Córtex 35
3.2.6 Endodermis 38
3.2.7 Cilindro Vascular 39
3.2.8 Caliptra 39
3.2.9 Nódulos Radicales 40

METODOLOGÍA 42

4.1 UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN 42

4.1.1 Ubicación Política 42
4.1.2 Ubicación Geográfica 42
4.1.3 Ubicación Ecológica 43

4.2 MATERIALES…… 43

4.2.1 Insumos:.....43

4.2.2 Equipos:.....43

4.2.3 Instrumentos:.....44

4.3 MÉTODOS……. 44

4.3.1. Toma de Muestras y Aislamientos.....44

4.3.2. Caracterización e identificación.....46

Inoculación de plantas de orquídeas, con endomicorrizas.....46

Orquideales (CP/1283).....46

4.3.4 Diseño Experimental.....48

4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO 50

4.4.1. Esquema de Análisis de Variancia.....50

4.4.2 Análisis Funcional.....50

4.4.3 Análisis Económico.....50

4.5 Variables a Medir 51

4.5.1 Elongación de las plántulas.....51

4.5.2 Número de hojas.....52

4.5.3 Aparecimiento de nuevos brotes o hijuelos 52

4.6 MÉTODOS ESPECÍFICOS DE MANEJO DEL EXPERIMENTO 52

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 54

- Caracterización…. 54

5.1 ALTURA DE PLANTA 55

5.2 NÚMERO DE HOJAS 60

5.3 NÚMERO DE BROTES 66

5.4. DISCUSIÓN 71

5.5. ANÁLISIS ECONÓMICO 74

VI. CONCLUSIONES 77

VII. RECOMENDACIONES 79

VIII. BIBLIOGRAFÍA..... 80

IX. ANEXOS ..... **¡Error! Marcador no definido.**

9.1 FOTOGRAFÍAS... ..... **¡Error! Marcador no definido.**

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No		Pág.
Tabla. 1	Principales tipos de micorrizas…….	30
Tabla. 2	Datos de ubicación Ecológica……	43
Tabla 3.	Especies y frecuencias de inoculación…….	48
Tabla 4.	Tratamientos y dosis……..	48
Tabla 5.	Formato de toma de datos…….	53

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No **Pág.**

CUADRO 1 Análisis de variancia para la altura de planta de dos especies de orquídeas bajo el efecto de dos frecuencias de inoculación de endomicorrizas…….. 56

CUADRO 2 Altura de planta promedio de dos especies de orquídeas en doce evaluaciones……..…….. 58

CUADRO 3 Altura de planta promedio de dos especies de orquídeas en doce evaluaciones bajo el efecto de dos frecuencias de inoculación de endomicorrizas y un testigo, en doce evaluaciones…… 59

CUADRO 4 Análisis de variancia para el número de hojas promedio por planta de dos especies de orquídeas bajo el efecto de dos frecuencias de inoculación de endomicorrizas…….. 61

CUADRO 5 Número de hojas promedio de dos especies de orquídeas en doce evaluaciones…… 63

CUADRO 6 Número de hojas promedio de dos especies de orquídeas bajo el efecto de dos frecuencias de inoculación de endomicorrizas y un testigo, en doce evaluaciones……..…. 64

CUADRO 7 Análisis de variancia para el número de brotes promedio de dos especies de orquídeas bajo el efecto de dos frecuencias de inoculación de endomicorrizas y un testigo…….. 67

CUADRO 8 Número de brotes promedio de dos especies de orquídeas en doce evaluaciones…… 68

CUADRO 9 Número de botes/planta promedio de dos especies de orquídeas el efecto de dos frecuencias de inoculación de endomicorrizas y un testigo, en doce evaluaciones……..…… 69

CUADRO 10 Beneficio bruto, costos variables y beneficio neto de los tratamientos en estudio..... 71

CUADRO 11 Análisis de dominancia de los tratamientos en estudio…… 72

CUADRO 12 Análisis marginal de los tratamientos no dominados……. 72

INDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No **Pág.**

GRÁFICO 1 Curvas de crecimiento de la altura de planta promedio de dos especies de orquídeas en doce evaluaciones…….. 58

GRÁFICO 2 Curvas del crecimiento de la altura de planta promedio de dos especies de orquídeas en doce evaluaciones bajo el efecto de dos frecuencias de inoculación de endomicorrizas y un testigo, en doce evaluaciones……... 60

GRÁFICO 3 Curvas del número de hojas promedio de dos especies de orquídeas en doce evaluaciones…….. 63

GRÁFICO 4 Curvas del número de hojas promedio de dos especies de orquídeas en doce evaluaciones bajo el efecto de dos frecuencias de inoculación de endomicorrizas y un testigo, en doce evaluaciones…… 65

GRÁFICO 5 Curvas del número de brotes promedio de dos especies de orquídeas en doce evaluaciones…….. 69

GRÁFICO 6 Curvas del número de botes/planta promedio de dos especies de orquídeas el efecto de dos frecuencias de inoculación de endomicorrizas y un testigo, en doce evaluaciones…… 70

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA No **Pág.**

Figura 1. Micorrizas en orquídeas. Consiste de enrollamientos de las hifas… 4

Figura 2. Tipos de micorrizas…….…….. 19

Figura. 3 Arbúsculos de una Micorriza Vesículo-Arbuscular (MVA)…..**.....** 22

Figura. 4 Endomicorrizas en corte longitudinal de la raíz…… 24

Figura. 5 Arbúsculos de endomicorrizas…… 25

Figura.6 Vesículas e hifas de una micorriza Vesículo-Arbuscular (VA), colonizando la raíz de una planta……. 26

Figura.7 Micorrizas (a) arbutoides, (b) ericoides, (c) orquidoides e (d) monotrepoides e) plantas Monotropa, no fotosintéticas……. 29

Figura. 8 Muestra de una raíz de una planta Vascular……. 31

Figura. 9 Estructura de una raíz primaria (esquema y dibujo)……. 31

Figura 10. Esquema de la porción apical mostrando la composición de la epidermis…….. 32

Figura 11. Velamen de Oncidium, transcorte de raíz aérea……34

Figura12. Ubicación del córtex en transcorte de raíz…….. 35

Figura13. Esquema de corte transversal y longitudinal……. 37

Figura 14. Endodermis y banda de Caspary en transcorte de raíz……..38

Figura 15. Caliptra en corte longitudinal radial……. 39

Figura 16. Diagrama tridimensional de raíz y un nódulo…… 40

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA No **Pág.**

Fotografía1. Toma satelital del Noroccidente de Pichincha..... 42

Fotografía 2. Toma de muestras de raíces en el Noroccidente de Pichincha...85

Fotografía 3. Raíces con posibles micorrizas…… 85

Fotografía 4. Micorrizas en raíz de orquídeas..... 85

Fotografía 5. Pesado de elementos en preparación de medios…… 86

Fotografía 6. Preparación de medios de Cultivo…….. 86

Fotografía 7. Dispensando medio Czapeck…… 86

Fotografía 8. Muestras de Raíces…… 87

Fotografía 9. Siembra de muestras de raíces en medio Czapeck……87

Fotografía 10. Secado de las muestras……. 87

Fotografía 11. Sembrado de las raíces……88

Fotografía 12. Etiquetado de las cajas Petri…… 88

Fotografía 13. Sellado de la caja Petri……. 88

Fotografía 14. Cajas sembradas para aislamiento de micorrizas…….. 89

Fotografía 15. Resultado de la siembra en medio Czapeck…….. 89

Fotografía 16. Muestra para análisis en microscopio..... 89

Fotografía 17. Observación de la muestra en microscopio…… 90

Fotografía 18. Micelio de *Rhizoctonia solani*…… 90

Fotografía 19. Micelio de *Rhizoctonia*…… 90

Fotografía 20. Materiales para la purificación……. 91

Fotografía 21. Purificación de cepas aisladas…….. 91

Fotografía 22. Muestra de micorriza purificada……. 91

Fotografía 23. Cepa de Micorriza sembrada en grano de trigo……... 92

Fotografía 24. Conservación de cepas de *R. solani*……... 92

Fotografía 25. Preparación de sustrato para plántulas…….. 92

Fotografía 26. Preparación para la inoculación……..93

Fotografía 27. Inoculación del sustrato……. 93

Fotografía 28. Plántula de orquídea……. 93

Fotografía 29. Plantas inoculadas…….. 94

Fotografía 30. Planta inoculada…… 94

Fotografía 31. Raíz de planta inoculada…….. 94

INTRODUCCIÓN

En condiciones naturales, los hongos del suelo colonizan las raíces de 90% de las plantas terrestres formando micorrizas, asociación simbiótica que juega un papel importante en el ecosistema capturando los nutrientes del suelo.

La orquídea es una flor de elevado atractivo comercial que resume belleza, encanto y fragancia. En el Ecuador se han encontrado gran diversidad de orquídeas ampliamente distribuidas, con caprichosas formas y colores; pudiendo convertirse en un importante renglón comercial.

La propagación de orquídeas de forma comercial se ve limitada por poseer diminutas semillas con un embrión simple carente de endospermo, lo que la hace de difícil germinación y sobrevivencia, si no se encuentra un hongo micorrízico compatible el cual se encarga de suministrarle los carbohidratos y nutrimentos esenciales, aún hasta después de haber formado sus primeras hojas verdes (Richardson *et al*., 1992), mientras que la micropropagación o producción *in vitro* de orquídeas permite la obtención masiva de plántulas a partir de semillas sembradas en medios específicos.

Los hongos que forman micorrizas con orquídeas, generalmente son saprófitos independientes o parásitos destructores de otros cultivos, representados principalmente por el género *Rhizoctonia* (Smith, 1963, citado por Oria, 1996; Rasmussen, 1992), lo que evidencia la estrecha especificidad que se establece en esta relación.

OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Aislar, caracterizar y analizar el efecto de la inoculación de endomicorrízas orquideales sobre dos especies híbridas en el Noroccidente de Pichincha, para mejorar el crecimiento y desarrollo de las plántulas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar y caracterizar las cepas de endomicorrízas provenientes de las raíces de orquídeas colectadas en el noroccidente de Pichincha.

- Elaborar un biopreparado para la aplicación de plantas *ex vitro*.

- Verificar los efectos producidos de la inoculación del biopreparado sobre las plántulas de orquídeas seleccionadas.

- Evaluar los efectos bioestimulantes que generen la inoculación (elongación, aparecimiento de brotes y número de hojas).

- Determinar el efecto rentable de la preparación del biofertilizante endomicorrizial.

REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. MICORRIZAS

Nombre que hace referencia a la simbiosis hongo-raíz ("myces-rhiza"), esta simbiosis es un fenómeno general en los vegetales. Las micorrizas fueron descubiertas por el botánico alemán Frank en 1885, en las raíces de algunos árboles forestales; recién en 1900 el francés Bernard puso de manifiesto su importancia estudiando las orquídeas (Martínez *et al*., 1981).

Las micorrizas eran consideradas excepciones, pero ahora se sabe que casi la totalidad de las plantas verdes, con algunas excepciones, viven en simbiosis con hongos. Y esto es así para musgos, helechos y Fanerogamas (Oria, 1996).

Las primeras que despertaron interés fueron las micorrizas de los árboles forestales, y aunque las de las plantas cultivadas comenzaron a estudiarse en 1910, es recién después de los trabajos de Mosse en Inglaterra, 1955, cuando se empieza a reconocer la importancia y la generalidad de esta simbiosis (Martínez *et al*., 1981).

Las micorrizas constituyen una simbiosis especialmente importante, que ocurre en la mayoría de los grupos de plantas vasculares. Las micorrizas son capaces de absorber y trasportar fósforo, zinc, manganeso y cobre, todos nutrientes esenciales. Los hongos se benefician obteniendo carbohidratos y vitaminas de la planta hospedante (Garbaye, 1994).

Solo unas pocas familias de angiospermas carecen de ellas: Brassicaceas y Cyperaceas. Las Proteaceas tienen raíces muy finas que parecen desempeñar un rol similar al de las micorrizas (Garbaye, 1994).

3.1.1 Micorriza en Orquídeas

Figura 1. Micorrizas en orquídeas. Consiste de enrollamientos de las hifas
Fuente: Djik, 1989

Las orquídeas pasan por un estado de semillero prolongado durante el cual son incapaces de fotosintetizar, además que éstas tienen escasas reservas de almidones y lípidos. En condiciones naturales, estos requerimientos son suplidos por el hongo micorrizógeno. La planta es colonizada después de la germinación, y el hongo suple el carbono y las vitaminas para el desarrollo del embrión hasta cuando se forman las hojas y se inicia la fotosíntesis. Los hongos que participan en la simbiosis son basidiomicetos,

algunos patógenos como *Armillaria, Fomes, Marasmius y Rhizoctonia (R. solani y R. repens)* (Anderson, 1982).

3.1.2 Beneficios de los Hongos Micorrízicos

Páez *et al.,* (2006), afirma que el principal beneficio que realizan las Micorrizas está relacionado con la nutrición de las plantas. Este proceso de la nutrición por medio de las Micorrizas está, pues, extremadamente difundido entre los vegetales, tiene notable importancia porque permite la vida de las plantas en determinadas condiciones y facilita la toma de los alimentos por parte de las plantas superiores, en competencia con la infinita y mucho más adaptable microflora del suelo.

Son muchos los beneficios que brindan las *Micorrizas* para la plantas, que las convierten fieles aliadas de productores, empresarios, investigadores, científicos y población en general. A continuación se resumen las más importantes:

Para las plantas verdes:

1) Incrementan la filosfera radicular activamente.

2) Incrementan la sinergencia de agua y nutrientes como fósforo, nitrógeno, potasio y calcio del suelo.

3) Incrementan la tolerancia a termorregulaciones bruscas del suelo (sustrato) y acidez extrema causadas por la presencia de aluminio, magnesio y azufre.

4) Proveen protección contra ciertos hongos patógenos y nematodos.

5) Inducen relaciones hormonales que producen que las raíces alimentadoras permanezcan fisiológicamente activas por periodos mayores que las raíces no micorrizadas (Gilman, 1963).

6) Una mejor asimilación de los nutrientes en las plantas, que facilita un aumento de la producción y mayor calidad biológica de ésta.

7) Una mayor tolerancia de las plantas frente a muchos factores de estrés: sequía, desequilibrios en el pH, altos contenidos de sales, exceso de viento, entre otros. Esto se debe a que facilita una adecuada evapotranspiración de la planta y un mejor funcionamiento fisiológico de éstas en sentido general.

8) La inoculación de las plantas con hongos micorrizógenos provoca, de manera general, un marcado incremento en los procesos de absorción y traslocación de nutrientes como: N, P, K, Ca, Mg, S, Zn, Cu, Mo, Fe, Mn, entre otros (Gilman, 1963).

9) Un aspecto de gran interés en el empleo de las Micorrizas es lo relacionado a la nutrición del Fósforo (P).

10) Se logra una mayor eficiencia en el uso de los fertilizantes fosfóricos aplicados en suelos deficientes y con elevada capacidad de fijación de fosfatos.

11) Además del efecto directo sobre el crecimiento de las plantas, el favorecimiento en la absorción del P, aumenta el crecimiento de las raíces y la fijación biológica de N en plantas.

3.1.3 Aspectos Fisiológicos de la Simbiosis

La toma de nutrientes de la planta está determinada principalmente por la capacidad de absorción de las raíces y por la difusión de los nutrientes y la subsecuente liberación de elementos en la solución del suelo. La tasa de absorción de iones con alta movilidad, tal como NO3-, de la solución del suelo es específica del cultivar y la especie. La capacidad de toma de iones con baja velocidad de difusión, p. ej. Zn y Mo y en menor grado K, S y NH4+, depende de la densidad de la raíz por volumen de suelo. En estos casos, la morfología de la raíz y el micelio externo del hongo VAM determina la tasa de toma de nutrientes para la planta (Sieverding, 1991).

El desarrollo y estructura planta-hongo en relación con el transporte de nutrientes, a nivel celular, la interfase en todos los tipos de micorrizas están compuestos de las membranas de ambos patrones, separados por una región del apoplasto . El desarrollo intracelular afecta la estructura de la pared del hongo, el metabolismo y la fisiología, incluyendo la represión de la superficie y enzimas extracelulares (Smith & Gianinazzi-Pearson 1988). La reacción de penetración y proliferación del hongo parece similar en diferentes endomicorrizas en la presencia del haustorio intracelular; pero las células del hospedante muestran modificaciones más específicas. En todos los casos, la interfase formada entre la célula de la planta y el hongo involucra una nueva formación de la membrana de la planta que se extiende desde la membrana plasmática de la periferia alrededor del haustorio del hongo (Smith *et al.*, 1988).

En orquídeas, el material de la pared celular persiste alrededor de la extensión intracelular. La presencia de pectinas y celulosa constituye la interfase arbuscular, simultáneamente con la actividad neutral fosfatasa indica que el protoplasto de la planta conserva la actividad de sintetizar la pared celular. La transferencia de carbohidratos de micorrizas en orquídeas es del hongo a la planta y sintetiza los componentes de la pared, no contribuye a la nutrición del hongo. La modificación en términos de transporte de nutrientes es la actividad de ATPasa en la membrana de la planta formada alrededor de los arbúsculos. En micorrizas versículo arbusculares (VMA) parte de esta actividad es atribuible a un ion H ATPasa presente en la membrana periarbuscular, pero citoquímicamente indetectable a lo largo de otras membranas de la planta adyacentes a la hifa. La distribución de la actividad alrededor del arbúsculo sugiere que las células de las raíces infectadas tienen la capacidad de incrementar la absorción de nutrientes (Smith *et al.*, 1988).

En ectomicorrizas, los cambios estructurales en el tejido de la planta es pequeño, pero en algunos casos el crecimiento de la pared hacia dentro, parece ser inducida por la infección del hongo. La actividad ATPasa está asociada con la membrana plasmática de ambos simbiontes cuando estos son activos y estrechamente asociados en la región "Harting", pero ésta desaparece en células de plantas senescentes (Smith *et al.*, 1987).La información de ultra estructura para todos los tipos de micorrizas indica que la acumulación de material en la interfase es reducida, en términos de la permeabilidad del apoplasto. Sin embargo, el material extracelular está también acumulado alrededor de la hifa de la endomicorrizas como punto de entrada a la célula hospedante y acumulada en los espacios intercelulares de la cubierta del hongo en las ectomicorrizas.

3.1.3.1 Tipos de interfase

Uno de los prerrequisitos para el movimiento de los nutrientes entre los simbiontes es el desarrollo de una interfase distintiva, la cual es modificada, estructural y funcionalmente, para promover la transferencia. En una asociación el desarrollo de la simbiosis es un proceso dinámico el cual puede resultar en la formación de diferentes tipos de interfases en diferentes tiempos y que la función de estas interfaces puede variar considerablemente.

Generalmente, son dos tipos de interfase que están involucradas en el transporte de nutrientes entre los simbiontes, denominados intercelular e intracelular. El desarrollo intercelular es ejemplificado por asociaciones ectomicorrizicas, en las cuales el contacto entre el hongo y el hospedante puede ser entre la envoltura del hongo y la capa externa de células de la raíces o entre las células corticales y la hifa de la red de “Harting” (o ambos). Solo en estados tardíos de desarrollo el hongo penetra las células de las células corticales de la raíz. En este ejemplo la interfase está compuesta de las membranas de los dos organismos separados por estas paredes, las cuales, con cualquier espacio intercelular, constituye una interfase en el apoplasto. La fase intercelular se presenta en muchas micorrizas vesiculo-arbusculares, como la hifa crece longitudinalmente en los espacios intercelulares de la corteza de la raíz.

En algunas asociaciones se ramifica la hifa intercelularmente, penetra la pared de la célula hospedante y crece entre ésta, formando la fase intracelular tales como arbúsculos, hifas o hasturio. En muchos de los casos es únicamente la pared, que es penetrada, la membrana plasmática de la célula hospedante mantiene intacta de tal

manera que el microsimbionte se encuentra en el apoplasto intercelular. Las estructuras intercelulares y sus interfases con las células de la planta son generalmente consideradas las más importantes en el transporte de nutrientes que las interfases intercelulares y esto se evidencia en el caso de algunos parásitos formadores de haustorio. En algunas asociaciones de micorrizas VA la fase intercelular es reducida, la hifa pasa directamente de una célula cortical a otra, formando espirales o arbúsculos (Smith *et al.,* 1987).

3.1.3.2 Localización de la simbiosis en el apoplasto

En las raíces, el hongo micorrízico coloniza el apoplasto cortical, inter o intracelularmente. De nuevo, conexiones plasmo desmátales entre las células influencian el balance entre el transporte simplástico y apoplástico y de esta manera el hongo se suple de los nutrientes. La endodermis forma una barrera para el movimiento apoplástico entre la estela y la corteza, y en las raíces de muchas especies una hipodermis suberizada puede prevenir el movimiento apoplástico entre la corteza y el suelo. Estas dos capas celulares efectivamente aíslan el apoplasto cortical, así que hay un control simplástico de la concentración de nutrientes del apoplasto cortical.

Tanto en raíces con ectomicorrizas y MVA la hipodermis bien desarrollada, el movimiento de nutrientes del suelo a las raíces estará restringido a una ruta simplástica a través de la hifa fungal y el paso a las células de la hipodermis. Los factores que afectan la pérdida de nutrientes minerales de la hifa fungal está determinada por el suministro de nutrientes al apoplasto cortical y también la toma por las células corticales. Recíprocamente un suministro de carbohidratos al hongo dependerá de la

descarga a partir de las células corticales al apoplasto de las raíces. Las capas impermeables en los límites de la corteza (endodermis) pueden tener importancia en permitir un mayor control de las concentraciones apoplásticas en la corteza de ambas clases de raíz (Smith *et al.,* 1987).

3.1.3.3 Mecanismos de transferencia

Los azúcares son importantes en la transferencia de carbohidratos, con la hidrólisis de la sacarosa. Otro recurso potencial de carbono incluye precursores de la pared, el cual puede requerir hidrólisis, y aniones orgánicos o componentes orgánicos de N.

Los nutrientes derivados del suelo que son transferidos del hongo a la planta varían en importancia en los diferentes tipos de asociación. Las Ectomicorrizas tienen mayor influencia sobre el nitrógeno (N) y un menor efecto sobre la nutrición en fósforo (P). En VAM la situación es inversa. La transferencia de N del hongo a la planta ha sido demostrada en Ectomicorrizas y es probable en asociaciones VAM. El N orgánico (como aminoácidos o amidas), más bien como NH4+, está probablemente involucrado. Tal transferencia puede resultar en el movimiento de carbono orgánico en contra del flujo de carbohidratos y afectaría el flujo neto de carbono reducido, dando una posible ruta para el movimiento del carbono durante la transferencia entre la planta. En ectomicorrizas se evidencia que el ortofosfato inorgánico es la mejor forma en la que el fósforo es transferido. En experimentos se ha demostrado la transferencia de otros nutrientes (S, Zn, Cu, Ca y Na) en varios tipos de micorrizas (Smith *et al.,* 1987).

El movimiento de carbohidratos de la planta al hongo y el movimiento de nutrientes minerales a la planta ocurre al nivel de toda la planta. Asumiendo que la transferencia bidireccional ocurre en una simple interfase, ambos simbiontes tienen membranas plasmáticas funcionales capaces de tomar nutrientes del apoplasto. En las ectomicorrizas, la coexistencia de la actividad ATPasa en la membrana plasmática del hongo a la red sugiere que los dos sistemas trabajan cooperadamente en intercambio bidireccional (Smith *et al.*, 1987).

3.1.3.4 Toma de macro y micronutrientes (P- Fósforo)

Los MVA pueden mejorar considerablemente el suministro de P para la planta hospedante mediante el uso de la capacidad absorbente de la extensa red de hifas externas asociadas a la raíz infectada. Las hifas de micorrizas versículo arbusculares (MVA), ligadas a la raíz, se extienden más allá de la zona de agotamiento de P que se desarrolla en los suelos deficientes en P, ya que la raíz absorbe iones fosfato más rápidamente de lo que se pueden difundir por el suelo para reabastecer el suministro a nivel de la superficie de la raíz. El movimiento de fosfatos que está mediado por las MVA ocurre en tres etapas: la absorción por la hifa endofita en el suelo, la translocación a la hifa dentro de la corteza radical mediante los puntos de entrada y la liberación hacia la planta. El hongo probablemente toma el fosfato del suelo, principalmente en la forma de iones ortofosfato de las existencias inestables.

Se cree que la translocación de este fosfato a la raíz ocurre principalmente mediante flujo citoplasmático de los gránulos polifosfatados en las vacuolas del hongo. Los MVA

mejoran sustancialmente el crecimiento de las plantas a las cuales se les ha suministrado fuentes de fósforo relativamente insolubles, tales como harina de hueso, fosfato tricálcico y fosfato de hierro y aluminio. El P adicional fue tomado de la fracción de P soluble asociada con dichas fuentes fosfatadas o liberados por ellas en el suelo. Por consiguiente, las micorrizas aseguran una mejor utilización del fosfato disponible, en lugar de la movilización de la fracción insoluble (Reich, 1988).

El fosfato está presente en el suelo en tres formas: (i) P inorgánico soluble en la solución del suelo, (ii) P inorgánico insoluble encontrado en estructuras cristalinas, y (iii) componentes orgánicos. El fósforo en el suelo es relativamente inmóvil y se difunde lentamente a las raíces de la planta. Como resultado, en suelos con baja disponibilidad de P, las zonas de depleción se desarrollan alrededor de las raíces. En los suelos la cantidad de P que es disponible es poca y la cantidad es cerca del 1 al 5% del total del contenido de P (Noval *et al.*, 1999).

En general, el mayor efecto en el desarrollo por la infección con micorrizas es causado por el incremento en la absorción de P. La efectividad para la toma de P por el hongo está relacionada por: (i) Formación de polifosfatos en la hifa y, mantenimiento de concentraciones internas bajas de fosfato (Pi), (ii) el diámetro pequeño de la hifa proporciona un volumen relativamente grande en el suelo por unidad de superficie comparada con el área superficial de la raíz, y (iii) producción de ácido fosfatasa extracelular el cual cataliza el P liberado de los complejos orgánicos del suelo (Marschner & Dell 1994). Se calcula que la concentración de P en la parte externa de la hifa es alrededor de 0.3% de la materia seca comparada con las concentraciones del suelo "1 a 3 µM de ortofosfato (Pi). El P se absorbe como ortofosfato y es transferido a

las hifas en forma de polifosfato, esta es la principal reserva de P en el hongo; los gránulos de polifosfatos se encuentran dentro de los arbúsculos jóvenes y en las vacuolas de las hifas (Noval *et al.,* 1999).

El modelo de transferencia de P a través de la interfase, generalmente involucra el flujo pasivo de Pi del hongo y activo de la absorción en la membrana plasmática de la célula de la planta. Cuando el hongo no se encuentra en simbiosis, la pérdida neta de Pi es poca, de esta manera las condiciones que promueven el flujo probablemente son importantes en la interfase hongo/raíz. El arbúsculo es un órgano del haustorio especializado capaz de gran actividad metabólica y particularmente está adaptado como un sitio de intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta hospedante (Noval *et al.,* 1999).

La concentración intercelular de Pi en ambos, hongo y planta, afecta el transporte de Pi. Altas concentraciones de P en la interfase de la hifa pueden, con el tiempo, reducir la reabsorción, maximizando la pérdida del hongo. Contenidos bajos de fósforo en las raíces en relación al hongo (mantenidos por el metabolismo y/o translocación ente la planta) y el concomitante incremento en el activo transporte de Pi a la membrana plasmática de la planta, puede permitir el movimiento neto de Pi dentro de la planta. La transferencia de Pi al tejido hospedante en ectomicorrizas es cerca de 10-20% del Pi absorbido por la hifa (Marschner & Dell, 1994).

- **Absorción de N- Nitrógeno**

Las investigaciones en toma de nitrógeno en plantas con micorrizas versículo arbusculares (VAM) han sido en leguminosas. Cuando VAM mejora la nutrición de P en la planta hospedante, esto puede corresponder a un incremento en la nodulación, fijación de N2 y desarrollo. En vista de los altos requerimientos de P para la nodulación, muchas especies de leguminosas que se desarrollan en suelos bajos de P son altamente dependientes de la infección VAM. Sin embargo, la simbiosis impone una gran competencia por los fotosintatos, usualmente a expensas del crecimiento de las raíces. De acuerdo a los efectos benéficos en la fijación con N2 son uno u otro confinados a suelos con bajo P (Marschner *et al.,* 1994).

Estudios con radioisótopos revelan que el micelio externo del hongo puede utilizar el N inorgánico del suelo eficientemente y es transportado 10-30 cm a través del suelo. Así, las plantas micorrizadas tienen acceso a formas de N que no son disponibles para plantas sin esta asociación. En muchos suelos agrícolas el ión NO3- es la forma predominante de N; aunque este ión es altamente móvil, cuando los suelos están restringidos por el contenido de agua, su movilidad se reduce drásticamente. En estas condiciones, el papel de las micorrizas en el transporte de NO3- a las raíces puede ser significativo. Esta forma de incremento de toma de N puede estimular las enzimas involucradas en la asimilación de nitrógeno de la planta hospedante. Se sugiere una relación positiva entre la contribución de N por la hifa y el estado metabólico/nutricional de la planta. Estos cambios pueden ayudar a la planta para resistir condiciones secas del suelo o sustrato (Marschner *et al.,* 1994).

- **Absorción de Micronutrientes**

La movilidad de Cu, Zn, Mn y Fe en suelos o sustratos es baja. Como resultado, la toma de estos nutrientes por las raíces es limitada. Cuando no hay adición de estos micronutrientes al suelo, la disponibilidad es aún más baja y se forman zonas de depleción alrededor de las raíces. Las plantas micorrizadas pueden tomar más nutrientes metales vía hifa extraradical, la cual provee grandes áreas de superficie (Marschner *et al.*, 1994).

De acuerdo a estudios la toma de Zn está influenciada por la distribución y longitud de la hifa en tres especies de VAM en el suelo. La alta densidad de la hifa en el suelo, gran superficie de absorción, corta distancia de los metales para difundirse, y la efectividad de plantas micorrrizadas pueden absorber estos nutrientes metales poco móviles.

Se ha encontrado que la contribución en la toma de Zn, Cu, Mn y Fe en el suelo o sustrato está significativamente influenciada por los niveles de P y micronutrientes en el suelo. Su efecto es positivo o negativo dependiendo no sólo del P sino también de los niveles de los micronutrientes en mención. La hifa extraradical puede absorber y transportar Cu y Zn a su planta hospedante. El efecto benéfico de la inoculación con micorriza para la toma de Cu y Zn se elimina con la adición de estos micronutrientes al suelo. Bajo condiciones de Cu y Zn abundante, las raíces parecen depender menos de la micorriza. El efecto de P sobre la toma de Zn tiene dos componentes. Por un lado, las raíces de las plantas crecidas en bajo contenido de P poseen más hifas y, sin embargo, puede potencialmente absorber más Cu y Zn (Djik, 1989).

- **Importancia de la transferencia de nutrientes en la productividad de la planta**

Los hongos de MVA son abundantes y de suma importancia ecológica en el trópico. Extensas áreas de suelos tropicales tales como el Cerrado de Brasil y los Llanos Orientales de Colombia, son deficientes en P o inmovilizan fertilizantes de P. Estas tierras agrícolas marginales podrían ser productivas si se desarrollaran y adicionaran al suelo hongos micorrizógenos con la capacidad de utilizar cantidades extremadamente pequeñas de fertilizantes. Como fuentes de P se podrían adicionar las rocas fosfatadas de bajo costo.

Se ha demostrado que algunos hongos de micorrizógenos utilizan la roca fosfatada mucho mejor que otras fuentes y pueden mejorar considerablemente el crecimiento de las planas que se desarrollan en suelos pobres fertilizados con este material. Una alternativa viable al uso de fertilizantes de alto costo en suelos agrícolas pobres que han sido talados y quemados, puede ser el uso de hongos de MVA efectivos en el trópico.

La transferencia entre los simbiontes está basada en el efecto potencial de la infección sobre la producción de la planta, o su supervivencia. Cuando el crecimiento y reproducción de la planta es limitada por la tasa de adquisición de nutrientes y cuando la infección micorrízica incrementa esto (por procesos de toma y transferencia), es claro que la infección es de importancia y que el resultado neto de la transferencia bidireccional en un parámetro medible en la biomasa de la planta. Sin embargo, la infección por la micorriza no siempre incrementa el crecimiento de la planta o su reproducción (Smith *et al.,* 1987).

3.1.4 Tipos de Micorrizas

Aproximadamente unas 5.000 especies de hongos con carpóforos que son los cuerpos fructíferos de los hongos superiores y aparato reproductor de las setas (principalmente Basidiomycetes) están asociadas a árboles forestales en regiones boreales y templadas, estableciendo un tipo de micorrizas (Gilman, 1963).

Las raíces de los árboles de las selvas tropicales, de los árboles frutales, y de casi la totalidad de las demás plantas verdes están asociadas a hongos inferiores, la mayoría microscópicos y que no producen carpóforos típicos. Estos hongos, aunque presentes en casi todo el planeta, asociados con casi todas las plantas verdes, establecen otro tipo de micorrizas y no pertenecen más que a 6 géneros y alrededor de un centenar de especies. Los dos tipos más comunes, más extendidas y más conocidas son las ectomicorrizas y las endomicorrizas (Gilman, 1963). Cada tipo se distingue sobre la base de la relación de las hifas del hongo con las células radicales del hospedador.

En las ectomicorrizas el micelio invade la raíz sin entrar en el interior de las células, de aquí el nombre de ectomicorrizas (Gilman, 1963).

En las endomicorrizas el micelio invade la raíz, inicialmente es intercelular, pero luego penetra en el interior de las células radicales, desde la rizodermis hasta las células corticales (Gilman, 1963).

3.1.4.1 Hongos formadores de simbiosis micorrícica

Las raíces de la mayoría de las especies vegetales terrestres, forman una asociación simbiótica mutualista con hongos del suelo, que recibe el nombre de micorriza. Sin este tipo de simbiosis un gran número de especies vegetales, incluidas muchas especies arbóreas, no podrían sobrevivir.

Evolutivamente se han diferenciado distintos tipos, que distinguimos según los caracteres morfo-anatómicos que desarrollan. Existe una gran diversidad en cuanto a morfología y fisiología de las asociaciones micorrícicas, (Figura 2). Cabe destacar cinco tipos principales de micorrizas: arbusculares o endomicorriza, orquidoides, ericoides, arbutoides y formadoras de manto o ectomicorriza.

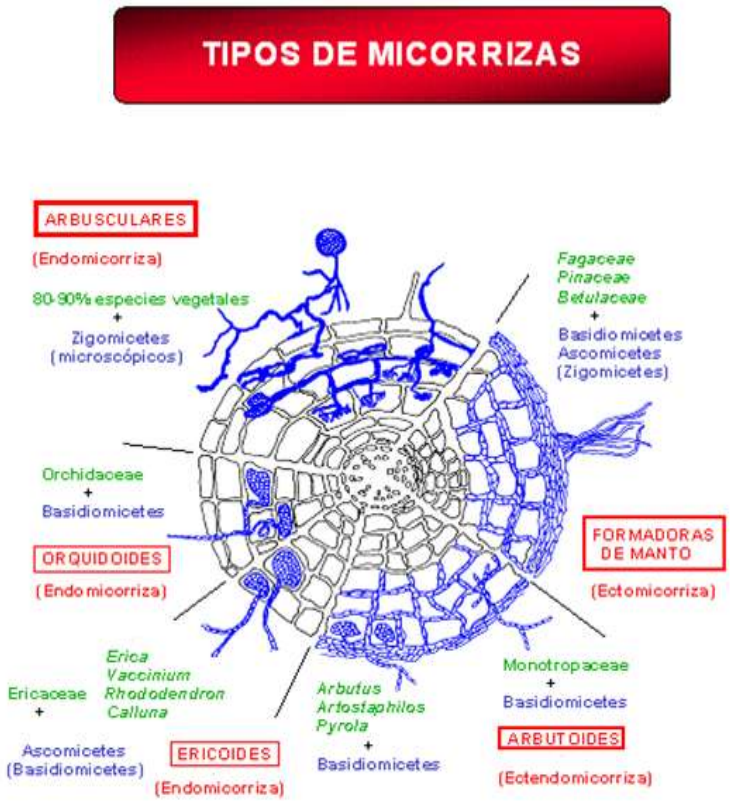


Figura 2. Tipos de micorrizas.
Fuente: Popoff, 1984

Esta simbiosis mutualista puede considerarse como organismos dobles en el sentido de que el órgano a través del cual absorben agua y nutrientes las plantas, está constituido por la raíz y el hongo simbionte que vive con ella. A pesar de lo anterior, en algunas ocasiones la relación hongo-planta puede cambiar de biotrófica a necrotrófica, es decir, dejar de ser una simbiosis mutualística para pasar a parasitismo.

3.1.4.2 Simbiosis para formar las micorrizas

Hay una coincidencia casi general, que la simbiosis para formar micorrizas, se produce en tres etapas o pasos (esto puede ser válido para el trabajo de otros microorganismos patógenos o fitopatógenos).

Como primer paso, se produce una identificación mutua planta hongo / hongo-planta, en la rizósfera, o en regiones próximas a las raíces nutricias o pelos radicales. Este reconocimiento lo facilitan al parecer, sustancias exudadas o emitidas por la raíz, que provocan el crecimiento del micelio y un biotropismo positivo del mismo hacia la raíz.

El segundo paso consiste en el acercamiento y acoplamiento progresivo y gradual del micelio y la raicilla produciéndose el contacto intercelular, al formarse una estructura que amarra y ata ambas biomasas.

En el tercer paso se realiza la colonización produciéndose cambios morfológicos y estructurales tanto en los tejidos colonizados por el hongo, como en la organización de

la pared celular de la raíz. Posteriormente se produce la integración fisiológica de ambos simbiontes (hongo-raíz), y por último se produce una alteración de las actividades enzimáticas, que se coordinan entre los simbiontes para integrar sus procesos metabólicos.

Este proceso de asociación para formar Micorrizas, provoca alteraciones morfológicas y anatómicas en las plantas colonizadas tales como: cambios en la relación tallo raíz, en la estructura de los tejidos radicales, en el número de cloroplastos, aumento de la lignificación, alteración de los balances hormonales, etc. Efectos que no son sólo explicables, como una simple mejora nutritiva de la planta, debido al aumento de eficacia en la absorción de nutrientes por la raíz, gracias a la formación de la Micorriza, sino que, responde a cambios metabólicos más profundos y complejos, debidos a la integración fisiológica de los simbiontes (Gilman, 1963).

En contraste, existen también casos en que la total inespecificidad asociativa, hacen que varias especies forestales estén colonizadas al mismo tiempo por formaciones tan distintas como: Ectomicorrizas y Endomicorrizas.

3.1.4.3 Factores que afectan al desarrollo de micorrizas

- Luz: Sombrías (-)
- Temperatura: Bajas (-)
- Fertilizantes N ó P (-)
- Presencia de Hormonas (Auxinas y etileno) (+)
- Interacción con microorganismos: *Azotobacter y Pseudomonas* (+)
- Pesticidas (-)

3.1.5 Endomicorrizas

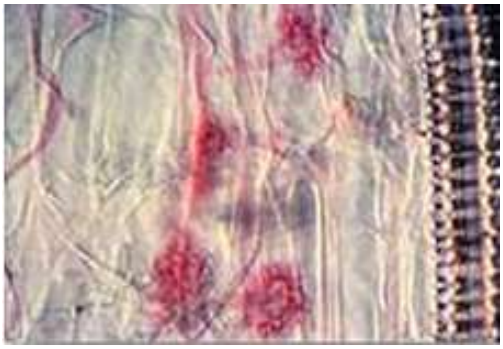


Figura. 3 Arbúsculos de una Micorriza Vesículo-Arbuscular (MVA).
Fuente: Gerdeman, 1968

Una gran cantidad de hifas fúngicas (hongos), existentes en el sustrato invaden las partes jóvenes de las raíces y penetran, a veces, hasta las células del parénquima sub epidérmico (debajo de la epidermis). Esta acción no afecta a las células de los tejidos y se establece el intercambio a ese nivel celular (Gerdeman, 1968).

El micelio de los hongos penetra en el tejido cortical de la raíz de la planta y provoca una infección progresiva de las células de la corteza. Un ejemplo de este proceso, se puede ver en la Micorriza Vesículo-Arbuscular (MVA), que forma en las células de la corteza extremos de micelios ramificados, similares a un árbol (arbúsculos) Fig. 3,

actuando en calidad de órganos nutritivos, mediante los cuales tiene lugar el metabolismo simbiótico entre hongo y planta. Además, se forman vesículas como órganos de reserva.

Los micelios fúngicos no solo penetran en la capa cortical de la raíz, sino que se alojan en el interior de sus células, y en parte son digeridas por la planta hospedante, que se benefician de sus albuminoides y nitrógeno orgánico (Gerdeman, 1968).

Las Endomicorrizas no son tan específicas, por lo que una especie puede colonizar a muchas especies de plantas y se adaptan mejor a las condiciones del medio porque sus esporas crecen con facilidad y pueden sobrevivir sin contacto con las raíces. Esas son dos causas principales por las cuales abundan más en la naturaleza que el resto de las Micorrizas.

Se ha declarado que, a este grupo pertenecen la mayor cantidad de Micorrizas existentes en la Naturaleza, y por lo tanto las que más especies vegetales colonizan. Dentro de este grupo existen tres tipos característicos:

a Orquideomicorrizas (asociadas a Orquidiáceas).

b Ericomicorrizas (ligadas a la Familia Ericáceas y con muchas similitudes estructurales con las ectendomicorrizas.

c Micorrizas Vesículo-Arbusculares (MVA): Caracterizadas por formar arbúsculos intracelulares. *Son las más abundantes y de mayor importancia ecológica y económica* (Gerdeman, 1968).

Se encuentran aproximadamente en el 80% de las plantas vasculares, en las Gimnospermas sólo presentan endomicorrizas las plantas *Taxus baccata, Sequoia semprvirens, Sequoia gigantea y Ginkgo biloba* (Strasburger, 2004).

Las endomicorrizas más frecuentes son Zygomycetes, con hifas no septadas y las asociaciones hongo/hospedante no son muy específicas (Strasburger, 2004).

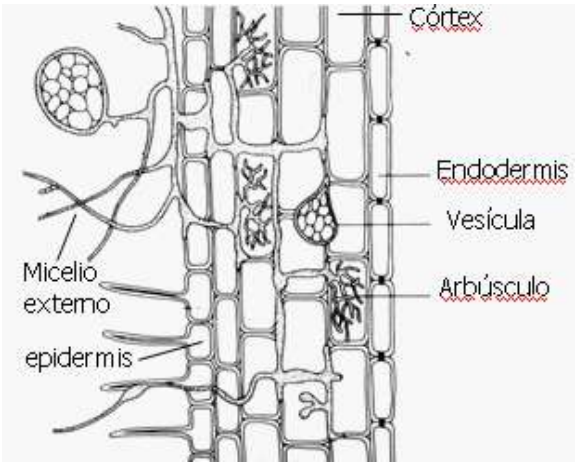


Figura. 4 Endomicorrizas en corte longitudinal de la raíz
Fuente: Mauseth 1988

Las hifas de las endomicorrizas penetran las células del córtex de la raíz, sin romper el plasmalema o el tonoplasto.

Forman unas estructuras dendroides llamadas arbúsculos o protuberancias llamadas vesículas, que quedan revestidas por la membrana plasmática, las endomicorrizas se

suelen llamar micorrizas V/A por la formación de estas estructuras. El hongo nunca penetra la endodermis, ni la estela, ni el meristema apical, ni la caliptra (Strasburger, 2004).

Las hifas se extienden varios centímetros por fuera de la raíz, incrementando la cantidad de nutrientes absorbidos, el intercambio entre hongo y hospedante tiene lugar en los arbúsculos, que se llenan de gránulos de fosfatos (Strasburger, 2004).

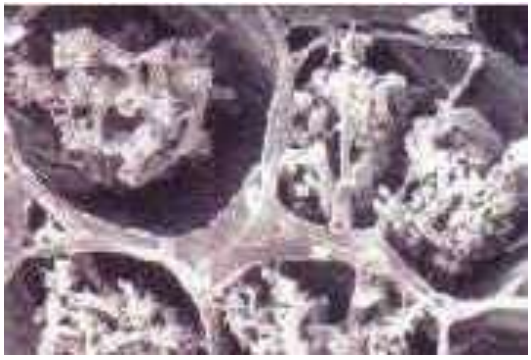


Figura. 5 Arbúsculos de endomicorrizas
Fuente: Raven & Eichhorn 2003

Las endomicorrizas son particularmente importantes en los trópicos donde los suelos tienden a retener los fosfatos.

La comprensión de las relaciones micorrícicas puede ser la clave para disminuir la cantidad de fertilizantes (especialmente fosfatos) que deben aplicarse a los cultivos para obtener buenas cosechas (Raven & Eichhorn, 2003).

En las Micorrizas de orquídeas intervienen hongos basidiomicetes con hifas septadas. Las plántulas de orquídeas dependen de las micorrizas, mueren si no las tienen, porque las semillas no tienen reservas. Por esta razón se habla en este caso de "hongos nodriza".

Se han estudiado varias especies de Leguminosas (*Lupinus*, *Astragalus*, *Trifolium*) en U.S.A. que presentan micorrizas V/A con hifas aseptadas, o micorrizas formadas por hifas septadas que a menudo forman esclerocios intracelulares (O'Dell & Trappe, 1992).

3.1.6 Ectomicorrizas

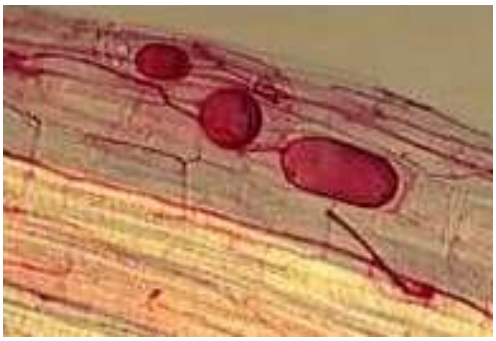


Figura.6 Vesículas e hifas de una micorriza Vesículo-Arbuscular (VA), colonizando la raíz de una planta.
Fuente: Raven & Eichhorn 2003

Las hifas fúngicas permanecen (que es lo más común) Fig.6, en la superficie epidérmica, alrededor de la cual forman una vellosidad que reemplaza a los pelos radicales. Rodean de una densa capa de micelios (Red de Harting), las partes más finas de la raíces, hasta envolverlas por completo, incluso en el ápice vegetativo de la misma. Las hifas de los hongos envuelven las raíces de las plantas, penetran intracelularmente en el parénquima de la corteza, sin infectar sus células. Los hongos que las forman son: Basidiomicetes y Ascomicetes principalmente (Strasburger, 2004).

Se forman Ectomicorrizas principalmente sobre especies forestales y leñosas: avellanos, abedules, coníferas, etc. Sus filamentos micélicos, aunque pueden insinuarse a través de los espacios intercelulares de la raíz, no penetran en sus células. Si las Ectomicorrizas no están en contacto con una raíz su crecimiento es limitado y pueden morir rápidamente. Colonizan las raíces por un corto período de tiempo que puede estar entre los 5 y 12 días.

El primer tipo se caracteriza por una modificación morfológica de la raíz que pierde sus pelos absorbentes y generalmente los extremos se ramifican profusamente y se acortan ensanchándose. (Strasburger, 2004).

El extremo de una raíz ectomicorrizada está cubierto por una red de hifas, como una vaina, que cubre hasta seudo-parenquima. Desde este manto se extiende una red de hifas entre las primeras capas de células de la corteza radical y rara vez llegan hasta la endodermis, pero sin entrar en el interior de las células, de aquí el nombre de ectomicorrizas. Esta red se llama "red de Hartig", donde las hifas también pueden tener muy variadas formas. Desde el manto hacia afuera se extiende la red miceliar, incluso llegando a formar cordones especializados en la conducción de sustancias (Gilman, 1963).

Las ectomicorrizas están ampliamente dispersas en la naturaleza y se estima que el 10% de la flora mundial presenta este tipo de asociación. Principalmente las familias Pinaceas, Betulaceas, Fagaceas, y también Ericaceas y algunas Myrtaceas, Junglandaceas y Salicaceas (Gilman, 1963).

Los hongos que forman estas micorrrizas son en general los conocidos hongos de sombrero, como "amanitas" y "boletos". Solo en Norte América son más de 2.000 especies, en su mayoría Basidiomycetes y algunos Ascomycetes ("trufas") (Gilman, 1963).

Muchos de estos hongos pueden ser cultivados en cultivo puro, aislados de su planta huésped, pero no pueden formar carpóforos (cuerpo fructífero) en su ausencia.

3.1.7. Otros Tipos de Micorrizas

Las orquídeas poseen las endomicorrizas orquidioides, llamadas de ovillo, y representan el tercer tipo más importante de micorrizas, ya que estas plantas son dependientes en estado juvenil, de protocormo, de sus hongos simbiontes. Entre la raíz de la planta y el hongo puede tomarse un número de formas distintas de transferencia de nutrientes: hifa intercelular e intracelular y arbúsculo intracelular. Su crecimiento se produce característicamente en el interior de la raíz, no forman vaina y el micelio externo es, relativamente, escaso. Una vez que la planta crece y fotosintetiza, generalmente se independiza del hongo *(*Martínez *et al., 1981).*

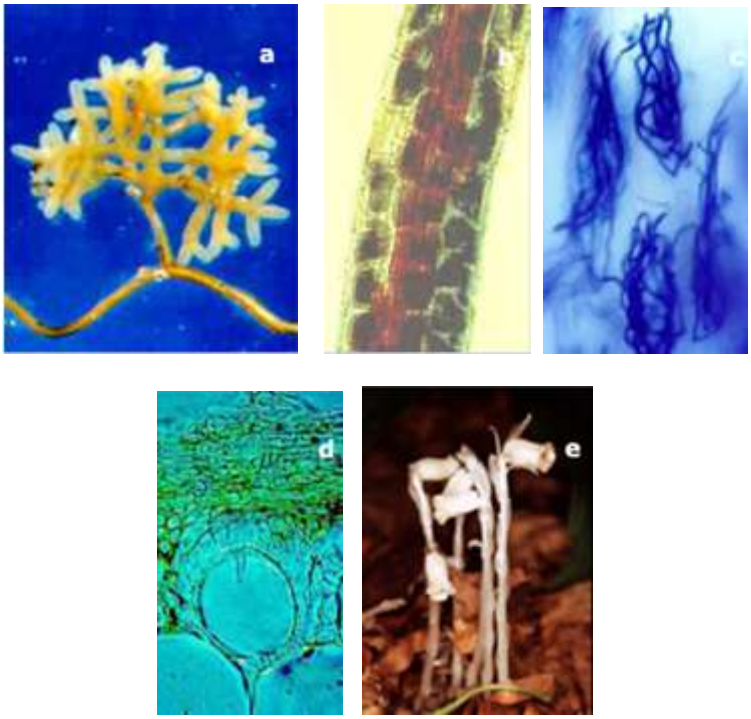


Figura. 7 Micorrizas (a) arbutoides, (b) ericoides, (c) orquidoides e (d) monotrepoides e) plantas Monotropa, no fotosintéticas
Fuente: Peyronel, 2003

Ectoendomicorrizas o Ectoendotróficas, donde se pude apreciar la formación de un manto, junto con la penetración de hifas a las células.

Ericoides, son las más sencillas, con raíces muy simples e hifas penetrando en las células para formar ovillos.

Arbutoides, donde también tenemos un manto externo junto con hifas que penetran a las células para formar rulos.

Tabla. 1 Principales tipos de micorrizas.

	Endomicorriza	Ectomicorriza	Arbutoide	Ericoide	Orquidoide	Monotropoide
Fungo	Zygomycota	Basidiomycota Ascomycota	Basidiomycota	Ascomycota Deuteromycota	Basidiomycota	Basidiomycota
Penetração das células	+	-	+	+	+	+
Manto	-	+	+	-	-	+
Rede de Hartig	-	+	+	-	-	+
Haustório	+	-	-	-	+ ou -	+
Arbusculo	+	-	+	+	+	-
Plantas hospedeiras	Briofitos Pteridófitos Gimnospérmicas Angiospérmicas	Gimnospérmicas Angiospérmicas	Algumas Ericales	Ericales	Orquídeas	Monotropa

Fuente: Deacon, 1997

3.2 MORFOLOGÍA DE LAS PLANTAS VASCULARES

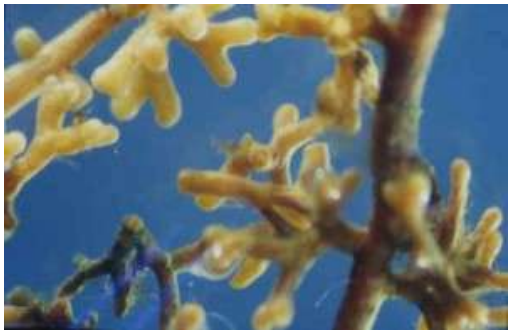


Figura. 8 Muestra de una raíz de una planta Vascular
Fuente: Raven & Eichhorn 2003

3.2.1. Anatomía de la Raíz

En el corte transversal de una raíz primaria se pueden distinguir tres zonas, que se corresponden con los tres sistemas de tejidos observados en el Vástago: la rizodermis (sistema dérmico), el córtex (sistema fundamental) y el cilindro vascular (sistema vascular).

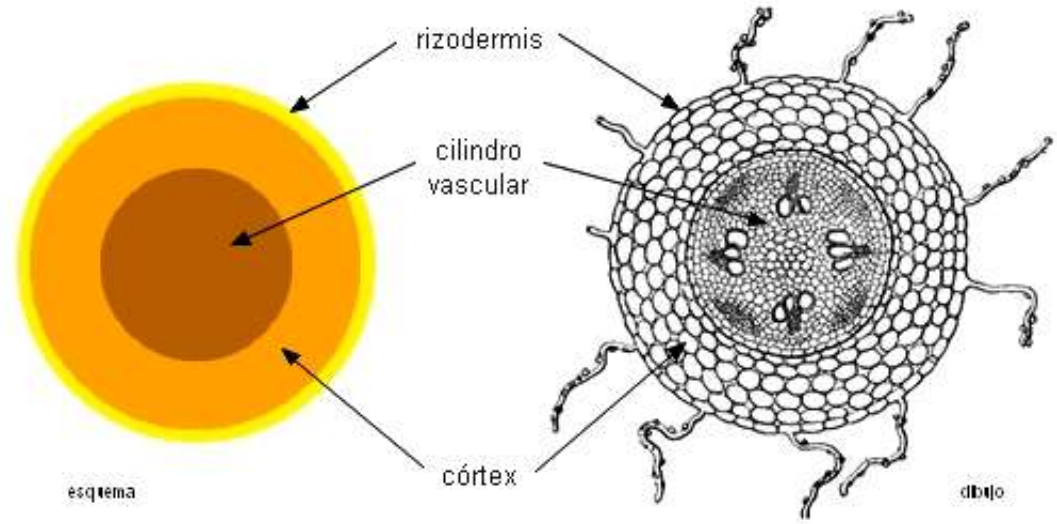


Figura. 9 Estructura de una raíz primaria (esquema y dibujo)
Fuente: Esau K.1977

3.2.2 Rizodermis

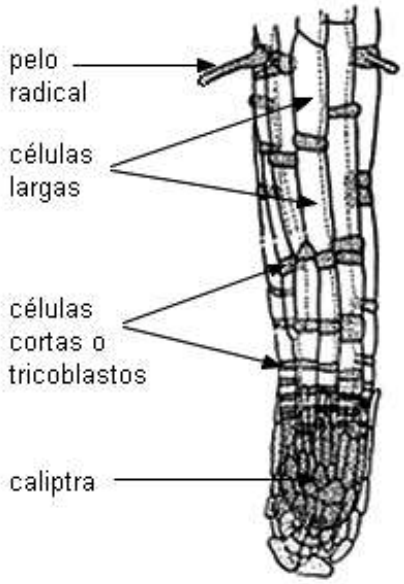


Figura 10. Esquema de la porción apical mostrando la composición de la epidermis
Fuente: Esau K. 1972

La epidermis de la raíz, la rizodermis, típicamente es uniestratificada, está formada por células alargadas, muy apretadas entre sí, de paredes delgadas, normalmente sin cutícula. En algunos casos se describió una cutícula, pero actualmente se cree que los compuestos detectados serían precursores de suberina que es un polímero natural (biopolímero) producido por las paredes celulares de las plantas, está formada por ácidos grasos hidróxidos y epóxidos unidos por enlaces éster y también por ácidos dicarboxílicos (Mauseth, 1988).

Los pelos radicales se encuentran en la zona pilífera; pueden originarse en todas las células epidérmicas, en algunas llamadas tricoblastos, o en la capa subepidérmica. Son tubulosos, raramente ramificados, con una vacuola central gigantesca, con citoplasma parietal, el núcleo poliploide va en el extremo que se alarga. Viven pocos días, su función es aumentar la superficie de absorción de la raíz (Lindorf *et al.*, 1991).

La familia Orchidaceae es la más grande y diversa del reino vegetal con más de 800 géneros, más de 25.000 especies distribuidas en todos los continentes (salvo en los desiertos permanentes y en los glaciares), con más especies que todos los animales vertebrados (excluyendo los peces óseos) (Hitrz, 2010).

En la región adyacente a la caliptra las células de la rizodermis son pequeñas y con citoplasma denso, sin vacuolas. En raíces que conservan su epidermis por largo tiempo, reemplazándola tardíamente por peridermis, las paredes celulares pueden engrosarse: suberificarse o lignificarse.

El estudio de los fósiles revela que las plantas más antiguas conocidas presentan endomicorrizas. Algunos investigadores postulan que el establecimiento de dichas asociaciones fue un paso decisivo en la colonización vegetal de la tierra firme. Los suelos disponibles debían ser muy pobres, o sea que el rol de las endomicorrizas puede haber tenido una importancia crucial, al extremo que los que invadieron la tierra pueden haber sido simbiontes antes que organismos (Raven *et al.*, 2003).

El método de inoculación va a consistir en aspersiones directas a la planta; las dosis que se van a emplear como inóculo se ajustaron previamente en diferentes pruebas de laboratorio con plantas obtenidas por propagación *in vitro* y se estudiaron para cada una de las especies.

Las orquídeas son plantas herbáceas, originarias de las regiones tropicales y subtropicales, aunque pueden encontrarse en cualquier parte del mundo. Presentan características biológicas muy diversas y su principal atractivo, tanto botánico como económico, lo constituyen sus flores, las cuales tienen variados tamaños siendo desde muy grandes y vistosas como las pertenecientes a la familia Cattleya , hasta las más extraordinariamente pequeñas como las del género *Lephantes* (Oria, 1996).

3.2.3 Velamen

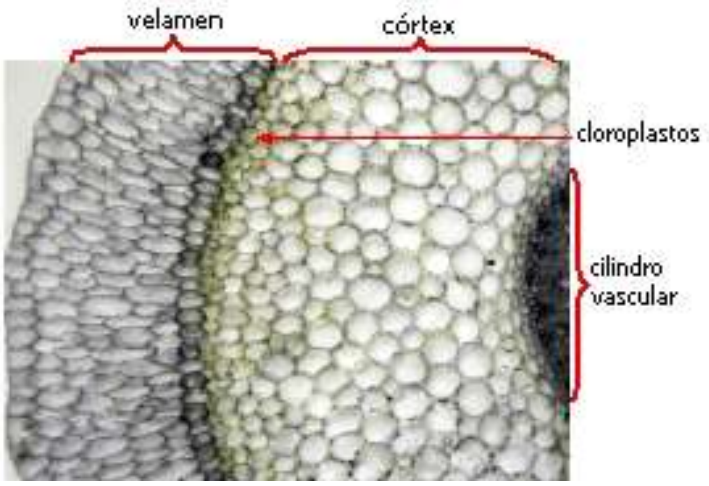


Figura 11. Velamen de Oncidium, transcorte de raíz aérea
Fuente: Oria, 1996.

Las raíces de las familias Orquidáceas y Aráceas epífitas presentan una rizodermis pluriestratificada denominada velamen, que también se puede encontrar en especies de otras familias como Cyperaceae y Velloziaceae. Algunas orquídeas terrestres también la tienen (Porembski & Barthlott 1988).

El velamen constituye una vaina esponjosa y blanquecina que rodea por completo a la raíz está constituida por células muertas de pared engrosada; los engrosamientos pueden

ser espiralados, reticulados o punteados. Si el tiempo está seco, están llenas de aire; cuando llueve se llenan de agua (Porembski & Barthlott 1988).

Su función principal parece ser la de protección mecánica, además de impedir la excesiva pérdida de agua del córtex. Porembski & Barthlott (1988) reconocen 10 tipos de velamen en orquídeas según el número de capas y las características de las células.

3.2.4 Córtex

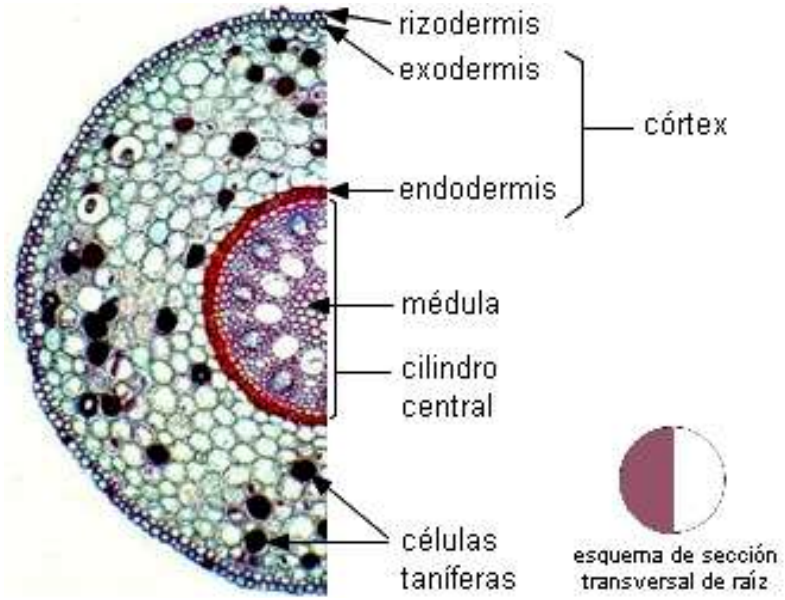


Figura12. Ubicación del córtex en transcorte de raíz
Fuente: Raven, & Eichhorn 2003

El córtex es la región comprendida entre la rizodermis y el cilindro central. Las capas más externas, debajo de la epidermis, pueden diferenciarse como un tejido especializado, la exodermis. La capa cortical más interna del córtex forma la endodermis en las plantas con semilla (Burr. & Barthlott., 1991).

El córtex propiamente dicho (la zona comprendida entre exodermis y endodermis) tiene estructura homogénea o está formado por varios tipos de células (Burr. & Barthlott., 1991).

Las raíces normalmente no presentan clorofila en el córtex, pero frecuentemente las células contienen almidón; pueden encontrarse idioblastos diversos que son las células que difieren a las que están a su alrededor, como por ejemplo células taníferas (los taninos se acumulan en la vacuola) o cristalíferas (poseen el parénquima axial septado); puede presentar estructuras secretoras como espacios intercelulares lisígenos (espacios que se forman por lisis de células enteras) o esquizógenos (cavidad que se forma gracias a que las células se separan por disolución de la laminilla media y por dilatación de los espacios intercelulares). En las Monocotiledóneas, donde se conserva largo tiempo, hay esclerénquima en abundancia. El esclerénquima puede tener disposición cilíndrica dentro de la exodermis o junto a la endodermis. Puede encontrarse colénquima (Burr. & Barthlott., 1991).

Las raíces de la familia Orchidaceae presentan cloroplastos en las células periféricas del córtex, por ejemplo las orquídeas con velamen tipo *Cymbidium*, presentan además, en el córtex, idioblastos traqueoidales; en el género *Grammangis*, todas las células del córtex están transformadas en un pseudovelamen formado por células traqueoidales vivas, con núcleo.

El pseudovelamen aparentemente no está relacionado con la absorción rápida de agua. Falta frente a las células endodérmicas de pasaje, frente a las raíces secundarias, en lugares donde se forman pelos absorbentes, y no se diferencia en células infectadas con micorrizas (Burr. & Barthlott., 1991).

3.2.5 Exodermis

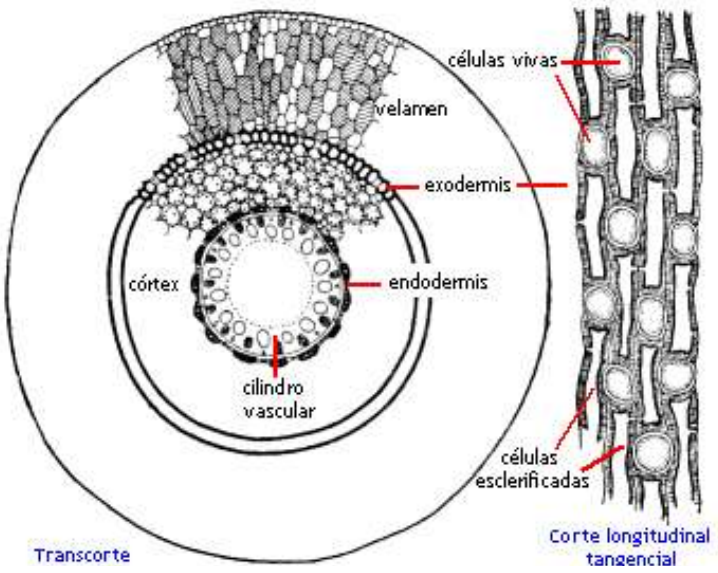


Figura13. Esquema de corte transversal y longitudinal
Fuente: Dibujos de Roth 1991

Las capas más externas del córtex, está formada por una a varias capas de células vivas, a veces incluyen esclerénquima. Sus células pueden ser todas alargadas y suberificadas o lignificadas o algunas ser cortas y no estar lignificadas (Burr. & Barthlott., 1991).

La exodermis de raíces de la familia Orchidaceae está formada por dos tipos de células, que en corte tangencial alternan regularmente:

1) células muertas, alargadas en sentido longitudinal, con paredes lignificadas, engrosadas y

2) células cortas con paredes delgadas y protoplasto vivo (Burr. & Barthlott., 1991).

3.2.6 Endodermis

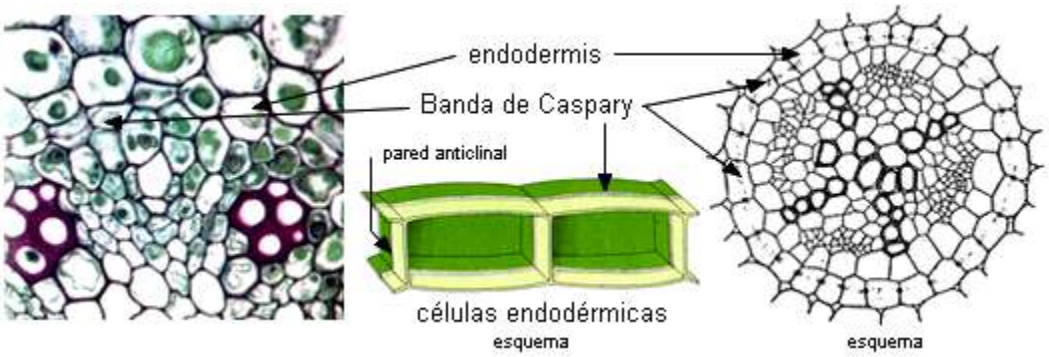


Figura 14. Endodermis y banda de Caspary en transcorte de raíz
Fuente: Raven 2003 y esquemas de Esau 1972.

La endodermis está presente en prácticamente todas las raíces, sólo se conocen tres especies que no la presentan: *Canarium commune* (Burseraceae), *Tinospora crispa* (Menispermaceae) y *Nyssa silvatica* (Cornaceae) (Mauseth, 1988).

Es una capa de células dispuestas de modo compacto, de aspecto parenquimático, divide el apoplasto de la raíz en dos compartimentos, lo que resulta muy conveniente para el desplazamiento selectivo de minerales y agua. Para entrar al cilindro vascular, es decir a la corriente transpiratoria, deben cruzar la membrana plasmática de una célula endodérmica, y así la planta controla qué iones pasan y qué iones son excluidos (Mauseth, 1988).

3.2.7 Cilindro Vascular

Comprende el sistema vascular y el parénquima asociado. Está delimitado por un tejido llamado periciclo, uni a pluriestratificado. Sus células son parenquimáticas, de paredes delgadas, alargadas, rectangulares en sección longitudinal. Puede contener laticíferos y conductos secretores. A veces queda interrumpido por la diferenciación de elementos del xilema y floema.

A menudo se esclerifica en raíces viejas de Monocotiledóneas sin crecimiento secundario (Roth, 1991).

En el sistema vascular el floema forma cordones por debajo del periciclo, tiene diferenciación centrípeta, el protofloema está en la periferia. El xilema está dispuesto en cordones que alternan con los de floema. El protoxilema es exarco, o sea que el desarrollo es centrípeto. El metaxilema puede tener vasos y traqueidas a veces no ocupa el centro (Roth, 1991).

3.2.8 Caliptra

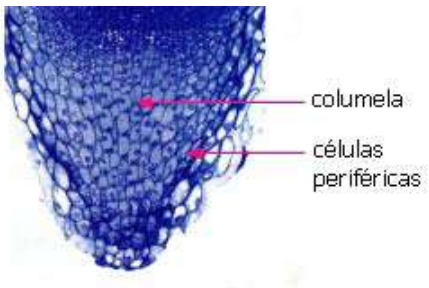


Figura 15. Caliptra en corte longitudinal radial
Fuente: Moore *et al.,* 1995

Está formada por células parenquimáticas vivas que a menudo contienen almidón. Las células se disponen hileras radiales, las células centrales forman un eje llamado columela. Las células apicales se diferencian en células periféricas que junto con las células epidérmicas secretan el mucigel, sustancia viscosa compuesta principalmente por polisacáridos elaborados en los dictiosomas. Las células periféricas se desprenden a medida que la raíz se abre paso en el suelo.

Desde hace mucho tiempo se sabe que la caliptra es el órgano que controla la geo-reacción de la raíz (Moore *et al.*, 1995).

3.2.9 Nódulos Radicales

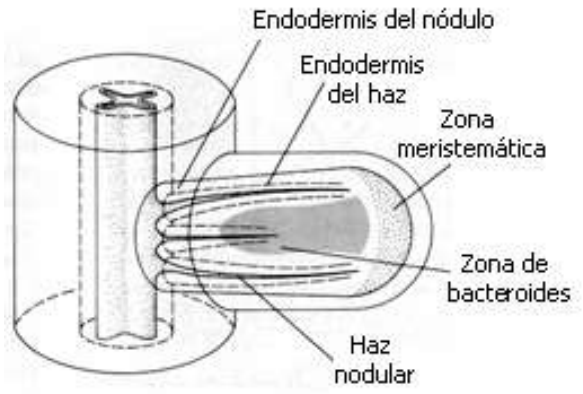


Figura 16. Diagrama tridimensional de raíz y un nódulo
Fuente: Mauseth 1988

Los nódulos radicales son asociaciones simbióticas entre bacterias y plantas superiores. La más conocida es la de *Rhizobium* con especies de Leguminosas. La planta proporciona a la bacteria compuestos carbonados como fuente de energía y un entorno

protector, y recibe nitrógeno en una forma utilizable para la formación de proteínas. La simbiosis entre cada especie de leguminosa y de *Rhizobium* es específica.

Los rizobios (bacterias) entran en los pelos radicales, que se deforman. La bacteria degrada la pared y la penetra; el crecimiento del pelo se altera, y se forma hacia adentro una estructura tubular llamada hebra de infección. La hebra se dirige a la base del pelo, y a través de las paredes celulares va al interior del córtex, las bacterias inducen la división celular en las células corticales, que se vuelven meristemáticas (Raven & Eichhorn 2003).

Cuando los rizobios son liberados de las hebras de infección y penetran en las células radicales, quedan envueltos por invaginaciones de la membrana plasmática de los pelos radicales. Debido a la continua proliferación de bacteroides (rizobios desarrollados) y células corticales, se forman unos crecimientos tumorales que constituyen los nódulos (Raven & Eichhorn 2003).

Los nódulos están formados por células infectadas por *Rhizobium* que adquieren gran tamaño y por células más pequeñas, no infectadas, que son ricas en peroxisomas y RE tubular (Raven & Eichhorn 2003).

METODOLOGÍA

4.1 UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN

4.1.1 Ubicación Política

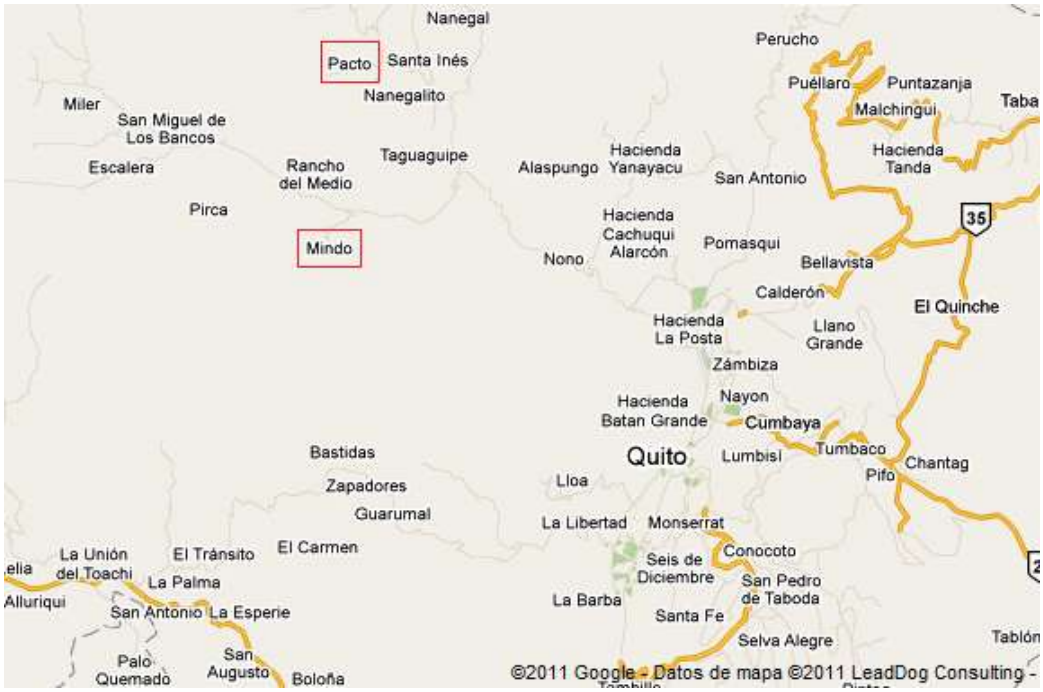
País: Ecuador

Cantón: Quito

Provincia: Pichincha

Lugar: Noroccidente (Parroquias de Mindo y Pacto)

4.1.2 Ubicación Geográfica



Fotografía1. Toma satelital del Noroccidente de Pichincha.

4.1.3 Ubicación Ecológica

Tabla. 2 Datos de ubicación Ecológica

Pacto	Mindo
Altitud: 1442 msnm	Altitud: 1400-1700 msnm
Temperatura promedio: 17 º C	Temperatura promedio: 19 º C
Precipitación anual: 1485 mm	Precipitación anual: 1352 mm
Vegetación: Bosque húmedo pre-montano	Vegetación: Bosque nublado
Piso latitudinal: Montano	Piso latitudinal: Montano
Luminosidad: 12h/luz	Luminosidad: 12h/luz

4.2 MATERIALES

4.2.1 Insumos: Medio de cultivo PDA para el aislamiento de endomicorrizas, Agua destilada a emplearse en varios medios, medios específicos para establecimiento de las endomicorrozas: Czapeck, Sphagnum(musgo), piedra pómez, corteza de coco y de pino para la preparación del sustrato, raíces de plantas madres para obtener las endomicorrizas.

4.2.2 Equipos: Cámara de flujo laminar, en la cual se realizaron las siembras, microscopios como medios visuales de identificación, balanza analítica, para pesar muestras de raíces colectadas, computadora, para tabulación de datos, jeringa de 10 ml para la inoculación de endomicorrizas, papel para determinar pH en los medios de cultivo.

4.2.3 Instrumentos: espátula para realizar la siembra en las cajas petri, asas de platino para tomar las muestras, cajas Petri para colocar el medio y sembrar las endomicorrizas, registros para llevar de forma organizada los datos.

4.3 MÉTODOS

4.3.1. Toma de Muestras y Aislamientos

Las muestras de las raíces de orquídeas se tomaron en dos localidades en Pacto y Mindo, para luego ser llevadas al laboratorio en donde se realizó el protocolo de aislamiento de las endomicorrizas, posterior a esto las plantas de donde se tomaron las muestras de las raíces se llevaron al invernadero para ser etiquetadas y tener un registro de las mismas y darles las condiciones ambientales de donde provienen.

Paso 1: Se cortaron tres muestras de raíces de las plantas de aproximadamente 1cm cada una para proceder a realizar la desinfección.

Paso 2: Se pusieron las muestras de las raíces en un vaso pequeño de vidrio con NaCl al 1 % durante un minuto, luego se sacaron las muestras y se realizó tres enjuagues con agua destilada esterilizada para retirar el exceso de NaCl, posteriormente se procedió a sacar las muestras en pedazos de papel estéril, todo esto se hizo dentro de la cámara de flujo para evitar que las muestras se contaminen.

Paso 3: Una vez realizada la desinfección de las muestras, se procedió a sembrar en las cajas Petri, y así obtener colonias aisladas. Al inocular en cajas Petri que contenían el medio PDA (papas, 250 g·litro^{-1}; dextrosa, 20 g·litro^{-1}; agar, 20 g·litro^{-1}) y el medio Czapeck ($NaNO_3$, 2 g·litro^{-1}; KCl, 0.5 g·litro^{-1}; $MgSO_4$ heptahidratado, 0.5 g·litro^{-1}; $FeSO_4$, 0.01 g·litro^{-1}; sacarosa, 30 g·litro^{-1}; agar, 12 g·litro^{-1}), ajustados a pH 5.6 y 6.8, respectivamente; esterilizados a 121°C durante 15 min, es importante que las muestras sean sembradas y etiquetadas para una posterior identificación, el micelio se separó con asa de platino.

Paso 4: Una vez obtenidas las colonias en las cajas Petri se procedió a realizar placas para la observación en el microscopio,el micelio fue separado con asa de platino estéril para poder hacer la caracterización de las mismas, se pudo determinar que en el medio Czapeck las colonias crecieron de mejor manera.

Paso 5: Todas las cajas Petri fueron incubadas a 29°C, durante un período no menor de 48 h a partir de las cuales se aislaran y depuraran las colonias que presenten características morfológicas diferentes; las cepas así obtenidas serán conservadas sobre ambos medios a 4°C (Martínez *et al*., 1981).

Paso 6: Los hongos fueron cultivados en tubos con PDA, una vez que se verificó un crecimiento abundante, en cámara de flujo laminar previamente desinfectada, se adicionó aceite de vaselina esterilizada a cada una de ellos.

4.3.2. Caracterización e identificación

Las cepas puras obtenidas fueron sembradas nuevamente en cajas Petri con medios Czapeck para obtener colonias más puras, incubándose a 29°C durante 48 h (Martínez *et al.*, 1981), a fin de obtener colonias puras y efectuar observaciones durante su desarrollo, para la identificación se consultó el manual clásico para hongos de suelo propuestos por Gilman, (1963).

Inoculación de plantas de orquídeas, con endomicorrizas Orquideales (CP/1283)

Para cumplir con los postulados de Koch, referidos a este caso especial, se procedió a incrementar el inóculo seleccionando los granos de trigo para usarlos como parte del sustrato. Para esto se ejecutaron los siguientes pasos:

Paso 1: Preparación de té, de zanahoria y otro de papa.

Paso 2: Los granos de trigo fueron macerados en los tés durante media hora.

Paso 3: Los granos recibieron un ligero oreo, luego fueron transferidos a frascos y a continuación fueron autoclavados a 15 psi durante 15 min.

Paso 4: En una cámara de de flujo laminar, previamente desinfectada, se procedió a sembrar las cepas seleccionadas como *Rhizoctonia* cultivadas en PDA y Czapek en el trigo. Este material fue incubado a 15 C por 4 días.

Cuando los frascos se encuentran llenos de la micorriza y su color es blanquecino los granos de trigo están completamente colonizados por el hongo.

Para poder realizar la inoculación se procede a tomar alrededor de 3 a 5 granos de trigo con la micorriza y ponerlos en 3 gramos de sustrato molido lo cual nos permitirá hacer una inoculación más efectiva.

Este proceso se efectuó en plántulas del género *Masdevallia* las cuales fueron seleccionadas según su talla, teniéndose en cuenta el número y largo de las hojas. Como hongos endomicorrízicos se emplearon la cepa de *Rhizoctonia* (CP/1283) que se obtuvo de los aislamientos, la frecuencia de inoculaciones con endomicorrizas se realizó los días lunes y miércoles dependiendo del tratamiento.

Las plántulas inoculadas se sembraron en macetas plásticas, el sustrato estaba constituido por una mezcla de musgo (sphagnum), corteza de coco y corteza de pino en una proporción de 1:1:1. El muestreo se realizó a los 7 días del transplante, evaluándose la altura, el número de hojas y número de brotes. Se calculó los incrementos para todas las variables comparando los tratamientos inoculados con el testigo sin inocular.

Para evaluar el efecto de la inoculación sobre algunas variables de crecimiento se contaron el número de hojas, raíces y brotes durante un periodo de tiempo que duró el experimento.

4.3.4 Diseño Experimental

4.3.4.1 Factores a probar

Tabla 3. Especies y frecuencias de inoculación.

Especies	Frecuencia de Inoculación Endomicorrizas
E1 *Masdevallia scitula*	I1: Una aplicación con endomicorrizas orquideales C/P 1283
E2: *Masdevallia coccinea*	I2: Dos aplicaciones con endomicorrizas orquideales C/P 1283

4.3.4.2 Tratamientos a comparar

De la combinación de los dos factores en estudio más dos testigos, uno por cada especie, se tuvo un total de 6 tratamientos:

Tabla 4. Tratamientos y dosis

Tratamientos	Nomenclatura	Descripción
T1	E1F1D	Plántulas de *Masdevallia scitula,*1aplicación de endomicorrizas, dilución al 1%
T2	E1F2D	Plántulas de *Masdevallia scitula*,2 aplicaciones de endomicorrizas, dilución al 1%
T3	E1 TESTIGO	Plántulas regadas con agua
T4	E2F1D	Plántulas de *Masdevallia coccinea,*1aplicación de endomicorrizas, dilución al 1%
T5	E2F2D	Plántulas de *Masdevallia coccínea* ,2 aplicaciones de endomicorrizas, dilución al 1%
T6	E2 TESTIGO	Plántulas regadas con agua

4.3.4.3 Tipo de diseño

Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar en un análisis grupal donde los grupos constituyeron las especies y dentro de cada grupo las inoculaciones con endomicorrizas y el testigo.

4.3.4.4 Características de las UE

Cada unidad experimental estuvo conformada por 5 plántulas de orquídeas (UE).

Número de unidades experimentales : 90 plántulas

Altura de la plántula: 8-10 cm

Forma de la UE: bloque de 5 pilones

Largo del Pilón: 4 cm

Ancho del Pilón: 4 cm

Forma del ensayo: Bloques al azar

4.3.4.5 Croquis del diseño

A	B	C
T6R1	T1R2	T1R3
T2R1	T5R2	T6R3
T5R1	T2R2	T4R3
T1R1	T3R2	T2R3
T3R1	T6R2	T5R3
T4R1	T4R2	T3R3

4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.4.1. Esquema de Análisis de Variancia

Fuentes de variación	Grados de libertad
Total	17
Repeticiones	2
Tratamientos	(5)
Entre Grupos (Especie)	1
DG1 (Masdevallia)	(2)
F1xF2	1
Testigo vs Resto	1
DG2 (Dracula)	(2)
F1xF2	1
Testigo vs Resto	1
Error	10

4.4.2 Análisis Funcional

Prueba de Duncan al 5% para comparar tratamientos y DMS al 5% para hacerlo entre especies y, tratamientos dentro de cada especie.

4.4.3 Análisis Económico

Según Perrin *et al*, (1976), se procedió a obtener los beneficios brutos que corresponden al número de platas obtenidas. Los costos variables corresponden a las inoculaciones de las endomicorrizas utilizados en los diferentes tratamientos, así como la mano de obra

para su aplicación. De la diferencia del beneficio bruto y los costos variable se obtuvo el beneficio neto. Colocando los beneficios netos en orden descendente acompañado de sus costos variables se procedió a realizar el análisis de dominancia donde, tratamiento dominado es aquel que es igual o menor al beneficio neto con respecto al costo variable. Con los tratamientos no dominados se procedió a realizar el análisis marginal y por medio del TIRM (Tasa interna de retorno marginal), se seleccionaron los tratamientos más económicos.

4.5 Variables a Medir

- Elongación de las plántulas
- Número de hojas
- Aparecimiento de nuevos brotes o hijuelos

4.5.1 Elongación de las plántulas

La altura de las plantas es un aspecto muy importante en el cultivo de muchas plantas florales y plántulas *ex vitro* (Vogelezang, 2000). La relación entre altura y biomasa es directa, por lo cual su registro es de gran importancia, pudiendo evidenciar la respuesta de las plántulas a la aplicación del biopreparado a base de endomicorrizas, de una forma cuantitativa y objetiva.

Para la toma de datos se procedió a medir desde el sustrato hasta la hoja más desarrollada.

4.5.2 Número de hojas

Se evaluó el número de hojas de cada plántula mediante la observación de cada una de ellas, práctica que se efectuó cada semana, los días sábados, en el invernadero que poseía las condiciones propicias para el eficiente desarrollo de las plántulas. Se debe considerar que la mayoría de las orquídeas tienen hojas de color verde claro, por lo que de presentarse algún cambio se anota en el registró en observaciones. Debido a que el número de hojas es importante para que una planta de orquídea florezca (Andersen& Andersen 2000).

4.5.3 Aparecimiento de nuevos brotes o hijuelos

Para las orquídeas es fundamental el aparecimiento de nuevos brotes, esto será un indicativo de que el biopreparado está produciendo el efecto deseado, por lo que se realizó observaciones cada 15 días dentro del invernadero y se anotaron los cambios que presentaron las plántulas. Para esto se utilizó una tabla en donde constó la fecha en la cual se hizo la observación.

4.6 MÉTODOS ESPECÍFICOS DE MANEJO DEL EXPERIMENTO

Se realizaron observaciones diarias para ver los cambios que presentaban las plántulas, se efectuó un riego por semana para mantener la humedad relativa, se procedió a la toma de datos de los tratamientos todos los días sábados y la revisión de las

temperaturas dentro del invernadero fue monitoreada con frecuencia a fin de evitar que se quemen las plántulas.

Se procedió a anotar los datos obtenidos, en la tabla de registro que se presenta a continuación:

Tabla 5. Formato de toma de datos

Fecha	Tratamiento	Plántula	Longitud total	Número de hojas	Número de brotes	Observaciones
			cm	#	#	

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- **Caracterización**

Una vez hecha la caracterización de las colonias puras se pudo determinar que efectivamente era una cepa de *Rhizoctonia solani* que se la nombró (CP/1283), esta posee características de formar micelio estéril que es incoloro cuando pasa por su etapa juvenil pero que se torna amarillo o de color café claro conforme madura. El micelio consta de células largas y produce ramificaciones que crecen casi en ángulo recto con respecto a la hifa principal, se estrechan ligeramente a nivel de la bifurcación y poseen una septa cerca de ella.

Las características de la ramificación comúnmente son los únicos medios disponibles para identificar al hongo como *Rhizoctonia.* En ciertas condiciones, el hongo produce ramilletes de células cortas, anchas, de forma oval o triangular y que se asemejan a esclerocidos, las cuales funcionan como clamidosporas, o en todo caso, dichos ramilletes se desarrollan en pequeños esclerocios de color café a negro dispuestos en forma laxa, los cuales son comunes en algunos hospedantes.

R. solani rara vez produce un estado perfecto de basidiomiceto conocido como *Pellicularia filamentosa* o *Thanatephous cucumeris*. Esta fase perfecta se forma cuando hay suficiente humedad y tiene el aspecto de un mildiu fino (puede parecer una pelusa blanquecina o grisácea) que se desarrolló sobre el sustrato o suelo. Los basidios tienen forma de barril, se forman sobre una capa membranosa de micelio y tienen cuatro

esterigmas (células especializadas), cada uno de los cuales produce una basidiospora ovoide.

5.1 ALTURA DE PLANTA

Al establecer el análisis de variancia para la altura de planta de dos especies de orquídeas, bajo el efecto de dos frecuencias de inoculación de endomicorrizas, en doce evaluaciones, no se encontró diferencias estadísticas para repeticiones y tratamientos, así como el resto de fuentes de variación establecidas a excepción de las tres últimas evaluaciones de las repeticiones que manifestaron diferencias al 5%, y de la comparación del testigo vs el resto de tratamientos en la especie *M. coccinea* que presentaron diferencias estadísticas a nivel del 5% en las evaluaciones décimo primera y décimo segunda (cuadro 1).

Los promedios generales de la altura de planta de las orquídeas se fueron incrementando desde 13.96 cm en la primera evaluación hasta alcanzar un promedio de 15.07 en la decimo segunda evaluación. Los coeficientes de variación se encuentran entre 9.26 a 11.89%

CUADRO 1 Análisis de variancia para la altura de planta de dos especies de orquídeas bajo el efecto de dos frecuencias de inoculación de endomicorrizas

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	EVALUACIONES DE ALTURA DE PLANTA (cm)					
		1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª
Total	17						
Repeticiones	2	0.64ns	1.28ns	1.46ns	3.07ns	4.45ns	6.43ns
Tratamientos	(5)	1.82ns	1.78ns	2.52ns	2.53ns	3.46ns	4.13ns
Entre (Especie)	1	0.72ns	0.37ns	0.18ns	0.06ns	0.07ns	0.07ns
DG1 (*M.scitula*)	(2)	1.79ns	2.14ns	2.09ns	2.63ns	2.94ns	3.63ns
Testigo vs Resto	1	0.61ns	0.43ns	0.002ns	0.04ns	0.27ns	0.44ns
F1vsF2	1	2.94ns	3.84ns	4.16ns	5.23ns	5.61ns	6.83ns
DG2 (*M.coccinea*)	(2)	2.40ns	2.16ns	4.12ns	4.42ns	5.69ns	6.66ns
Testigo vs Resto	1	4.70ns	4.30ns	8.00ns	8.82ns	11.0ns	13.01ns
F1vsF2	1	0.11ns	0.03ns	0.24ns	0.03ns	0.33ns	0.33ns
Error	10	1.796	1.83	1.72	2.01	2.61	2.87
$\bar{X}$(cm)		13.96	13.97	14.17	14.28	14.44	14.57
CV(%)		9.60	9.71	9.26	9.93	11.19	11.62

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	EVALUACIONES DE ALTURA DE PLANTA (cm)					
		7ª	8ª	9ª	10ª	11ª	12ª
Total	17						
Repeticiones	2	7.91ns	10.78ns	12.09ns	13.83*	14.24*	14.82*
Tratamientos	(5)	4.84ns	4.83ns	4.70ns	4.67ns	4.89ns	4.79ns
Entre (Especie)	1	0.011ns	0.18ns	0.08ns	0.00ns	0.00ns	0.04ns
DG1 (*M.scitula*)	(2)	4.33ns	4.27ns	4.81ns	4.88ns	5.10ns	5.03ns
Testigo vs Resto	1	0.05ns	0.38ns	0.50ns	0.64ns	0.57ns	0.44ns
F1vsF2	1	8.17ns	8.17ns	9.13ns	9.13ns	9.63ns	9.63ns
DG2 (*M.coccinea*)	(2)	7.71ns	7.71ns	6.90ns	6.78ns	7.13ns	6.94ns
Testigo vs Resto	1	14.94ns	14.94ns	13.52ns	13.52ns	14.22*	13.87*
F1vsF2	1	0.48ns	0.48ns	0.28ns	0.04ns	0.04ns	0.02ns
Error	10	3.05	3.08	2.83	2.46	3.44	2.45
$\bar{X}$(cm)		14.68	14.79	14.87	14.99	15.03	15.07
CV(%)		11.89	11.86	11.32	10.46	10.38	9.95

Si bien las dos especies en cada una de las evaluaciones no manifestaron diferencias estadísticas en la altura de planta; sin embargo, *M. coccínea* presentó promedios ligeramente superiores en la mayoría de evaluaciones (cuadro 2).

CUADRO 2 Altura de planta promedio de dos especies de orquídeas en doce evaluaciones

ESPECIES	EVALUACIONES DE ALTURA DE PLANTA (cm)					
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª
E1 *M. scitula*	13.76	13.82	14.07	14.22	14.38	14.51
E2 *M. coccinea*	14.16	14.11	14.27	14.33	14.50	14.63

ESPECIES	EVALUACIONES DE ALTURA DE PLANTA (cm)					
	7ª	8ª	9ª	10ª	11ª	12ª
E1 *M. scitula*	14.60	14.69	14.80	14.98	15.02	15.11
E2 *M. coccinea*	14.76	14.89	14.93	15.00	15.02	15.04

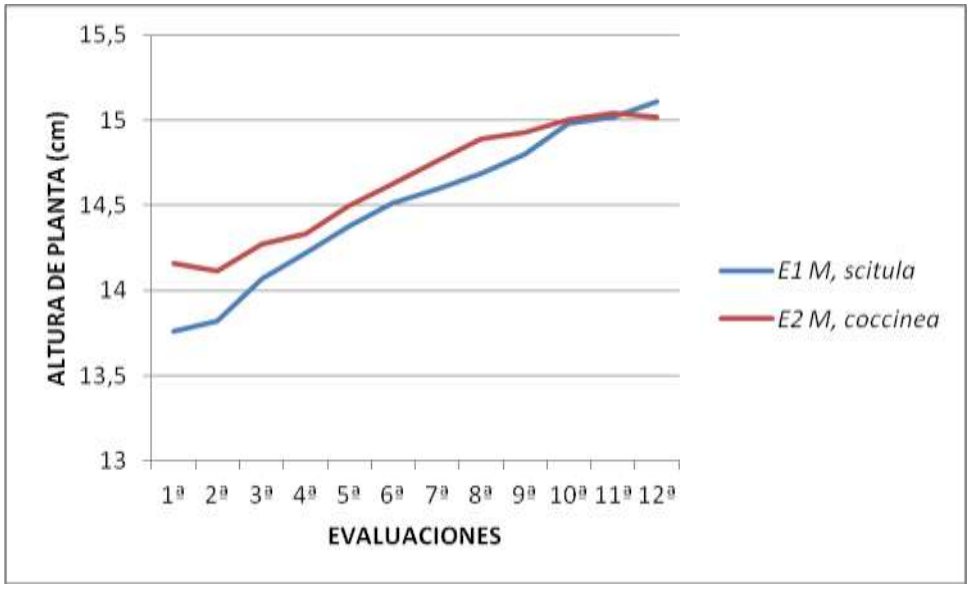


GRÁFICO 1 Curvas de crecimiento de la altura de planta promedio de dos especies de orquídeas en doce evaluaciones

Al analizar todos los tratamientos, si bien no se manifestó diferencias estadísticas se pudo apreciar que los mayores promedios en las dos primeras evaluaciones correspondieron a la especie *M. coccínea*,, en las dos frecuencias de aplicación de las endomicorrizas, pero a partir de la tercera evaluación los mayores promedios

correspondieron a la aplicación de dos veces las endomicorrizas en cada una de las dos especies (cuadro 3).

CUADRO 3 Altura de planta promedio de dos especies de orquídeas en doce evaluaciones bajo el efecto de dos frecuencias de inoculación de endomicorrizas y un testigo, en doce evaluaciones.

TRATAMIENTOS	EVALUACIONES DE ALTURA DE PLANTA (cm)					
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª
E1F1	12.67	12.87	13.20	13.33	13.53	13.60
E1F2	14.27	14.47	14.87	15.20	15.47	15.73
E1 testigo	14.13	14.13	14.13	14.13	14.13	14.20
E2F1	14.80	14.53	14.73	14.97	15.05	15.25
E2F2	14.53	14.67	15.13	15.10	15.52	15.72
E2 testigo	13.13	13.13	12.93	12.93	12.93	12.93

TRATAMIENTOS	EVALUACIONES DE ALTURA DE PLANTA (cm)					
	7ª	8ª	9ª	10ª	11ª	12ª
E1F1	13.60	13.67	13.73	13.93	13.93	14.00
E1F2	15.93	16.00	16.20	16.40	16.47	16.53
E1 testigo	14.27	14.40	14.47	14.60	14.67	14.80
E2F1	15.38	15.52	15.58	15.78	15.85	15.85
E2F2	15.95	16.08	16.02	15.95	16.02	15.95
E2 testigo	12.93	13.07	13.20	13.27	13.27	13.27

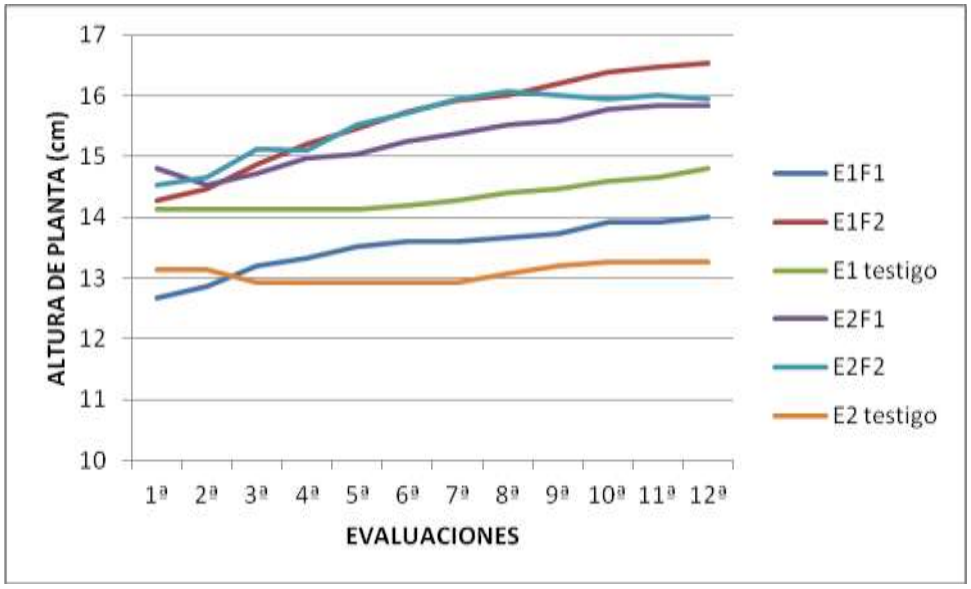


GRÁFICO 2 Curvas del crecimiento de la altura de planta promedio de dos especies de orquídeas en doce evaluaciones bajo el efecto de dos frecuencias de inoculación de endomicorrizas y un testigo, en doce evaluaciones.

5.2 NÚMERO DE HOJAS

El análisis de variancia para el número de hojas de dos especies de orquídeas bajo el efecto de dos frecuencias de inoculación de endomicorrizas, no presentó diferencias estadísticas para repeticiones y tratamientos en las seis primeras evaluaciones, pero en la séptima evaluación exhibieron diferencias estadísticas a nivel del 5% y en las siguientes evaluaciones se diferenciaron al 1%. En cada una de las evaluaciones las especies de orquídeas en estudio no se diferenciaron estadísticamente. Los tratamientos dentro de la especie *M. sccitula* no se diferenciaron estadísticamente en las seis primeras evaluaciones y en las comparaciones establecidas, pero a partir de la octava evaluación los tratamientos respectivos se diferenciaron a nivel del 5% y a partir de la séptima evaluación el testigo se diferenció de los tratamientos con la aplicación de endomicorrizas; las frecuencias de inoculación de las endomicorrizas de la especie *M. sccitula* no se difirieron estadísticamente. Dentro de la especie de *M. coccínea* los tratamientos difirieron estadísticamente a partir de la sexta evaluación, al nivel del 5%

en la sexta y séptima y en el resto a nivel del 1%, el testigo se diferenció de los tratamientos con endomicorrizas a nivel del 5% en las evaluaciones quinta y sexta y a nivel del 1% de la séptima a la décimo segunda; las dos frecuencias de inoculación de endomicorrizas no presentaron significación estadística en las evaluaciones (cuadro 4).

Los promedios generales del número de hojas de las orquídeas, se fueron incrementando de 9.41 en la primera evaluación hasta ubicarse en un promedio de 15.57 en la décimo segunda evaluación, con coeficientes de variación entre 9.25 a 14.56%.

CUADRO 4 Análisis de variancia para el número de hojas promedio por planta de dos especies de orquídeas bajo el efecto de dos frecuencias de endomicorrizas

FUENTES DE VARIACIÓN	**GL**	**EVALUACIONES DEL NÚMERO DE HOJAS/PLANTA**					
		1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª
Total	17						
Repeticiones	2	5.52ns	1.57ns	0.90ns	3.49ns	4.88ns	8.62ns
Tratamientos	(5)	0.33ns	0.41ns	1.10ns	3.36ns	4.43ns	6.51ns
Entre (Especie)	1	0.67ns	0.12ns	0.00ns	1.00ns	0.52ns	0.81ns
DG1 (*M.scitula*)	(2)	0.24ns	0.79ns	1.78ns	3.59ns	4.14ns	5.71ns
Testigo vs Resto	1	0.42ns	1.26ns	3.14ns	5.47ns	6.58ns	8.49ns
F1vsF2	1	0.06ns	0.33ns	0.43ns	1.71s	1.71ns	2.94ns
DG2 (*M.coccinea*)	(2)	0.25ns	0.17ns	0.96ns	4.32ns	6.67ns	10.15*
F1vsF2	1	0.50ns	0.18ns	1.50ns	8.54ns	13.35*	20.26*
Testigo vs Resto	1	0.01ns	0.17ns	0.43ns	0.11ns	0.00ns	0.04ns
F1vsF2	10	1.83	1.78	1.73	2.57	2.06	2.28
$\bar{X}$(N°)		9.41	9.98	10.58	11.01	11.69	12.33
CV(%)		14.39	13.36	12.42	14.56	12.28	12.25

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	EVALUACIONES DEL NÚMERO DE HOJAS/PLANTA					
		7ª	8ª	9ª	10ª	11ª	12ª
Total	17						
Repeticiones	2	11.43*	17.16**	26.13**	41.31**	50.13**	55.82**
Tratamientos	(5)	9.75*	11.79**	14.86**	17.55**	20.38**	22.07**
Entre (Especie)	1	1.09ns	0.75ns	0.64ns	0.77ns	0.97ns	0.38ns
DG1 (*M.scitula*)	(2)	8.53ns	8.54*	10.38*	11.84*	11.92*	14.22*
Testigo vs Resto	1	12.57*	12.57*	15.53*	18.08*	16.13*	18.81*
F1vsF2	1	4.51ns	4.51ns	5.23ns	5.61ns	7.71ns	9.63ns
DG2 (*M.coccinea*)	(2)	15.29*	20.56**	26.45**	31.64**	38.53**	40.76**
Testigo vs Resto	1	30.55**	41.10**	52.87**	63.28**	76.47**	80.22**
F1vsF2	1	0.03ns	0.02	0.03ns	0.00ns	0.60ns	1.31ns
Error	10	2.29	1.97	1.71	2.06	2.16	2.27
$\bar{X}$(N°)		12.99	13.63	14.15	14.69	15.22	15.57
CV(%)		11.65	10.29	9.25	9.77	9.65	9.67

Las dos especies de orquídeas no se diferenciaron estadísticamente en el número de hojas en cada una de las evaluaciones realizadas; sin embargo, en las dos primeras evaluaciones los promedios más altos correspondieron a la especie *M. coccínea*, equilibrándose en la tercera evaluación para luego presentar ligeros mayores promedios la especie *M. scitula* (cuadro 5).

CUADRO 5 Número de hojas promedio de dos especies de orquídeas en doce evaluaciones

ESPECIES	EVALUACIONES DEL NÚMERO DE HOJAS/PLANTA					
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª
E1 *M. scitula*	9.21	9.90	10.58	11.25	11.86	12.55
E2 *M. coccinea*	9.60	10.07	10.58	10.78	11.52	12.12

ESPECIES	EVALUACIONES DEL NÚMERO DE HOJAS/PLANTA					
	7ª	8ª	9ª	10ª	11ª	12ª
E1 *M. scitula*	13.23	13.83	14.34	14.90	15.45	15.71
E2 *M. coccinea*	12.74	13.42	13.96	14.47	14.99	15.42

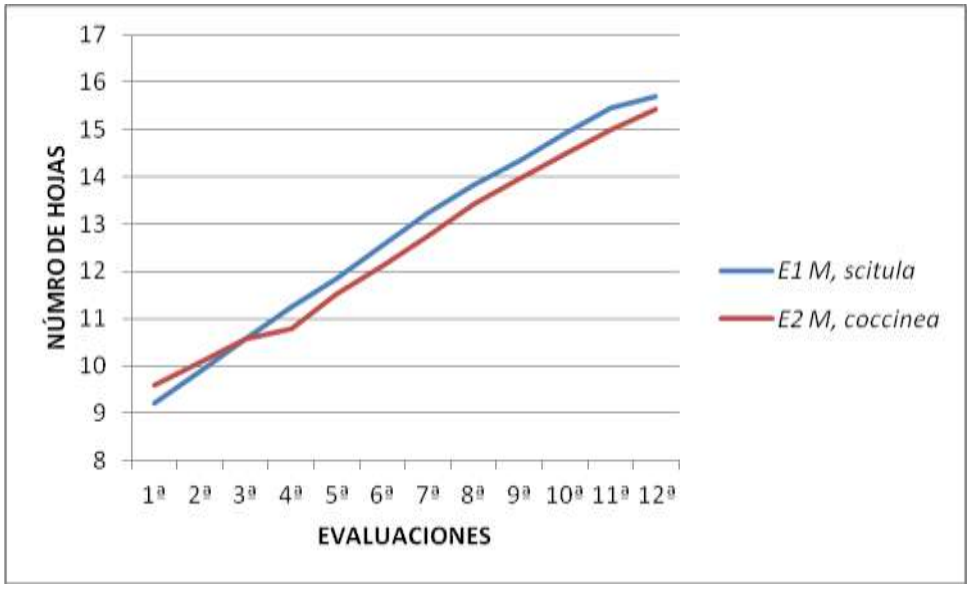


GRÁFICO 3 Curvas del número de hojas promedio de dos especies de orquídeas en doce evaluaciones

Al analizar todos los tratamientos se puede apreciar claramente tanto en el cuadro 6 como en el gráfico 3 la eficiencia de las endomicorrizas sobre la mayor presencia de hojas en las dos especies de orquídeas, pues los tratamientos correspondientes manifestaron de manera general una mayor presencia de hojas que el testigo, en todas

las evaluaciones. Además dentro de cada especie y en cada una de las evaluaciones en plantas sometidas a las dos frecuencias de inoculación de endomicorrizas, presentaron un mayor promedio de hojas que las de una sola aplicación que fueron inoculadas en una sola oportunidad (cuadro 6).

CUADRO 6 Número de hojas promedio de dos especies de orquídeas bajo el efecto de dos frecuencias de inoculación de endomicorrizas y un testigo, en doce evaluaciones.

TRATAMIETOS	EVALUACIONES DEL NÚMERO DE HOJAS/PLANTA					
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª
E1F1	9.27	9.93	10.73	11.27	11.93	12.53
E1F2	9.47	10.40	11.27	12.33	13.00	13.93
E1 testigo	8.91	9.37	9.75	10.15	10.65	11.17
E2F1	9.47	10.00	10.60	11.33	12.40	13.10
E2F2	9.40	10.33	11.13	11.60	12.37	13.27
E2 testigo	9.93	9.87	10.00	9.40	9.80	10.00

TRATAMIETOS	EVALUACIONES DEL NÚMERO DE HOJAS/PLANTA					
	7ª	8ª	9ª	10ª	11ª	12ª
E1F1	13.20ab	13.80ab	14.33ab	14.93ab	15.27ab	15.47ab
E1F2	14.93a	15.53a	16.20a	16.87a	17.53a	18.00a
E1 testigo	11.56bc	12.16bc	12.48bc	12.89bc	13.56b	13.67bc
E2F1	13.97ab	14.88a	15.60a	16.33a	16.73a	17.07ª
E2F2	14.12ab	14.98a	15.75a	16.38a	17.37a	18.00a
E2 testigo	10.13c	10.40c	10.53 c	10.73c	10.87c	11.20c

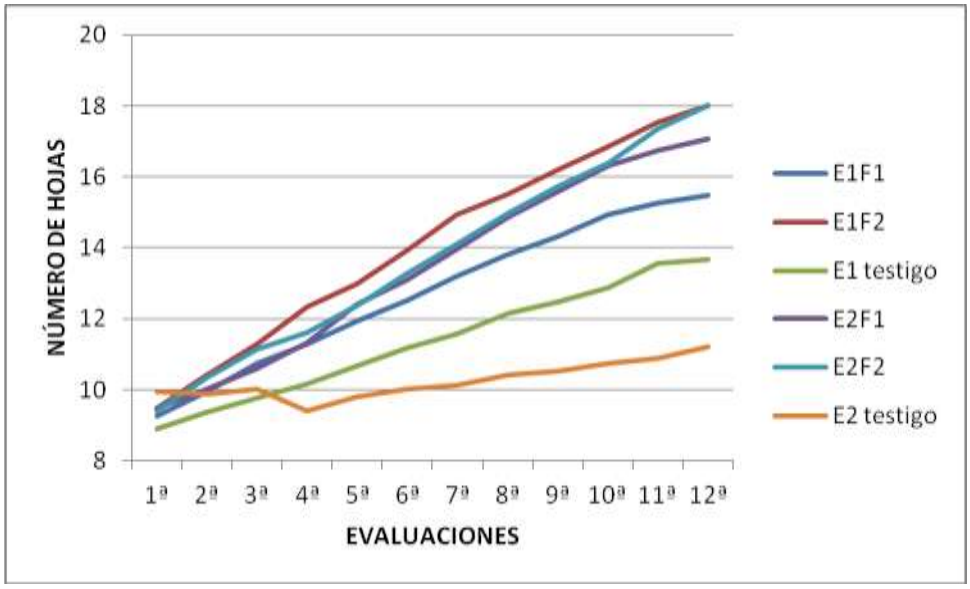


GRÁFICO 4 Curvas del número de hojas promedio de dos especies de orquídeas en doce evaluaciones bajo el efecto de dos frecuencias de endomicorrizas y un testigo, en doce evaluaciones.

De los resultados anteriores se desprende que las micorrizas están cumpliendo una función muy adecuada para proveer fósforo y mejorar el desarrollo de las orquídeas, está corroborado por Strasburger (2004) quien manifiesta que las hifas de las micorrizas se extienden varios centímetros por fuera de la raíz, incrementando la cantidad de nutrientes absorbidos, el intercambio entre hongo y hospedante tiene lugar en los arbúsculos, que se llenan de gránulos de fosfatos. Por otro lado se sabe que las endomicorrizas son muy importantes en los trópicos donde los suelos tienden a retener los fosfatos.

5.3 NÚMERO DE BROTES

Al establecer los análisis de variancia para el número de brotes en dos especies de orquídeas bajo dos frecuencias de inoculación de endomicorrizas, no se encontró diferencias estadísticas para repeticiones en cada una de las evaluaciones establecidas a excepción en la séptima evaluación. Los tratamientos se diferenciaron estadísticamente al nivel del 5% y 1%, salvo en dos evaluaciones (5ª y 10ª). Las dos especies no se diferenciaron estadísticamente en las diversas evaluaciones. En términos generales los tratamientos dentro de cada especie acusaron significación estadística debido a que el testigo tuvo un comportamiento diferente a los tratamientos con la aplicación de endomicorrizas; no obstante las frecuencias de aplicación de inóculo de micorriza varió estadísticamente en cada una de las evaluaciones realizadas (cuadro 7).

Los promedios generales del número de brotes fueron muy bajos y se encuentran enmarcados entre 0.72 a 1.11, con coeficientes de variación altos entre 27.71 a 44.47%, debido a la gran variabilidad presente dentro de cada tratamiento.

CUADRO 7 Análisis de variancia para el número de brotes promedio de dos especies de orquídeas bajo el efecto de dos frecuencias de inoculación de endomicorrizas y un testigo.

FUENTES DE VARIACION	GL	EVALUACIONES DEL NÚMERO DE BROTES/PLANTA					
		1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª
Total	17						
Repeticiones	2	0.22ns	0.06ns	0.03ns	0.03ns	0.13ns	0.06ns
Tratamientos	(5)	0.60*	0.76**	0.51**	0.58**	0.24ns	0.25*
Entre (Especie)	1	0.22ns	0.14ns	0.02ns	0.04ns	0.02ns	0.08ns
DG1 *(M.scitula)*	(2)	0.41ns	0.49ns	0.49**	0.87**	0.093ns	0.17ns
Testigo vs Resto	1	0.72*	0.98*	0.98**	1.05**	0.18ns	0.32*
F1vsF2	1	0.11ns	0.01ns	0.01ns	0.24ns	0.01ns	0.03ns
DG2 *(M.coccinea)*	(2)	0.96**	1.33**	0.76**	0.55**	0.49ns	0.41**
Testigo vs Resto	1	1.39**	2.57**	1.25**	1.08**	0.98*	0.72**
F1vsF2	1	0.54ns	0.11ns	0.24ns	0.03ns	0.01ns	0.11ns
Error	10	0.11	0.12	0.06	0.06	0.14	0.05
$\bar{X}$(N°)		0.84	1.11	0.77	0.73	0.83	0.80
CV(%)		39.55	31.29	32.99	33.03	44.47	27.00

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	EVALUACIONES DEL NÚMERO DE BROTES/PLANTA					
		7ª	8ª	9ª	10ª	11ª	12ª
Total	17						
Repeticiones	2	0.47*	0.19ns	0.09ns	0.06ns	0.00ns	0.06ns
Tratamientos	(5)	0.55**	0.43**	0.58**	0.58ns	0.55**	0.42*
Entre (Especie)	1	0.05ns	0.06ns	0.08ns	0.02ns	0.06ns	0.00ns
Testigo vs Resto	(2)	0.57*	0.49**	0.76**	0.28ns	0.89**	0.46*
F1vsF2	1	0.98**	0.89**	1.28**	0.57*	1.62**	0.89**
Testigo vs Resto	1	0.17ns	0.11ns	0.24ns	0.00ns	0.17ns	0.03ns
DG2 (M.coccinea)	(2)	0.78**	0.55**	0.65**	0.40*	0.46*	0.59*
Testigo vs Resto	1	1.39**	1.07**	1.28**	0.80*	0.89**	1.18**
F1vsF2	1	0.17ns	0.03ns	0.03ns	0.01ns	0.03ns	0.01ns
Error	10	0.08	0.05	0.05	0.10	0.08	0.08
$\bar{X}$(N°)		0.81	0.83	0.73	0.72	0.79	0.91
CV(%)		35.35	27.71	31.10	43.39	35.75	31.73

En el cuadro 8 se presentan los promedios del número de brotes para cada una de las especies, los cuales no se diferenciaron estadísticamente

CUADRO 8 Número de brotes promedio de dos especies de orquídeas en doce evaluaciones

ESPECIES	EVALUACIONES DEL NÚMERO DE BROTES/PLANTA					
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª
E1 *M. scitula*	0.73	1.20	0.73	0.78	0.87	0.87
E2 *M. coccinea*	0.96	1.02	0.80	0.69	0.80	0.73

ESPECIES	EVALUACIONES DEL NÚMERO DE BROTES/PLANTA					
	7ª	8ª	9ª	10ª	11ª	12ª
E1 *M. scitula*	0.87	0.78	0.80	0.69	0.73	0.91
E2 *M. coccinea*	0.76	0.89	0.67	0.76	0.84	0.91

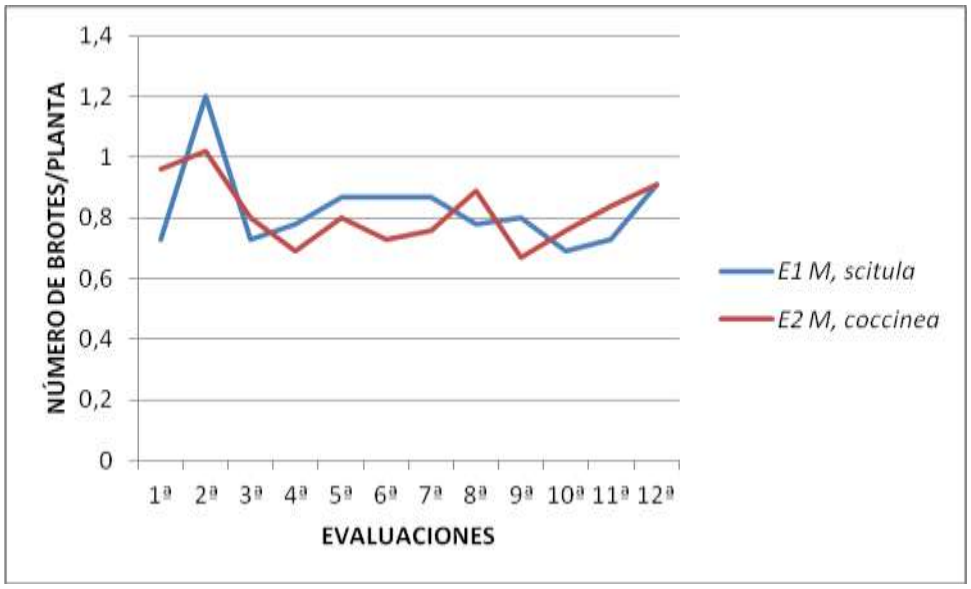


GRÁFICO 5 Curvas del número de brotes promedio de dos especies de orquídeas en doce evaluaciones.

CUADRO 9 Número de brotes/planta promedio de dos especies de orquídeas bajo el efecto de dos frecuencias de endomicorrizas y un testigo, en doce evaluaciones.

TRATAMIETOS	EVALUACIONES DEL NÚMERO DE BROTES/PLANTA					
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª
E1F1	0.80bc	1.40ª	1.00a	0.87a	0.93	0.93ab
E1F2	1.07ab	1.47ª	0.93a	1.27a	1.00	1.07ª
E1 testigo	0.33c	0.73bc	0.27b	0.20b	0.67	0.60bc
E2F1	0.93abc	1.27ª	0.87a	1.00a	1.00	0.80ab
E2F2	1.53a	1.53ª	1.27a	0.87a	1.07	1.07ª
E2 testigo	0.40c	0.27c	0.27b	0.20b	0.33	0.33c

TRATAMIETOS	EVALUACIONES DEL NÚMERO DE BROTES/PLANTA					
	7ª	8ª	9ª	10ª	11ª	12ª
E1F1	0.93a	0.87ª	0.87ª	0.87ab	0.87ab	1.20ª
E1F2	1.27a	1.13ª	1.27ª	0.87ab	1.20a	1.07ª
E1 testigo	0.40bc	0.33b	0.27b	0.33b	0.13c	0.47b
E2F1	0.87ab	1.20ª	0.87ª	0.93ab	1.00a	1.13ª
E2F2	1.20a	1.07ª	1.00a	1.00a	1.13a	1.20ª
E2 testigo	0.20c	0.40b	0.13b	0.33b	0.40bc	0.40b

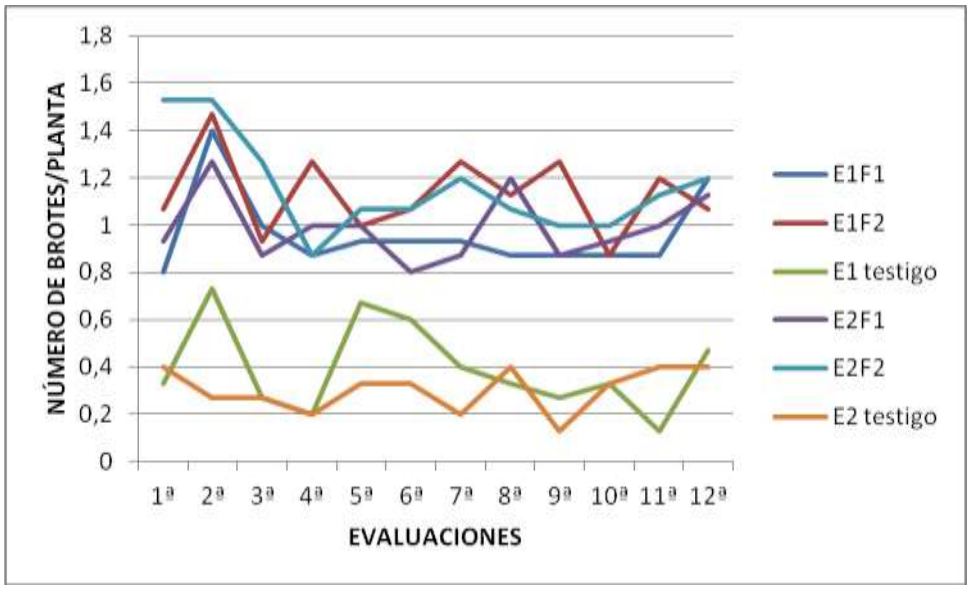


GRÁFICO 6 Curvas del número de brotes/planta promedio de dos especies de orquídeas debido al efecto de dos frecuencias de inoculación de endomicorrizas y un testigo, en doce evaluaciones

Luego de analizar todas las variables se determinó la funcionalidad de las endomicorrizas en mejorar el desarrollo de las orquídeas, disminuyendo los costos de producción lo que corroborado con Raven (2003) quien manifiesta que la comprensión de las relaciones micorrícicas puede ser la clave para disminuir la cantidad de fertilizantes (especialmente fosfatos) que deben aplicarse a los cultivos para obtener buenas cosechas.

5.4. DISCUSIÓN

Las diferentes variables evaluadas en la investigación, estadísticamente no marcaron diferencias significativas, por lo que se puede determinar que su comportamiento fue bastante semejante, éste contrasta de alguna manera con datos experimentales obtenidos por Olivera & Sajo (1999), quienes determinaron que *M. coccinea* presentó hojas mucho más suculentas que *M. scitula*, las cuales funcionaron como reservorios de agua y almidón, cabe señalar que en la presente investigación no se evaluó este parámetro.

Masuhara y Katsura (1994) al inocular *Spiranthes sinensis* con *Rhizoctonia solani*, aislada de una fuente no micorrízica, obtuvo resultados positivos en cuanto a la producción de hojas nuevas, incrementando de tres a seis hojas después de tres meses de crecimiento; concluyendo que los hongos aislados de otras fuentes tienen el mismo efecto que los provenientes de orquídeas, por tanto todo parece indicar que las especies *M. coccínea y M. scitula* poseen una especificidad bastante alta, en cuanto a su asociación con la micobiota. En la practica el proceso de inoculación de una vez por semana en plantas de *Masdevallia* determinó que con su testigo existiera una diferencia de incremento de 3 hojas promedio en las plantas evaluadas; a la vez que entre valores fue bajo con relación al obtenido en las dos especies de *Masdevallia* que se sujetaron a dos inoculaciones por semana; las cuales aumentaron una diferencia de desarrollo de hojas igual a 7 hojas promedio con relación a su testigo; lo que demuestra que la asociación simbiótica *Masdevallia* + *Rhizoctonia* es fundamental en el desarrollo y generación de hojas.

La barrera física creada por el manto de las hifas: el espacio ocupado en las raíces por el hongo, ofrece una protección al huésped ante patógenos que pudieran afectar a las raíces, debido a que el espacio ocupado por un organismo no puede ser ocupado por otro a la vez, lo cual produce una resistencia por exclusión competitiva del patógeno. Esto ofrece una gran resistencia ante posibles patógenos radicales como lo afirman Newsham et al., (1995). Las plantas de la investigación no manifestaron ninguna enfermedad a pesar de la ocurrencia dentro del invernadero de plantas enfermas de otras especies de orquídeas las cuales constituían una fuente de inóculo potencial.

La micorrización podría atenuar las alteraciones provocadas por el déficit hídrico y mejorar la capacidad de resistencia al estrés. Además la presencia de micorrizas favorece la absorción de agua por la planta Ruiz-Lozano *et al.,* (1995). Existe la posibilidad de que las micorrizas sobre las plantas sea el aumento y mejore la asimilación de nutrientes. Esto se debe a que facilita una adecuada evapotranspiración de la planta y un mejor funcionamiento fisiológico de éstas en sentido general: aumenta la ramificación y el crecimiento de las raíces y alarga las células (mayor eficacia de las mismas), de tal manera que la superficie de las raíces combinada con una gran población de hifas es muy superior a la de una planta no micorrizada.

Además las hifas extendidas son capaces de alcanzar, a mayor distancia, fuentes de alimentos y sobre todo de agua, donde las raíces no llegan, lo que se traduce en una mayor eficiencia para localizar y absorber agua, y esto implica un efecto altamente beneficioso contra el estrés hídrico como anota Allen (1991). Por este motivo el riego semanal que se dio en el presente ensayo fue suficiente para las plantas del genero *Masdevallia.*

Pérez *et al.,* (2002), mencionan que, desde el inicio de las inoculaciones observaron un incremento en los valores de las variables analizadas, lo que se hizo significativamente superior para aquellas plantas que recibieron las tres dosis en períodos separados durante 3 meses. Las dos frecuencias de inoculación de endomicorrizas aplicadas a las plantas *M. scitula y M. coccinea*, aparentemente no fueron suficientes para poder marcar significativamente diferencias en cada uno de los parámetros estudiados; sin embargo, se observó discordancias reducidas que permiten afirmar en términos generales que a mayor número de inoculaciones el valor de las variables se incrementa, con relación a un número inferior de inoculaciones y al testigo.

Las micorrizas orquideales difieren de los otros tipos de micorrizas en que mantienen un transporte bidireccional de carbohidratos Djik, (1989). Este debió ser el hecho por el que las plantas y el hongo se desarrollaron de forma similar, en este caso práctico de simbiosis.

Considerando que son plantas epífitas y que dependen en gran medida de sus capacidades fotosintéticas para cubrir sus necesidades nutricionales, es de destacar que la coloración que se presentaba antes de las inoculaciones era un verde suave y posterior a esta un verde obscuro; no obstante, es necesario realizar estudios más prolongados y detallados, con un mayor número de unidades experimentales y especies, antes de establecer conclusiones al respecto.

La inoculación de las plantas con hongos micorrizógenos provoca, de manera general, un marcado incremento en los procesos de absorción y traslocación de nutrientes como: N, P, K, Ca, Mg, S, Zn, Cu, Mo, Fe, Mn, entre otros Smith & Read, (1997). De esta

forma, se comprende que lógicamente, gracias a la mejor asimilación ya no solo de agua, sino de nutrientes se facilita un aumento de la producción y una mayor calidad biológica de las plantas de *M. coccínea y M. scitula* utilizadas en el ensayo.

5.5. ANÁLISIS ECONÓMICO

Siguiendo la metodología del análisis de presupuesto parcial, según Perrin *et. al* (1976) se procedió a obtener el beneficio bruto que corresponde al rendimiento de la inoculación por el valor del biopreparado en el mercador (65 dólares /kilo), por otro lado se obtuvo los costos variables que corresponden al valor de los insumos correspondientes a la elaboración del biopreparado, de la diferencia de los beneficios brutos, menos los costos variables, se obtuvo el beneficio neto (cuadro 17).

CUADRO 10 Beneficio bruto, costos variables y beneficio neto de los tratamientos en estudio.

Tratamientos	**Beneficio Bruto ($/Inóculo)**	**Costo Variable total ($/Inoculación)**	**Beneficio Neto ($/Inoculación)**
T1 *Masdevallia scitula,*1aplicación	65,50	39,98	25,52
T2 *Masdevallia scitula,* 2 aplicaciones	196,50	119,94	76,56
T3 E1 TESTIGO	0,00	0,00	0,00
T4 *Masdevalliac coccinea,*1aplicación	65,50	39,98	25,52
T5 *Masdevallia coccinea,* 2 aplicaciones	131	79,96	51,04
T6 E1 TESTIGO	0,00	0,00	0,00

Colocando los beneficios netos en orden decreciente acompañado de los costos variables, se procedió a obtener la dominancia. Donde el tratamiento dominado es aquel que, a igual o menor beneficio neto presenta un mayor costo variable, este análisis determinó que los únicos tratamientos no dominados fueron el T3 E1 TESTIGO y T3 E1 TESTIGO (Cuadro 18).

CUADRO 11 Análisis de dominancia de los tratamientos en estudio.

Tratamientos	**Beneficio Neto ($/Inóculo)**	**Costo Variable total ($/Inoculación)**	***Tratamientos dominados**
T3 E1 TESTIGO	0,00	0,00	*
T6 E2 TESTIGO	0,00	0,00	*
T1 *Masdevallia scitula,*1aplicación	25,52	39,98	*
T4 *Masdevalliac coccinea,*1aplicación	25,52	39,98	*
T5 *Masdevallia coccinea* 2 aplicaciones	51,04	79,96	
T2 *Masdevallia scitula,* 2 aplicaciones	76,56	119,94	

Con los tratamientos no dominados se procedió a determinar el análisis marginal estableciendo la mejor opción económica constituyen los tratamientos T2 *Masdevallia scitula,* 2 aplicaciones y T5 *Masdevallia coccinea* 2 aplicaciones, por alcanzar una tasa interna de retorno adecuada, (cuadro 19).

CUADRO 12 Análisis marginal de los tratamientos no dominados.

Tratamientos	**Beneficio Neto ($/Inóculo)**	**Costo Variable total ($/ Inoculación)**	**Δ Beneficio Neto**	**Δ Costo Variable**	**TIR M**
T2 M*asdevallia scitula, 2* aplicaciones	76,56	119,94	25,52	39,98	0,63
T5 *Masdevallia coccinea,* 2 aplicaciones	51,04	79,96	25,52	39,98	0,63

VI. CONCLUSIONES

- Las dos especies de orquídeas, *M. scitula* y *M. coccinea* manifestaron un comportamiento similar con respecto a su altura de planta, número de hojas/planta y número de brotes/planta a lo largo de todas las evaluaciones programadas.

- La aplicación de inóculo de micorrizas fue efectiva en el desarrollo de las orquídeas, pues lograron una mayor altura de planta, número de hojas y número de brotes en relación al testigo, característica que fue evidenciada en las dos especies *M. scitula* y *M. coccinea.*

- La frecuencia de aplicación de inóculo incidió matemáticamente en las variables, altura de planta, número de hojas y generación de brotes; pero estadísticamente no exhibieron significación.

- La variabilidad en el número de brotes/planta fue mayor lo que se reflejó en los altos coeficientes de variación, debido a la ausencia brotes en algunas plantas de las unidades experimentales dentro de cada tratamiento.

- *M. coccinea* acusó un menor desarrollo ante la falta de inoculación de las endomicorrizas pues presentó a lo largo de las evaluaciones programadas una

menor altura de planta, menor número de hojas/planta y menor número de brotes/planta.

- La preparación del sustrato para las endomicorrizas fue rentable puesto que permitió obtener beneficios y disminuir los costos de producción.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar este tipo de investigación para otras especies de orquídeas, por las ventajas encontradas en el uso de las micorrizas las cuales incrementan la altura de planta, número de hojas por planta y número de brotes.

- Validar la información obtenida del efecto de las micorrizas en la producción de orquídeas a nivel comercial mediante la aplicación del protocolo realizado en el presente ensayo.

- Las endomicorrizas mejoran los rendimientos por ende es recomendable como alternativa de fertilizante orgánico, en consecuencia su empleo se debe generalizar.

- Realizar investigaciones que permitan evaluar en forma integral, parámetros concomitantes, como la capacidad de absorción de P y otros elementos, de plantas inoculadas con la micorriza.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ALLEN, M.F. 1991. The Ecology of Mycorrhizae. Ed. Cambridge University Press.

- ANDERSEN, A., & L. ANDERSEN. 2000. Growth regulation as a necessary prerequisite for introduction of new plants. Acta Hort. 541: 183-192.

- ANDERSON, N. A .1982. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. Ann. Rev Phytopathol 20, 329-347

- BURR B. & BARTHLOTT 1991. On a velamen like tissue in the root cortex of orchids. Flora 185: 313- 323.

- DEACON, J. W. 1997. Modern Mycology. 3ª ed. Blackwell Science, EUA.

- DJIK, E. 1989 Effects of mycorrhizal fungi on in vitro nitrogen reponse of juvenile orchids. Agriculture, ecosystems and environments, vol. 29, p. 91-97.

- ESAU K. 1972. Anatomía vegetal. Ed. Omega, S.A.

- ESAU K.1977. Anatomy of Seed Plants. 2nd. Ed. John Wiley and Sons. New York.

- GARBAYE J. 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. New Phytol. 128: 197-210

- GERDEMAN, J. W. 1968.Vesicular- arbuscular mycorrhiza and plant growth. Ann. Rev Rhytopathol 6, 397-418

- GILMAN, C.J. 1963. Manual de Hongos del Suelo. Ed. Continental, S.A. D.F., México.

- HITRZ, A. 2010. Las orquídeas en el Ecuador. Taller de Orquideologia Jardín Botánico Quito.

- LINDORF H., L.DE PARISCA & RODRIGUEZ P. 1991. Botánica. Clasificación - Estructura - Reproduccion. Univ.Central Venezuela. Ediciones de la Biblioteca, Caracas. 584 pags.

- MARSCHNER, H Y B. DELL. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosi. Pp. 89-102. *In:* A.D. Robson, L.K. Abbott y N. Malujezuck (eds.). Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.

- MARTÍNEZ, J.; ROMAY, Z.; ROJAS, T.; GUERRA, G. 1981. Manual práctico de microbiología. Ministerio de Educación Superior. U.H. La Habana, Cuba. pp. 96-104.

- MAUSETH J. 1988. Plant Anatomy. Benjamin/Cummings.

- MASUHARA, G.; KATSUYA, A. 1994. *In situ* and *in vitro* specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Per-soon). Ames. var. amoena. (M. Bieberstein) Hara. (Orchida-ceae). New Phytol**.** 127: 711-718.

- MOORE, R., W. DENNIS CLARK & K. R. STERN. 1995. Botany. Wm. C. Brown Publishers.

- NEWSHAM, K. K., FITTER, A. H., WATKINSON, A. R. 1995. Arbuscular Mycorrhiza Protect an Annual Grass from Root Pathogenic Fungi in the Field. The Journal of Ecology, Vol. 83, No. 6, pp. 991-1000.

- NOVAL, B.M. DE LA; ORIA, A.; CASADESUS, L. Y GÓMEZ, M. 1999. Aislamiento, caracterización e inoculación con endomicorrizas orquídeales en especies de orquídeas. Revista Chapingo serie horticultura, vol.5, no.1

- O´DELL T.E. & TRAPPE J.M. 1992. Root endophytes of Lupin and some other legumes in North Western U.S.a. New Phytologist 122: 479-486.

- OLIVEIRA VC, SAJO MG 1999. Anatomía foliar de espécies epífitas de Orchidaceae. *Rev. Bras. Bot. 22*: 363-374.

- ORIA, A. 1996. Aislamiento e identificación de hongos radiculares de orquídeas. Micorrización de vitroplantas de *Cattleya* sp. (Orchidaceae). Trabajo de Diploma. U.H. Facultal de Biología.

- PÁEZ, O. G. GUERRERO. 2006. Las Micorrizas: Alternativa Ecológica para una Agricultura Sostenible. Disponible en: http://www.fao.org/ag/agl/agll/ipns/index_es.jsp.

- PEYRONEL, B.; FASSI, B. Y FONTANA, A. 1969. Terminology of micorrhizae. Mycologia, 61. p. 410 – 411.

- PERRIN *et al.* 1976**.** Un Manual Metodológico de Evaluación Económica; Formulación de recomendaciones a partir de datos agronómicos. México DF, México, Ed. CIMMYT. Programa de Economía p. 5-15

- PÉREZ, E; FERNÁNDEZ, F; FERNÁNDEZ, K ; MÁRQUEZ, R. 2002, Cultivos Tropicales, vol. 23, no.3, p. 53-55

- POREMBSKI S. & BARTHLOTT W. 1988. Velamen radicum micromorphology and classification of Orchidaceae. Nordic J.Bot. 8: 117-137.

- POPOFF, O. 1984. Clasificación de las micorrizas. Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes, Argentina.

- RAVEN, EVERT & EICHHORN. 2003. Biology of Plants. 6th. ed. W.H.Freeman and Company. New York.

- RASMUSSEN, H. N. 1992. Seed dormancy patterns in *Epicaptuis palustris* (Orchidaceae): Requirements for germination and establishment of mycorrhizal. Physiol. Plant, vol. 86, p. 161-167.

- READ, D.J. 1984.Progress, problems and prospects in research on Ericaceous and Orchidaceous mycorrhizas. En: Proceeding of the Nacom p. 202-206.

- REICH, 1988. Rates of infection and effects of five vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi Can, J. Bot, 68: 233-239

- RICHARDSON, K.A.; PETERSON, R.L.; Currah, R.S. 1992. Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Plantanthera* hyperborea (Orchidaceae). Can. J. Bot. 70: 291-300.

- ROTH, I. 1991. Anatomía de las plantas superiores. Ediciones de la Biblioteca. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

- RUIZ-LOZANO, J. M., AZCÓN, R. 1995. Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by the fungal species and water status. Physiologia Plantarum 95 (3), 472–478.

- SMITH, D.C, Y A.E, DOUGLAS, 1987. The biology of symbiosis, Edward Arnold Publishers, London.

- SMITH, S.E Y V. GIANINAZZI-PEARSON, 1988. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol. 39; 221-224

- SMITH, S.E., READ, D.J. Mycorrhizal symbiosis. New York, Academic Press,1997. 605 p.

- STRASBURGER. 2004. Tratado de Botánica. 35a. ed. Ed. Omega.

- SIEVERDING, E.1991.Vesicular Arbuscular Mycorrhiza in Tropical Agrosystem. Deutsche Gesellsschaft fur techniische Zusammenarbeit (GTZ) GMBH, federal Republic of Germany. 371 p.

- VOGELEZANG, J. 2000. Improvement of plant quality by integrated control of light, temperature and DIF strategy. Acta Hort. 515: 83-90.