



Universidad de San Carlos de Guatemala
Dirección General de Investigación



Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas
(nombre del programa universitario de investigación de la Digi)

Aislamiento e identificación de micorrizas en especies del género *Lycaste* con fines de conservación en el Bosque Nuboso, Baja Verapaz, Guatemala
nombre del proyecto de investigación

DES1-2021
código del proyecto de investigación

Instituto de Investigación de Ciencias Químicas y Biológicas -IIQB,
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
unidad académica o centro no adscrito a unidad académica avaladora

Lcda. Mabel Anelisse Soto Vásquez
Coordinadora del proyecto

Ing. Agr. Francisco Javier Morales Siná
Investigador

Br. Pablo José Rodríguez Aguilar
Auxiliar de investigación

nombre del coordinador del proyecto y equipo de investigación contratado por Digi

Guatemala, febrero 23/02/2022
lugar y fecha de presentación del informe final dd/mm/año

Autoridades

Dr. Hugo Pérez Noriega
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
Coordinador del Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas

Autores

Licda. Mabel Anelisse Soto Vásquez
Coordinador del proyecto

Ing. Agr. Francisco Javier Morales Siná
Investigador

Br. Pablo José Rodríguez Aguilar
Auxiliar de investigación II

Colaboradores:

Ing. Agr. Gustavo Álvarez
Coordinador Centro de Diagnostico Parasitológico, Facultad de Agronomía

Dra. Natalia Escobedo Kenefic
Encargada Unidad de Investigación para el Conocimiento, Uso
y Valoración de la Biodiversidad, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (Digi), 2021. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada con recursos del Fondo de Investigación de la Digi de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de del código DES1-2021 en el Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas

Los autores son responsables del contenido, de las condiciones éticas y legales de la investigación desarrollada.

| | |
|--|----|
| 1 Índice general | |
| 1 Índice general | 3 |
| 2 Resumen y palabras claves | 6 |
| 3 Introducción | 8 |
| 4 Planteamiento del problema | 9 |
| 5 Delimitación en tiempo y espacio | 11 |
| 6 Marco teórico | 12 |
| 6.1 Generalidades de la familia <i>Orchidaceae</i> | 12 |
| 6.2 Características de las semillas de las orquídeas | 12 |
| 6.3 La importancia de los hongos micorrícicos | 13 |
| 6.4 Las micorrizas y su importancia en la familia <i>Orchidaceae</i> | 13 |
| 6.5 La familia <i>Orchidaceae</i> en Guatemala | 14 |
| 7 Estado del arte | 14 |
| 7.1 Estado de conservación de la familia de orquídeas en Guatemala | 14 |
| 7.2 Estado de conservación hongo-orquídea a nivel mundial | 15 |
| 8 Objetivos (generales y específicos aprobados en la propuesta) | 16 |
| 8.1 Objetivos General | 16 |
| 8.2 Objetivos Específicos | 16 |
| 9 Hipótesis (si aplica) | 17 |
| 10 Materiales y métodos | 17 |
| 10.1 Enfoque de la investigación | 17 |
| 10.2 Método | 17 |
| 10.2.1 Área de estudio | 17 |
| 10.2.2 Selección de las especies de orquídea | 17 |
| 10.2.3 Hongos micorrícicos | 18 |
| 10.3 Recolección de información | 18 |
| 10.4 Técnicas e instrumentos | 19 |
| 10.4.1 Técnicas | 19 |
| 10.5 Procesamiento y análisis de la información | 22 |

| | | |
|------|--|----|
| 11 | Resultados y discusión | 22 |
| 11.1 | Resultados..... | 22 |
| 12 | Referencias | 33 |
| 13 | Apéndice | 37 |
| 8 | Vinculación..... | 40 |
| 9 | Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual..... | 40 |
| 11 | Aporte de la propuesta de investigación a los ODS:..... | 41 |
| 12 | Orden de pago final..... | 41 |
| 13 | Declaración del Coordinador(a) del proyecto de investigación | 42 |
| 14 | Aval del Director (a) del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario | 42 |
| 15 | Visado de la Dirección General de Investigación..... | 42 |

Índice de tablas

| | | |
|---------|---|----|
| Tabla 1 | Listado de especies de orquídeas y localidad de las muestras vegetales colectadas. | 24 |
|---------|---|----|

Índice de figuras

| | | |
|----------|---|----|
| Figura 1 | Especies de orquídeas del género <i>Lycaste</i> nativas de la región de las Verapaces; A. <i>Lycaste virginalis</i> f. <i>alba</i> (Dombrain) Archila & Chiron (2011) B. <i>Lycaste lasioglossa</i> Rchb.f.(1872) C. <i>Lycaste dowiana</i> Endrés ex Rchb.f. (1874) D. <i>Lycaste virginalis</i> (Scheidw.) Linden (1888). E. <i>Lycaste deppei</i> (G.Lodd. ex Lindl.) Lindl. (1843)..... | 23 |
| Figura 2 | Estado de desarrollo radicular en especies del género <i>Lycaste</i> . A. Crecimiento inicial de las raíces en orquídeas epífitas. B. Estado adulto de raíces de orquídeas. C. Estado joven-maduro de raíces de orquídeas epífitas optimas de colecta. D. División por estrato basal, medio y apical de la muestra colectada..... | 25 |
| Figura 3 | Tinción de estructuras radiculares. A. Micrografía del corte transversal radicular en orquídea epífita. B. Micrografía del corte longitudinal radicular en especie en orquídea epífita..... | 26 |
| Figura 4 | Proceso de aislamiento micelial. A. Identificación y siembra de las muestras vegetales empleadas para el aislamiento de hongos micorrícicos. B. Crecimiento de hifas a partir de los explantes de raíz utilizados en medio MEA. C. Crecimiento de hifas a los 5 días después de la siembra. D. Medio de cultivo sin respuesta al desarrollo fúngico. E. Desarrollo micelial a los 12 días después de la siembra. F. Purificación de cepas empleando la metodología agujas de vidrio. G-H. Micrografía de cepas purificadas observadas a 10x. I. Micrografía de las estructuras miceliales observadas a 100x. | 28 |

Figura 5 Agentes contaminantes. A. Crecimiento de agentes contaminantes en medio de cultivo PDA y MEA. B. Micrografía del hongo *Aspergillus* sp. observado a 40x. C. Micrografía del hongo *Fusarium* sp. observado a 10x. D. Micrografía del hongo *Fusarium* sp. observado a 40x. E. Micrografía del hongo *Rhizopus* sp. observado a 10x. F. Micrografía del hongo *Rhizopus* sp. observado a 40x. G. Crecimiento del hongo *Pithyus* sp. I. Fotografía del crecimiento bacteriano en medios de cultivo de PDA. 29

Figura 6 Evaluación de cepas en función a la germinación de semillas de orquídeas. A. Siembra de semillas de *Lycaste virginalis* (Scheidw.) Linden (1888) en medio PDA. B. Prueba de tetrazolio para determinar el porcentaje de viabilidad de semillas. C-D. Micrografía del inicio de interacción hongo-semilla a 100x. E. Micrografía de las semillas de orquídea a los dos meses después de la siembra observado a 100x. 30

2 Resumen y palabras claves

La familia *Orchidaceae* es la más abundante y la más afectada en estado natural. Este grupo de plantas ha sido drásticamente alterado en su germinación debido a las condiciones ambientales desfavorables. La reducción de su hábitat disminuye el porcentaje de reproducción natural, así como la simbiosis con microorganismos favorables para su reproducción. Su germinación depende de la intervención de micorrizas para su sobrevivencia, pues carecen de endospermo y con ello de limitada fuente nutritiva. El porcentaje de desarrollo del embrión es bajo en estas especies; al grado que números individuos de este grupo se encuentran en peligro de extinción. Por lo tanto, es importante buscar e implementar alternativas para su conservación.

En base a lo antes descrito se plantea la identificación de hongos micorrícicos en especies del género *Lycaste* (Fam. *Ochidaceae*) tales como *L. lasioglossa* Rchb.f.(1872), *L. dowiana* Endrés ex Rchb.f. (1874), *L. virginalis* (Scheidw.) Linden (1888), especies *L. virginalis f. alba* (Dombrain) Archila & Chiron (2011) y *L. deppei* (G.Lodd. ex Lindl.) Lindl. (1843) en los departamentos de Baja Verapaz y Alta Verapaz. Entre los resultados obtenidos se logró aislar un hongo micorrícico de las muestras de raíces de estas cinco especies. Las características observadas de la estructura micelial aislada en medio de cultivo Agar Dextrosa y Papa (PDA) pueden atribuirse al género *Rhizoctonia*, presentando su mayor actividad con un 44% en raíces en estado joven-maduro en la sección basal. Los resultados obtenidos indican que el género *Lycaste* tiene una asociación altamente específica con microorganismos micorrícicos en esta zona de estudio.

Palabras Clave: *Rhizoctonia*, interacción simbiótica, familia *Orchidaceae*, género *Lycaste*, Agar Dextrosa y Papa

Abstract and keyword

The *Orchidaceae* family is the most abundant and the most affected in the wild. This group of plants has been drastically altered in its germination due to unfavorable environmental conditions. The reduction of its habitat reduces the percentage of natural reproduction, as well as the symbiosis with favorable microorganisms for its reproduction. Their germination depends on the intervention of mycorrhizae for their survival since they lack endosperm and thus a limited nutritional source. The percentage of embryo development is low in these species, to the extent that many individuals of this group are in danger of extinction. Therefore, it is important to seek and implement alternatives for their conservation.

Based on the above described, the identification of mycorrhizal fungi in species of the genus *Lycaste* (Fam. *Ochidaceae*) such as *L. lasioglossa* Rchb.f.(1872), *L. dowiana* Endrés ex Rchb.f. (1874), *L. viridiana* Endrés ex Rchb.f. (1874), *L. virginalis* (Scheidw.) Linden (1888), species *L. virginalis* f. *alba* (Dombrain) Archila & Chiron (2011) and *L. deppei* (G.Lodd. ex Lindl.) Lindl. (1843) in the departments of Baja Verapaz and Alta Verapaz. Among the results obtained, a mycorrhizal fungus was isolated from root samples of these five species. The observed characteristics of the mycelial structure isolated in Potato Dextrose Agar (PDA) culture medium can be attributed to the genus *Rhizoctonia*, presenting its highest activity with 44% in roots in the young-mature stage in the basal section. The results obtained indicate that the genus *Lycaste* has a highly specific association with mycorrhizal microorganisms in this study area.

Keyword: *Rhizoctonia*, symbiotic interaction, *Orchidaceae* family, genus *Lycaste*, Potato Dextrose Agar.

3 Introducción

Guatemala, país con gran riqueza en diversidad florística; albergue de inmensurables especies de flora nativa, a tal grado que representa el 79.39% de variabilidad natural a nivel nacional. Según el Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP, 2008) ostentan aproximadamente 321 familias, distribuidas en 2,478 géneros y 10,364 especies de plantas. Muchos de estos individuos se enmarcan en el listado de especies amenazadas en Guatemala; ya que presentan algún tipo de endemismo y otras de ellas se encuentran en peligro de extinción. La familia *Orchidaceae* representa el 16.75%, siendo la más diversa y abundante en el país. En el plan “Guatemala y su biodiversidad: Un enfoque histórico, cultural, biológico y económico” reportan alrededor de 800 especies, repartidas en 138 géneros; 200 de ellas endémicas. Actualmente varios de estos individuos se ven afectados por diversos factores para su reproducción (CONAP, 2008).

Dentro de las principales amenazas de los recursos genéticos de la familia *Orchidaceae*, destacan la fragmentación de las áreas boscosas (73% de pérdida de bosques latifoliados y un 23% de conífera), cambios en el uso de la tierra, falta de estrategias de conservación del germoplasma forestal, entre otros (Melgar, 2003). El resultado de estos factores conlleva a la reducción de los ecosistemas y limitación de las poblaciones de plantas en su reproducción sexual natural. Obteniendo como resultado la pérdida de la biodiversidad del país.

Las orquídeas son plantas de hábito epífita, terrestre y/o litófito, principalmente. El grupo de individuos de esta familia forman frutos denominados cápsulas. Los cuales pueden contener desde 1,300 a 4,000,000 semillas según la especie de orquídea, su tamaño oscila desde pocas micras hasta aproximadamente 5 mm (Banda-Sanchez, Pinzón Ariza, & Vanegas Martínez, 2017). Este grupo de plantas se caracteriza por desarrollar semillas sin endospermo, es decir que carece de tejido almacenamiento de reserva energética para su desarrollo, dependiendo únicamente de la energía provista por el embrión durante el proceso germinativo (Kauth, et al., 2008). Dada esta condición para la sobrevivencia de estos organismos, en gran medida se ven obligados a establecer relación con hongos micorrícicos, incurriendo en una germinación simbiótica. Estos microorganismos juegan un papel importante en el desarrollo del embrión, por lo que establecen una interacción simbiótica en donde se abastecen de nutrientes para el crecimiento y desarrollo del brote en estado joven (Honrubia, M., 2009). Aunado a lo anterior, los frutos formados son dehiscentes, por lo que, en su estado de

madurez, las semillas utilizan el viento como medio de diseminación para encontrar las condiciones adecuadas para germinar, cuyo éxito puede verse interrumpido por la alteración del hábitat natural. En base en estas limitaciones el porcentaje de semillas germinadas naturalmente es bajo en relación con el número de semillas producidas por cápsula, lo que afecta su conservación (Banda-Sanchez, Pinzón Ariza, & Vanegas Martínez, 2017).

Con base a lo antes descrito el siguiente estudio buscó identificar la presencia de microorganismo potencialmente asociados a orquídeas del género *Lycastes*. Dentro de los ejemplares estudiados se colectaron muestras radiculares de aproximadamente de *L. virginalis* f. alba (Dombrain) Archila & Chiron (2011), *L. dowiana* Endrés ex Rchb.f. (1874), *L. deppei* (G.Lodd. ex Lindl.) Lindl. (1843), *L. virginalis* (Scheidw.) Linden (1888) y *L. lasioglossa* Rchb.f.(1872). A través de técnicas morfológicas en las cinco especies de orquídeas evaluadas se logró aislar una especie de micorriza, de acuerdo con sus características puede atribuirse al género-forma *Rhizoctonia*., sin embargo, se logró también la identificación de otros tres géneros de hongo *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. y *Rhizopus* sp. los que se clasificaron como contaminantes.

Bajo estos términos, la investigación buscó fortalecer las medidas de conservación de la variabilidad genética de plantas en peligro de extinción, con esto generar y establecer planes de manejo técnicos y protocolos de conservación y rescate de especies a futuro que aseguren la sobrevivencia de estos organismos. La sumatoria de estos factores favorece las diferentes líneas de investigación abriendo nuevas oportunidades estratégicas que mitiguen los factores que provocan el bajo porcentaje de germinación en su medio natural y que conlleve a la pérdida de estos individuos.

4 Planteamiento del problema

El estatus actual de los ecosistemas a nivel nacional se encuentra amenazado por factores de carácter social y económico. Uno de los factores de mayor relevancia es la pérdida de la cobertura forestal, reflejado en la deforestación bruta que ha aumentado de 100,000 ha anuales a más de 132,000 ha, equivalente a un 3.4% anual; siendo la más alta de Latinoamérica. (Instituto de Investigación y Proyección sobre Ambiente Natural y Sociedad [IARNA], 2012). Por otra parte, el avance de las fronteras agrícola y ganadera, expansión de los monocultivos, urbanización, incendios forestales, invasiones en área protegidas, asentamientos humanos no autorizados, desastres naturales y actualmente el cambio climático; influyen en la pérdida de la diversidad biológica, mostrando la

expansión de los bosques secos y muy secos en el país; ocupando el 20% del territorio en la actualidad (CONAP, 2014). El resultado actual de estos factores se refleja en; zonas ambientales altamente frágiles para la preservación, conservación, desarrollo y reproducción de estos micro y macroorganismos.

Uno de los grupos de plantas más afectados por los componentes anteriormente descritos es la familia *Orchidaceae*. Las orquídeas son plantas de hábito epífita, terrestre y/o litófito, obligados a establecer una relación simbiótica con hongos micorrícicos, para su reproducción. La pérdida de la cobertura forestal y la reducción de sus hábitats a nivel nacional afectan severamente la abundancia de estos microorganismos, alterando el equilibrio de las poblaciones silvestres de orquídeas. Otro efecto asociado a la disminución del área boscosa es el decrecimiento en la diseminación efectiva de semillas de orquídeas, reduciendo severamente el porcentaje de germinación en estado silvestre de esta familia de plantas y por ende sus poblaciones.

Con base a lo antes mencionado, se han desarrollado en otros países investigaciones relacionados con la conservación de la riqueza florística, especialmente la preservación y conservación de la familia *Orchidaceae*, a partir de estudios para la identificación de hongos micorrícicos de orquídeas; en especies del género *Dracula* y *Epidendrum*, se lograron identificar estos microorganismos mediante técnicas morfológicas y moleculares. Entre los resultados obtenidos se reporta, que en 12 especies de orquídeas se logró aislar una especie de micorriza, mientras que en otras cinco se lograron aislar dos micorrizas distintas. Se identificaron cinco géneros de hongos a nivel morfológico: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Phoma* y *Trichoderma*. (Fuertes-Flores, Mallitasig-Quishpe, Cerna-Cevallos, & Gutiérrez, 2018). En Chile los géneros más representativos de orquídeas por su potencial ornamental son *Chloraea*, *Codonorchis*, *Brachystele* y *Gavilea*. Se realizó la identificación de hongos endomicorrícicos en la especie de *Gavilea arucana*, obteniendo como resultado la presencia de hongos del género *Sistotrema*, sin embargo, se recomienda estudios de pruebas moleculares, para validar el género de hongo identificado (Durán, Rivero, & Seemann, 2007).

Estudios realizados en Colombia, demuestran la presencia de la asociación de hongos *Rhizoctonia* sp. en base al porcentaje de enrollamientos hifales presenten en la raíz de plantas jóvenes; el género con mayor presencia de enrollamientos fue *Comparettia* (63%), seguido del género *Cattleya* (34%), *Odontoglossum* (29%) y *Miltonia* con un 10%; es decir mientras más porcentaje de enrollamiento

mayor interacción raíz-hongo. (Moreno-López, Herrera-Sánchez, & Prado-Dorado, 2014). Por otra parte Otero y Colaboradores (2004) han realizado estudios de especies de orquídeas tropicales *Tolumnia variegata* e *Ionopsis utricularioides* ambas de la subtribu *Oncidiinae*, en Puerto Rico y la riqueza de estos microorganismo en asociarse con un mismo grupo de plantas, entre los resultados obtenido resalta la mayoría de los aislamientos de hongos identificados se encuentran en cuatro clados diferentes de *Ceratobasidium*, para la primera especie de orquídea, para la segunda; estos microorganismos se encuentran restringidos a un solo clado del género mencionado.

Por otra parte, estudios indican que la aplicación de inoculantes del género *Rhizoctonia* (fam. *Ceratobasidiaceae*) en plantas de orquídeas aumentan el crecimiento y desarrollo vegetativo de la planta. Las cepas de hongos de este género, aislado de raíces de orquídeas de la especie *Cymbidium goeringii*, aumentaron la altura de la planta, el porcentaje de peso fresco, el número de hojas por planta y la elongación de la raíz (Wu et al., 2010). De igual forma la aplicación de inóculos de hongos endófitos en orquídeas de la especie *Vanilla planifolia Andrews* como fuentes estimulantes benéficas reflejaron un efecto significativo positivo en el crecimiento y desarrollo de la biomasa aérea, longitud de raíces y altura de planta. (Ordóñez, Otero., & Díez, 2012). Sin embargo, existe poca información o casi nula en Guatemala relacionado con la identificación de hongos micorrícicos y la importancia de la interacción y/o asocio en la germinación, desarrollo y crecimiento de esta familia de plantas.

El desarrollo de la presente investigación es relevante en la exploración de una nueva rama de estudio en la conservación de la diversidad florística de Guatemala de especies en peligro de extinción. En primera, la generación de bases primarias de información que contribuya como guía en desarrollo de protocolos de rescate de especies y estrategias que beneficien la proliferación exponencial de micorrizas de forma natural, para la conservación de orquídeas en su estado silvestre. En segunda, obtener como resultado final cepas puras de estos microorganismos que tengan potencial de asocio en la germinación y desarrollo de este género de plantas, para su posterior caracterización y/o uso en ensayos experimentales, generando así nuevas alternativas de propagación más efectivas para algunas especies del género *Lycaste* en peligro de extinción a futuro.

5 Delimitación en tiempo y espacio

Primer Fase: esta fase se desarrolló a nivel de campo entre los meses de marzo -mayo, se identificaron y seleccionaron los sitios de muestreo comprendidos entre los departamentos de Baja Verapaz y Alta

Verapaz. Aunado a esto, se realizó una revisión y recopilación de fuentes primarias y secundarias relacionadas con el tema de investigación.

Segunda Fase: comprendida entre los meses junio a enero; fase de experimentación a nivel de laboratorio, siembra y aislamiento de microorganismos identificados en las muestras de raicillas colectadas en campo. Estandarización de la metodología para la caracterización de los hongos de las especies de orquídeas de estudio. Obtención de cepas de los hongos micorrícicos.

Tercera fase: Compreendida entre los meses de diciembre a febrero; fase de divulgación, análisis, tabulación e interpretación de los resultados. Redacción de informe final y artículo científico.

6 Marco teórico

6.1 Generalidades de la familia *Orchidaceae*

La familia *Orchidaceae* pertenece al grupo de plantas monocotiledóneas, constituyendo la más numerosa. Aproximadamente existen entre 25,000 a 35,000 ejemplares de este grupo de plantas. Su diversidad se encuentra ligada a su gran facilidad para la hibridación, no solo entre especies del mismo género, sino también intergenéricos, esto por ser un grupo de plantas jóvenes dentro de la evolución del reino plantae. Se estima un aproximado de 30,000 ejemplares de híbridos registrados en el mundo (Freuler, 2007).

6.2 Características de las semillas de las orquídeas

Las semillas de orquídeas tienen la característica de ser muy pequeñas casi microscópicas, similares al polvo, casi imposible de observar a simple vista. Los primeros escritos sobre las semillas de este grupo de plantas se dieron aproximadamente en el siglo XVI. Los primeros observadores de estas estructuras microscópicas fueron Geogius Evehardus Rumphius, alrededor de 1627-1702, Conrad Gesner, entre 1516-1565 y Richard Anthony Salisbury, 1761-1829 (Yam & Arditti, 2009).

Este grupo de planta tiene una gran diversidad de formas y tamaño en la estructura de sus semillas. Estas por su forma pueden ser desde filiformes, fusiformes y elipsoidales, su tamaño oscila entre las dimensiones de 1 a 2 mm de largo y dentro de 0.5 a 2 mm de ancho. Aproximadamente, se estima que una cápsula del fruto de orquídea contiene de 1,300 a 4, 000,000 semillas. El tamaño del fruto oscila desde micras a unos 5 mm aproximadamente. El peso por cápsula oscila entre 1 a 22 mg, esto puede variar según la especie de orquídea (McKendrick, 2000, como citó Banda-Sánchez et al., 2017).

6.3 La importancia de los hongos micorrícicos

Conocidas también como micorrizas, son asociaciones simbióticas mutualistas establecidas entre hongos del suelo y raíces de una planta. Se reconocen cinco grupos de micorrizas, basado en su morfología, anatomía y sistemática, tales grupos son ectomicorrizas, micorrizas de ericales, micorrizas de *Orchidaceae*, ectoendomicorrizas y micorrizas arbusculares (endomicorrizas). La importancia de estos tipos de hongos microscópicos es establecer el tipo de asociación hongo-raíz, lo cual colonizan intracelularmente la corteza de la raíz por medio de sus estructuras, actuando como órganos de intercambio de nutrientes entre la célula vegetal y el huésped (Aguilera, Olalde, Rubí, & Contreras, 2007).

6.4 Las micorrizas y su importancia en la familia *Orchidaceae*

La importancia de los hongos micorrícicos ha aumentado con el paso de los años ya que se han reportado los efectos positivos en la simbiosis de estos organismos, relacionada con plantas. Lo antes descrito se refleja en el incremento de la absorción de los nutrientes, la influencia sobre las relaciones hídricas, la protección contra agentes patógenos y el papel ecológico que de las asociaciones en la sucesión de estas especies de plantas en su estado silvestre (Aguilera et al., 2007).

Los primeros indicios de la presencia de la asociación con estos hongos en orquídeas se observaron alrededor del año 1,824, confirmándose sino hasta 1,899 como organismo primordial en la germinación de las semillas de orquídeas (Yam & Arditti, 2009).

Las orquídeas son organismos heterótrofos en sus primeros estadios (germinación) y primeras etapas de desarrollo. Por lo que, estas no únicamente necesitan del recurso agua para su germinación sino de otros factores externos para su desarrollo (hongos micorrícicos). Otros factores están relacionados con su tipo de latencia, tanto como exógenos como endógenos, frecuentemente observadas en semillas de orquídeas holárticas (Rasmussen, 1995). En la familia de orquídeas las micorrizas desempeñan un rol importante en su reproducción, preservación y perpetuación de la especie. Tal es el caso, que sus semillas en su mayoría no dependen únicamente del recurso hídrico para su germinación, bajo condiciones adecuadas de aire y temperatura.

Para su germinación las especies pertenecientes a este grupo de plantas necesitan la presencia de hongos micorrícicos, especializados para la transferencia de nutrientes a los embriones en ausencia de endospermo. Las hifas fúngicas de la gran diversidad de estos microorganismos colonizan las plantas

de orquídeas, formando estructuras denominadas pelotones. Varios estudios afirman la diversidad de hongos que establecen simbiosis con la diversidad de orquídeas en el mundo, como por ejemplo la presencia del hongo del género *Sistotrema* en la especie de *Gavilea arucana* (Durán, et al., 2007).

6.5 La familia *Orchidaceae* en Guatemala

La familia *Orchidaceae* es el grupo más diversos de plantas de Guatemala. Se reportan aproximadamente 796 especies. (CONAP, 2008) Esta familia de plantas por su belleza y vistosidad, son especímenes fáciles de depredación para su comercialización ilícita. Aunado a este factor se suman otros tales como la fragmentación de los bosques, prácticas no amigables con el ambiente, el crecimiento poblacional y el de monocultivos (MARN, 2012). Como consecuencia de estos factores las orquídeas se han visto afectadas en la reducción de su hábitat, para su reproducción en estado silvestre. La sumatoria de estos factores se ve reflejado en la pérdida de la diversidad florística de esta familia de plantas.

El estatus silvestre de esta familia de plantas se ha visto afectada severamente por los factores antes mencionado. Según el LEA (2009), reporta que la mayoría de estos organismos se encuentran en la categoría tres, es decir, si bien en la actualidad no se encuentra en peligro de extinción, podrían llegar a estarlo si no se regula su aprovechamiento. Otros especímenes se encuentran en la categoría uno, es decir, ejemplares en peligro de extinción, como por ejemplo *Lycaste virginalis* (Scheidw.) Lindl., *Phragmipedium* spp, *Lophiaris cavendishiana* (Batem.) y *Lycaste skinneri* (Batem. ex Lindl.) Lindl. var *alba* Dombroin (Monja Blanca: Flor nacional de Guatemala) siendo la más representativa de esta familia de plantas.

7 Estado del arte

7.1 Estado de conservación de la familia de orquídeas en Guatemala

En Guatemala se han realizado esfuerzos que contribuyan a impulsar mecanismos de conservación para la reducción del impacto negativo a esta familia de plantas. La Universidad Rafael Landívar (URL) a través del IARNA ha desarrollado diferentes aportes al conocimiento y conservación de orquídeas, plasmados en desarrollar protocolos para la propagación de 21 especies de este grupo de plantas. Dentro de los aportes realizados cabe resaltar el estudio del desarrollo de embriones bajo diferentes medios de crecimiento, con el fin de determinar las condiciones de germinación y desarrollo

más adecuado por especie. Otras investigaciones se han desarrollado en base a la evaluación de las condiciones ambientales favorables para especies como *Guarianthe x guatemalensis* (T. Moore) W.E. Higgins y *Epidendrum macfougllii* (Hágsater), analizando las siguientes variables de respuesta: porcentajes de sombra, tipos de sustratos y fórmulas de fertilización (López-Selva, 2016).

7.2 Estado de conservación hongo-orquídea a nivel mundial

Las orquídeas, actualmente se encuentran amenazadas por diferentes factores tales como, depredación, comercio ilícito, reducción de hábitat, cambio climático, entre otros, por lo que se han realizado esfuerzos para la identificación tradicional de taxones fúngicos utilizando caracteres morfológicos para el aislamiento e identificación de hongos micorrícicos que intervienen en la germinación y desarrollo de las plantas, con fines de preservación y conservación de especies. El avance de la tecnología, mediante técnicas moleculares ha permitido identificar la gran diversidad de micorrizas que establecen simbiosis con una gran gama de especies de orquídeas (Sathiyadash, Muthukumar, Karthikeyan, & Rajendran, 2020).

Estudios recientes buscan establecer la red de interacciones de orquídea-hongo en especies del género *Dendrobium* spp., hoy en día se identifica una gran gama de hongos interactuando con plantas de orquídeas y no se tienen claro los procesos que determinan los mecanismos ecológicos y evolutivos, es decir, si las orquídeas se encuentran estrechamente relacionados con los hongos micorrícicos o viceversa. Ejemplo de ello, es el estudio realizado por Xing y colaboradores (2020), que pretendía evaluar el papel evolutivo de las comunidades de orquídeas del género *Dendrobium* spp. con relación a los hongos micorrícicos sin la variación ambiental. Entre los resultados obtenidos se identificaron 101 unidades taxonómicas operacionales fúngicas diferentes. El 80% de estas secuencias identificadas pertenecen a la familia *Serendipitaceae*.

En Turquía, la familia de orquídeas se ha visto amenazada por dos factores perjudiciales reflejados en la recolección excesiva y la destrucción del hábitat. En base a lo antes descrito se han realizado esfuerzos para la creación de bancos de hongos mediante la identificación molecular de micorrizas asociados con las orquídeas, con el fin de proteger la diversidad de estos individuos en la región de Samsun, Turquía. Dentro del resultado obtenido se observa la presencia del hongo del género *Rhizoctonia* sp. Basados en la secuencia de DNA, siete de los aislamientos se asociaron con secuencias

de especies de la *Tulasnellaceae* y dos asociadas a la especie de *Ceratobasidiaceae* (Mutlu & Kömpe, 2020).

A nivel de Latinoamérica se han realizado estudios para la identificación de estos hongos benéficos en el desarrollo y crecimiento de esta familia de plantas, en Chile se realizaron estudios para identificar las asociaciones micorrícicas de dos especies de orquídeas *Bipinnula apinnula* y *B. volckmanii*; especies en peligro de extinción. Dicho estudio consistió en verificar la gama de diversidad de agentes de hongos simbióticos en especies de orquídeas endémicas, con especies de *Bipinnula* ampliamente distribuidas en el país. Entre sus resultados obtuvieron que las especies endémicas, mostraron una baja diversidad de socios micorrícicos pertenecientes a la familia *Ceratobasidiaceae* sin embargo, juegan un papel importante en la germinación, ya que la cepa de hongo aislado tiene el potencial de promover la ruptura de la testa de la semilla (Claro, Mujica, Cisternas, Armesto, & Pérez, 2019).

Otros estudios se han enfocado en la caracterización específica de hongo micorrícicos identificados en trabajos anteriores, a partir de cepas obtenidas del género *Tulasnella*. En base a 50 aislamientos obtenidos de; veinte aislamientos de raíces de la especie *C. cinnabarina*, catorce de raíces de *C. caulescens*, nueve de *H. jongheana* y siete de *Z. maxillare* se procedió a cultivarlas y someterlas al análisis filogenético-basados en el alineamiento de secuencias del espaciado transcrito interno (ITS) del ADN ribosómico nuclear. Los resultados obtenidos al final revelan la presencia de nuevas cepas de este hongo *Tulasnella brigadeiroensis*, *Tulasnella hadrolaeliae*, *Tulasnella orchidis* y *Tulasnella zygopetali* (Freitas et al., 2020).

8 Objetivos (generales y específicos aprobados en la propuesta)

8.1 Objetivos General

Identificar los géneros de hongos micorrícicos que se asocien en la germinación y desarrollo natural de las orquídeas del género *Lycaste*, con fines de conservación de la diversidad florística de especies en peligro de extinción.

8.2 Objetivos Específicos

- Identificar morfológicamente las diferentes colonias de microorganismos, que tengan el potencial de asocio en la germinación y crecimiento en especies del género *Lycaste*.

- Obtener cepas puras de hongos asociados a las especies de orquídeas de interés, para su posterior caracterización y/o uso en ensayos experimentales.
- Inducir la respuesta germinativa de semillas de orquídeas a partir de la inoculación de hongos micorrícicos potencialmente asociados al género *Lycaste*.

9 Hipótesis (si aplica)

Para el primer y segundo objetivo no aplica, ya que el alcance es exploratorio.

Al menos una cepa de hongo micorrícico aislado tendrá una respuesta significativa potencialmente asociada en la germinación de las orquídeas de interés del género *Lycaste*.

10 Materiales y métodos

10.1 Enfoque de la investigación

- Enfoque de la investigación: Cuantitativo Exploratorio
- Alcance de la investigación: Experimental Aplicado

10.2 Método

10.2.1 Área de estudio

Los informes realizados por Standley y Steyermark citados por Ames y Corell (1985), indican que los bosques húmedos de las Verapaces, dado a sus abundantes lluvias durante todo el año, son el albergue de una gran diversidad y abundancia de orquídeas, encontrando 242 especies en 60 géneros distintos. Siendo el hábitat con el mayor número de especies y diversidad de géneros. La mayor diversidad de orquídeas se encuentra en rango altitudinal entre 800 a 1600 msnm, altitud correspondiente a la región de las Verapaces (López-Selva, 2016). En base a lo antes descrito, las características climáticas de esta zona son propicias para el desarrollo de especies de orquídeas del género *Lycaste*.

10.2.2 Selección de las especies de orquídea

Se emplearon ejemplares del género *Lycaste* específicamente de *L. virginialis f. alba* (Dombrain) Archila & Chiron (2011), *L. dowiana* Endrés ex Rchb.f. (1874), *L. deppei* (G.Lodd. ex Lindl.) Lindl. (1843), *L. virginialis* (Scheidw.) Linden (1888) y *L. lasioglossa* Rchb.f.(1872). Las muestras vegetales fueron identificadas por especie, localidad, fecha de colecta y colector. El material utilizado fue

fragmentos de raíces de aproximadamente 10 cm de la raíz joven-maduro en contacto con su hospedero. Se verificó que la muestra vegetal no presentara ningún signo de daño y/o enfermedad. Las muestras colectadas se almacenaron en bolsas herméticas en hieleras para su posterior transporte al Centro de Diagnóstico Parasitológico, Uviger. Las plantas de orquídeas seleccionadas no fueron extraídas de su hábitat. Se obtuvo el registro de investigadores para el manejo de vida silvestre CONAP I-RM-009-2021 y I-RM-013-2021. A través Jardín Botánico-Herbario USCG e *Index seminum* se gestionó la adición de los investigadores a la Licencia de Investigación No. 00728-B.

10.2.3 Hongos micorrícicos

El desarrollo micelial de hongos micorrícicos de las orquídeas se encuentra dentro de las estructuras epifitas radiculares. Por lo tanto, se colectaron raíces en estado joven-maduro clasificándola en estrato basal, medio y apical. Se empleó un fragmento de 0.5 cm por estrato para la siembra en medio de cultivo Agar de Dextrosa y Papa y Extracto de Malta. Se brindó las condiciones apropiadas para el desarrollo óptimo de los hongos, induciendo así al crecimiento del micelio en una incubadora a ± 25 °C en oscuridad. Se llevó a cabo el monitoreo de cada cepa de hongo aislado. Se empleo el libro *Illustrated genera of imperfect fungi* (Barnett, H. L., & Hunter, B.B, 1972). Posteriormente para identificar las características morfológicas de las estructuras desarrolladas. Identificado el hongo se procedió a obtener cepas puras través de la técnica con agujas de vidrio con fin de preservar las estructuras para inducir la respuesta germinativa de las semillas de orquídeas *L. virginalis* a partir de la inoculación de hongos obtenidos a través de un ensayo experimental.

10.3 Recolección de información

Algunos ejemplares de orquídeas del género *Lycaste* se obtuvieron del Corredor Biológico Bosque Nuboso, Biotopo del Quetzal Mario Dary, Reserva Natural Privada Orquigonía en estado natural, otros se obtuvieron de bancos de conservación de germoplasma de La Asociación Altaverapacense de Orquideología (AAO) en los departamentos de Alta y Baja Verapaz; para el muestreo las orquídeas seleccionadas no presentaban signos de enfermedad o daños ocasionados por acción del hombre o el ambiente; así mismo las muestras radiculares seleccionadas no presentaban ningún signo de pudrición o enfermedad, siendo manipuladas cuidadosamente para no dañar el pseudobulbo ni el conjunto de raíces de las plantas permitiendo el desarrollo estable del individuo.

10.4 Técnicas e instrumentos

10.4.1 Técnicas

10.4.1.1 Esterilización de materiales y cristalería

Se colocaron en una autoclave todos los instrumentos, equipo y cristalería utilizada en el laboratorio de fitopatología a 15 libras de presión por pulgada cuadrada y temperatura de 121°C, durante 1 hora.

10.4.1.2 Preparación y almacenamiento de los medios de cultivo

Se emplearon tres tipos de medios de cultivo para la siembra, desarrollo y purificación de las cepas. El primer medio de cultivo utilizado fue el de Extracto de Malta (MEA) para la siembra del material vegetal. El segundo medio de cultivo fue el Agar Dextrosa y Papa (PDA) para el crecimiento y desarrollo de las estructuras miceliales aisladas a partir de la siembra. El medio Agar-Agua (AA) se empleó para el aislamiento y purificación de las cepas contaminadas y siembra del micelio de interés. Los medios de PDA se elaboraron a partir de una solución de 18 g de PDA en 350 ml agua destilada. El medio MEA se elaboró a partir de 20 g de MEA y 15 g de agar en 350 ml de agua destilada. Para la preparación del medio AA se prepararon a partir de una solución de 15 g de Agar en 350 ml de agua destilada. Posteriormente, se esterilizaron en una autoclave a 20 PSI durante 20 m. Las soluciones se trasladaron a la cámara de flujo laminar para verterlas en cajas Petri de 90 mm de diámetro y 15 mm de altura con una capacidad de 20 ml. Para las soluciones de PDA y MEA se adicionaron 0.0625 g de ampicilina por solución. Cada medio de cultivo se agito de manera manual antes de verterlo cada caja Petri.

10.4.1.3 Traslado de material vegetativo

Cada muestra vegetal fue identificada por especie de orquídea, sitio de colecta, fecha de colecta y colector; siendo codificados de la siguiente forma para su traslado *L. L. virginialis f. alba* (L.V.fA), *L. dowiana* (L.DW.), *L. deppei* (L. DP), *L. virginialis* (L.V.) y *L. lasioglossa* (L.LS.). Los sitios de colecta se clasificaron: Orquigonea (ORG), Biotopo del Quetzal (BIO), banco de germoplasma 1 (ER), banco de germoplasma 2 (KG), banco de germoplasma 3 (PV), banco de germoplasma 4 (HA) y banco de germoplasma 5 (DES) las muestras fueron colocadas en bolsas plásticas con cierre hermético para almacenarlas en hieleras para su posterior procesamiento. Se utilizó hielo para la conservación y evitar la deshidratación del material vegetal que fue procesado 24 horas posteriores a la colecta en campo.

10.4.1.4 Desinfección del material vegetal para aislamiento de hongos micorrícicos

El proceso de desinfección del material vegetal se desarrolló en dos etapas. La primera, consistió en el lavado de las raíces utilizando agua y jabón antibacterial, en dicho proceso se buscó eliminar los restos de sustrato y otros agentes externos que se encontraran adheridos a las raíces colectadas. La segunda etapa se desarrolló bajo condiciones asépticas en la campana de flujo laminar. Esta etapa se realizó después de la remoción del velamen, y consistió en someter las raíces a un tren de desinfección con hipoclorito de sodio al 3% por un minuto, agua destilada por 20 s y alcohol etílico al 70% por un min.

10.4.1.5 Establecimiento de las secciones de raíz y siembra en medios de cultivo MEA

Se eliminó la capa externa conocida como Velamen de cada una de las muestras vegetales con el fin de descartar cualquier crecimiento externo y adherido a la superficie de la raíz. Las raicillas empleadas fueron divididas en tres estratos; basal, medio y apical. Por cada estrato se tomó una porción de material vegetal de 0.5 cm. Se empleó medio de cultivo de Extracto de Malta para la siembra de la porción radical seleccionada. Con papel Parafilm se selló cada una de las cajas Petri de 10 a 20 ml de capacidad, de 90 mm de diámetro y 15 mm de altura. Cada caja Petri se incubó a temperaturas entre ± 25 °C con monitoreo constante para descartar la proliferación de contaminantes externos como bacterias, entre otros (Otero & Baymann, 2009).

10.4.1.6 Aislamiento y purificación de cepas

Se empleó el medio PDA como medio de crecimiento y desarrollo. Con el paso de los días se observó el desarrollo micelial de las colonias obtenidas de los segmentos de las raíces de las muestras vegetales. Estas fueron almacenadas en una incubadora a ± 25 °C en oscuridad. Las cepas fueron observadas en microscopio alrededor de los 12 días después de la siembra. Las colonias que presentaron un crecimiento potencial de sus estructuras se duplicaron en medio Agar-Agua como medio de purificación de cepas. Estas se incubaron nuevamente por aproximadamente 24 h transcurrido el tiempo, se procedió a extraer el micelio de interés de la cepa, separándolo del resto de micelio y sembrándolo en medio PDA para su incubación y subcultivo. La realización de este método se utilizó para purificar las colonias de hongos observados. Los medios contaminados por agentes externos fueron eliminados.

10.4.1.7 Subcultivo de las cepas de interés

A través del empleo de agujas de vidrio se realizaron subcultivos de las cepas resultantes para obtención de estructuras purificadas, se observó el crecimiento micelial durante siete a diez días en medio PDA. Los medios fueron almacenados en incubadora a incubadora a ± 25 °C en oscuridad. Posteriormente se identificaron las colonias de hongos mediante características morfológicas del micelio. Estas presentaron estructuras hialinas, septadas, de crecimiento a 90° coloración blanca-amarillenta y de consistencia cremosa o algodonosa (Guáman & Ochoa, 2016).

10.4.1.8 Test de germinación para evaluar la respuesta en la inducción germinativa de semillas de asocio hongo-orquídea

Se obtuvieron cápsulas en estado maduro de *L. virginalis* (Scheidw.) Linden (1888). Los ejemplares obtenidos se encontraban sanos, sin signos de enfermedades o daños mecánico. Las cápsulas con semillas fueron sometida a un proceso de desinfección que consistió en el lavado de las cápsulas con agua y jabón antibacterial. Seguidamente, las cápsulas se abrieron para extraer las semillas. Estas se sumergieron en hipoclorito de sodio al 1%. Posterior a ello, se sumergieron en agua destilada estéril para eliminar el exceso de hipoclorito de sodio. Finalmente, las semillas colocaron en suspensión con 15 ml agua destilada estéril para ser utilizadas para inducir la actividad germinativa de las semillas de *L. virginalis* (Scheidw.) Linden (1888).

Se tomaron alícuotas con la cantidad de 50 μ L de semillas en suspensión en agua con una micropipeta y se vertieron en cajas Petri de 60 mm con medio PDA; la cantidad de semillas aplicadas por caja Petri se determinó mediante el conteo de semillas un estereoscopio Marca Luxeo 6Z. Posteriormente, el inóculo de hongo micorrízico se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Otero y Bayman (2009). Para ello, con un bisturí se tomó una porción de inóculo de 1 cm x 1 cm de medio con micelio de cada una de las cepas purificadas de interés y se transfirieron a las cajas Petri a las cuales se le aplicaron las alícuotas de semillas. Cada medio se identificó de acuerdo con la cepa de la cual se obtuvo el inóculo.

10.4.1.9 Viabilidad de las semillas.

Para determinar la viabilidad de las semillas se tomó una alícuota de 10 μ L de semillas en suspensión empleada para inducir la actividad germinativa de las semillas. Posteriormente, se transfirieron las

semillas a una caja Petri de 60 mm dentro de un sobre de papel filtro y se dejaron por 24 h en agua destilada. Pasado el tiempo previsto se secaron las semillas dentro del sobre de papel filtro y se transfirieron a otra caja Petri donde se adicionó una solución de Tetrazolio al 1% y se dejó reposar en oscuridad por otras 24 h (Alomía, Mosquera-E, Flanagan, & Otero, 2017; Aguilar-Morales et al., 2016; Chávez, Pinzón Ariza, & Vanegas Martínez, 2014). Finalmente, las semillas se secaron y se colocaron bajo un estereoscopio para su observación. La prueba de viabilidad se realizó cuatro veces para obtener datos más consistentes. Las semillas viables reaccionaron a la solución de tetrazolio presentando una tinción rojiza del embrión. Esto indica que las semillas presentan actividad celular, por el contrario, las semillas que no se tiñeron no presentaron actividad respiratoria de las células por lo que son semillas no viables. Se realizó un conteo de las semillas viables y no viables y se determinó el porcentaje de viabilidad de las semillas.

10.5 Procesamiento y análisis de la información

El procesamiento de datos obtenidos se realizó de forma descriptiva, micrográfica y fotográfica de los organismos observados durante el desarrollo de experimento. Los datos obtenidos se tabularon, considerando distintos aspectos durante la fase experimental (agentes contaminantes, medios de cultivo sin crecimiento, colonias aisladas). Se inicio con la identificación y codificación de cada muestra de raíces de las especies de orquídeas colectadas. La información colectada en la fase de laboratorio se realizó en base a manuales de hongos con el objetivo de describir las características morfológicas de las estructuras miceliales observadas. A través de micrografías se observaron las características de las cepas. Durante la evaluación y monitoreo del crecimiento micelial de las estructuras aisladas se estableció una base de datos descriptiva.

11 Resultados y discusión

11.1 Resultados

El listado de especies amenazadas de Guatemala (LEA) reporta que diversos especímenes pertenecientes al grupo de *Lycaste*, familia de las *Orchidaceae* se encuentran en peligro de extinción. Especies tales como *L. virginalis* f. *alba* (Dombrain) Archila & Chiron (2011), *L. dowiana* Endrés ex Rchb.f. (1874), *L. deppei* (G.Lodd. ex Lindl.) Lindl. (1843), *L. virginalis* (Scheidw.) Linden (1888) y *L. lasioglossa* Rchb.f.(1872) se encuentran albergadas en los bosques húmedos entre los

departamentos de Baja y Alta Verapaz. Diversas entidades resguardan la diversidad de esta familia de plantas, algunas de estas son El Biotopo del Quetzal de Mario Dary, Orquigonea, La Asociación Altaverapacense de Orquideología (AAO), entre otras. El resguardo de estos especímenes induce a su conservación y reproducción a través de técnicas sexuales y asexuales para su propagación, ya que su sobrevivencia se ve limitada al bajo porcentaje de germinación en su hábitat natural.

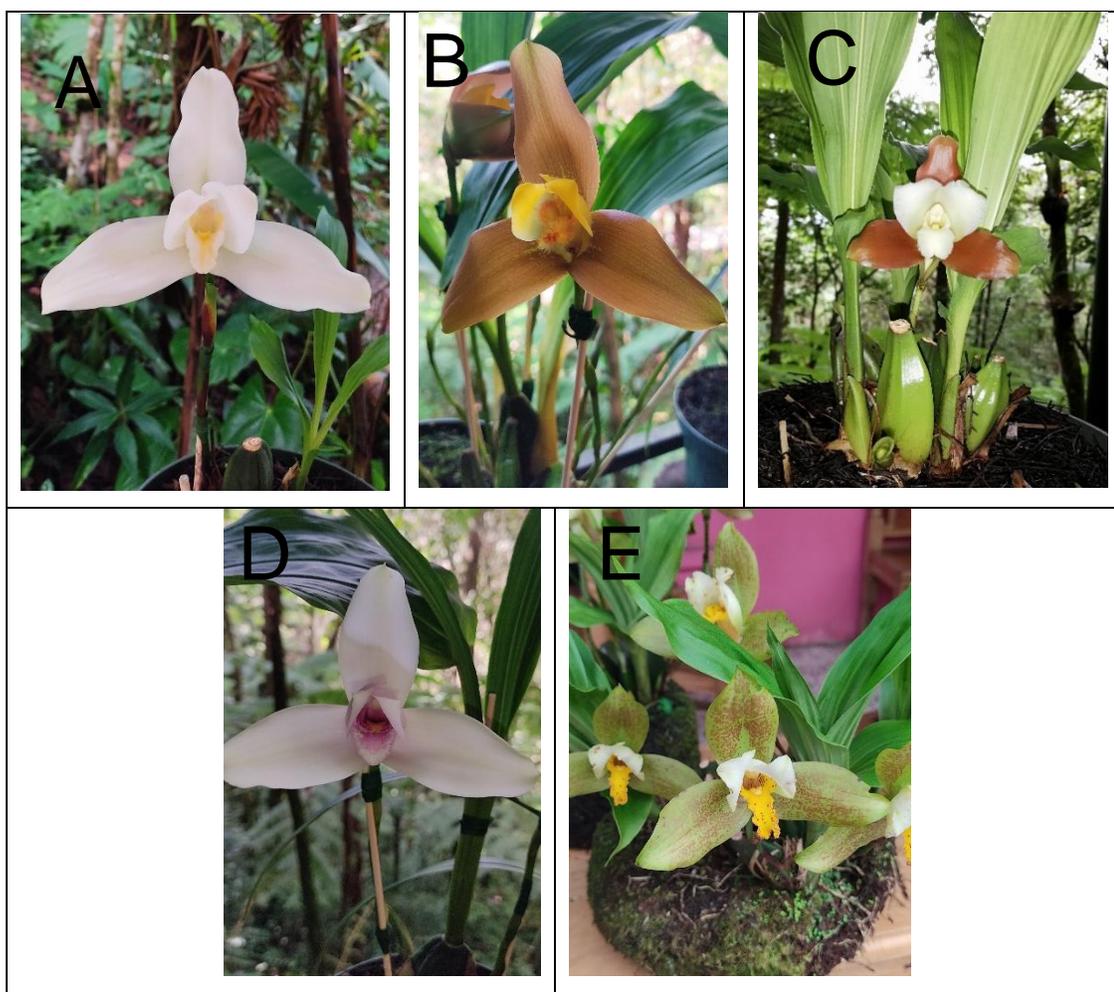


Figura 1 Especies de orquídeas del género *Lycaste* nativas de la región de las Verapaces; A. *Lycaste virginalis* f. *alba* (Dombraïn) Archila & Chiron (2011) B. *Lycaste lasioglossa* Rchb.f.(1872) C. *Lycaste dowiana* Endrés ex Rchb.f. (1874) D. *Lycaste virginalis* (Scheidw.) Linden (1888). E. *Lycaste deppei* (G.Lodd. ex Lindl.) Lindl. (1843).

Se identificaron especies de orquídeas epífitas pertenecientes al género *Lycaste* de la región comprendida entre los departamentos de Alta Verapaz y Baja Verapaz. Las muestras vegetales fueron

obtenidas en diferentes salidas de campo entre los meses de mayo y octubre 2021 en diferentes localidades de la región. Algunas muestras vegetales fueron colectadas en la zona boscosa; sotobosques de bosques nativos y bancos de germoplasma.

Tabla 1 Listado de especies de orquídeas y localidad de las muestras vegetales colectadas.

| Especies | Ubicación | Referencia | Número de raíces |
|---|-----------------------------|------------------------|------------------|
| <i>L. virginalis f. alba</i> | 15°12'47.8"N 90°12'56.10"O | Biotopo del Quetzal | 4 |
| (Dombraïn) Archila & Chiron (2011) | 15°26'15.2"N 90°24'44.30"O | Orquigonia | 3 |
| | 15°28'8.40"N 90°21'60.00"O | Banco de Germoplasma 1 | 2 |
| <i>L. virginalis</i> | 15°26'15.2"N 90°24'44.30"O | Orquigonia | 4 |
| (Scheidw.) Linden (1888) | 15°10'57.2"N 90°12'18.6"O | Banco de germoplasma 5 | 4 |
| | 15°28'32.4"N 90°18'31.70"O | Banco de Germoplasma 3 | 4 |
| | 15°28'32.4"N 90°22'21.5"W | Banco de Germoplasma 4 | 3 |
| <i>L. dowiana</i> Endrés ex Rchb.f. (1874) | 15°26'15.2"N 90°24'44.30"O | Orquigonia | 3 |
| | 15°28'8.40"N 90°21'60.00"O | Banco de Germoplasma 1 | 3 |
| | 15°28'32.4"N 90°18'31.70"O | Banco de Germoplasma 3 | 4 |
| <i>L. deppei</i> (G.Lodd. ex Lindl.) Lindl. (1843) | 15°26'15.2"N 90°24'44.30"O | Orquigonia | 4 |
| | 15°28'22.50"N 90°21'46.00"O | Banco de Germoplasma 2 | 3 |
| | 15°28'8.40"N 90°21'60.00"O | Banco de Germoplasma 1 | 4 |
| | 15°28'32.4"N 90°18'31.70"O | Banco de Germoplasma 3 | 4 |
| <i>L. lasioglossa</i> | 15°26'15.2"N 90°24'44.30"O | Orquigonia | 3 |
| Rchb.f.(1872) | 15°28'8.40"N 90°21'60.00"O | Banco de Germoplasma 1 | 3 |
| | 15°28'32.4"N 90°18'31.70"O | Banco de Germoplasma 3 | 3 |

Las raíces colectadas se encontraban en contacto con el hospedero en estado joven-maduro (Ver figura 2. C). Se extrajo raíces sanas y sin daño mecánico. Se seleccionaron especies de orquídeas *Lycaste* vigorosas con aproximadamente 4 pseudobulbo. Cada raíz colectada se secciono en basal, media y apical. De las muestras colectas se eliminó 1 cm de la parte apical (zona de crecimiento) (Ver figura 2. D).

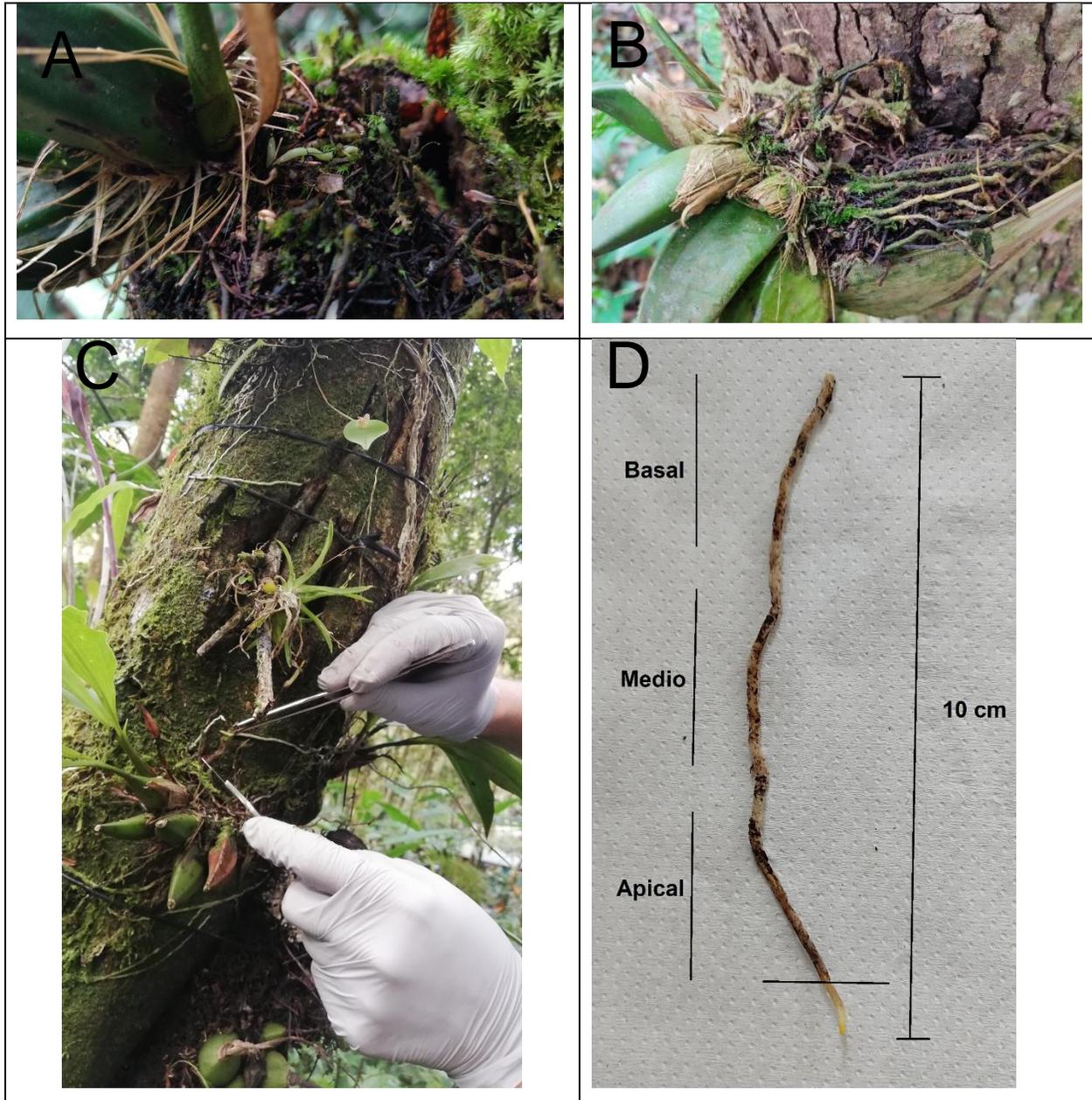


Figura 2 Estado de desarrollo radicular en especies del género *Lycaste*. A. Crecimiento inicial de las raíces en orquídeas epífitas. B. Estado adulto de raíces de orquídeas. C. Estado joven-maduro de raíces de orquídeas epífitas óptimas de colecta. D. División por estrato basal, medio y apical de la muestra colectada.

Como primer procedimiento, para la identificación de estos microorganismos se realizó la tinción con azul de Tripano en las estructuras radiculares. Con el objetivo de observar la presencia de pelotones

de estos hongos en las raíces de especies epífitas de *Lycaste* se realizaron cortes transversales de muestras radiculares para posteriormente ser observadas en un microscopio.

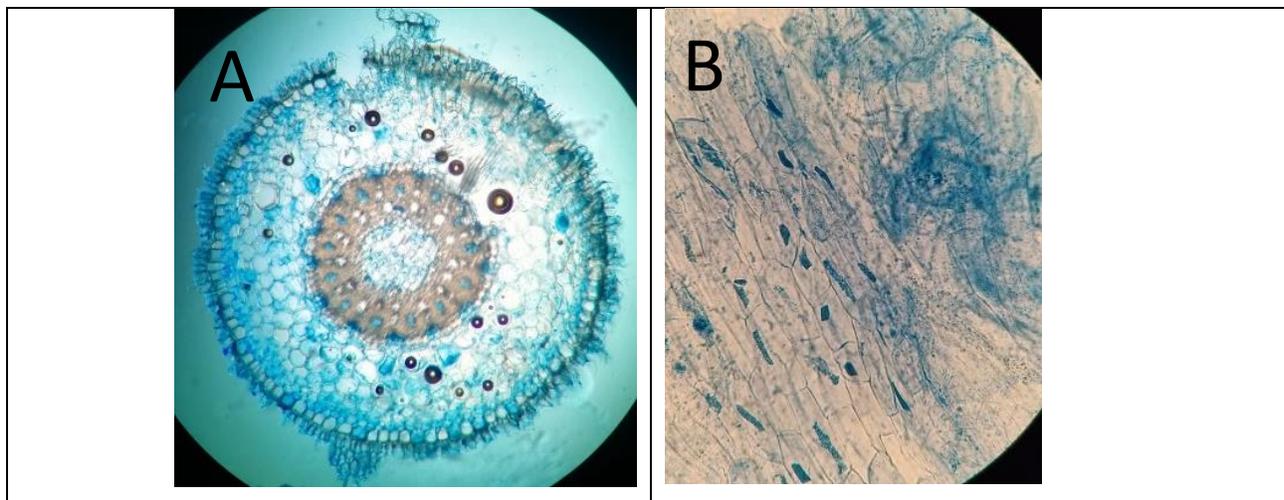


Figura 3 Tinción de estructuras radiculares. A. Micrografía del corte transversal radicular en orquídea epífita. B. Micrografía del corte longitudinal radicular en especie en orquídea epífita.

De los cortes transversales y longitudinales de las muestras vegetales no se observaron pelotones de hifas de hongos en las raíces de estos ejemplares (Véase figura 3. A-B). Sin embargo, se observó estructuras miceliales en el crecimiento en medio de cultivo PDA y MEA. Se empleó el medio MEA para la siembra de muestras vegetales de raíces colectadas. Clasificadas en basal, medio y apical; de raíces en estado joven-maduro de diferentes ejemplares de orquídeas en la zona de la Verapaces. A los siete días después de la siembra, se aislaron estructuras del medio MEA a medio PDA para el crecimiento, desarrollo y purificación de las cepas. Las raíces en estado joven-maduro presentaron la mayor actividad micelial observado en el crecimiento de hifas en un 44 % en la sección basal, con 39% en la sección media y un 17% de la zona apical. En raíces adultas y muy jóvenes el desarrollo fúngico fue nulo (Véase figura 4. D). Dentro las características observadas con aumentos de 40x y 100x, se identificaron estructuras hifas hialinas septadas, hifas emergentes en ángulo recto y crecimiento de cepas algodonoso (Véase figura 4. F, H, I). Cada cepa fue identificada según la especie de orquídea, el sitio de colecta, estrato de la raíz y fecha de siembra.

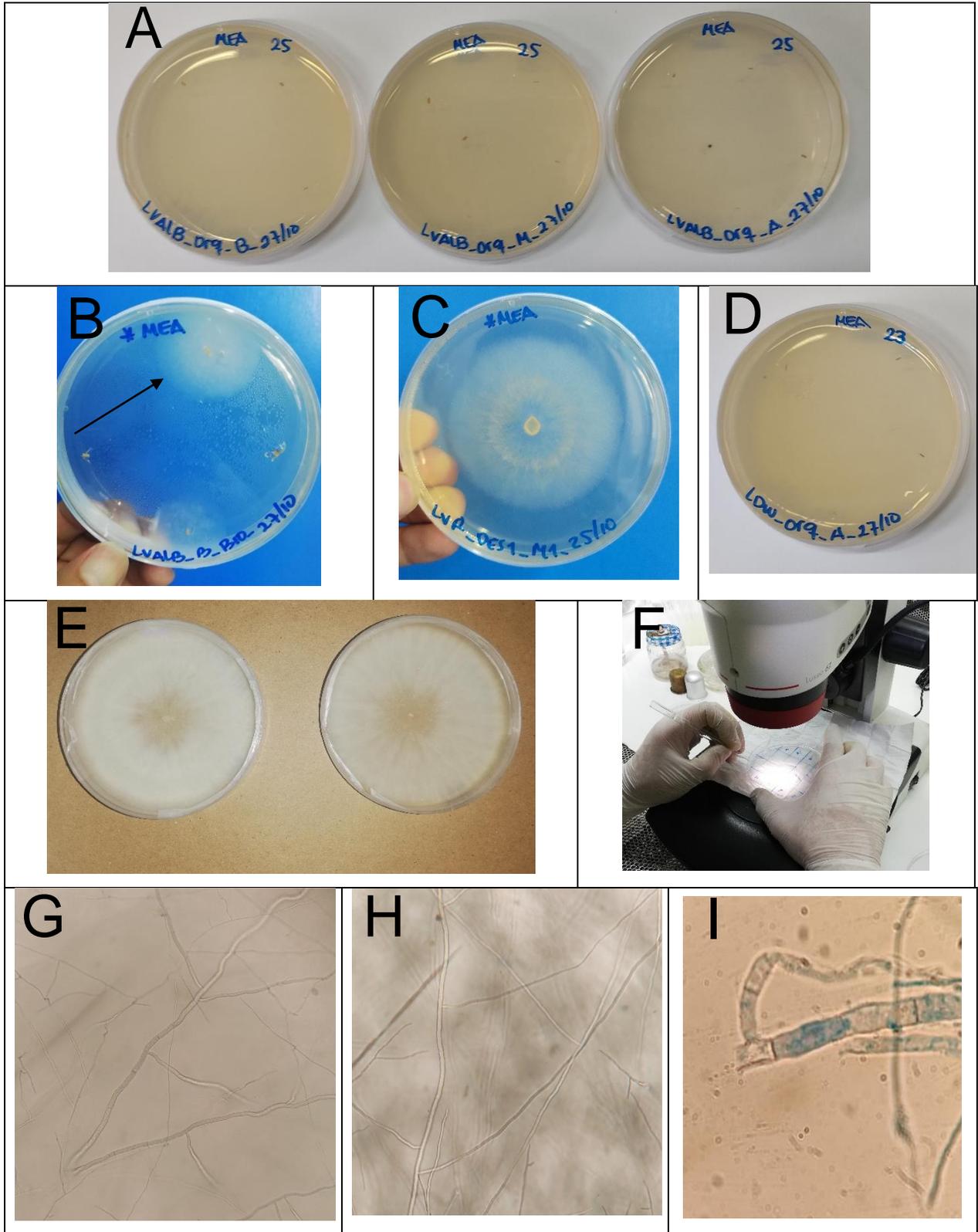


Figura 4 Proceso de aislamiento micelial. **A.** Identificación y siembra de las muestras vegetales empleadas para el aislamiento de hongos micorrícicos. **B.** Crecimiento de hifas a partir de los explantes de raíz utilizados en medio MEA. **C.** Crecimiento de hifas a los 5 días después de la siembra. **D.** Medio de cultivo sin respuesta al desarrollo fúngico. **E.** Desarrollo micelial a los 12 días después de la siembra. **F.** Purificación de cepas empleando la metodología agujas de vidrio. **G-H.** Micrografía de cepas purificadas observadas a 10x. **I.** Micrografía de las estructuras miceliales observadas a 100x.

Dentro de las cepas empleadas se observaron estructuras miceliales de otros agentes fúngicos y bacterianos. Estos agentes fúngicos fueron clasificados como agentes contaminantes desarrollados en los medios de cultivo MEA y PDA, se observaron estructuras de *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.*, y crecimiento bacteriano.

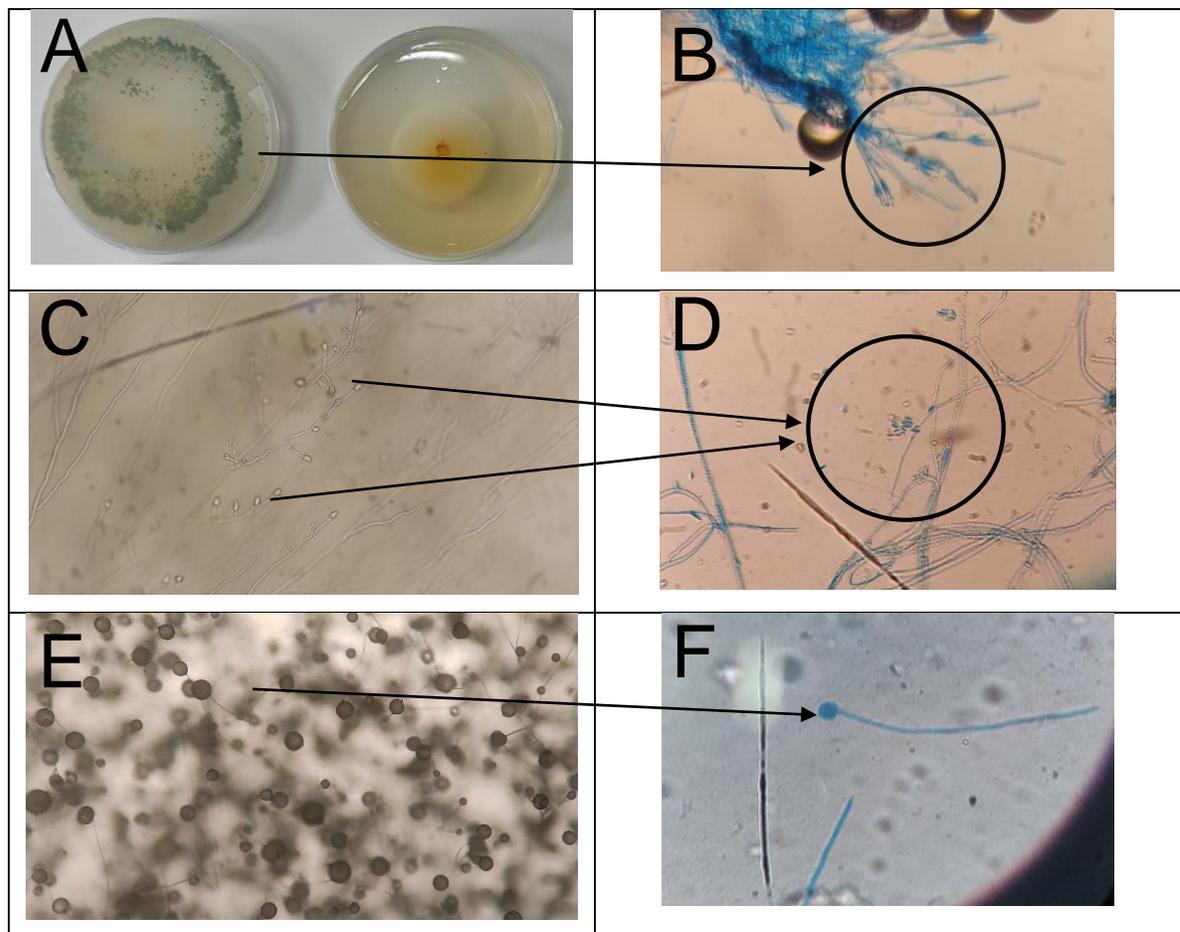
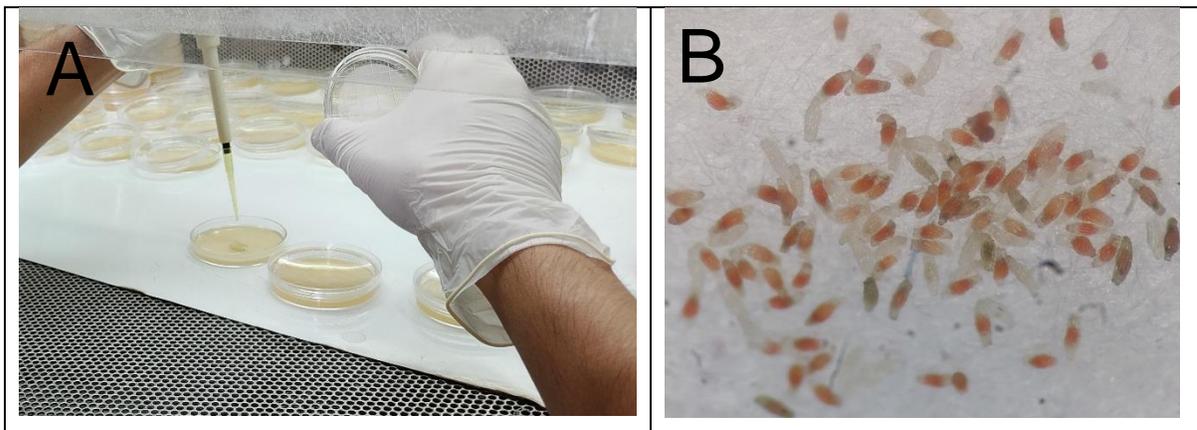




Figura 5 Agentes contaminantes. A. Crecimiento de agentes contaminantes en medio de cultivo PDA y MEA. B. Micrografía del hongo *Aspergillus sp.* observado a 40x. C. Micrografía del hongo *Fusarium sp.* observado a 10x. D. Micrografía del hongo *Fusarium sp.* observado a 40x. E. Micrografía del hongo *Rhizopus sp.* observado a 10x. F. Micrografía del hongo *Rhizopus sp.* observado a 40x. G. Crecimiento del hongo *Pithyium sp.* I. Fotografía del crecimiento bacteriano en medios de cultivo de PDA.

Por medio de la prueba de tetrazolio se determinó la viabilidad de las semillas. El porcentaje de semillas viables fue del 74.7 %. Para semillas sin embrión (vanas) y muertas se estimó el 25.3 % de la cápsula de orquídea empleada. De las 18 cepas resultantes se procedió a inducir germinación de la semilla de *L. virginalis*; de las cuales se obtuvieron 72 cepas hongo/semilla en medio PDA. Las unidades experimentales se almacenaron en una incubadora en condiciones de oscuridad a ± 25 grados Celsius, después de dos meses y medio de monitoreo las semillas no muestran actividad germinativa en función de las cepas de hongo aisladas.



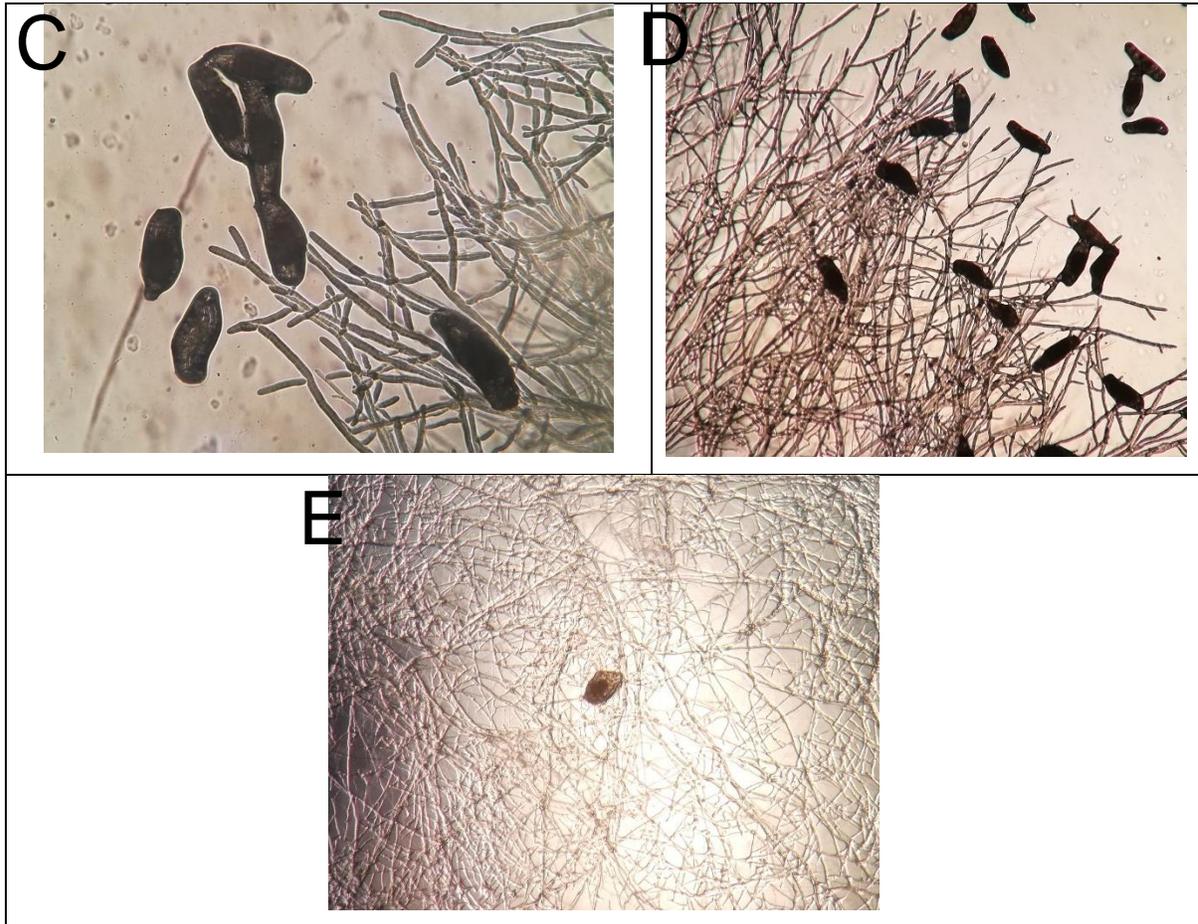


Figura 6 Evaluación de cepas en función a la germinación de semillas de orquídeas. A. Siembra de semillas de *Lycaste virginalis* (Scheidw.) Linden (1888) en medio PDA. B. Prueba de tetrazolio para determinar el porcentaje de viabilidad de semillas. C-D. Micrografía del inicio de interacción hongo-semilla a 100x. E. Micrografía de las semillas de orquídea a los dos meses después de la siembra observado a 100x.

11.2 Discusión de resultados:

La diversidad de sobrevivencia de orquídeas se ve limitada a la relación mutualista entre hongos denominadas micorrizas en estado natural. Estos microorganismos son de importancia en la sobrevivencia de la familia *Orchidaceae* (Atala et al., 2015; Wang, Jacquemyn, Gomes, Vos, & Merckx, 2021). Tal es su relevancia que se ha reflejado la presencia de estos en las estructuras radiculares de orquídeas epífitas, terrestres y litofitas. Estas estructuras fúngicas abastecen de suministros nutritivos a semillas con una limitada fuente energética, carentes de endospermo y de

cotiledón reducido; característico de las semillas de orquídeas (Kauth et al., 2008). Diversos estudios reportan la importancia de la relación hongo-orquídea atribuyéndose al género *Rhizoctonia* como uno de los principales grupos de micorrizas para este grupo de plantas. Estudios realizados por Knudson (1992); Rivas y colaboradores (1998); Moreno-Lopez y colaboradores (2014); Herrera y colaboradores (2021) reflejan la presencia este género de microorganismos en las raíces de orquídeas. Sin embargo, otros estudios mencionan el asocio con diversos grupos de hongos tales como basidiomicetos ectomicorrízicos, saprotroóficos y ascomicetos (McCormick, Whigham, & Canchani-Viruet, 2018). El género *Lycaste* es un grupo de plantas epífitas pertenecientes a las *Orchidaceae*, especies nativas de la región de las Verapaces. Especímenes como *L. virginalis* f. *alba* (Dombrain) Archila & Chiron (2011), *L. dowiana* Endrés ex Rchb.f. (1874), *L. deppei* (G.Lodd. ex Lindl.) Lindl. (1843), *L. virginalis* (Scheidw.) Linden (1888) y *L. lasioglossa* Rchb.f.(1872) fueron objeto de estudio para identificar y aislar microorganismo desarrollados a partir del empleo de raíces en estado jóvenes-maduras (ver figuras 2. C) de orquídeas. Para su caracterización morfológica se realizaron 162 aislamientos en medio MEA y DPA de las cuales se obtuvieron 18 cepas purificadas. Como resultado se identificaron los siguientes microorganismo *Fusarium* sp, *Penicillium* sp, *Rhizopus* sp (véase figuras 5. B.C.D.E.F) y un hongo que por sus características morfológicas puede atribuirse al grupo género-forma *Rhizoctonia*. El desarrollo de estas estructuras se ve reflejado en crecimiento micelial del 44% en la sección basal, con un 39% en la sección media y un 17% en la sección apical estas provenientes de raíces en estado joven-maduro. Caso contrario se evidenció en raíces muy jóvenes o raíces muy adultas, en las que el crecimiento de hifas fue casi nulo. Dentro de las características morfológicas observadas de los aislamientos que se atribuye al género *Rhizoctonia* se observó un micelio septado, de hifas emergentes de ángulo recto (90°), hialino de desarrollo algodonoso (véase figuras 4. G.H.I), sin embargo, para la determinación específica de las cepas obtenidas se debe desarrollar un análisis molecular para la determinación de este grupo de micorrizas. No se obtuvo el aislamiento de *Rhizoctonia* con certeza debido a que es de suma importancia la determinación taxonómica a través de marcadores moleculares específicos para correr un análisis que demuestre la presencia e identifique el género de hongo aislado; estudios realizados por Hossain (2019) reporta el 98.28 % de coincidencia de los aislamiento obtenidos relacionados al género *Rhizoctonia*, a través de la extracción de ADN utilizando el kit Qiagen DNeasy y la amplificación del gen ITS1 Y ITS4 se determinó taxonómicamente este género de hongo como la principal micorriza de *Gastrochilus calceolari* (fam.

Orchidaceae). Por otra parte, Xi y Colaboradores (2020) realizaron aislamiento de hongos micorrícicos de *Serendipita* en la especie *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb.f. utilizando la secuencia ITS amplificándolo mediante PCR, se identificó este género de hongo mediante BLAST versus la base de datos de nucleótidos GenBank. Estudios por Fan y Colaboradores (2021) reportan la identificación taxonómica la extracción del ADN mediante el método de bromuro de cetyltrimetilamonio (CTAB) empleando cebadores para la secuencia de estos microorganismos de ITS1 y ITS4 para la especie de orquídea *Paphiopedilum barbigerrum*, lo que hace que los resultados obtenidos mediante la metodología empleada en el presente estudio sean distintos debido a la alta especificidad de estos microorganismos por especie de orquídea. Por lo tanto, se deben ampliar en futuras investigaciones para determinar el grado de influencia en la variación taxonómicas de resultados. Los agentes observados fueron *Fusarium* sp, *Penicillium* sp, *Rhizopus* sp estos manifestaron crecimiento y desarrollo de esporas, estos microorganismos fueron descartadas por no presentar las características antes mencionados y fueron clasificadas como agentes contaminantes. De la misma forma se observó crecimiento bacteriano en los medios (véase figuras 4.H). Se empleo la metodología del uso de agujas de vidrio para aislar y purificar los micelios que cumplieran las características de interés, eliminando agentes externos y contaminantes. Las 18 cepas resultantes fueron empleadas para conocer la relación de simbiosis de estos microorganismos con semillas de una especie de orquídea pertenecientes a este género-forma. Se realizó la prueba de tetrazolio para determinar el porcentaje de viabilidad de las semillas, siendo del 74.7%. El 25.3% se atribuye a semillas vanas y muertas. Se obtuvieron 72 tratamiento en medio PDA las cuales fueron almacenadas en una incubadora a ± 25 grados Celsius. Los tratamientos fueron monitoreados en un lapso de dos meses y medio, sin embargo, aún no presentan respuesta germinativa. Se estima que alrededor de cinco a seis meses dependiendo de la especie está presente respuesta en la actividad germinativa, sin embargo, algunas estructuras aisladas no presentan respuesta en la germinación de las semillas. Estudios realizados por Otero & Bayman (2009) reportan la inactividad de la respuesta germinativa de las semillas de *T. variegata* (Fam. *Orchidaceae*) en función a las estructuras aisladas empleando medio de cultivo Knudson. Por otra parte, León & Molina (2015) reportan que especies como *Ondontoglossum* sp. (Fam. *Orchidaceae*) manifiestan actividad germinativa del 20% en función a estructuras miceliales de *tulasnella* sp. desarrollados en medio a base de agua de coco y avena; sin embargo, ejemplifica que la baja actividad germinativa se debe a la inhibición de desarrollo micelial y efecto de patógenos. Por otra parte, se

considera que la semilla se encuentra limitada en reserva energética y hace que este proceso sea más lento en condiciones *ex situ*. Y adicional la carencia de suministros nutricionales por el medio (PDA) empleado en el ensayo es reducido haciéndolos dependientes rigurosamente de las estructuras miceliales para su inducción germinativa. Por lo tanto, es de suma importancia seguir desarrollando investigación relacionada con la diversidad de hongos micorrícicos en función a la amplia gama de plantas de la familia *Orchidaceae*, con el propósito de enriquecer el resguardo y preservar del sitio en donde cohabitan dichos especímenes.

12 Referencias

- Aguilar-Morales, M. A., Laguna-Cerda, A., Vences-Contreras, C., & Lee-Espinosa, H. E. (2017). Análisis de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae) para su conservación *ex situ*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(7), 1741-1747. <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i7.166>
- Aguilera, L. G., Olalde, V. P., Rubí, M. A., & Contreras, R. A. (2007). Micorrizas arbusculares. *CIENCIA Ergo-Sum*, 14(3), 300-306.
- Alomia, Y. A., Mosquera-E, A. T., Flanagan, N. S., & Otero, J. T. (2017). Seed Viability and Symbiotic Seed Germination in *Vanilla* spp. (Orchidaceae). *Research Journal of Seed Science*, 10(2), 43-52. <https://doi.org/10.3923/rjss.2017.43.52>
- Ames, O., & Correll, D. S. (1985). *Orchids of Guatemala and Belize*. USA: Courier Corporation.
- Atala, C., Pereira, G., Romero, C., Muñoz-Tapia, L., Vargas, R., & Suz, L. M. (2015). Orchidoid fungi of the form-genus *Rhizoctonia* associated with the roots of *Chloraea cuneata* Lindl. from Araucanía, Chile. *Gayana Botánica*, 72(1), 145-148. <https://doi.org/10.4067/s0717-66432015000100017>
- Barnett, H. L., & Hunter, B.B. (1972). *Illustrated genera of the imperfect fungi*. Third edition. California, Estados Unidos: Burgess Publishing Company.
- Banda-Sánchez, L. del C., Pinzón Ariza, Y. H., & Vanegas Martínez, L. E. (2017). Características físicas y germinativas de la semilla de *Prosthechea* sp. (Orchidaceae) nativa de Fusagasugá. *Biota Colombiana*, 18(1), 79-86. <https://doi.org/10.21068/c2017.v18n01a6>

- Chavez, H. K., Mosquera, A. T., & Otero Ospina, J. T. (2014). Propagación in vitro de semillas de la orquídea *Comparettia falcata* Poepp. & Endl. (Orchidaceae) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas. *Acta Agronómica*, 64(2), 125-133. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.42976>
- Claro, A., Mujica, M. I., Cisternas, M., Armesto, J. J., & Pérez, F. (2020). Low mycorrhizal diversity in the endangered and rare orchids *Bipinnula volckmannii* and *B. apinnula* of Central Chile. *Symbiosis*, 80(2), 145-154. <https://doi.org/10.1007/s13199-019-00648-w>
- Consejo Nacional de Áreas Protegidas, Guatemala. (2008). Guatemala y su biodiversidad: Un enfoque histórico, cultural, biológico y económico. Guatemala: CONAP. 650 pág.
- Consejo Nacional de Áreas Protegidas, Guatemala. (2009). Lista de especies amenazadas de Guatemala (LEA). Guatemala: CONAP.
- Consejo Nacional de Áreas Protegidas, Guatemala. (2014). Informe Nacional de cumplimiento a los acuerdos del convenio sobre la diversidad biológica. Documento Técnico No. 3. Guatemala: CONAP.
- Cruz, H., J. B. (2014). *Desarrollo de una trampa in situ para el Aislamiento Micorrízico de Una Orquídea Epífita del Parque Nacional el Tepozteco* (Tesis de licenciatura). México, D.F.
- Durán, C., Rivero, M., & Seemann, P. (2007). Identificación de endomicorrizas en la orquídea nativa *gavilea araucana* (phil.) correa. *Agro Sur*, 35(2), 67-69. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2007.v35n2-32>
- Fan T., Xiao-Feng L., Lian-Hui W., Xin-Xiang B., Yan-Bin Y., Zai-Qi L., & Feng-Xia Y. (2021). Isolation and identification of beneficial orchid mycorrhizal fungi in *Paphiopedilum barbiggerum* (Orchidaceae), *Plant Signaling & Behavior*. <https://doi.org/10.1080/15592324.2021.2005882>
- Freitas, E. F.S., da Silva, M., Cruz, E. da S., Mangaravite, E., Bocayuva, M. F., Veloso, T. G. R., Selosse, M. A., & Kasuya, M. C. M. (2020). Diversity of mycorrhizal *Tulasnella* associated with epiphytic and rupicolous orchids from the Brazilian Atlantic Forest, including four new species. *Scientific Reports*, 10(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63885-w>
- Freuler, M. J. (2007). Orquídeas (1er. Edición). ALBATROS. 48p. https://books.google.com.gt/books?hl=es&lr=&id=SjFbL4qd9-MC&oi=fnd&pg=PA7&dq=las+orquideas&ots=06kUFzpNNq&sig=a2xR2C6hfjuBUNy341rFw8tBxyo&redir_esc=y#v=onepage&q=las%20orquideas&f=false

- Fuerte-Flores, B., Mallitasig-Quishpe, D., Cerna-Cevallos, M. & Gutiérrez, S. (2018). Identificación morfológica y molecular de hongos micorrízicos de especies del género *dracula* y *epidendrum* (orchidaceae). *Bionatura*, 1(1), 1-17. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/CS/2018.01.01.4>
- Guamán, M. V., & Ochoa, L. G. (2011). *Aislamiento y selección de hongos potencialmente micorrízicos en seis especies de orquídeas nativas del Cerro Abuga en la Provincia del Cañar* (Tesis de licenciatura). Cuenca, Ecuador.
- Honrubia, M. (2009). Las micorrizas: Una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. *Anales Del Jardín Botánico de Madrid*, 66(SUPPL. 1), 133-144.
<https://doi.org/10.3989/ajbm.2226>
- Honsain, M. (2019). Morpho-Molecular Characterization of *Ceratobasidium* Sp.: a Mycorrhizal Fungi Isolated From a Rare Epiphytic Orchid. *Bangladesh J. Plant Taxon*, 26(2), 249-257.
- Instituto de Investigación y Proyección sobre Ambiente Natural y Sociedad, Guatemala. (2012). Perfil Ambiental de Guatemala 2020-2012. Guatemala: Universidad Rafael Landívar (URL).
- Kauth, P. J., Dutra, D., Johnson, T. R., Stewart, S. L., Kane, M. E., & Vendrame, W. A. (2008). Techniques and applications of in vitro orchid seed germination. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues.*, (January), 375-391.
- Knudson, L. (1922). Nonsymbiotic Germination of Orchid Seeds. *Botanical Gazette*, LXXIII (1).
- León, M., E., & Molina, L., R. (2015). *Aislamiento y selección de micorrizas con evaluación preliminar de su efecto en la germinación de orquídeas en el orquideario de la universidad de cuenca* (Tesis de licenciatura). Cuenca, Ecuador.
- López-Selva Quintana, M. M. (2016). Orquídeas de Guatemala: características principales, estatus de conservación y generación de conocimiento en la URL. *Revista Eutopía*, 1(2), 205-216.
- McCormick, M. K., Whigham, D. F., & Canchani-Viruet, A. (2018). Mycorrhizal fungi affect orchid distribution and population dynamics. *New Phytologist*, 219(4), 1207-1215.
<https://doi.org/10.1111/nph.15223>
- Melgar, W. (2003). Estado de la diversidad biológica de los árboles y bosques de Guatemala. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO).
- Ministerio de Ambiente y Recursos Naturales. (2012). Informe Ambiental del Estado de Guatemala 2011. Guatemala: MARN. Guatemala. 269 pág.

- Moreno-López, P., Herrera-Sánchez, A. Y., & Prado-Dorado, A. A. (2014). Aislamiento y caracterización de rhizoctonia sp. asociados a raíces de orquídeas en fusagasugá-cundinamarca. *Fitopatología Colombiana*, 38(1), 9-12.
- Mutlu, V. A., & Kömpe, Y. Ö. (2020). Mycorrhizal fungi of some Orchis species of Turkey. *Pakistan Journal of Botany*, 52(2), 687-695. [https://doi.org/10.30848/PJB2020-2\(42\)](https://doi.org/10.30848/PJB2020-2(42))
- Ordóñez, N. F. C., Otero, J. T., & Díez, M. C. G. (2012). Hongos endófitos de orquídeas y su efecto sobre el crecimiento en *Vanilla planifolia* Andrews. *Acta Agronómica*, 61(3), 282-290. https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/37544/39920
- Otero, J. T., & Bayman, P. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epifitas. *Acta Agronómica*, 58(4), 270-276.
- Otero, J. T., Ackerman, J. D., & Bayman, P. (2002). Diversity and host specificity of endophytic Rhizoctonia-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*, 89(11), 1852-1858. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.11.1852>
- Otero, J. T., Ackerman, J. D., & Bayman, P. (2004). Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology*, 13(8), 2393-2404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02223.x>
- Rasmussen, H. (1995). Requirements for germination. In *Terrestrial Orchids: From Seed to Mycotrophic Plant* (pp. 39-76). Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9780511525452
- Rivas, M., Warner, J., & Bermúdez, M. (1998). Presencia de micorrizas en orquídeas de un jardín botánico neotropical. *Revista de Biología Tropical*, 46(2), 211-216.
- Sathiyadash, K., Muthukumar, T., Karthikeyan, V., & Rajendran, K. (2020). *Orchid Biology: Recent Trends & Challenges: Orchid Mycorrhizal Fungi: Structure, Function, and Diversity*. Springer. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-32-9456-1_13
- Wang, D., Jacquemyn, H., Gomes, S. I. F., Vos, R. A., & Merckx, V. S. F. T. (2021). Symbiont switching and trophic mode shifts in Orchidaceae. *New Phytologist*, 231(2), 791-800. <https://doi.org/10.1111/nph.17414>
- Wu, J., Ma, H., Lü, M., Han, S., Zhu, Y., Jin, H., Liang, J., Liu, L., & Xu, J. (2010). Rhizoctonia fungi enhance the growth of the endangered orchid *Cymbidium goeringii*. *Botany*, 88(1), 20-29. <https://doi.org/10.1139/B09-092>

Xi, Jun Shi, Jingbao Li & Zhengmin Han (2020) Isolation and identification of beneficial orchid mycorrhizal fungi in *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb.f.(Orchidaceae), *Plant Signaling & Behavior*, 15(12), <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.181664>

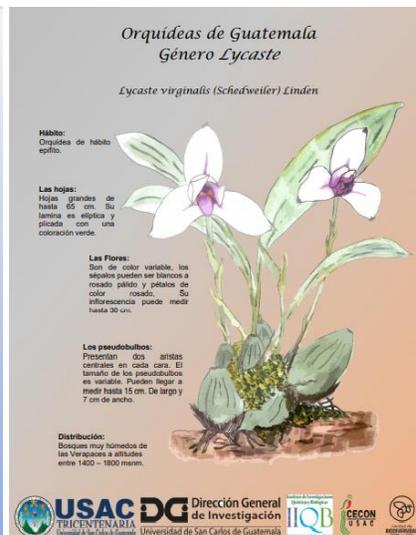
Xing, X., Liu, Q., Liu, Q., Gao, Y., Shao, S., Guo, L., Jacquemyn, H., Zhao, Z., & Guo, S. (2020). The Architecture of the Network of Orchid-Fungus Interactions in Nine Co-occurring *Dendrobium* Species. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8, 1-10. Artículo 130. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00130>

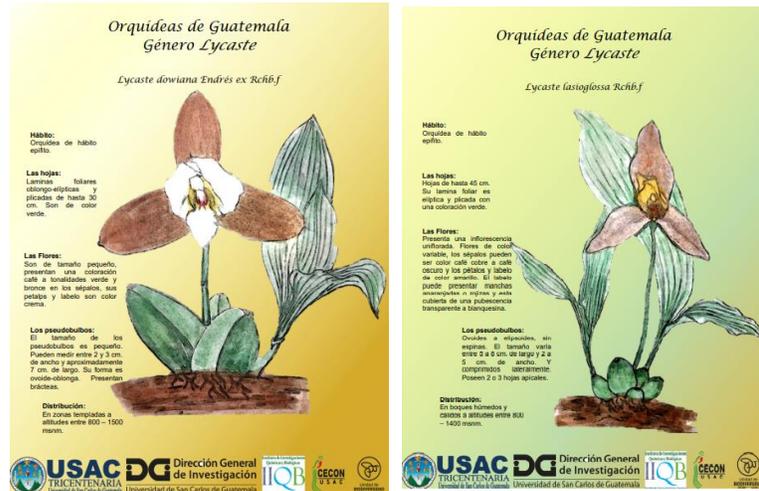
Yam, T. W., & Arditti, J. (2009). History of orchid propagation: A mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnology Reports*, 3(1), 1-56. <https://doi.org/10.1007/s11816-008-0066-3>

Zettler, L. W. & Corey L. L. (2018) Orchid Mycorrhizal Fungi: Isolation and Identification Techniques. In: Lee YI., Yeung ET. (eds) Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses-Methods and Protocols. *Springer Protocols Handbooks*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7771-0_2

13 Apéndice

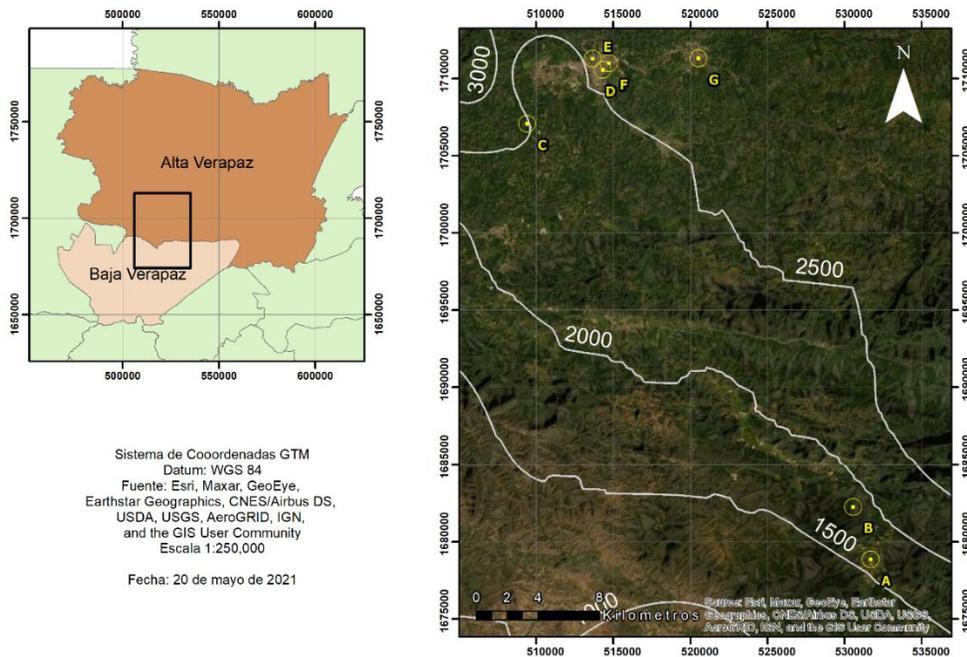
Se realizaron infografías de las especies de orquídeas colectadas como material divulgativo.





Mapa de las localidades de los puntos de colectas del material vegetal radicular de las diferentes especies de orquídeas del género *Lycaste*.

Puntos de muestreo Corredor del Bosque Nuboso



8 Vinculación

Durante el desarrollo del proyecto se trabajó con el Centro de Estudios Conservacionistas (CECON), en colaboración con las autoridades del Biotopo Universitario para la Conservación del Quetzal Lic. Mario Dary Rivera, así como entidades privadas que promueven la importancia de la familia de *Orchidaceae* en la región; Orquigonea y bancos de germoplasma a través de La Asociación Altaverapacense de Orquideología. Durante la fase experimental de laboratorio se trabajó en conjunto con Centro de Diagnóstico Parasitológico, Uviger de la facultad de Agronomía.

9 Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual

Se elaboró material divulgativo digital para socializar la información de los resultados obtenidos a las autoridades e instituciones (Biotopo del Quetzal, Orquigonia, CECON y La Asociación Altaverapacense de Orquideología) que contribuyeron en la ejecución del proyecto. Se Participó en ponencias relacionados con el tema de desarrollo a nivel local. La Divulgación la información obtenida fue dada a conocer mediante, entrevistas y exposiciones a los actores involucrados en el desarrollo de la investigación. Se pretende publicar en revistas científicas como la Dirección General de Investigación -DIGI- y/o revistas internacionales indexadas. Con base en lo antes descrito se pretende gestionar la propiedad intelectual antes su divulgación por medio de CATIE-DIGI.

10 Conclusiones

Se observó la presencia de microorganismo fúngicos en las estructuras radiculares de las especies de orquídeas *L. virginalis* f. alba (Dombrain) Archila & Chiron (2011), *L. dowiana* Endrés ex Rchb.f. (1874), *L. deppei* (G.Lodd. ex Lindl.) Lindl. (1843), *L. virginalis* (Scheidw.) Linden (1888) y *L. lasioglossa* Rchb.f.(1872). Dentro de las características morfológicas se identificaron estructuras miceliales septadas, hialinas, de crecimiento a 90 grados desarrollo algodonoso en cepas con medio de cultivo a base de Agar Dextrosa y Papa. Sin embargo, se debe dar seguimiento con el estudio para realizar análisis moleculares y determinar específicamente las estructuras resultantes.

Los principales agentes identificados y clasificados como contaminantes observados fueron *Aspergillus* sp, *Fusarium* spp. *Penicillium* sp, *Rhizopus* sp, y crecimiento bacteriano.

La actividad fúngica de los hongos aislados no se desarrolla constantemente en todo el ciclo de crecimiento de las raíces de plantas epífitas. La mayor actividad se observó en raíces en estado joven-

madura en contacto con hospedero de anclaje y/o sustrato, en raíces de temprano crecimiento y raíces muy antiguas la presencia de estos microorganismos fue muy bajo en ocasiones nulo.

Se emplearon semillas de *Lycaste virginalis* (Scheidw.) Linden (1888) con un 74.7% de viabilidad germinativa se realizó la prueba para inducir el proceso germinativo de las semillas de esta especie de orquídea en función a la actividad fúngica de las cepas resultantes, sin embargo, dos meses y medio bajo observación las semillas no presentan actividad germinativa

11 Aporte de la propuesta de investigación a los ODS:

El proyecto de investigación contribuyó a la exploración de una nueva rama de estudio relacionada a la conservación de la diversidad florística de Guatemala, en particular en especies de flora en peligro de extinción. Debido a que numerosos individuos de este grupo son objeto de comercio ilegal, la familia *Orchidaceae* es un claro ejemplo de la depredación en su estado natural para el tráfico de vida silvestre, afectando desproporcionadamente la comunidad de individuos dependientes de ellos. Actualmente no se encuentra regulado el manejo que frene la amenaza que conlleva a su extinción por lo que es imperante que se implementen medidas y/o programas de rescate de especies.

En base a lo antes descrito de la presente propuesta de investigación se obtuvo información primaria sobre la interacción hongo-orquídea como nuevo aporte para contribuir a la conservación del género *Lycaste*. Así mismo buscó que el conocimiento obtenido del proyecto de investigación genere impacto a las líneas de estudios relacionadas a la familia *Orchidaceae* desarrolladas en la Unidad para el Conocimiento, Uso y Valoración de la Biodiversidad.

12 Orden de pago final

| Nombres y apellidos | Categoría (investigador /auxiliar) | Registro de personal | Procede pago de mes (Sí / No) | Firma |
|---|------------------------------------|----------------------|-------------------------------|-------|
| Ing. Agr. Francisco Javier Morales Siná | Investigador | 20180731 | Sí | |
| Br. Pablo José Rodríguez Aguilar | Auxiliar de Investigación II | 20200736 | Sí | |

Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación -DIGI-

13 Declaración del Coordinador(a) del proyecto de investigación

La Coordinadora de proyecto de investigación con base en el *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación*, artículos 13 y 20, deja constancia que el personal contratado para el proyecto de investigación que coordina ha cumplido a satisfacción con la entrega de informes individuales por lo que es procedente hacer efectivo el pago correspondiente.

| | |
|--|--|
| Lcda. Mabel Anelisse Vásquez Soto Vo.Bo. Coordinadora del proyecto de investigación DES1-2021 | |
| Fecha: 23/02/2022 | |

14 Aval del Director (a) del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario

De conformidad con el artículo 13 y 19 del *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación* otorgo el aval al presente informe mensual de las actividades realizadas en el proyecto **Aislamiento e identificación de micorrizas en especies del género *Lycaste* con fines de conservación en el Bosque Nuboso, Baja Verapaz, Guatemala** en mi calidad Directora del instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas, mismo que ha sido revisado y cumple su ejecución de acuerdo a lo planificado.

| | |
|--|--|
| Dra. María Eunice Enríquez Vo. Bo. Directora del instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas | |
| Fecha: 23/02/2022 | |

15 Visado de la Dirección General de Investigación

| | |
|--|--|
| Ing. Agr. MARN. Julio Rufino Salazar Vo.Bo. Coordinador del Programa Universitario de Investigación | |
| Fecha: 23/02/2022 | |

Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación -DIGI-

| | |
|--|--|
| Ing. Agr. MARN. Julio Rufino Salazar Vo.Bo. Coordinador del Programa Universitario de Investigación | |
|--|--|

| |
|-------------------|
| Fecha: 23/02/2022 |
|-------------------|