

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Estudio de la factibilidad del empleo de Hongos Macromicetos como mediadores en el bio-endurecimiento de Plántulas de orquídea

Manuel Gastelbondo Medina

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2018

Estudio de la factibilidad del empleo de Hongos Macromicetos como mediadores en el bio-endurecimiento de Plántulas de orquídea

Manuel Gastelbondo Medina

Tesis Maestría presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Química

Directora:

Dr. Sc. Ivonne Jeannette Nieto R.

Línea de Investigación:

Productos Naturales

Grupo de Investigación:

Química de Hongos Macromicetos Colombianos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento Química

Bogotá, Colombia

2018

"Rather than love, than money, than fame, give me truth."

<Henry D. Thoreau>

Agradecimientos

Primeramente, quiero agradecer a Dios, a quien reconozco como mi creador y en quien deposito todas mis esperanzas y anhelos. Luego hago un especial reconocimiento a mis padres (Pilar y Fernando), que no solo fueron el centro de mi formación moral y un constante ejemplo por medio de sus vidas, sino que también fueron mi sostenimiento durante mi niñez y estudios académicos, por soportarme y no perder la fe en mí. También quiero agradecer a mi esposa Úrsula y a mi hija Cora, quienes son ahora mi núcleo familiar y con quienes comparto mi vida en todas sus facetas. A mi hermano, que siempre me ha acompañado y con quien comparto mis sueños y convicciones. A mi directora quien además de mostrarse paciente durante el proceso de creación de este documento y desarrollo de esta investigación fue también un verdadero compás para este proceso, mostrándome que es verdaderamente ser un tutor y un mentor. A Mariano Ospina Hernández, mi guía en la ciencia y quien me enseñó sobre las orquídeas y muchos otros temas (Q.E.P.D). A Angela Ospina por dejar cariñosamente pistas en mi camino para que yo las siguiera. Al grupo de química de Hongos Macromicetos Colombianos con cuyo apoyo mutuo considero hemos logrado importantes investigaciones y con quienes compartí buenas amistades. También a mis amigos, músicos, científicos, revolucionarios y santos, que viven en este mundo buscando algo más que lo establecido. Finalmente, a la empresa Ball SB, especialmente a Joaquín De la Torre por apoyarme en mi formación profesional y depositar su confianza en mí.

Resumen

En los trópicos las orquídeas encarnan una de las mayores expresiones de la riqueza florística; debido a su belleza, color y por su capacidad para adaptarse a casi cualquier ambiente. En Colombia, son consideradas un producto valioso, haciendo que su explotación se realice a partir la extracción de material vegetal silvestre para su posterior cultivo. Esta práctica y la disminución de su hábitat natural amenazan con su extinción, problema que se puede solucionar mediante la propagación In Vitro. Sin embargo, uno de los grandes inconvenientes es la pérdida de las plántulas cuando pasan de cultivo In vitro al desarrollo Ex vitro. Este proceso puede ser convencional (control de factores físicos y empleo de fungicidas y pesticidas) o de bio-endurecimiento (empleo de hongos y bacterias). En el caso de los hongos, los reportes hacen referencia al empleo de hongos micromicetes (endófitos y HFMO).

Con base en las características de los macromicetes, productores de compuestos antimicrobianos, antifúngicos y promotores de crecimiento se planteó la presente investigación, pionera en el área, buscando explorar el empleo de los hongos macromicetes como mediadores en el bio - endurecimiento de plántulas de orquídea. Las tasas de supervivencia obtenidas bajo co-cultivo y la posterior determinación de los exometabolitos permitieron determinar el potencial bio-endurecedor del *P. ostreatus* Var. Columbinus y que son los ácidos palmítico, margárico y linoleico, el ergosta-5-en-3-ol, el (23)-etilcolesta-5-en-3-ol, junto con los exopolisacáridos y las fitohormonas AIA y AG₃ los posibles responsables de la acción, sentando las bases para desarrollar una nueva ecotecnología.

Palabras clave: Macromicetes, Bio-endurecimiento, In-vitro, endurecimiento, orquídeas, metabolitos, fito-hormonas.

Abstract

Orchids are one of the most diverse botanical families and embody a floristic richness, not only for the beauty and colors of the flowers, but also for their capacity to adapt to almost any land ecosystem in the world. In Colombia, orchids are a valuable asset, this generates pressure from illegal extraction of wild plants, the previous in connection to the loss of habitat is reducing natural populations and has proven to be unsustainable. This problem may be addressed by In vitro mass propagation of orchids. One of the main challenges of this technique is the loss of plantlets during the hardening stage. Two main approaches have been developed, one denominated conventional hardening (using physical means and using fungicides and bactericides) and a bio-hardening (by means of beneficial fungi and bacteria). At present all the studies of fungi for hardening have dealt with micromycetes (endophytic and OMF).

Based on the characteristics of macromycetes fungi, which are natural producers of antimicrobial, anti-fungal and plant growth regulating (PGR) metabolites this study was presented, pioneer in the area of bio-hardening, proposing macromycetes as mediators in the adaptation process of orchid plantlets. The survival rates during the co-culture trial and the later determination of the exo-metabolites excreted by the fungi enabled to demonstrate the bio-hardening potential of *P. ostreatus* Var. Columbinus and that palmitic, margaric and linoleic acids, the ergosta-5-en-3-ol, the (23) -etilcolesta-5-en-3-ol, together with the exopolysaccharides and phytohormones AIA and AG3, are the accountable for the action, laying the foundations to develop a new ecotechnology..

Keywords: Macromycetes, Bio-hardening, In-vitro, Hardening, Orchids, Metabolites, Phytohormones.

Contenido

	Pág.
1. CAPÍTULO 1: PROPAGACIÓN IN VITRO DE ORQUÍDEAS Y PROCESOS DE ENDURECIMIENTO.....	17
1.1 Resumen.....	18
1.2 Abstract.....	18
1.3 Introducción.....	19
1.4 Antecedentes	22
1.4.1 Fisiología Vegetal y Propagación <i>In vitro</i>	22
1.5 Endurecimiento y tipos de endurecimiento	24
1.5.1 Métodos Convencionales de Endurecimiento	24
1.5.2 Métodos de bio – endurecimiento	28
1.5.3 Métodos de bio – endurecimiento	28
1.5.4 Bio-endurecimiento mediante empleo de hongos micromicetes formadores de micorrizas.....	30
1.5.5 Bio-endurecimiento mediado por hongos endófitos	33
2. CAPÍTULO 2: DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LAS PLÁNTULAS DE ORQUÍDEA SOMETIDAS AL BIO-ENDURECIMIENTO CON MACROMICETES	35
2.1 Resumen.....	36
2.2 Abstract.....	37
2.3 Introducción.....	37
2.4 Antecedentes	40
2.4.1 Generalidades de los hongos macromicetes	40
2.4.2 Generalidades sobre los basidiomicetes estudiados en la presente investigación	43
2.4.3 Hongos macromicetes y bio-endurecimiento	45
2.4.4 Ventajas adicionales de los macromicetes en bio-endurecimiento.....	47
2.5 Materiales y métodos	48
2.5.1 Material Fúngico	48
2.5.2 Material Vegetal.....	50
2.5.3 Co-cultivo.....	52
2.5.4 Obtención de la semilla (Spawn)	53
2.5.5 Inoculación del Spawn en la Corteza de Pino	54
2.6 Resultados y Discusión	56
2.6.1 Potencial de macromicetos en proceso de bio-endurecimiento.....	56
2.6.2 Selección del hongo con mayor potencial en bio-endurecimiento	61
2.7 Conclusiones.....	65
3. CAPÍTULO 3: ESTUDIO QUÍMICO PRELIMINAR DE LOS POSIBLES FUNGIMETABOLITOS MEDIADORES EN EL BIO-ENDURECIMIENTO	67

3.1	Resumen	68
3.2	Abstract	68
3.3	Introducción	69
3.4	Antecedentes.....	70
3.4.1	Fitohormonas	71
3.4.2	Compuestos Triterpenoidales.....	75
3.4.3	Ácidos Grasos.....	79
3.4.4	Polisacáridos.....	81
3.5	Metodología.....	84
3.5.1	Extracción y caracterización de los metabolitos de interés.....	84
-	Extracción y cuantificación de polisacáridos y β -glucanos.....	85
-	Extracción, detección y/o cuantificación de fitohormonas.....	86
3.6	Análisis Estadístico	87
3.7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	88
3.7.1	Selección del hongo con el mayor potencial para el proceso de bio- endurecimiento, Ácidos grasos y compuestos de carácter triterpenoidal	90
3.7.2	Estudio comparativo de los fungimetabolitos de baja polaridad.....	95
3.7.3	Cuantificación de carbohidratos totales y β -glucanos	99
3.7.4	Detección y cuantificación de fitohormonas.....	104
3.8	DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS	113
4.	Conclusiones y recomendaciones	115
4.1	Conclusiones	115
4.2	Recomendaciones	116

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Esquema de ubicación de estomas en las hojas (Taiz and Zeigar, 2006).....	23
Figura 1-2: Micrografía de impronta de los estomas de vitro plantas.....	23
Figura 1-3: Micrografía del corte transversal de una raíz de orquídea.....	31
Figura 2-1: Diagrama de hongos macromicetes.....	41
Figura 2-2: Características morfológicas de Ascomycota y Basidiomycota.....	42
Figura 2-3: Material fúngico utilizado en el estudio.....	49
Figura 2-4: Variedades de orquídeas utilizadas en el estudio.....	50
Figura 2-5: Protocolo para la obtención del material vegetal.....	51
Figura 2-6: Tamaño ideal para extraer plántula de orquídea <i>In vitro</i>	52
Figura 2-7: Producción de Spawn.....	53
Figura 2-8: Matraces con corteza de pino inoculados con cada especie de hongo.....	54
Figura 2-9: Plántulas de Irene Finney después de 1 año de desarrollo bajo los dos tratamientos.....	59
Figura 2-10: Síntomas presentados por las plántulas endurecidas bajo tratamiento control.....	60
Figura 2-11: Comparación después de 1 año de desarrollo de las plántulas de LC Irene Finney posterior a endurecimiento con y sin co-cultivo.....	60
Figura 2-12: Cromatograma en Capa Delgada de la fracción grasa de los hongos macromicetes evaluados.....	63
Figura 2-13: Cromatogramas de Gases de la fracción grasa de los hongos macromicetes evaluados.....	64
Figura 3-1: Núcleos triterpenoidales más comunes en hongos basidiomicetos. ...	76
Figura 3-2: Estructuras de esteroides ampliamente distribuidos en macromicetes. 77	77
Figura 3-3: Estructuras de los ácidos grasos más abundantes en basidiomicetos.80	80
Figura 3-4: Metodología de extracción de fitohormonas(Ünyayar, Topcuoglu and Ünyayar, 1996).....	87
Figura 3-5: Mecanismo de la hidrólisis de celulosa mediante el complejo celulasas.(Yoon <i>et al.</i> , 2014).....	89
Figura 3-6: Cromatogramas de Gases de la fracción grasa de los hongos evaluados.....	91
Figura 3-7: Cromatograma correspondiente a los extractos de las diferentes matrices estudiadas.....	105
Figura 3-8: Cromatograma correspondiente a los extractos de las diferentes matrices estudiadas revelado con Luz UV 254 nm con pretratamiento.....	106
Figura 3-9: Cromatograma correspondiente a los extractos de las diferentes matrices estudiadas revelado con Luz UV 365 nm con pretratamiento.....	107

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Estrategias empleadas en el endurecimiento convencional de plantas propagadas <i>In vitro</i>	26
Tabla 1-2: Agroquímicos utilizados de manera rutinaria y preventiva durante el endurecimiento de plántulas producidas <i>In vitro</i>	27
Tabla 2-1: Metabolitos secundarios aislados de macromicetes con actividades biológicas potencialmente aprovechables en bio-endurecimiento.....	46
Tabla 2-2: Cantidad de plántulas sembradas para cada tratamiento.....	55
Tabla 2-3: Tasas de supervivencia de orquídeas empleando endurecimiento convencional y bio-endurecimiento.....	57
Tabla 2-4: Tiempo de colonización del sustrato (corteza de pino) por parte de los hongos evaluados.....	62
Tabla 3-1: Estructura de las principales fitohormonas.....	73
Tabla 3-2: Contenido de fitohormonas en Basidiomicetes (modificada de Türker, 2005).....	74
Tabla 3-3: Ejemplos de esteroides bioactivos aislados de basidiomicetes.....	78
Tabla 3-4: Estructuras de algunos β -glucanos aislados de macromicetes.....	82
Tabla 3-5: Compuestos constituyentes de la fracción grasa y sus fragmentaciones características en Espectrometría de Masas.....	94
Tabla 3-6: Absorbancia y concentración a 203 nm de las tres matrices evaluadas.....	110
Tabla 3-7: Absorbancia y concentración a 280 nm de las tres matrices evaluadas.....	111
Tabla 3-8: Comparación entre endurecimiento convencional, bio-endurecimiento reportado y bio-endurecimiento con macromycetes.....	114

Lista de Gráficas

Gráfica 2-1 Porcentaje de supervivencia de plántulas de orquídea sometidas a bio-endurecimiento mediado por macromicetes comparado al tratamiento control.....	56
Gráfica 3-1. Contenido (%) de los metabolitos de baja polaridad en cada uno de los hongos estudiados.....	93
Gráfica 3-2. Contenido de metabolitos secundarios de baja polaridad en las tres matrices analizadas.....	95
Gráfica 3-3. Curva de Calibración para Glucosa por el método de Dubois.....	99
Gráfica 3-4. Curva de Calibración para β -glucanos por el método de Nitschke modificado.....	100
Gráfica 3-5. Contenido de carbohidratos totales en las tres matrices.....	101
Gráfica 3-6. Contenido de β -glucanos en las tres matrices.....	101
Gráfica 3-7. Espectro UV del AIA (1 ppm en metanol) obtenido por barrido entre 200 y 380 nm.....	108
Gráfico 3-8. Espectro UV del AG ₃ (1 ppm en metanol) obtenido por barrido entre 200 y 380 nm.....	109
Gráfica 3-9. Curva de calibración de absorbancia a 203 nm con 4 concentraciones de patrón de AG ₃	109
Gráfica. 3-10. Curva de calibración de absorbancia a 280 nm con 4 concentraciones de patrón de AIA.....	110

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
AG ₃	Ácido Giberélico
AGs	Giberelinas
AIA	Ácido Indol Acético
AAS	Ácido Acetilsalicílico
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas
CO ₂	Dióxido de Carbono
DCM	Diclorometano
EPS	Exo-polisacáridos
HFM	Hongos formadores de micorrizas
HFMO	Hongo Formador de Micorriza Orquidoide
HMA	Hongo Formador de Micorriza Arbuscular
IPS	Intra-polisacáridos
LC	Laeliocattleya
MS	Medio Enriquecido formula Murashige Skoog
PDA	Medio Enriquecido Papa Dextrosa Agar
PS	Polisacáridos totales
Rf	Factor de retención
Sp	Especie
Spp	Especies
Tr	Tiempo de retención
Var	Variedad

1. CAPÍTULO 1: PROPAGACIÓN IN VITRO DE ORQUÍDEAS Y PROCESOS DE ENDURECIMIENTO

1.1 Resumen

Las plantas propagadas *In vitro* carecen de algunas de las capacidades fisiológicas requeridas para sobrevivir en entornos cambiantes propios de las condiciones naturales, siendo este el paso de mayor restricción en la técnica de multiplicación masiva de plantas. Con el fin de sortear dicho obstáculo se diseñó una etapa de aclimatación denominada endurecimiento durante la cual, las plántulas son sometidas a condiciones con leves cambios controlados, estimulando las habilidades fisiológicas requeridas por ellas para soportar las condiciones de campo. Este proceso contempla dos técnicas: Las convencionales basadas en el control de humedad, intensidad lumínica y empleo de agroquímicos, lo que genera costos importantes en los procesos y origina inconvenientes ambientales y las metodologías alternativas que son más ecoamigables, denominadas bio-endurecimiento, en las que se utilizan microorganismos benéficos (bacterias y hongos micromicetos formadores de micorrizas) para asistir el proceso de endurecimiento de las plantas.

En este capítulo se presenta una revisión que pretende dar un panorama general de lo reportado sobre el tema en los últimos 10 años, para con la apropiación de los conocimientos generales sobre el proceso de endurecimiento y el know-how sobre las características particulares de los macrohongos, como son facilidad de desarrollo, gran poder biodegradativo y biosíntesis de metabolitos secundarios con variedad estructural y de actividad biológica, presentar la posibilidad de introducir una alternativa novedosa utilizando una metodología pionera de inoculación con micromicetos comestibles, resaltando las ventajas que presentaría frente al empleo tanto de bio-endurecimiento con micromicetos formadores de micorrizas como de endurecimiento convencional.

1.2 Abstract

In vitro propagated plants lack some of the physiological capacities required to survive in changing environments typical under natural conditions, this being the step of greatest restriction of this technique of mass propagation of plants. In order to overcome this

obstacle, an acclimatization stage called hardening was designed during which the seedlings are subjected to conditions with slight controlled changes, stimulating the physiological abilities required by them to withstand the field conditions. This process contemplates two types of approaches: The conventional ones based on the control of humidity, light intensity and the use of agrochemicals, which generates important costs in the processes and originates environmental inconveniences and the alternative methodologies that are more eco-friendly, called bio-hardening, in which the relationships of plants and beneficial microorganisms (bacteria and mycorrhiza forming micromycetes fungi) are exploited to assist during the hardening process of the plants.

This chapter presents a review that aims to give an overview of what has been reported on this subject in the last 10 years, with the appropriation of general knowledge about the hardening process and the know-how about the particular characteristics of the macro-fungi, as well as their potential based on several advantages in relation with other bio-hardening microorganisms studied, their great biodegradative power and the broad biosynthesis of secondary metabolites with structural variety and biological activity, the above support the possibility of introducing a novel alternative using a pioneering methodology of inoculation with edible macromycetes, highlighting the advantages that it would present comparison to bio-hardening with mycorrhiza-forming micromycetes and also to conventional hardening protocols.

1.3 Introducción

En la actualidad la industria de la venta de plantas ornamentales es una de las más grandes en el mundo. Colombia es el segundo país exportador de flores, aportando alrededor de 130.000 empleos directos y generando el 7% del PIB nacional. La calidad del producto floral es tal que la empresa más grande a nivel mundial es colombiana. En el 2015 nuestro país exportó 1.295 millones de dólares en flores (Sociedades, 2016). Dentro del mercado internacional las plantas más vendidas son las orquídeas, generando solo en los Estados Unidos de América para el año 2014, un monto de casi 300.000 millones de dólares en plantas de materia y 2.200 millones de dólares en venta de flor cortada (Vilsack and Clark, 2010). En Colombia, las orquídeas son un producto valioso, haciendo que su explotación se realice a partir del empleo de bosques nativos como sitios de extracción de material

vegetal de origen para su posterior cultivo, amenazando con su extinción por la disminución de su hábitat natural (Calderón, Constantino and Farfán, 2006) problema que se puede solucionar mediante la propagación *In Vitro*.

La familia botánica Orquidácea es considerada como una de las más diversas del mundo y desde los tiempos monárquicos, estas plantas han sido consideradas como especímenes de lujo (Chadwick and Chadwick, 2006). Una de las características de ésta familia es la ausencia de reservas nutricionales para los embriones en las semillas (Darwin, 1877), lo que hace necesario para su desarrollo una simbiosis con hongos formadores de micorrizas (HFM), los cuales brindan energía y nutrientes al embrión hasta que él mismo es capaz de generar energía por medio de la fotosíntesis. Muchas orquídeas mantienen estas relaciones micorrícicas durante toda su vida (Sánchez de Prager, 2007).

Sin embargo, dicha interacción es muy específica en cuanto a hábitat y compatibilidad entre el huésped y el hospedero, en muchos casos puede requerir de grupos complejos de especies distintas en cada etapa de desarrollo de la planta (Bidartondo and Read, 2008), dificultando su aprovechamiento práctico en la germinación de semillas y producción masiva de orquídeas (Otero and Paul, 2009). En la actualidad, gracias al desarrollo de los medios enriquecidos con nutrientes y la tecnología de cultivo de tejidos *In vitro*, es posible aumentar la tasa de propagación a niveles sin precedentes y lograr el cruce direccionado e hibridación de las orquídeas (Knudson, 1922).

La propagación *In vitro* es la técnica por excelencia para la multiplicación masiva de plantas, incluyendo las orquídeas. Durante el desarrollo *In vitro* las condiciones ambientales son controladas y constantes por lo que las plantas provenientes de micro-propagación presentan una capacidad fotosintética reducida, un mal funcionamiento de los estomas, un sistema radicular alterado (sin o con menos pelos radiculares), un desarrollo pobre de la cutícula, una disminución considerable del potencial osmótico y bajas reservas de cera (Rasmia, 2015). Cuando el desarrollo *In Vitro* ha concluido y las plántulas son extraídas de los contenedores se enfrentan a cambios abruptos en su entorno, entrando a la fase *Ex vitro* lo que repercute en una baja tasa de supervivencia. Para su viabilidad en esta etapa del proceso productivo se requiere que dichas plántulas pasen por un periodo de adaptación denominado endurecimiento. Durante este proceso las plántulas

acondicionan su fisiología a los nuevos ambientes que imperan *Ex vitro* (variaciones de temperatura, luminosidad, humedad relativa y presencia de otros organismos depredadores y patógenos), condiciones que generan distorsiones en el desarrollo de las plantas.

De manera convencional este proceso requiere del uso de agro insumos del tipo fungicida, insecticida y bactericida, complementando el control de la humedad, temperatura y luminosidad (Deb and Imchen, 2010). El uso de agroquímicos durante la etapa de adaptación genera costos importantes en los procesos de producción masiva de plantas (Deb and Imchen, 2010) y origina inconvenientes ambientales debido a la contaminación producida por sus residuos (National Association of Professional Environmentalists, 2012). Si bien los agroquímicos previenen la infección de las plántulas por parte de patógenos y plagas, no resuelven el problema de susceptibilidad que afrontan las plantas al carecer de una fauna benéfica en su rizosfera (Sánchez de Prager, 2007)(Vasane and Kothari, 2006).

Con el fin de afrontar las dificultades concernientes al uso de agroquímicos durante el endurecimiento se han explorado metodologías alternativas para asistir a este proceso, aprovechando las relaciones benéficas entre los microorganismos y las plantas, originándose así una nueva técnica denominada bio-endurecimiento(Vasane and Kothari, 2006; Ordoñez, Otero and Diez, 2012) (Mosquera-espínosa *et al.*, 2013)(Verma, Yadav and Singh, 2011). De manera general, los estudios relacionados al bio-endurecimiento se han centrado en el uso de bacterias(Deb and Imchen, 2010) y hongos micromicetos (endófitos y formadores de micorrizas) (Ordoñez, Otero and Diez, 2012; Mosquera-espínosa *et al.*, 2013)(Das *et al.*, 2013), con buenos resultados(Müller *et al.*, 2013).

Con base en la fisiología de los hongos macromicetos y su excelente producción de metabolitos bioactivos(Türker *et al.*, 2005; Suárez, 2012; Chegwin-Angarita and Nieto-Ramírez, 2014), así como en los resultados arrojados por la investigación adelantada sobre la inducción de la germinación asimbiótica de especies pertenecientes a la familia Orquidaceae con extractos de origen fúngico, en donde se emplearon basidiomicetos (*Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*), la cual demostró un mejor desarrollo de la semillas con el empleo de los extractos en mención(Zaragoza, 2013), cabe inferir que ellos pueden presentar efectos similares en un proceso de bio-endurecimiento y posiblemente con algunas ventajas frente a los hongos micromicetos, lo que los posicionaría como

excelentes candidatos para la implementación de una técnica limpia de bio-endurecimiento, hipótesis que dio pie a la realización de la presente investigación que tiene como finalidad determinar el real potencial de los macromicetos como mediadores en procesos de bio-endurecimiento.

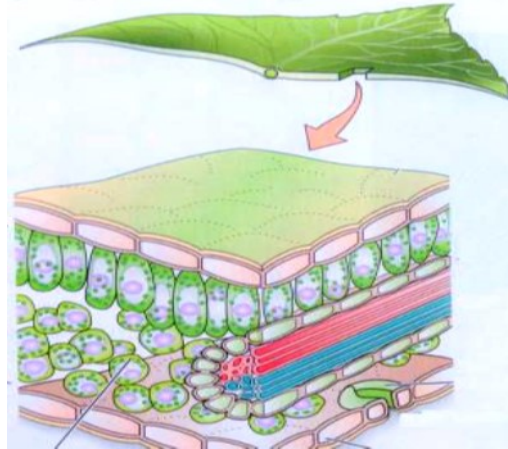
1.4 Antecedentes

1.4.1 Fisiología Vegetal y Propagación *In vitro*

La propagación *In vitro* es una herramienta empleada para la multiplicación masiva de plantas partiendo de un tejido o semilla en condiciones asépticas(Perea Dallos and Tirado Perea, 2011). Durante el periodo denominado *In vitro* las condiciones ambientales son controladas y constantes. Los niveles de humedad, disposición de nutrientes y luminosidad son mantenidos a niveles que favorecen el desarrollo de las plantas(Perea Dallos and Tirado Perea, 2011).

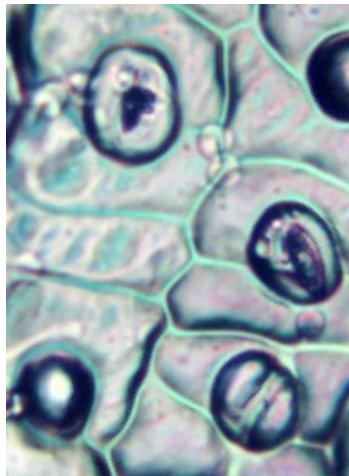
Debido a lo anterior, la mayoría de vitro-plantas carecen de la capacidad de controlar sus estomas(During and Harst, 1996), estructuras celulares responsables de regular el intercambio gaseoso de las plantas. Se ubican en el envés de las hojas y son unos poros microscópicos rodeados por dos células guardianas (Figuras 1-1 y 1-2).

Figura 1-1: Esquema de ubicación de estomas en las hojas (Taiz and Zeigar, 2006).



Tomado de: Taiz y Zeigar, 2006.

Figura 1-2: Micrografía de impronta de los estomas de vitro plantas.



Micrografía propia del autor.

La cutícula que recubre las hojas es prácticamente impermeable, de manera que los poros de los estomas son el único lugar por el cual puede ocurrir la transpiración (resultante del proceso de fotosíntesis). El agua es evacuada en forma de vapor y gracias a los fenómenos de cohesión y adición del agua, nueva agua es arrastrada por el tejido conductivo de la planta desde las raíces por toda la planta. Este mecanismo rige gran parte de la

distribución, no solo de agua a todo el tejido de la planta, sino también de los nutrientes, fitohormonas y otros metabolitos. Por estos mismos poros ingresa el CO₂ requerido por la planta y es liberado O₂ (resultante de la fotosíntesis). La tasa de consumo de CO₂ también regula la velocidad metabólica de la planta, la tasa fotosintética y en general el desarrollo de la planta (Taiz and Zeigar, 2006). Es evidente entonces la importancia que tiene para las plantas la regulación de la apertura y cerrado de estas estructuras, ya que de no poder cerrarlos la planta pierde humedad y se deshidrata rápidamente, de igual manera, si no los puede abrir la planta es incapaz de distribuir nutrientes por su tejido o de ingresar CO₂ (Tayz and Zeiger, 2006).

Con el fin de lograr corregir fisiológicamente el control de los estomas y disminuir las pérdidas de plántulas obtenidas *In vitro*, se desarrolló el periodo de transición denominado endurecimiento (Deb and Imchen, 2010).

El endurecimiento es la última fase de la propagación *In vitro*, consta de mantener las plántulas en condiciones controladas que cambian gradualmente para estimular cambios fisiológicos que les permitirán a las plántulas soportar las condiciones variables de campo.

1.5 Endurecimiento y tipos de endurecimiento

1.5.1 Métodos Convencionales de Endurecimiento

Tradicionalmente los procesos de endurecimiento se han enfocado en tratamientos físicos buscando corregir las deficiencias fisiológicas de las plántulas producidas *In vitro*. El control de la humedad relativa es una constante en todas las metodologías de endurecimiento y se logra usualmente por medio de regímenes de riego, cortos y continuos. Otra estrategia para remediar el problema de la deshidratación o complementaria del manejo hídrico es el uso de sustratos que retengan humedad (Perea Dallos and Tirado Perea, 2011; Müller *et al.*, 2013) (Deb and Imchen, 2010). Así mismo, las plántulas *In vitro* dependen del empleo de medios enriquecidos con carbohidratos como fuente de carbono, puesto que sus tasas

fotosintéticas son mínimas. El paso del estado de heterotrofia a autotrofia debe ser gradual, y generalmente puede ser conseguido regulando la intensidad lumínica (Vasane and Kothari, 2006) mediante el empleo de métodos físicos. La Tabla 1-1 recoge las estrategias más comúnmente empleadas en esta clase de endurecimiento.

Tabla 1-1: Estrategias empleadas en el endurecimiento convencional de plantas propagadas *In vitro*.

Tipo de Estrategia	Descripción	Referencia
Control de la humedad Relativa	Regímenes de riego cortos y continuos, utilizando micro aspersores o nebulizadores.	(Perea Dallos and Tirado Perea, 2011)
	Uso de confinamiento como túneles de endurecimiento, contenedores o compartimientos en el invernadero.	(Perea Dallos and Tirado Perea, 2011)
	Instalación de geomembranas o materiales retenedores de humedad en el suelo del invernadero y regando el suelo de este.	(Tayz and Zeiger, 2006)
Pre-endurecimiento <i>In vitro</i>	Disminución del contenido de azúcares en el medio de cultivo e incremento de la intensidad lumínica.	(Hartmann and Kester, 1989; Müller <i>et al.</i> , 2013)
	Aumento del intercambio gaseoso del contenedor <i>In vitro</i> utilizando filtros en las tapas de los frascos.	(Pacheco <i>et al.</i> , 2006)
Control de la retención de humedad en el sustrato	Empleo de sustratos de alta retención de agua como turba, musgo, jiffys o espumas agrícolas.	(Pacheco <i>et al.</i> , 2006; Perea Dallos and Tirado Perea, 2011)
Control de la intensidad lumínica	Instalación de poli sombras de distinto porcentaje de sombra en el techo del invernadero. Uso de plástico lechoso en el túnel de endurecimiento.	(Tayz and Zeiger, 2006)

Un aspecto de vital importancia en el endurecimiento y que se ha convertido en uno de los mayores problemas es el hecho de que las plántulas son extremadamente susceptibles a infecciones por hongos o bacterias. Esto es debido al manejo de altos niveles de humedad, a la carencia de organismos acompañantes y a la falta de “experiencia” en los mecanismos de respuesta de las plántulas (Deb and Imchen, 2010). En los métodos convencionales de

endurecimiento este inconveniente se trata de solucionar mediante la aplicación preventiva y rutinaria de agroquímicos (Hartmann and Kester, 1989; Fajardo *et al.*, 2007)(Tabla 1-2).

Tabla 1-2: Agroquímicos utilizados de manera rutinaria y preventiva durante el endurecimiento de plántulas producidas *In vitro*.

Ingrediente Activo	Nombres comerciales	Tipo de Patógeno
Sulfonato diazosónico de <i>p</i> -dimetilaminobenceno	Diazoben	<i>Phytophthora, Pythium</i>
Benzimidazol	Benomyl	<i>Rhizoctonia, Cylindrocladium, Fusarium</i>
Sulfato de y clorhidrato de oxitetraciclina	Cumbre	Bacterias
N-(triclorometiltio) ciclohex-4-eno-1,2-dicarboximida	Captan	<i>Rhizoctonia, Cylindrocladium, Fusarium</i>
Mancozeb	Dithane	Fungicida

Aunque las metodologías convencionales de endurecimiento reportan tasas de supervivencia satisfactorias (Vasane and Kothari, 2006; Deb and Imchen, 2010; Rasmia, 2015), presentan algunas desventajas como son: incremento en los costos de producción de plantas por el uso de agroquímicos (Deb and Imchen, 2010), incapacidad de solucionar el problema de susceptibilidad a plagas y enfermedades (Sánchez de Prager, 2007), posibles casos de fito-toxicidad y amenazas contra el medio ambiente y riesgos para la salud de los trabajadores (Hartmann and Kester, 1989; Tayz and Zeiger, 2006; Gepp and Mondino, 2011).

1.5.2 Métodos de bio – endurecimiento

Los métodos de bio–endurecimiento buscan aprovechar las interacciones benéficas que ocurren entre las plantas y otros organismos en la naturaleza (Latif *et al.*, 2015), con fines productivos. Existen múltiples experiencias exitosas en las que se han utilizado microorganismos en los procesos de endurecimiento de plántulas producidas *In vitro* (Vasane and Kothari, 2006; Ordoñez, Otero and Diez, 2012; Mosquera-espinoza *et al.*, 2013) (Das *et al.*, 2013; Mosquera-espinoza *et al.*, 2013; Müller *et al.*, 2013).

De manera general, los estudios de bio-endurecimiento se han enfocado en el aprovechamiento de bacterias (Galdiano Junior *et al.*, 2011), hongos micromicetos formadores de micorrizas (Pérez, 2011) y hongos endófitos (Ordoñez, Otero and Diez, 2012; Das *et al.*, 2013).

1.5.3 Métodos de bio – endurecimiento

Las bacterias promotoras del crecimiento de plantas son bacterias capaces de colonizar la rizosfera y estimular el crecimiento de las plantas por medio de una gran variedad de mecanismos como: mineralización de materia orgánica, control biológico de organismos patógenos, fijación de nitrógeno atmosférico, solubilización de fósforo y promoción del desarrollo radicular por la secreción de reguladores de crecimiento de plantas (Pii *et al.*, 2015).

Existen casos en los que se ha utilizado bacterias como inoculante durante la propagación *In vitro*, un ejemplo de esto ha sido el uso de *Pseudomonas spp.*, benéficas para biotizar los cultivos *In vitro* de papa y tomate. Esta metodología demostró que las plántulas biotizadas con estas bacterias presentaron cambios en su desarrollo frente a las plantas control (sin biotización) dichos cambios se expresaron en su sistema radicular principalmente, el cual fue mayor y más ramificado en las plántulas biotizadas. De igual manera se reporta que dichos cambios permiten una mejor captación de agua por la planta y un aumento de resistencia a niveles bajos de

patógenos. Adicionalmente se encontró que las bacterias utilizadas en dicho estudio exhibieron un grado de especificidad en cuanto al entorno y las condiciones requeridas para su desarrollo. (Nowak, 1998).

Para el caso específico de orquídeas también se ha explorado el uso de bacterias aisladas de la raíz de la especie *Cattleya walkeriana* para utilizarlas durante los procesos de endurecimiento de plántulas propagadas *In vitro*. En ese estudio las plántulas fueron sumergidas en cultivos líquidos de las 26 bacterias distintas que fueron evaluadas durante 30 minutos inmediatamente después de ser extraídas de los recipientes *In vitro*. De la totalidad de las bacterias evaluadas 2 mostraron tener el mayor potencial para mediar procesos de bio-endurecimiento, obteniéndose tasas de supervivencia entre 75 y 80%. No obstante, también se indica que el número y las especies de bacterias aisladas en distintos momentos de la misma planta variaba, lo que plantea que los consorcios de bacterias tienen una compleja interacción con su hospedero y las condiciones ambientales en las que se encuentran. De igual manera esta metodología fue probada solo con la especie de la cual se aislaron las bacterias, lo que podría resultar en un proceso de naturaleza específica. Así mismo, los autores determinaron que aunque las dos bacterias de mayor potencial (*Bacillus sp.* y *Enterobacter sp.*) incrementaron el desarrollo y viabilidad de las plántulas inoculadas, también acrecentaron en algunos casos la colonización por parte de otros microorganismos fitopatógenos, lo que presenta retos al momento de emplear esta técnica en estos procesos a un nivel comercial (Galdiano Junior *et al.*, 2011).

Otras investigaciones en las que se han utilizado bacterias en procesos similares a los anteriores coinciden con las afirmaciones propuestas, lo que plantea el potencial que presentan las bacterias benéficas, pero de igual manera exponen algunas de las dificultades que puede presentar este tipo de protocolos debido a la alta especificidad que pueden presentar estos organismos y sus complejas e íntimas relaciones con el hospedero y demás microorganismos acompañantes, además de las variaciones que presentan debido a condiciones ambientales (Nowak, 1998; Deb and Imchen, 2010).

1.5.4 Bio-endurecimiento mediante empleo de hongos micromicetes formadores de micorrizas

En cuanto a los hongos formadores de micorrizas (HFM) estos son especies de hongos capaces de formar una relación simbiótica con las raíces de las plantas. Esta simbiosis puede ocurrir de 2 maneras distintas dando origen a las denominadas endomicorrizas y ectomicorrizas. También puede ocurrir el caso dual, el cual se denomina ectendomicorrizas (Sánchez de Prager, 2007). Las endomicorrizas hacen relación a aquellas en que el mico simbionte penetra al interior de las células corticales de la plantas y constituyen el caso más abundante en la naturaleza y es el tipo de micorriza que se da particularmente en las orquídeas (Sánchez de Prager, 2007). Esta es también la clase de micorriza más común entre especies de árboles y hongos micromicetes, las cuales son conocidas como micorrizas arbusculares. Las ectomicorrizas son relaciones en las que el mico simbionte puede crecer en espacios entre las células y alrededor de ellas pero sin penetrar dentro de la célula (Sánchez de Prager, 2007).

Se estima que el 90% de las plantas presentan asociaciones micorrícicas y gracias a los avances en estudios genómicos y transcriptómicos se han identificado un gran número de simbiontes. Basado en el conocimiento anterior, ha sido posible determinar que los HFM abarcan un amplio espectro taxonómico y trófico, albergando hongos saprofitos, mutualistas que pueden desarrollarse en diversos sustratos. Los micosimbiontes son capaces de influenciar la nutrición de las plantas, la absorción de agua, el crecimiento y la resistencia de las mismas a enfermedades. Paralelamente las plantas hospederas son indispensables para el crecimiento y desarrollo de los HFM (Bonfante and Genre, 2010).

La distribución geográfica de las micorrizas es igualmente amplia, presentándose desde zonas boreales, bosques tropicales, sabanas y hasta cultivos antrópicos (Bonfante and Genre, 2010).

Las redes de hifas de diversos micosimbiontes pueden estar relacionadas con raíces de distintos individuos de plantas y en algunas ocasiones de varias especies simultáneamente, haciendo honor al nombre otorgado por algunos, es a saber,

“internet del bosque” o “Wood-wide web”(Bonfante and Genre, 2010). Para el caso de las orquídeas, las micorrizas que forman con hongos se denominan micorrizas orquídioides, en donde el micosimbionte coloniza al interior de las células corticales de las raíces de las orquídeas y forma pelotones dentro de los mismos (Figura 1-3).

Figura 1-3: Micrografía del corte transversal de una raíz de orquídea.



Izquierda: Corte transversal raíz de LC. Irene Finney (10x). **Derecha:** Célula cortical de la raíz de la orquídea con pelotón orquídiode (100x).

Micrografía propia del autor.

El aprovechamiento de hongos formadores de micorrizas se ha utilizado en la aclimatación de plántulas propagadas *In vitro*, especialmente para el caso de plantas ornamentales(Guar and Adholeya, 1999). La inoculación con micorrizas arbusculares (MA) a plántulas ornamentales durante procesos de bio-endurecimiento han demostrado optimizar la captación por parte de las plantas de nutrientes como fosforo y zinc, disminuir afectación por enfermedades, aumentar tolerancia a estrés hídrico y reducir la mortalidad de plántulas(Guar and Adholeya, 1999). Es así, como para el caso de plántulas de *Syngonium Sp.* y *Draceana Sp.* la inoculación con MA durante periodos de endurecimiento aumentó la supervivencia y disminuyó la necesidad de aplicaciones de fertilizantes, especialmente cuando la inoculación se llevaba a cabo al inicio del endurecimiento, aunque mostrando efectos diferenciales entre las dos

especies, sugiriendo la existencia de cierto grado de especificidad en la técnica (Guar and Adholeya, 1999).

Para el caso específico de orquídeas, las HFM se han utilizado en procesos de germinación simbiótica de semillas, especialmente para el caso de orquídeas terrestres, las cuales requieren tratamientos complejos durante su germinación *In vitro*. Aunque la germinación fue exitosa, la especificidad de nicho y micosimbionte para la formación de las micorrizas fue claramente demandante y variable entre especies (Rasmussen *et al.*, 2015). Tal es el caso de los estudios efectuados con orquídeas del género *Cymbidium* los que demostraron una optimización en la germinación por medio de inoculación con hongos endófitos y formadores de micorrizas aislados de las mismas plantas, sin embargo, requiriendo medios de cultivo complejos para los mico-simbiontes. Las plántulas germinadas simbióticamente demostraron tener desarrollos superiores a las producidas convencionalmente por germinación asimbiótica, generando efectos benéficos durante la aclimatación de las plántulas, en el mismo estudio se mencionó que los mico-simbiontes aislados variaban no solo entre especies, sino también de acuerdo a la temporada en la cual se aislaron y al estado de desarrollo de las plantas utilizadas para el aislamiento. En general los hongos aislados se identificaron, mediante el empleo de técnicas moleculares, como anamorfos pertenecientes al género *Rhizoctonia* (Aggarwal *et al.*, 2012).

Igualmente, Hossain y colaboradores reportaron en 2013 que el uso de HFM aislados de raíces de orquídeas para el endurecimiento de plántulas de orquídeas del género *Cymbidium* provenientes de semillas germinadas asimbióticamente *In vitro* proporcionaba tasas de supervivencia mayores que las tratadas con protocolos de endurecimiento convencional. Los hongos fueron identificados también como pertenecientes al género *Rhizoctonia* y de igual manera fue necesario el uso de técnicas moleculares para su identificación (Hossain *et al.*, 2013).

Debido a que las raíces de orquídeas son colonizadas, no solo por HFM, sino también por bacterias benéficas y en algunos casos microalgas, sumado al hecho de poseer también hongos endófitos, algunos investigadores han evaluado el uso de consorcios de HFM y bacterias durante la germinación de las semillas, produciendo plántulas más robustas con

mayores tasas de supervivencia que las producidas convencionalmente (Teixeira da Silva *et al.*, 2015).

1.5.5 Bio-endurecimiento mediado por hongos endófitos

En lo concerniente a los hongos endófitos estos son especies de hongos que colonizan el tejido interno de las plantas, por medio de interacciones cuya gran mayoría son del tipo mutualista y resultado de una coevolución ocurrida entre la planta y el hongo. Estos hongos pueden inhibir los controles de defensa de la planta produciendo fitohormonas y otros metabolitos. Estos organismos se agrupan en dos conjuntos, los endófitos obligados que solo pueden alimentarse a partir de células vegetales vivas, y los endófitos facultativos, que pueden alimentarse de tejido muerto así como de células vegetales vivas (Hallmann and Sikora, 2011). Aquellos asociados a las raíces tienen, entre otros posibles beneficios la defensa contra patógenos y un aumento en la disponibilidad de nutrientes. La efectividad de estos hongos sobre la protección de plantas o la estimulación en el crecimiento contribuye a la generación de herramientas para el uso de bio-inoculantes.

De esta forma se reduce el uso de insumos químicos y se promueven prácticas amigables con el ambiente. Ejemplo de esto es el trabajo realizado con orquídeas del género *Vanilla* en estado silvestre (Ordoñez, Otero and Diez, 2012), en donde se aislaron hongos endófitos de las raíces de las orquídeas del género mencionado, con el fin de determinar su efecto sobre el crecimiento de plantas de *V. planifolia* cuando se inocularon en el sustrato, encontrando que la inoculación de organismos de este grupo pueden no sólo favorecer a la planta en la disponibilidad de nutrientes en el sustrato sino también en la secreción de enzimas o metabolitos secundario que puedan evitar o biocontrolar patógenos. Si bien no se han empleado estos organismos en bio-endurecimiento de plantas se visualiza el potencial que ellos presentan para esta clase de procesos.

Existen reportes del aprovechamiento de hongos posiblemente endófitos, como es el caso de *Piriformosa indica*, el cual ha sido utilizado como inoculante del sustrato durante el periodo de endurecimiento de vitro plantas de tabaco. En este caso aún no hay claridad si este hongo es un hongo endófito o un hongo formador de micorriza, de cualquier manera el tratamiento con el

inoculo obtuvo tasas entre el 88 y el 94%, sin embargo las condiciones de endurecimiento fueron complejas (sustratos con tratamientos complejos y cámara nebulizadora) y algunas de las condiciones utilizadas no fueron constantes en los distintos tratamientos (bolsas plásticas a algunas plantas y a otras no)(Sahay and Varma, 1999).

Lo anterior pone de manifiesto el gran potencial que tiene emular las interacciones benéficas que presentan las plantas en sus entornos naturales, y específicamente para el caso de las orquídeas, sin embargo, las investigaciones mencionadas evidencian que dichas interacciones son complejas y específicas, lo que lleva a pensar que escalar dichos procesos a nivel de producción comercial presenta grandes retos e inversiones importantes en investigación para cada caso, lo que podría hacerse más eficiente con procesos más generalistas

Aunque el uso de micromicetos en bio-endurecimiento ha permitido el mejoramiento en las tasas de supervivencia, vigor de las plantas y otros atributos(Kaur, Anand and Goyal, 2011; Das *et al.*, 2013), estos organismos presentan algunas desventajas como son la baja facilidad de acceso comercial a cepas, la dificultad de identificación taxonómica por métodos no moleculares(Pryce *et al.*, 2003), la especificidad de hábitat e interacción huésped - hospedero(Sánchez de Prager, 2007), una alta producción de micotoxinas(Nelson, Desjardins and Plattner, 1993) y el alto número de este tipo de hongos reportados como patógenos de plantas (Nelson, Desjardins and Plattner, 1993; Mosquera-espinoza *et al.*, 2013).

Son estos inconvenientes, junto con la ausencia de estudios sobre bio-endurecimiento mediado por hongos micromicetos, lo que direcciona la investigación a explorar el potencial de los macrohongos en este tipo de procesos, máxime cuando es bien conocido que ellos, mediante la producción y excreción de sus metabolitos bioactivos y/o posible formación de ectomicorrizas, pueden aportar a las plántulas los mismos beneficios y posiblemente más que los proporcionados por los organismos hasta este punto estudiados.

2. CAPÍTULO 2: DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LAS PLÁNTULAS DE ORQUÍDEA SOMETIDAS AL BIO- ENDURECIMIENTO CON MACROMICETES

2.1 Resumen

Con la finalidad de evitar la pérdida de plántulas durante la fase *Ex vitro* en el proceso de micropropagación en la industria de comercialización de orquídeas se emplea el denominado proceso de bio-endurecimiento, que se realiza empleando hongos micromicetos formadores de micorrizas, los que presentan como inconvenientes la especificidad y la presencia de micotoxinas. En la investigación presentada en este capítulo, pionera en su clase, se exploró el potencial como mediadores en bio-endurecimiento de los hongos macromicetos *Pleurotus ostreatus* Var. *Columbinus*, *Pleurotus citrinopileatus*, *Lentínula edodes*, *Laetiporus sulphureus* y *Agaricus bisporus*, encontrándose como resultado que los porcentajes de supervivencia de las orquídeas en co-cultivo con estos hongos fueron superiores o iguales a las reportadas hasta el presente, tanto para técnicas convencionales como de bio-endurecimiento, lo que posiciona a estos organismos como excelentes mediadores en el bio-proceso, destacándose el *Pleurotus ostreatus* Var. *Columbinus*. Así mismo, el empleo de los macromicetos trae el valor agregado de que no se requiere de un tratamiento previo especializado, ni del empleo de sustratos no sostenibles, ni de la aplicación de fungicidas, ya que las plántulas no presentaron síntomas de desecación, de desarrollo lento, o de incidencia de plagas y enfermedades. Adicionalmente, presentan la ventaja frente a los micromicetos formadores de micorrizas de que el efecto parece ser general sobre las orquídeas. Lo alcanzado con la investigación realizada proporciona las bases para el futuro desarrollo de una tecnología limpia para esta clase de procesos y pone de manifiesto una nueva y desconocida acción de los macrohongos.

2.2 Abstract

In order to mitigate the loss of seedlings of micropropagated orchids during the *Ex vitro* phase for the orchid industry, an alternative approach of hardening named bio-hardening is used, which is carried out benefiting from mycorrhizal micromycete fungi. This techniques have proven to be useful but present some disadvantages like specificity and the production of mycotoxins. In this chapter the research presented proposes an alternative, pioneer in its class, the potential of macromicetes fungi (*Pleurotus ostreatus* Var. *Columbinus*, *Pleurotus citrinopileatus*, *Lentinula edodes*, *Laetiporus sulphureus* and *Agaricus bisporus*) was explored as mediators in bio-hardening of vitro plants, finding as a result that the survival rates of orchids in co-culture with these fungi were greater than or equal to those reported to date, both for conventional and bio-based techniques. The above presents these organisms as excellent mediators in the bio-hardening process, highlighting the species *Pleurotus ostreatus* Var. *Columbinus*. Likewise, the use of macromicetes brings the added value of not requiring a specialized prior treatment, or the use of unsustainable substrates, or the application of fungicides or other biocides, since the seedlings did not show symptoms of drying, slow development, or incidence of pests and diseases.

Additionally, they macro fungi have the advantage over mycorrhizal micromycetes that the benefits seem to be general for the evaluated orchids. What has been achieved with the research carried out provides the basis for the future development of a clean technology for this kind of processes and reveals a new and unknown action for macro-fungi.

2.3 Introducción

En las últimas décadas, la micropropagación ha sido una poderosa herramienta para la reproducción y propagación de plantas hortícolas, especialmente plantas ornamentales. Esta técnica aumenta la escala y la velocidad de producción y da un producto más saludable (Guar and Adholeya, 1999). La micropropagación consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado. El

cultivo es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada. Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencial que tienen las células vegetales; es decir la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a los estímulos adecuados. Así, las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posea y al estímulo que reciban (Olmos, Luciani and Galeano, 2010).

Dependiendo de las características de la planta que se pretenda propagar y del objetivo perseguido, la micropropagación puede realizarse a través de tres vías de regeneración: brotación de yemas adventicias preexistentes, producción de yemas de novo y embriogénesis somática. La micropropagación presenta cuatro etapas principales: 1) establecimiento del cultivo, 2) desarrollo y multiplicación de vástagos o embriones, 3) enraizamiento y 4) aclimatación de las plántulas. Generalmente, las etapas de enraizamiento y aclimatación pueden combinarse en condiciones *Ex vitro*. En el caso de la embriogénesis somática, el enraizamiento es reemplazado por una etapa de maduración y germinación de los embriones para la diferenciación de los ápices caulinar y radicular (Olmos, Luciani and Galeano, 2010).

Sin embargo, son varios los problemas que limitan su uso generalizado, siendo el más crítico la transferencia de plántulas *In vitro* a *Ex vitro*, debido a los altos grados de mortalidad (entre 50 y 90%), como consecuencia de una cutícula poco desarrollada, estomas no funcionales y un sistema radical débil que facilita la deshidratación por estrés hídrico (Chandra *et al.*, 2010). Como bien se indicó con anterioridad para solucionarlo se implementaron las técnicas de endurecimiento convencional y de bio-endurecimiento de las plántulas, siendo este último el más ecoamigable. Así mismo, de manera general, los estudios de bio-endurecimiento se han enfocado en el aprovechamiento de hongos micromicetos formadores de micorrizas y hongos endófitos.

El carácter heterótrofo de los hongos les condiciona a obtener su fuente de carbono a partir de otros organismos. Los hongos micorrícicos reciben directamente de las plantas los azúcares que precisan para desarrollarse y a cambio captan del suelo y ceden a sus

hospedantes vegetales los nutrientes minerales y el agua que éstos necesitan para crecer. Básicamente, en ello consiste la simbiosis micorrícica. En todos los tipos de micorrizas, se establece una interfase de contacto íntimo entre hifas y células vegetales, donde se produce el intercambio de nutrientes de manera bidireccional (los nutrientes minerales son transvasados disueltos en agua desde el hongo a la planta, mientras ésta cede al hongo los azúcares procedentes de su actividad fotosintética) o unidireccional, como es el caso de las orquídeas, en donde no hay un mutualismo trófico aparente en sentido estricto, aunque sí una simbiosis (“vivir conjuntamente dos o más organismos”), en la que al menos uno de los partícipes resulta beneficiado.

Si bien es conocido que al inocular las plantas micropropagadas con hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA), se logra alcanzar un crecimiento óptimo (Guillemin, Gianinazzi and Trouvelot, 1992) lo que ha permitido en la actualidad integrar ambas biotecnologías, la micropropagación *In vitro* y el uso de la inoculación micorrícica para la mejor producción de plantas, lo es también el hecho de que un aspecto muy importante es la selección de las mejores cepas del hongo para un eficiente desarrollo micorrícico en plantas micropropagadas (Roveda *et al.*, 2007). En el caso particular de las orquídeas éstas requieren una especificidad muy grande en cuanto a los Hongos formadores de micorriza orquidioide (HFMO), lo que significa grandes retos para escalar dichos procesos a niveles comerciales.

Aunque las micorrizas de las orquídeas corresponden a endomicorrizas, cabe la posibilidad de que algunos hongos septados, principalmente Basidiomicetes, cuyo hábito alimenticio es fundamentalmente saprofítico, consoliden un mutualismo ectomicorrícico (Honrubia, 2009). Este hecho permitiría su mediación en el bio-endurecimiento de las plántulas de orquídeas o como se infiere en la presente investigación, por la excreción al sustrato de sus metabolitos secundarios con bioacciones ya comprobadas, lo que hasta el presente no se ha explorado y por ende se desconoce el potencial real de su empleo en esta clase de procesos. En búsqueda de una respuesta a la interrogante planteada se desarrolló esta parte de la investigación en donde se estudió la viabilidad de las plántulas de orquídeas al ser sometidas a bio-endurecimiento con macromicetes.

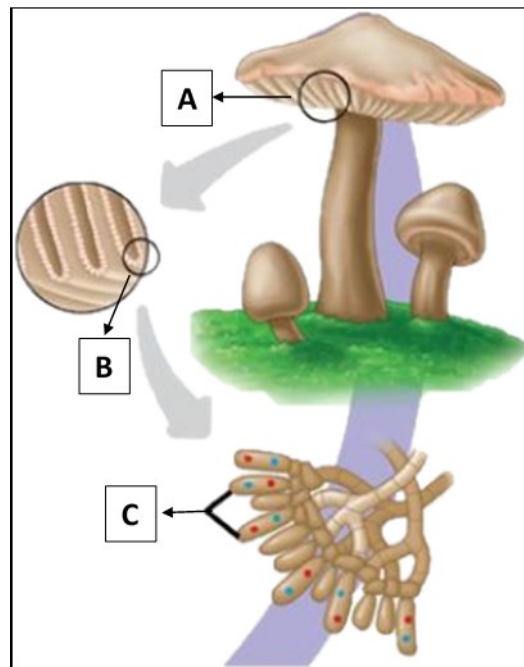
2.4 Antecedentes

Los hongos son uno de los grupos más fascinantes en todo el mundo. Más de 70.000 especies de hongos se han descrito en la actualidad, y se ha estimado conservadoramente que existen 1,5 millones de especies en la tierra. Los hongos han desempeñado siempre papeles importantes en la vida humana como alimento o medicina y constituyen un componente primordial en la estructura y función de todos los ecosistemas conocidos del planeta, principalmente en el reciclaje de nutrientes. Son organismos heterotróficos, y por consiguiente tienen que usar fuentes de energía extracelulares para su mantenimiento, crecimiento y reproducción. Por lo tanto, tienen por lo menos tres caminos diferentes, no excluyentes, para adquirir sus fuentes de energía (a partir de plantas, animales u otros microorganismos), como compuestos de carbono, siendo por lo tanto (i) saprotrofos (ii) parasitarios, o (iii) mutualistas (Pérez-Moreno and Martín-Reyes, 2014).

2.4.1 Generalidades de los hongos macromicetos

Los hongos denominados macromicetos forman una estructura fructífera denominada carpóforo y este es observable a simple vista, son organismos heterótrofos conformados por filamentos miceliales denominados hifas (Figura 2-1) (Miles and Chang, 2004).

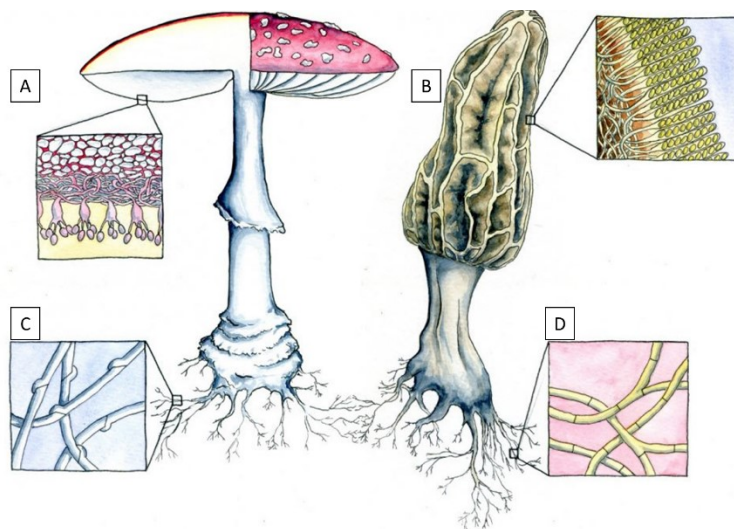
Figura 2-1: Diagrama de hongos macormicetes.



A) Basidiocarpo. **B)** Himenoforo y lamelas. **C)** Micelio que conforma todo el cuerpo del hongo incluido el basidiocarpo.

Tomado y modificado de iwate-kokyo.info.

En términos taxonómicos los macormicetes están distribuidos dentro de las divisiones Ascomicota y Basidiomycota. Algunos de los ascomicetes pueden presentar cuerpo fructífero, en contraste con los basidiomicetes que siempre lo presentan, siendo estos de gran variedad de formas y tamaño (Figura 2-2) (Miles and Chang, 2004).

Figura 2-2: Características morfológicas de Ascomycota y Basidiomycota

A y C: Basidiomycota, **B y D:** Ascomycota.

Tomado de: <http://xylaria.net/2016/09/30/basidiomycetes-and-ascomycetes/>

Los macrohongos pueden agruparse también de acuerdo con el tipo de interacción que puedan tener con los seres humanos. Es así, como aquellos que contienen sustancias tóxicas para los humanos son denominados hongos venenosos, mientras aquellos que no las presentan y que son aprovechados como alimento por los seres humanos, brindando una serie de beneficios nutricionales, son llamados hongos comestibles. Dentro de esta última categoría se encuentran también los hongos medicinales, acompañados por otros que no son comestibles per se, los cuales biosintetizan una serie de metabolitos que presentan actividades biológicas benéficas para la salud de los seres vivos y actúan como antitumorales, inmunoestimulantes, antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, citostáticos y reguladores del crecimiento (Brizuela, García and Pérez, 1998)

Uno de los primeros hongos cultivado por la humanidad, alrededor de 600 años d. C. fue la especie *Auricularia auricula* en China, seguido por *Flammulina velupites* 200 años después y *Lentinula edodes* 1000 años d. C. En 1600 se realizó el primer cultivo sobre un sustrato sólido de *Agaricus bisporus* en Francia, convirtiéndose el champiñón en el hongo comestible más producido en el mundo actualmente (Miles and Chang, 2004).

Es menester en este punto presentar algunas generalidades de los macro hongos utilizados en este estudio con el fin de contextualizar al lector.

2.4.2 Generalidades sobre los basidiomicetes estudiados en la presente investigación

Pleurotus ostreatus Var. Columbinus

Este hongo forma parte del filo Basidiomycota y del orden Agaricales. El género *Pleurotus* es uno de los géneros más cultivados comercialmente y en general sus especies son comestibles. Las especies pertenecientes a este género son descomponedores de madera y han sido estudiados tanto por su potencial nutraceutico (Suárez Arango and Nieto, 2013) como por su aplicación en la bio-remediación (Stamets, 2005) debido a su versatilidad al momento de crecer en distintos sustratos, gracias a los complejos enzimáticos que poseen. Se han descrito más de 70 especies para este género, aunque la descripción de especies es complicada y requiere usualmente de la secuenciación de ADN (Kong, 2004). Este género se encuentra distribuido en todos los continentes por lo que se le considera cosmopolita. El estudio químico de sus metabolitos ha puesto de manifiesto la producción de compuestos que exhiben importantes actividades biológicas entre los que se encuentran polisacáridos (Suárez Arango and Nieto, 2013), triterpenoides (Chegwin-Angarita and Nieto-Ramírez, 2014) y fito hormonas (Türker *et al.*, 2005).

Lentinula edodes

Este hongo es conocido como el hongo fragante, su consumo es alto en países orientales. Su cultivo comercial también es importante globalmente. Pertenece al filo Basidiomycota y al orden Agaricales y es uno de los que mayor diversidad de actividades biológicas presenta por lo que se ha estudiado extensivamente en cuanto a la producción de sus metabolitos secundarios (Suárez, 2010), (Suárez Arango and Nieto, 2013). También es degradador de lignina y es utilizado principalmente para consumo de los carpóforos y la producción de nutraceuticos a partir de su micelio (Stamets, 2005).

Laetiporus sulphureus

Esta seta recibe el nombre vulgar de Gallina de monte (*Chicken of the Woods*), debido a que el sabor de sus carpóforos al ser cocinados asemeja al de la carne de pollo. Es colectado en bosques de norte América para consumir su cuerpo fructífero sésil y de color azufrado. Pertenece al filo Basidiomycota y forma parte del orden de los Poliporales. Este orden es fácilmente identificado por que carece de lamelas, posee poros y es de crecimiento sésil. Aunque es un hongo saprofito degradador de lignina también ha sido reportado como patógeno de algunos árboles pertenecientes al género *Quercus* (Banik, Burdsall and Volk, 1998).

Los estudios efectuados sobre este hongo han demostrado que también es poseedor de una gran cantidad de metabolitos secundarios con importante actividad biológica (Petrovic *et al.*, 2013). Su cultivo comercial no es tan común como los dos anteriores, pero presenta un gran potencial.

Agaricus bisporus

Es un hongo Basidiomycota conocido comúnmente como champiñón es el más ampliamente cultivado y consumido en el mundo. Su cultivo se realiza sobre material compostado (descomponedor secundario) requiriendo temperaturas entre 14 y 18 °C para una fructificación ideal (Marshall and Nair, 2009). Aunque este hongo es más conocido por su empleo en gastronomía es también productor de metabolitos con actividades biológicas relevantes entre las que se encuentran actividad antifúngica (Mehrparvara, M. Mohammadi *et al.*, 2016), antioxidante (Liu *et al.*, 2013) e hipoglicemiante (Mao, Mao and Meng, 2013).

Pleurotus citrinopileatus

Es una seta comestible perteneciente al género *Pleurotus*, que se caracteriza por su pelis amarillo cítrico. Es conocido también por el nombre de hongo ostra dorado. Una media docena de estudios recientes se han centrado en su cultivo con la finalidad de aprovechar sus numerosas actividades biológicas como son la actividad inhibitoria de la bio-síntesis de melanina, la actividad antioxidante y antibacteriana (Meng *et al.*, 2012). Dentro de sus metabolitos los más estudiados son los polisacáridos los cuales exhiben actividad biológica

comprobada y reportada con aplicaciones en distintas áreas de la medicina (Khan and Tania, 2012).

2.4.3 Hongos macromicetes y bio-endurecimiento

Si bien hasta el presente no existen reportes del uso de hongos macromicetes en procesos de bio-endurecimiento, lo expuesto anteriormente sobre este proceso permite ver claramente que los aspectos que se buscan remediar son control de humedad, defensa frente a microorganismos patógenos y aporte de nutrientes. Con base en ello y conociendo la producción por parte de los macrohongos de un gran número de metabolitos secundarios con acciones biológicas reconocidas como son sustancias reguladoras de crecimiento de plantas (Özcan, 2001; Türker *et al.*, 2005; Ünyayar, Topcuoglu and Bozcuk, 2016), triterpenoides (Suárez Arango and Nieto, 2013) , polisacáridos (Suárez, 2012) y en general compuestos benéficos en el desarrollo de plantas (Valentino and Galvez, 2015), es fácil inferir que pueden presentar un gran potencial para su empleo en bio-endurecimiento (Tabla 2-1).

Tabla 2-1: Metabolitos secundarios aislados de macromicetos con actividades biológicas potencialmente aprovechables en bio-endurecimiento.

HONGO	METABOLITO	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIA
<i>Ganoderma sp.</i>	Triterpenos ganodéricos. Triterpenoides tipo Ergosta y Lanosta	Immunomoduladora Antimicrobiana	(Xia <i>et al.</i> , 2014)
<i>Boletus impolitus</i>	Giberilinas	Fitohormonal	(Türker <i>et al.</i> , 2005)
<i>Suillus granulatus</i>	Giberilinas	Fitohormonal	(Türker <i>et al.</i> , 2005)
<i>Fomitopsis sp.</i>	Triterpenoides tipo Lanosta	Antimicrobiana	(Popova <i>et al.</i> , 2009a)
<i>Coprinus atramentarius</i>	Giberilinas	Fitohormonal	(N. Zaragoza, 2013)
<i>Laetiporus sulphureus</i>	Triterpenoides tipo Lanosta	Antimicrobiana Antiviral Inmunomoduladora	(Ríos <i>et al.</i> , 2012)
<i>Cortinarius Fr. sp.</i>	Giberilinas	Fitohormonal	(N. Zaragoza, 2013)
<i>Lentinus tigrinus</i>	Giberilinas y Absciscic acid (ABA)	Fitohormonal	(Özcan, 2001)
<i>Inonotus obliquus</i>	Triterpenoides tipo Lanosta	Antitumoral Antimicrobiana Antioxidante	(Ríos <i>et al.</i> , 2012)
<i>Gibberella fujikuroi</i>	Giberilinas	Fitohormonal	(Türker <i>et al.</i> , 2005)
<i>Phellinus pini</i>	Vinilfenoles	Antimicrobiana	(Popova <i>et al.</i> , 2009a)
<i>Pleurotus florida</i>	Absciscic acid (ABA)	Fitohormonal	(Ünyayar, Topcuoglu and Bozcuk, 2016)
<i>Pleurotus Ostreatus</i>	Giberilinas	Fitohormonal	(Türker <i>et al.</i> , 2005)
<i>Lentinula edodes</i>	Polisacáridos	Inmunoestimuladora	(Gründemann <i>et al.</i> , 2015)

2.4.4 Ventajas adicionales de los macromicetes en bio-endurecimiento

Macromicetes toxicidad y asequibilidad

Como bien se indicó con anterioridad, uno de los inconvenientes en los procesos generales de bio-endurecimiento mediante micromicetes es la fito-toxicidad (Nelson, Desjardins and Plattner, 1993)(Romberg, 2016), problema que podría obviarse a través de la selección de hongos macromicetes comestibles, los cuales no producen micotoxinas, trayendo como resultado obvio que el riesgo de generar fito-toxicidad es nulo, convirtiéndose esta característica en una ventaja frente al empleo de los micromicetes.

Aunado a lo anterior y debido a que han sido aprovechados desde tiempos milenarios por el hombre, tanto en la alimentación como en la etnomedicina (Grienke, Peintner and Rollinger, 2014), los hongos macromicetes comestibles se han estudiado extensamente en cuanto a su cultivo tradicional y biotecnológico(Suárez, 2012; Suárez Arango and Nieto, 2013), lo que ha permitido no sólo un acceso más sencillo a cepas de estas especies en contraste con las de los micromicetes, sino que su aislamiento es también relativamente más sencillo, ya que pueden ser obtenidos mediante aislamiento vegetativo (fragmentos de carpóforo) o por esporada (Marshall and Nair, 2009). Los cuerpos fructíferos son una alternativa que posibilita una descripción macroscópica y gracias al amplio conocimiento que se ha generado sobre las especies comestibles para humanos, muchas veces es posible identificar especies por una simple descripción macroscópica, a diferencia de la mayoría de hongos micromicetes, de los cuales hay menos conocimiento y requieren casi siempre de técnicas moleculares para su identificación (Pryce *et al.*, 2003). Una ventaja adicional de los hongos macromicetes es su gran pool enzimático que les permite aprovechar un amplio rango de sustratos, entre los que se encuentran la corteza de pino y la fibra de coco, los cuales son comúnmente utilizados en el cultivo comercial de orquídeas (Orquideología, 2011). Adicionalmente, el desarrollo de los macromicetes degradadores de madera es rápido y abundante proporcionando barreras físicas (malla micelial) y metabolitos secundarios con actividad fitohormonal (Türker *et al.*, 2005), anti fúngica y

antibiótica (Haque *et al.*, 2016) que podrían fungir como reguladores de deshidratación y de crecimiento, así como controladores biológicos de plagas y enfermedades.

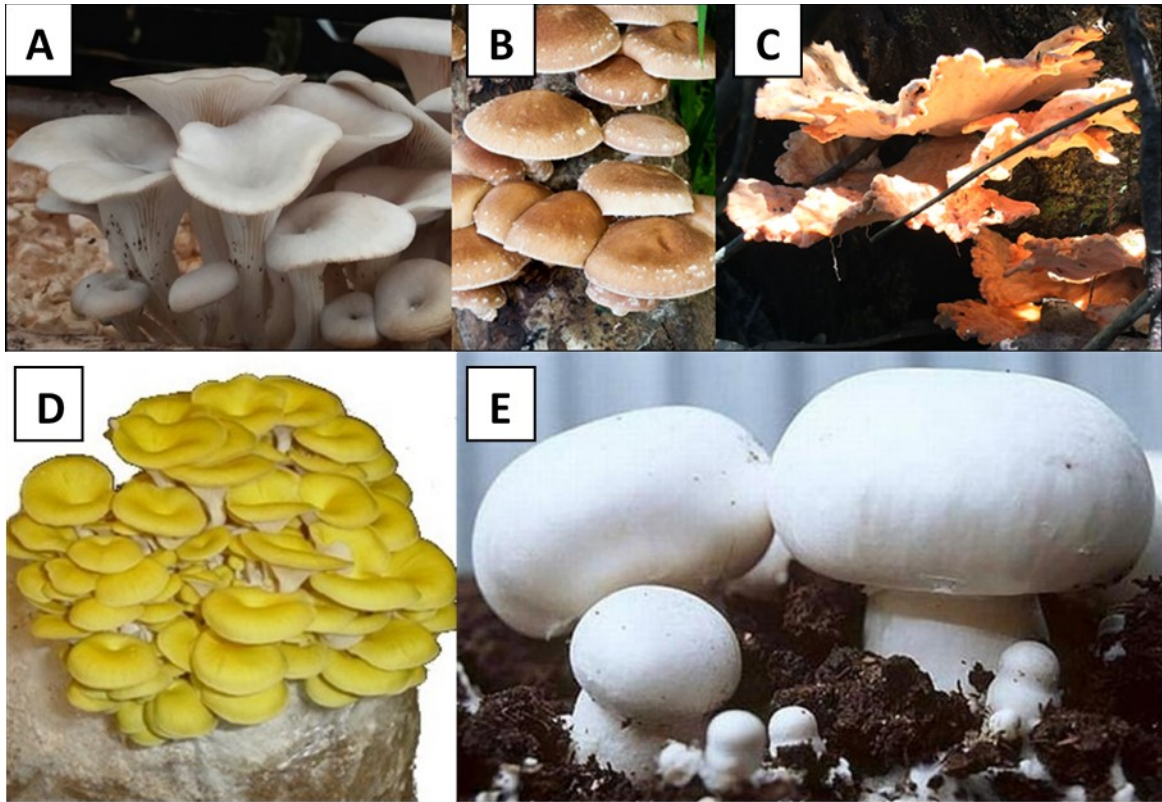
Con base en todo lo expuesto se seleccionaron para la presente investigación 5 hongos Basidiomicetes comestibles, saprofitos, celulíticos y ligninolíticos, es decir degradadores de madera muerta (Suárez, 2010; Chan, Heredia and Rodriguez, 2016). Dicha condición provee a éstos una ventaja importante en el caso del endurecimiento de plántulas de orquídea ya que estas últimas son cultivadas sobre corteza de pino, sustrato principalmente conformado por celulosa y lignina. Por otro lado ninguno de ellos ha sido reportado como fito-patógeno, por el contrario, los metabolitos extraídos a partir de estos hongos han demostrado tener actividad biológica anti-fúngica, bacteriostática y bactericida (Zjawiony and Zjawiony, 2004).

2.5 Materiales y métodos

2.5.1 Material Fúngico

Las especies de hongos utilizados en este estudio fueron *Pleurotus ostreatus* Var. *Columbinus*, *Pleurotus citrinopileatus*, *Lentínula edodes*, *Laetiporus sulphureus* y *Agaricus bisporus*, cuyas cepas fueron compradas a la empresa Shroom Supply, con excepción de la cepa de *Laetiporus sulphureus* que fue aislada a partir de un fragmento de un ejemplar colectado en los cerros orientales de Bogotá, creciendo sobre un tocón de tronco de eucalipto (Figura 2-3).

Figura 2-3: Material fúngico utilizado en el estudio



A) *Pleurotus ostreatus* Var. *Columbinus*. **B)** *Lentinula edodes*. **C)** *Laetiporus sulphureus*. **D)** *Pleurotus citrinopileatus* (Fotografía de ilshopofspores.com). **E)** *Agaricus bisporus* (Fotografía de Jackseeds.com).

Todas las fotos son del autor salvo en las que se menciona lo diferente

2.5.2 Material Vegetal

Figura 2-4: Variedades de orquídeas utilizadas en el estudio.



A) *Catasetum tubulare* planta masculina. **B)** *Miltoniopsis Kumbia*. **C)** LC. Irene Finney. Fotografías propias del autor.

Las plántulas utilizadas provienen de semillas de orquídea de los géneros *Cattleya*, *Miltoniopsis* y *Catasetum* (Figura. 2-4), germinadas asimbióticamente en condiciones *In vitro* utilizando el medio de cultivo enriquecido estandarizado por Murashige y Skoog (medio MS) (Murashige and Skoog, 1962). Las semillas fueron producidas por cruces direccionados de plantas pertenecientes a la colección privada de orquídeas Pan de Azúcar, como parte del programa de fito-mejoramiento y fueron proporcionadas por la empresa Orquídeas El Dorado. La variedad híbrida *Miltoniopsis Kumbia* fue desarrollada por Manuel Gastelbondo como parte de su función de fito-mejorador de la colección mencionada, de igual manera en los clones mejorados de LC. Irene Finney y de la especie *C. tubulare*. Las flores de cada una de las plantas fueron fertilizadas por polinización cruzada, extrayendo las masas polínicas (polinios) de una flor y depositándolas en el

estigma receptivo de otra. A continuación las cápsulas fueron cosechadas justo antes de alcanzar dehiscencia (método “Green pod” o capsula verde), lavadas con agua corriente y jabón, y desinfectadas superficialmente con una solución de cloruro de calcio a una concentración de 0.7 mg / mL (Arditti, 2008), dejándolas en reposo durante 7 minutos en la solución desinfectante, bajo condiciones asépticas (Echeverri, Jaramillo and Villegas, 2011);(Arditti, 2008), para luego abrirlas y extraer las semillas. Inmediatamente y en cabina de flujo laminar se efectuó la siembra de las semillas directamente en los frascos previamente esterilizados con el medio de cultivo. Las plántulas se mantuvieron en cultivo *In vitro* en el medio de cultivo MS modificado resembrándolas cada 4 meses. Las orquídeas requieren de 3 resiembras para alcanzar el tamaño ideal para ser extraídas de los contenedores (Figura 2-5). Pasado 1 año de cultivo *In vitro* desde la siembra de las semillas, las plántulas obtuvieron un tamaño y un desarrollo radicular suficiente, necesarios para resistir el periodo de endurecimiento (Figura 2-6).

Figura 2-5: Protocolo para la obtención del material vegetal.

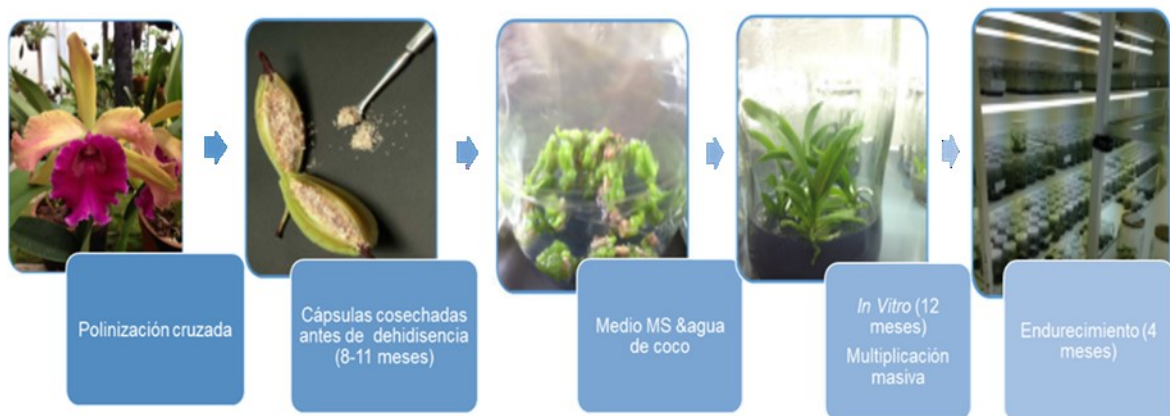
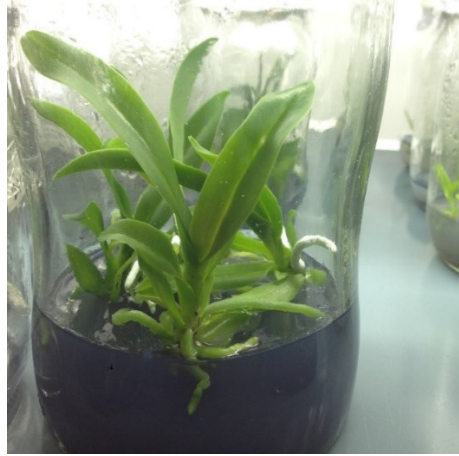


Figura 2-6: Tamaño ideal para extraer plántula de orquídea *In vitro*



Plántulas de LC. Irene Finney después de 1 año de cultivo *In vitro* lista para ser extraída del contenedor y ser sometida al proceso de endurecimiento.

2.5.3 Co-cultivo

Para los ensayos de co-cultivo, las plántulas se individualizaron y se lavaron, removiendo cualquier residuo de medio enriquecido presente en las raíces. Los fragmentos no diferenciados de callo o protocormo fueron descartados y se seleccionaron los individuos por tamaños. Como sustrato se empleó fragmentos de corteza de *Pinus patula* de dimensiones aproximadas de 0.5 cm x 0.5 cm, el cual se remojó durante 12 horas en agua destilada. El exceso de agua se descartó y se procedió a esterilizar el sustrato durante 1 hora en autoclave a una temperatura de 125 °C y a una presión de 17 psi durante 60 minutos. Posterior a la esterilización por vapor el sustrato se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente, luego se procedió a inocularlo con los hongos evaluados. Como inóculo se empleó Spawn obtenido sobre maíz blanco.

2.5.4 Obtención de la semilla (Spawn)

Cada uno de los 3 hongos seleccionados fueron sembrados en matraces de 100 ml, cada uno con 35 g de maíz blanco (peso seco) marca Carulla. Los matraces se taparon con papel aluminio y se llevaron a autoclave a una presión de 1.3 Kg/cm² y a una temperatura de 125°C durante 30 minutos. Posteriormente se adicionó agua destilada estéril en cada uno de los matraces hasta cubrir totalmente el maíz, el cual se dejó en remojo durante 45 horas a 4°C. Pasado este tiempo se descartó el excedente de agua y se llevó nuevamente a esterilización bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, pero durante 1 hora. A continuación, los matraces se enfriaron durante 30 minutos y se procedió a inocularlos empleando como inóculo 3 cuadrados de 1 x 1 cm de agar papa dextrosa colonizado por micelio de cada hongo (Figura 2-7). Todo el procedimiento se realizó por triplicado para cada hongo empleado. Se llevó el registro de la colonización superficial del micelio sobre el maíz hasta alcanzar un cubrimiento total de la superficie visible del matraz.

Figura 2-7: Producción de Spawn



A) Caja de petri con medio PDA con crecimiento micelial del hongo. **B)** Matraz con maíz blanco estéril listo para inocular. **C)** Matraz con maíz blanco totalmente colonizado por el hongo (spawn).

2.5.5 Inoculación del Spawn en la Corteza de Pino

Se colocaron 40 g (peso seco) de corteza de pino de partículas de tamaño 0 (0.5 – 1 cm de diámetro) en matraces 200 ml, los cuales se taparon con papel aluminio y se esterilizaron durante 30 minutos bajo las mismas condiciones descritas previamente. Al finalizar la esterilización se adicionó agua destilada estéril hasta cubrir la totalidad de la corteza de pino, dejando reposar los matraces durante 45 horas a 4°C. Una vez hidratada la corteza, se volvió a autoclavar durante 1 hora bajo las condiciones antes descritas, para posteriormente enfriar los matraces durante 30 minutos e inocularlos con 15 granos de la semilla previamente obtenida (2.25 g) (Figura 2-8).

El desarrollo del micelio se llevó a cabo durante el tiempo suficiente para alcanzar una colonización homogénea en toda la superficie visible del matraz.

Figura 2-8: Matraces con corteza de pino inoculados con cada especie de hongo.



Cuando cada sustrato se encontraba completamente colonizado por micelio (sustrato micogenizado) se procedió a llenar las bandejas que albergarían las plántulas. Se utilizaron

bandejas plásticas reutilizables de 72 celdas para las pruebas de bio- endurecimiento. A cada celda se le añadió el sustrato micogenizado, se colocó 1 plántula por celda de acuerdo con las cantidades indicadas por triplicado (Tabla 2-2) durante un período de 4 meses. Las bandejas se ubicaron en un invernadero de plástico, bajo un régimen de riego de 15 minutos de microaspersión cada 6 horas con agua del acueducto de Bogotá, sin ningún tratamiento complementario.

Tabla 2-2: Cantidad de plántulas sembradas para cada tratamiento.

Tratamiento	No. de plántulas Miltoniopsis Kumbia	No. de plántulas Catasetum tubulare	No. de plántulas LC. Irene Finney
Control*	20	10	10
<i>P. columbinus</i>	50	50	20
<i>P. citrinopileatus</i>	10	10	15
<i>L. edodes</i>	20	10	20
<i>L. sulphureus</i>	50	50	20
<i>A. bisporus</i>	15	15	15
Total	165	145	100

* Sustrato estéril

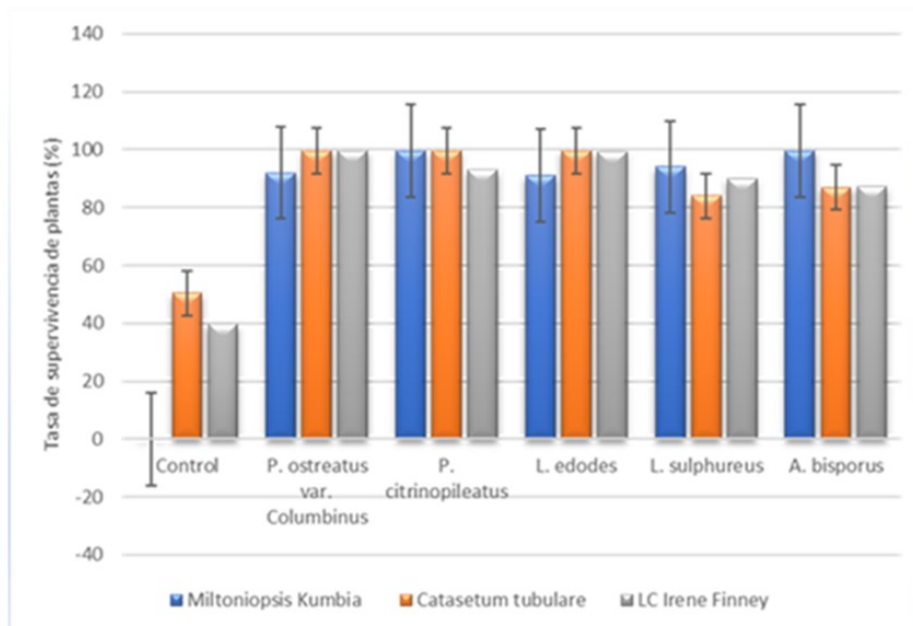
Las plántulas se dejaron 4 meses en cada tratamiento (co-cultivo con cada uno de los hongos y control sin hongo) para comparar el desarrollo y supervivencia de estas. Ningún agente químico fue utilizado durante el proceso de endurecimiento para controlar plagas y enfermedades, tampoco se aplicó ningún fertilizante durante el desarrollo de los tratamientos. El control de la humedad por medio de riego nebulizado, la disminución de radiación solar con poli sombra y la barrera física del invernadero fueron las únicas medidas abióticas utilizadas en este estudio.

2.6 Resultados y Discusión

2.6.1 Potencial de macromicetos en proceso de bio-endurecimiento

Al finalizar el tiempo de endurecimiento (4 meses), se realizó el conteo de individuos que sobrevivieron, obteniéndose así la tasa de supervivencia para cada tratamiento, arrojando valores del doble o más para los ensayos de co-cultivo en comparación con el tratamiento control (Gráfica 2-1). Cabe aquí anotar que en el tratamiento de control ninguna de las plántulas de *Miltoniopsis kumbia* sobrevivieron. Con relación al proceso en sí se aprecia claramente que todos los macromicetos ensayados ejercen una excelente acción bio-endurecedora posicionándolos como valiosísimos mediadores en el bio-endurecimiento para las plántulas de las orquídeas cultivadas en la presente investigación.

Gráfica 2-2 Porcentaje de supervivencia de plántulas de orquídea sometidas a bio-endurecimiento mediado por macromicetos comparado al tratamiento control.



La afirmación anterior se realiza con base en los porcentajes de supervivencia obtenidos con las orquídeas en co-cultivo con macromicetes, los cuales fueron superiores o iguales a las reportadas hasta el presente, tanto para técnicas convencionales como de bio-endurecimiento (Tabla 2-3); con el valor agregado de que no se requiere de un tratamiento previo especializado, ni del uso de sustratos no sostenibles, ni de la aplicación de fungicidas para obtener porcentajes altos de tasas de supervivencia, como si es requerido en los procesos de endurecimiento aplicados actualmente.

Tabla 2-3: Tasas de supervivencia de orquídeas empleando endurecimiento convencional y bio-endurecimiento.

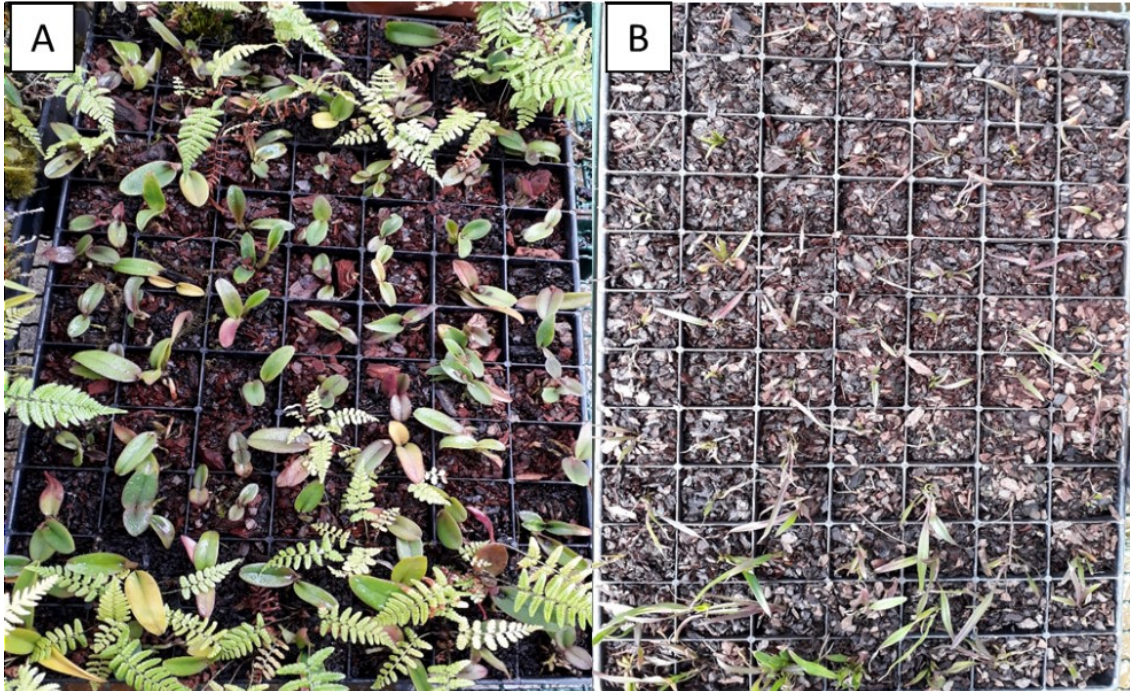
Especie	Tipo de endurecimiento	Tratamiento	Tasa de supervivencia (%)	Referencia
<i>Cattleya trianae</i>	Convencional	Empleo de fungicidas y aplicación de sales de la formula MS durante el primer mes	80 – 85	(Franco <i>et al.</i> , 2007)
<i>Phalaenopsis</i> y <i>Cattleya</i>	Convencional	Pre-endurecimiento <i>In vitro</i> y la aplicación de soluciones de sales nutritivas MS durante el primer mes	90 – 100	(Díaz <i>et al.</i> , 2010)
<i>Laelia speciosa</i>	Convencional	Pre-endurecimiento <i>In vitro</i> , cámaras de aclimatación	97.5 – 100	(Ortega-Loeza <i>et al.</i> , 2011)
<i>Dendrobium chrysanthum</i>	Convencional	Pre-endurecimiento <i>In vitro</i>	79	(Hajong, Kumaria and Tandon, 2013)
<i>Aerides ringens</i>	Convencional	Aplicación de Captan 80 WG y cámaras de endurecimiento	80	(Srivastava, Gayatri and Sarangi, 2015)
<i>Camellia sinensis</i>	Bio-endurecimiento	<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Pseudomona fluorescens</i> y <i>Azospirillum brasilense</i>	>70 81	(Thomas <i>et al.</i> , 2010)
<i>Cattleya walkeriana</i>	Bio-endurecimiento	Bacterias de los géneros <i>Enterobacter</i> y <i>Bacillus</i>	75 y 80	(Galdiano Junior <i>et al.</i> , 2011)
<i>Vanda coerulea</i>	Bio-endurecimiento	<i>Rhizoctonia zeae</i>	80	(Aggarwal <i>et al.</i> , 2012)
<i>Cymbidium sp.</i>	Bio-endurecimiento	Hongos endófitos aislados de <i>Aerides multiflorum</i> y <i>Rhynchostylis retusa</i>	92 – 95	(Hossain <i>et al.</i> , 2013)

Hoy en día, es ampliamente reconocido que la relación micorrízica entre hongos y plantas confieren a la planta un nivel nutricional mejorado, resistencia a enfermedades y una mayor tolerancia a el estrés hídrico (estrés abiótico) así como a algunos bióticos (Nowak, 1998), por lo que el empleo de hongos formadores de micorrizas ha sido un tema de estudio intensivo (Rasmussen *et al.*, 2015). Con excepción de *L. edodes*, seta a la que se determinó su asociación micorrízica con la orquídea *Erythrorchis ochobiensis* (Umata, 1998), los hongos evaluados no han sido reportados como formadores de micorrizas con las orquídeas pertenecientes a los géneros utilizados en el ensayo y para poder afirmar ese tipo de interacciones se requeriría de una caracterización microscópica de las células corticales de las raíces de las plántulas, lo que permitiría diagnosticar o descartar una asociación micorrízica. Sin embargo, estos hongos, debido a la producción de metabolitos secundarios con actividades biológicas reconocidas como son: los esteroides que exhiben actividad antimicrobiana, antifúngica e inmuoestimuladora, los diterpenos como las giberelinas con actividad fitohormonal y los polisacáridos fuente de energía e inmuoestimuladores, proveerían las plantas de las condiciones benéficas para su desarrollo sin necesidad de hacerse indispensable la aparición de dicha asociación.

De los metabolitos fúngicos antes mencionados, los primeros serían los responsables de la resistencia de las plántulas al ataque de bacterias y microorganismos en general, mientras que los segundos presentarían efectos sobre las plántulas en crecimiento, ya que en una primera etapa aumentarían la tasa mitótica del tejido caulinar y radicular, para en una segunda favorecer en forma clara el desarrollo de raíces, con lo cual las plántulas se encuentran mejor preparadas para resistir las condiciones *Ex Vitro*. De igual manera, la formación de redes de hifas sobre el sustrato permite incrementar la capacidad de retención de agua en el sustrato, disminuyendo así la pérdida de plantas por desecación.

De otra mano, la tasa de supervivencia no fue el único factor que varió entre los tratamientos y el control, al realizar la comparación de las plántulas después del año de desarrollo (Figura 2-9) puso de manifiesto que el vigor de las plantas que se desarrollaron sobre el sustrato colonizado por los hongos evaluados fue mayor, representado en un crecimiento más rápido que las plántulas sin co-cultivo.

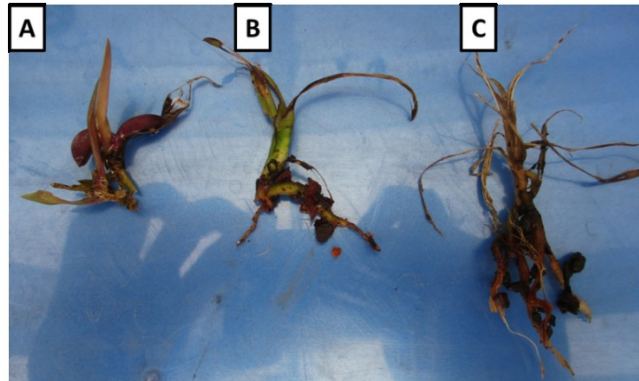
Figura 2-9: Plántulas de Irene Finney después de 1 año de desarrollo bajo los dos tratamientos.



A) Cultivadas bajo tratamiento de co- cultivo con *P. ostreatus* Var. Columbinus y **B)** Cultivadas sobre el sustrato esterilizado (tratamiento control).

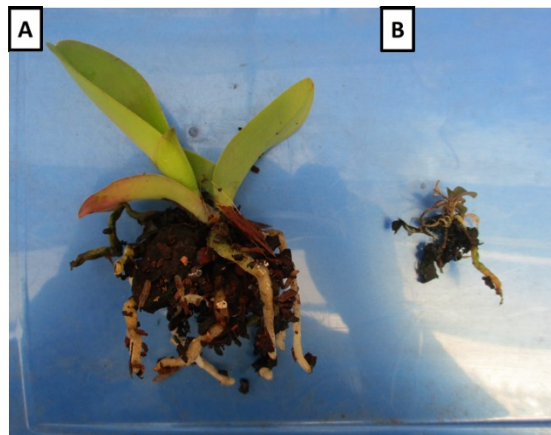
Así mismo, las plántulas del tratamiento control presentaron síntomas de desecación, desarrollo lento y sufrieron una alta incidencia de plagas y enfermedades (Figura 2-10 y 2-11).

Figura 2-10: Síntomas presentados por las plántulas endurecidas bajo tratamiento control.



A) Plántula de LC. Irene Finney con desarrollo lento y mostrando señales de depredación de sus hojas por moluscos. **B)** Plántula de Miltoniopsis Kumbia con depredación de sus hojas por moluscos. **C)** Plántula de *Catasetum tubulare* con síntomas de deshidratación y posible daño por hongos fitopatógenos.

Figura 2-11: Comparación después de 1 año de desarrollo de las plántulas de LC Irene Finney posterior a endurecimiento con y sin co-cultivo.



A) Plántula de endurecida bajo tratamiento de co-cultivo con *P. ostreatus* Var. *Columbinus*. **B)** Plántula del tratamiento control.

Ya que durante el proceso de adaptación no se utilizaron agroquímicos ni fertilizantes, los resultados positivos, tanto en la supervivencia como en el desarrollo de las plántulas, son

un verdadero hallazgo y evidencian un gran potencial para este método de bio-endurecimiento.

2.6.2 Selección del hongo con mayor potencial en bio-endurecimiento

Las tasas de supervivencia obtenidas para cada uno de los hongos en esta parte de la investigación no fueron significativamente diferentes entre sí, por lo que no fue posible definir cuál de los hongos empleados en el proceso de bio-endurecimiento era el de mayor potencial. Sin embargo, ellos presentan ciertas características que pueden ser la base para realizar una preselección de los hongos con mayor posibilidad de emplearse como mediadores en bio-endurecimiento.

Con base en el hecho de que el sustrato a emplear es corteza de *Pinus patula*, aprovechable para el desarrollo de hongos descomponedores primarios y siendo el *Agaricus bisporus* un degradador secundario (Heneghan *et al.*, 2016) (Cruz, Sánchez and Mora, 2017) se puede descartar su empleo, ya que es fácil asumir que la producción de metabolitos secundarios será muy baja. En lo referente al *Pleurotus citrinopileatus*, éste requiere para el desarrollo de su micelio (Mycelia, 1999) temperaturas de 27-32 °C lo que lo haría inviable bajo las condiciones en las que se desarrollará el proceso de bio-endurecimiento. Las consideraciones anteriores permitieron preseleccionar tres hongos a saber: *Pleurotus ostreatus* Var. *Columbinus*, *Lentinula edodes* y *Laetiporus sulphureus* para determinar, con base al tiempo de colonización del sustrato, el hongo con mejor potencial (Tabla 2-4).

Tabla 2-4: Tiempo de colonización del sustrato (corteza de pino) por parte de los hongos evaluados.

HONGO	TIEMPO DE COLONIZACIÓN (DÍAS) DE 40G DE SUSTRATO
<i>P. ostreatus</i> Var. Columbinus	30
<i>L. edodes</i>	41
<i>L. sulphureus</i>	45

Dado que la colonización del sustrato por *Pleurotus ostreatus* Var. Columbinus fue considerablemente más rápida que para los demás hongos evaluados y que además presenta la ventaja de desarrollarse mejor en las condiciones climáticas de Bogotá (promedio 14 °C), lo que facilita su producción tanto en el laboratorio como en el lugar de cultivo, lo posiciona como el posible candidato para bio-endurecimiento.

Aunado a lo anterior, y teniendo presente que probablemente son los metabolitos secundarios los que van a incidir directamente en el proceso, se efectuó una extracción de los componentes de baja polaridad de los 5 hongos iniciales. El cromatograma en CCD (Figura 2-12) correspondiente a los compuestos triterpenoidales presentes en cada uno de los extractos y que a su vez son los metabolitos secundarios con mayor variedad de bioacciones, evidencia que su composición es similar (la determinación estructural se presenta en el capítulo 3) y que solo muestran variaciones en su concentración, siendo mayor la producción de los mismos para el *Pleurotus ostreatus* Var. Columbinus.

Figura 2-12: Cromatograma en Capa Delgada de la fracción grasa de los hongos macromicetes evaluados

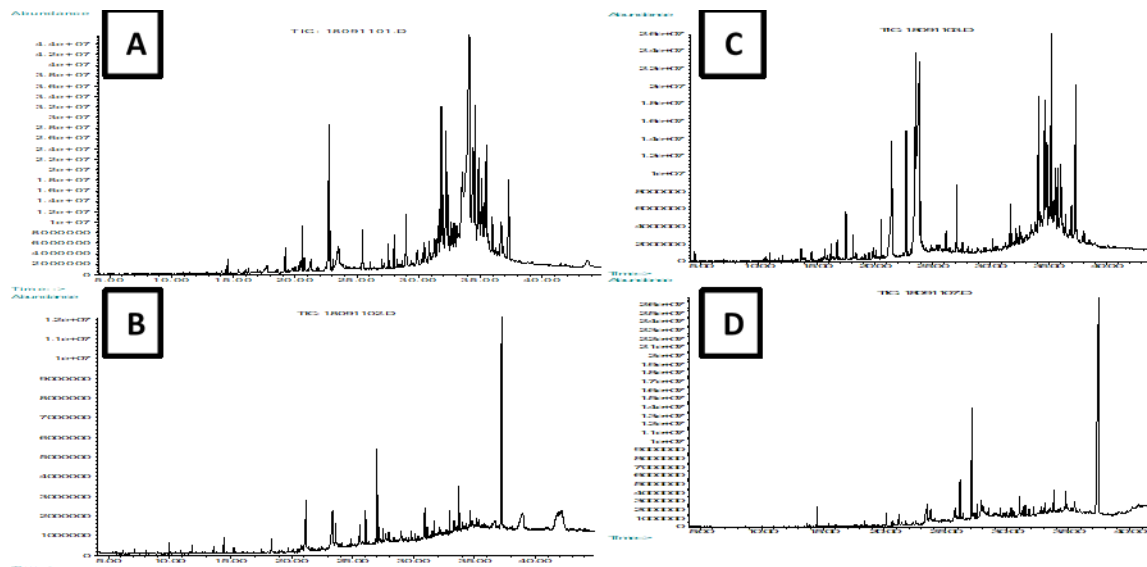


P: Patron de Lanosterol + Estigmasterol, **A:** *P. ostreatus* Var. Columbinus **B:** *P. citrinopileatus*, **C:** *A. bisporus*, **D:** *L. edodes* y **E:** *L. sulphureus*. **Fase móvil:** DCM: acetato de etilo (8:2). **Revelador:** ZnCl₂

Con respecto al *Laetiporus sulphureus*, si bien en el cromatograma en capa delgada aparecen manchas tenues a valores de R_f similares a los presentados por los otros hongos evaluados, la coloración de las mismas con el revelador específico permite concluir que no se trata de compuestos de carácter triterpenoidal. Lo anterior hace que se descarte de análisis posteriores a este hongo. Este resultado y su tiempo de colonización tan grande permitieron eliminar al *Laetiporus sulphureus* como hongo promisorio para el proceso.

En lo referente a la cromatografía de Gases el análisis de los perfiles (Figura 2-13) realizado sobre las zonas de interés permitió descartar al *Agaricus bisporus* y al *Pleurotus citrinopileatus*, dado que el número y concentración de compuestos triterpenoidales (tiempo de retención entre 30 y 40 min.) es muy bajo (resultados que se analizarán en el capítulo 3), quedando como opcionales *Lentinula edodes* y *P. ostreatus* var. *Colombinus*. Sin embargo, a pesar de que aparentemente la presencia y concentración de los compuestos antes mencionados son muy similares (Figura 2-13) se descarta a la *Lentinula edodes* debido a que presenta un tiempo de colonización mayor.

Figura 2-13: Cromatogramas de Gases de la fracción grasa de los hongos macromicetos evaluados.



A: *Agaricus bisporus*, **B:** *Lentinula edodes*, **C:** *Pleurotus citrinopileatus*, **D:** *Pleurotus ostreatus* Var. *Colombinus*

El análisis hasta aquí realizado define que, debido tanto a las condiciones de desarrollo como a la producción de bioactivos, es el *P. ostreatus var. Colombinus* el hongo a escoger para su aplicación en el bio-endurecimiento de las plántulas de orquídeas y por ende con él se continuará el estudio.

En lo referente al proceso propiamente dicho, los resultados obtenidos permitieron determinar que en todos los casos las plántulas que crecieron sobre el sustrato colonizado con micelio demostraron una mejor adaptación a las condiciones *Ex vitro*, poniendo de manifiesto que estos 5 macromicetos exhiben un buen potencial para mediar en procesos de bio-endurecimiento y que su acción parece ser general para las orquídeas evaluadas.

2.7 Conclusiones

- Con base en la tasa de supervivencia de las plántulas co-cultivadas con hongos macromicetes cuyos valores fueron semejantes o mejores a los reportados, tanto para procedimientos convencionales de endurecimiento como para métodos de bio-endurecimiento, se puede ver el gran potencial que dichos hongos presentan para esta clase de bio-procesos.
- El efecto parece generalizado a todas las especies de orquídeas, contrario a los hongos micromicetes formadores de micorrizas, los cuales han demostrado ser específicos de cada especie y con requerimientos complejos de hábitat, lo que restringe en algunos casos su empleo, convirtiéndose esta característica de los macromicetes en una gran ventaja cuando de bio-endurecimiento se trata.
- Ya que los hongos evaluados no han sido reportados como formadores de micorrizas y que su micelio se desarrolla sobre el sustrato de las orquídeas, un estudio de caracterización microscópica de cortes transversales de las raíces podría comprobar o descartar dicha asociación. De cualquier modo, por primera vez se reporta el efecto de estos hongos, sea cual sea la vía del mismo para endurecer plántulas de orquídeas.
- Los resultados arrojados por esta parte de la investigación posicionan al *P. ostreatus* Var. *Colombinus* como un excelente agente bio-endurecedor, constituyéndose en el primer reporte sobre el área y sentando las bases para el futuro desarrollo de una nueva tecnología limpia para este tipo de procesos.

3. CAPÍTULO 3: ESTUDIO QUÍMICO PRELIMINAR DE LOS POSIBLES FUNGIMETABOLITOS MEDIADORES EN EL BIO- ENDURECIMIENTO

3.1 Resumen

Como resultado de la evaluación del potencial que presentan los macromicetos en procesos de Bio-endurecimiento de plántulas de orquídeas realizada a 5 hongos macromicetos, la cual fue presentada en el capítulo anterior, se determinó que estos organismos se posicionan como excelentes mediadores en dicho proceso y que el *Pleurotus oestratus* var. *Columbinus* presentó el mejor potencial, poniendo de manifiesto una novedosa y desconocida acción de estos hongos. Así mismo, analizando los resultados obtenidos se presume que la misma puede atribuirse a los exo-fungimetabolitos, dentro de los cuales se encuentran compuestos con actividad antimicrobiana, antifúngica y fitohormonal entre otras.

Con la finalidad de confirmar dicha hipótesis, se procedió a determinar la estructura y concentración de estos en las tres matrices (micelio, sustrato virgen y sustrato agotado) para, con base en la bioacción exhibida por ellos, definir cuáles serían los posibles mediadores en el bio-proceso. En el presente capítulo se exponen los resultados arrojados por el estudio químico comparativo de tres tipos de metabolitos: los de baja polaridad, los carbohidratos y las fitohormonas. Del análisis efectuado se determinó que el bio-endurecimiento es el resultado de la combinación de las bioacciones ejercidas por los ácidos palmítico, linoleico y margárico, de los compuestos triterpenoidales (23)-etilcolest-5-en-3-ol y ergosta-5-en-3-ol, junto con los exopolisacáridos y las fitohormonas AIA Y AG3 excretadas al sustrato por el hongo macromicete *P. ostreatus* Var. *Columbinus*.

3.2 Abstract

As a result of the evaluation of the potential presented by 5 macro fungi in the processes of bio-hardening of orchid seedlings, which was presented in the previous chapter, it was determined that these organisms are positioned as excellent mediators in said process and that the *Pleurotus oestratus* var. *Colombinus* possess the best potential, revealing a novel and unknown action of these fungi. Likewise, analyzing the results obtained it is presumed that it can be attributed to the exo-fungimetabolites, within which are compounds with antimicrobial, antifungal and phytohormonal activity among others.

In order to confirm this hypothesis, we proceeded to determine the structure and concentration of these in the three samples (mycelium, virgin substrate and exhausted substrate) to, based on the bioaction exhibited by them, define which would be the possible mediators in the bio-process. In this chapter we present the results of the comparative chemical study of three types of metabolites: those of low polarity, carbohydrates and phytohormones. From the analysis carried out, it was determined that the bio-hardening is the result of the combination of the bioactions of the palmitic, linoleic and margaric acids, of the triterpenoidal compounds (23) -ethylcolest-5-en-3-ol and ergosta-5-in-3-ol, together with the exopolysaccharides and the phytohormones AIA and AG3 excreted to the substrate by *P. ostreatus* Var. *Columbinus*.

3.3 Introducción

La explotación de los hongos macromicetes por el hombre no es un fenómeno reciente. Se conocen varios ejemplos acerca del valor de estos organismos desde civilizaciones antiguas. Como uno de los empleos más ancestrales se puede citar la utilización de ciertas propiedades de los hongos para la fermentación de bebidas alcohólicas practicadas en los días de los faraones (Schultes and Hofmann, 2000; Russell and Paterson, 2008). Con la determinación química de los fungimetabolitos y el conocimiento de sus cualidades farmacológicas, el empleo de los mismos se ha difundido a diferentes esferas hasta el punto de que se toman como materia prima para producción de bebidas (Goyal, Ramawat and Mérillon, 2016), compuestos terapéuticos (Liao *et al.*, 2008), compuestos orgánicos simples, biorremediación, eliminadores de contaminantes metálicos, etc. Sin embargo, siendo los hongos una biofactoría por excelencia (Paterson, 2006), son muchos los campos en los que aún no se ha explorado el real potencial de sus metabolitos como es el caso de las áreas agronómicas.

Cabe aquí recordar que las ciencias agronómicas no son ciencias formales sino aplicadas y que corresponden a una unión de técnicas para producir bienes utilizando los recursos que brinda la naturaleza, permitiendo la aplicación de la tecnología, que no es más que el tratamiento de estos problemas sobre un fondo de conocimiento científico. Existen diferentes parámetros para la toma de decisiones, a la hora de manejar un sistema y adaptar la tecnología a las condiciones logísticas encontradas. Hay muchas áreas actuales

de trabajo interdisciplinario para el manejo de agro sistemas más sostenibles dentro de las cuales se encuentra el fitomejoramiento. Esta área que cada vez se vuelve más dinámica, al permitir seleccionar plantas con características deseables como resistencia a plagas y enfermedades, alto rendimiento, siendo una estrategia incluida en el manejo fitosanitario integrado, condiciones de estrés, índice de cosecha o nutrición. Esta disciplina también se relaciona con la creciente producción de plantas ornamentales, que al tener una demanda muy elástica y mayor movilidad tienen la posibilidad de producir frecuentemente nuevos cultivares.

Como resultado del estudio del potencial que exhiben los macromicetos en procesos de Bio-endurecimiento de plántulas de orquídeas, presentado en el capítulo anterior, se determinó que estos organismos se posicionan como excelentes mediadores en dicho proceso, proporcionándoles una novedosa y desconocida acción, la que puede atribuirse a los metabolitos secundarios biosintetizados y excretados por ellos, dentro de los cuales se encuentran compuestos con actividad antimicrobiana, antifúngica, fitohormonal entre otras, Mediante la comparación de las tres matrices fue posible identificar algunos de los metabolitos producidos por el hongo y excretados al medio, de los cuales muchos han sido reportados por tener actividades biológicas que parecen explicar los beneficios expuesto por las orquídeas bio-endurecidas.

3.4 Antecedentes

Dado que los hongos carecen de clorofila y son por tanto organismos no- fotosintéticos, no utilizan energía solar para convertir agua y dióxido de carbono en materia orgánica compleja, como lo hacen comúnmente las plantas verdes. Sin embargo, pueden producir varios grupos de complejos enzimáticos, que pueden convertir una inmensa cantidad de residuos lignocelulósicos en una amplia diversidad de productos con efectos multibenéficos sobre el bienestar humano (Chang, Gantulga and Adhikary, 2018). Los Macrohongos en general han demostrado ser excelentes inmunomoduladores y han manifestado poseer compuestos con importantes actividades dentro de las cuales se destacan antitumoral, cardiovascular, antiviral, antibacteriana, antiparasitaria,

hepatoprotectora y antidiabética. Del amplio número de fungimetabolitos, resultado de la biosíntesis propia de los macrohongos, se presenta a continuación una visión general de aquellos que podrían ser responsables de los efectos evidenciados al realizar el co-cultivo con orquídeas y que mediarían en procesos de bio-endurecimiento.

3.4.1 Fitohormonas

Las fitohormonas, también conocidas como hormonas vegetales o reguladores de crecimiento de plantas, son moléculas sintetizadas en determinado lugar de la planta para ser transportados luego a otros lugares de la misma, en los que actúan a muy bajas concentraciones regulando el crecimiento, induciendo diferenciación en el tejido y cambios en el metabolismo de las células. Muchas son fotolábiles y algunas son termolábiles (Perea Dallos and Tirado Perea, 2011).

Estos compuestos se han clasificadas en 3 grupos principales: Auxinas, Citoquinas y Giberelinas. También existen otras sustancias reguladoras de crecimiento que no hacen parte de estos grupos o que presentan actividades biológicas duales, como el caso del Ácido abscísico, las poliaminas, los brasinoesteroides y el Ácido jasmónico (Perea Dallos and Tirado Perea, 2011).

Las auxinas están implicadas principalmente en el desarrollo de raíces, pero también se ha reportado su participación en el proceso de división celular, alargamiento celular, diferenciación del tejido conductivo, en las respuestas trópicas como el gravitropismo y el fototropismo, la promoción de la dominancia apical y la regulación de la formación floral. El ácido 3-indol acético (AIA) es una de las auxinas endógenas más comunes. Otros de estos compuestos, generalmente empleados en el cultivo de tejidos de plantas, son el Ácido 2,4-diclorofenoxy acético (2,4 D), el Ácido 2-1 naftalenacético (ANA), el Ácido (2,4,5-triclorophenoxy) acético (2,4,5-T) y el Ácido Indol Butírico (AIB) (Perea Dallos and Tirado Perea, 2011).

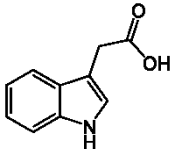
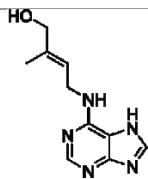
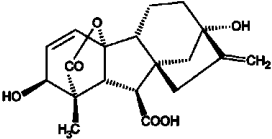
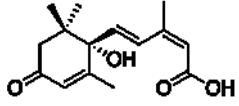
Las Citoquininas son fitohormonas naturales que promueven la división celular en tejido no meristematico, retardan la senescencia, activan el desarrollo de yemas laterales y rebrotes.

Son ampliamente utilizadas en procesos de multiplicación clonal(Perea Dallos and Tirado Perea, 2011). Dentro de este grupo se encuentran la zeatina, la 6-bencilaminopurina (BAP), el thiadiazuron phenyl-3 (1,2,3-thiadiazol-5H)urea (TDZ), la kinetina (N⁶-furfuriladenina), la N⁶-benciladenina (BA) y la N⁶(2-isopentil) adenina (2-iP)(Perea Dallos and Tirado Perea, 2011).

Las Giberelinas son terpenoides y están relacionadas con el proceso de elongación de tejido, también se les vincula con la disminución del potencial hídrico permitiendo entrar más agua a la célula, lo cual es vital para el incremento de tamaño, la elongación y respuestas a estrés hídrico. Así mismo se ha evidenciado su efecto en el rompimiento de la dormancia de semillas recalcitrantes(Perea Dallos and Tirado Perea, 2011).

Una de las fitohormonas que no está incluida en ninguno de los grupos anteriores, pero que merece especial mención es el Ácido abscísico, esta sustancia presenta algunas semejanzas, en cuanto a su actividad biológica, tanto con auxinas como con citoquininas. Entre otras actividades se ha descrito que el Ácido abscísico está relacionado con la capacidad de apertura y cerrado de estomas. Esta es la facultad más importante que las plantas propagadas *In vitro* carecen y que restringen esta tecnología en la multiplicación masiva de plantas(Davies, 1987). La tabla 3-1 recopila las estructuras de algunas de las fitohormonas aquí citadas.

Tabla 3-1: Estructura de las principales fitohormonas.

Tipo de Fito-hormona	Fito-hormona	Estructura
Auxina	ácido 3-indol acético (AIA)	
Citoquinina	Zeatina	
Giberelina	ácido giberélico (AG ₃)	
Dual	ácido abscísico (ABA)	

Fitohormonas en basidiomicetes

No solamente los miembros del reino Plantae son productores de fitohormonas. En la actualidad se sabe que dichas sustancias son también producidas por otros organismos, entre los cuales figuran los hongos (Chanclud and Morel, 2016). El rápido crecimiento de micelio de los hongos y la manera especial de su desarrollo, así como la producción comparativamente alta de materia orgánica durante la formación de cuerpos fructíferos en los hongos superiores indican que estos organismos poseen también un sistema de regulación en el que participan sustancias de crecimiento. La intervención de los reguladores de crecimiento en el proceso de diferenciación de los hongos permite inferir que los hongos los deben sintetizar en cantidades apreciables.

74 Estudio de la factibilidad del empleo de Hongos Macromicetos como mediadores en el bio-endurecimiento de Plántulas de orquídea

Es así como la presencia de ácido giberélico, zeatina y ácido indolacético se ha reportado en hongos macromicetos de las especies *Lentinus tigrinus*, *Laetiporus sulphureus*, *Coprinus atramentarius*, *Coprinus comatus*, *Boletus impolitus*, *Suillus granulatus*, *Leccinum scabrum*, *Agaricus bernardii*, *Ptychoverpa bohemica*, *Agrocybe dura*, *Lycoperdon molle*, *Volvariella speciosa*, *Pleurotus eringii*, *Morchella esculenta* entre otras especies (Tabla 3-2) (Türker *et al.*, 2005) (Ünyayar, Topcuoglu and Bozcuk, 2016) (Özcan, 2001) (Bose, Shah and Keharia, 2013).

Tabla 3-2: Contenido de fitohormonas en Basidiomicetes (modificada de Türker, 2005).

Macrofungi	AGs (µg/mg)		t-Zeatina (µg/mg)		AIA (µg/mg)	
	Seco	Fresco	Seco	Fresco	Seco	Fresco
<i>Cortinarius sp.</i>	188,03	80,24	67,05	4,58	0,68	0,43
<i>Lentinus tigrinus</i>	80,12	65,14	8,05	0,68	3,15	0,46
<i>Coprinus atramentarius</i>	22,13	10,24	17,1	0,62	9,48	0,23
<i>Boletus impolitus</i>	26,31	40,21	9,2	0,09	0,54	0,035
<i>Suillus granulatus</i>	35,21	28,41	6,65	0,04	0,85	0,035
<i>Leccinum scabrum</i>	267,22	37,3	4,36	0,04	2,83	0,065
<i>Pleurotus ostreatus</i>	30,18	25,02	4,43	0,42	0,18	0,024
<i>Agaricus bernardii</i>	45,86	28,37	92,18	0,89	0,23	1,36
<i>Ptychoverpa bohemica</i>	444,08	148,65	40,28	0,72	7,27	0,46
<i>Agrocybe dura</i>	250,4	20,18	32,99	0,3	23,41	0,018
<i>Lycoperdon molle</i>	276,29	103,06	6,39	0,42	1,49	0,16
<i>Volvariella speciosa</i>	372,02	96,24	11,2	0,042	12,24	0,02
<i>Pleurotus eryngii</i>	147,2	94,27	10,13	0,61	2,44	0,13
<i>Morchella esculenta</i>	76,21	18,26	8,14	0,013	1,24	0,06
<i>Coprinus comatus</i>	94,31	81,32	21,2	2,38	0,86	0,62
<i>Inocybe sp.</i>	425,16	12,06	2,65	0,16	2,6	0,03
<i>Hebeloma longicaudum</i>	80,24	19,24	4,41	0,18	1,13	0,074
<i>Amanita gemmate</i>	298,42	150,02	7,42	0,71	3,41	0,09

Los niveles de fitohormonas pueden ser, como muchos otros de los compuestos sintetizados por los hongos, dependientes del hábitat, de los caracteres genéticos, del estado nutricional y de los otros metabolitos secundarios producidos (Türker *et al.*, 2005). Existen estudios que reportan la extracción y cuantificación de fitohormonas a partir de *P. ostreatus* y de otras especies de macro hongos (Morrison *et al.*, 2015) (Türker *et al.*, 2005).

Es así como a partir de extractos de *P. ostreatus* ha sido posible cuantificar las fitohormonas presentes obteniendo 30 µg/mg de AGs, 4.43 µg/mg de Zeatina y 0.18 µg/mg de Ácido Indol Acético (Türker *et al.*, 2005), concordante con lo encontrado por Morrison *et al* en 2017 quien reporta una alta producción de Ácido abscísico y citoquininas por parte de este hongo.

3.4.2 Compuestos Triterpenoidales

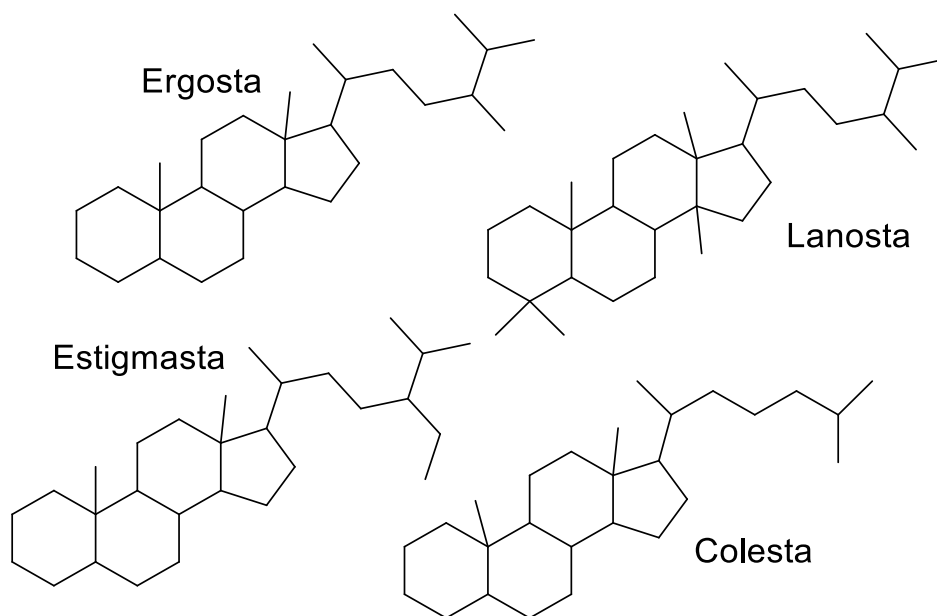
Los terpenoides forman una gran familia estructuralmente diversa de productos naturales derivados a partir de la unión virtual cabeza-cola de unidades de isopreno (C_5). La estructura típica contiene un esqueleto carbonado de $(C_5)_n$, y se clasifican como hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}) y tetraterpenos (C_{40}) (Dewick 2002).

Dentro del grupo de los terpenos están los triterpenos, compuestos ampliamente difundidos en el reino vegetal y en el reino Fungi, que se pueden encontrar como glicósidos, ésteres o en forma libre. Por definición se consideran “productos naturales que tienen esqueleto de 30 átomos de carbono y que derivan del escualeno (6 unidades de isopreno) por ciclaciones y/o modificaciones de este (Silva *et al.*, 1992). Dentro de estos metabolitos revisten mayor importancia los triterpenoides tetracíclicos. compuestos que presentan un amplio rango de actividades biológicas entre las que se destacan tanto la antimicrobiana como la antifúngica (Popova *et al.*, 2009a). Al parecer algunas sustancias triterpenoidales interrumpen el funcionamiento de la mitocondria de los microorganismos generando un efecto de control biológico (Haque *et al.*, 2016).

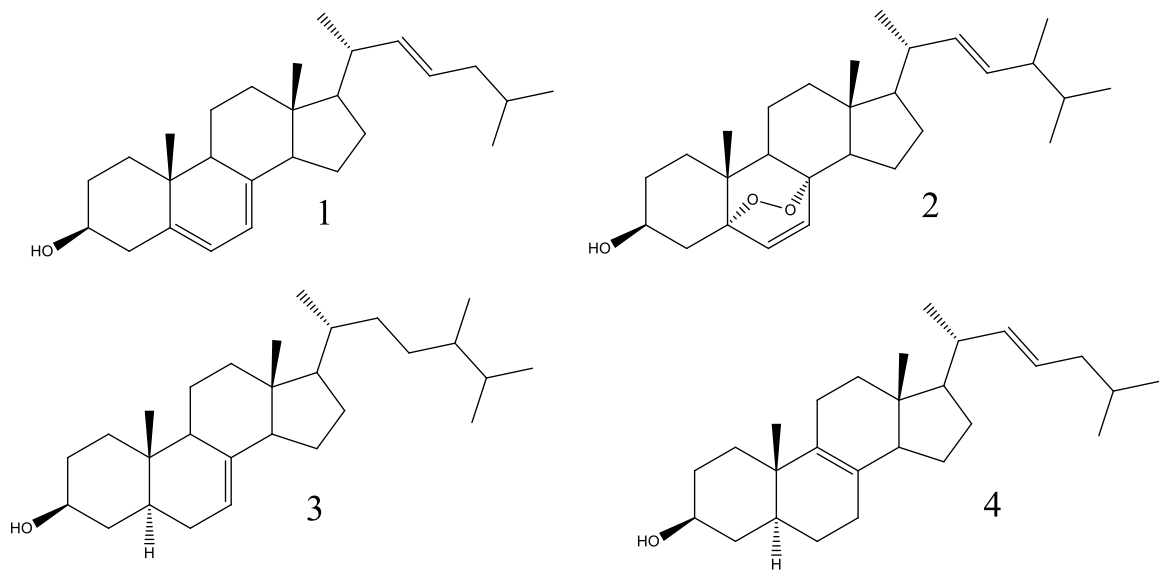
Estos metabolitos secundarios forman parte de los componentes grasos del hongo y pueden ser divididos en cuatro grupos mayoritarios en los macrohongos, dependiendo de

los sustituyentes presentes en el núcleo básico: los lanosta, colestá, estigmasta y los ergosta (figura 3.1). Estos metabolitos exhiben actividades biológicas comprobadas, entre las que se destaca la antimicrobiana (Keller, Maillard and Hostettmann, 1996; Jain, Singh and Jain, 2001; Popova *et al.*, 2009b; Gyawali and Ibrahim, 2014)

Figura 3-1: Núcleos triterpenoidales más comunes en hongos basidiomicetos.

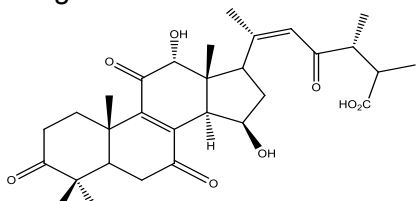
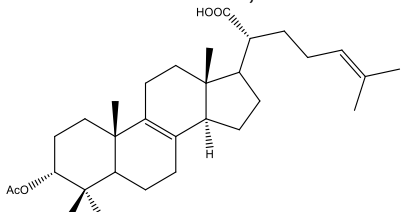
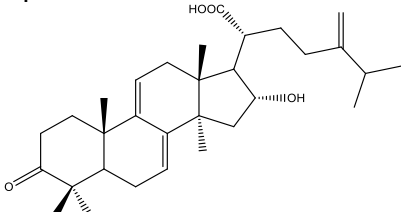
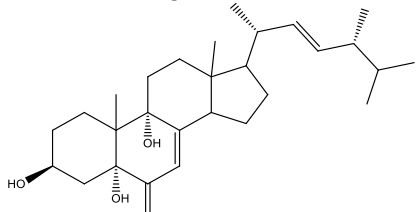
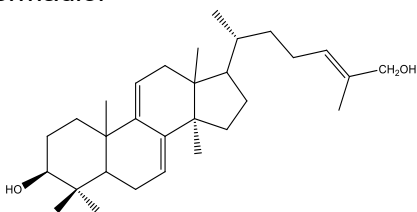
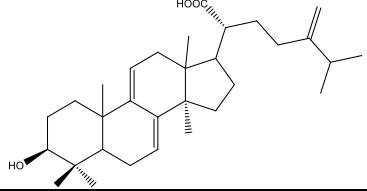


Formando parte de los compuestos triterpenoidales están los esteroides considerados de gran importancia ya que presentan una distribución amplia entre los diferentes grupos de hongos macromicetos (Vega, 2016) y además son poseedores de una gran variedad estructural, lo que podría conferirles diferentes actividades biológicas (Avila and Nieto, 2009). A modo de ejemplo de estos metabolitos se pueden citar el ergosterol (1) precursor de la vitamina D2, el peróxido de ergosterilo (2) el zimosterol (3) y el fungisterol (4) (Figura 3-2).

Figura 3-2: Estructuras de esteroides ampliamente distribuidos en macromicetes.¹**1) Ergosterol, 2) Peróxido de ergosterol, 3) Zimosterol, 4) Fungisterol**

Muchos de los esteroides aislados de basidiomicetes exhiben actividad biológica comprobada. Algunos de ellos se presentan en la tabla 3-3.

Tabla 3-3: Ejemplos de esteroides bioactivos aislados de basidiomicetes.

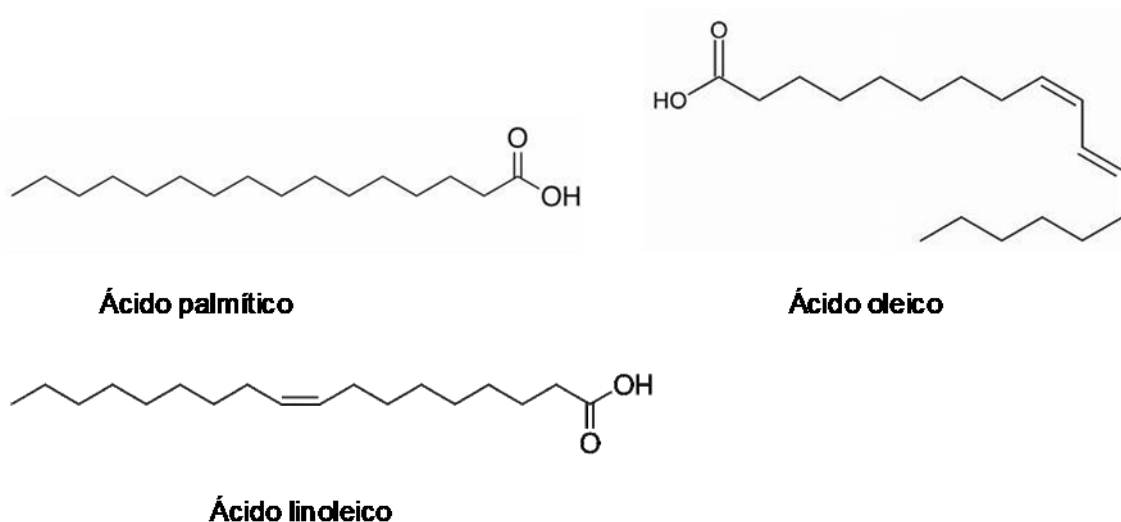
HONGO	COMPUESTO	ACTIVIDAD
<i>Elfvíngia applanata</i>	<p>Ácido elfvíngico A</p> 	Anticancerígena (Yoshikawa <i>et al.</i> , 2002)
<i>Fomiptosis pinicola</i>	<p>Ácido 3α-acetiloxilano-8,24-dien-21-oico</p> 	Antimicrobiana (Keller, Maillard and Hostettmann, 1996)
<i>Fomiptosis pinicola</i>	<p>Ácido poliporénico</p> 	Antimicrobiana (Keller, Maillard and Hostettmann, 1996)
<i>Trametes versicolor</i>	<p>3β,5α,9α-trihidroxi ergosta-7,22-dien-6-ona</p> 	Citotóxica (Zjawiony, 2004)
<i>Ganoderma pfeifferi</i>	<p>Ganodermadiol</p> 	Antiviral contra influenza tipo A (Zjawiony, 2004)
<i>Leatiloporus sulphureus</i>	<p>Ácido dehidrotrametenónico</p> 	Hipoglicemiante (Zjawiony, 2004)

3.4.3 Ácidos Grasos

Dentro de los componentes de los hongos se encuentran los ácidos grasos que corresponden a un 6 – 8% del peso seco. Particularmente, los ácidos grasos poliinsaturados son esenciales para el metabolismo basal humano y tienen muchos efectos beneficiosos sobre la salud. La falta en la dieta de los ácidos de grasos esenciales trae como consecuencia un metabolismo ineficiente y por ende la aparición de enfermedades, entre las que se encuentran las cardiovasculares.

Estos compuestos están constituidos por una cadena hidrocarbonada cuyo número de átomos de carbono es variable, pero en los sistemas biológicos tienen generalmente un número par entre 10 y 28 C. En un extremo de la cadena se encuentra un grupo carboxilo (-COOH) y en el otro extremo un grupo metilo. El grupo carboxilo es hidrofílico mientras que la cadena hidrocarbonada es hidrofóbica, haciendo a la molécula anfipática. Los ácidos grasos con un número de átomos de carbono <8 se consideran de cadena corta, mientras que aquellos con > 16 se denominan de cadena larga. Pueden ser saturados e insaturados (Desbois and Smith, 2010). La composición de ácidos grasos de los hongos varía con las diferencias en el ambiente, las condiciones de clima, origen geográfico y / u otros factores (Tokul-Olmez *et al.*, 2013). En general el perfil de estos metabolitos es altamente variable en los macrohongos, pero son palmítico, oleico y linoleico los más abundantes (Doga, 2013) (Figura 3-3).

Figura 3-3: Estructuras de los ácidos grasos más abundantes en basidiomicetos.



Las actividades biológicas que presentan los ácidos grasos juegan papel importante en la defensa contra microorganismos oportunistas o patógenos potenciales. Un aspecto importante de esto es la inhibición del crecimiento o la muerte directa de las bacterias. Existe una extensa literatura sobre los efectos antibacterianos de los ácidos grasos provenientes de una gran variedad de fuentes biológicas, incluyendo algas, animales, plantas y hongos. La actividad antibacteriana de cada ácido graso está influenciada por su estructura y forma, lo que a su vez es una función de la longitud de la cadena carbonada y la presencia, número, posición y orientación de los enlaces dobles. La literatura contiene informes contrastados sobre la relación entre la estructura y su actividad antibacteriana, pero surgen algunas tendencias generales. El grupo – OH del grupo carboxilo parece ser importante para la actividad antibacteriana. Los ésteres de ellos a menudo presentan una menor actividad y en la mayoría de los casos carecen de ella (Desbois and Smith, 2010). Además de la actividad antibacteriana se ha reportado actividad antifúngica de los ácidos butírico, caproico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, oleico y linoleico contra cuatro hongos fitopatógenos: *Alternaria solani*, *Colletotrichum lagenarium*, *Fusarium oxysporum* f. SP. Cucumerinum y *Fusarium oxysporum* f. SP. Lycopersici (Liu *et al.*, 2008).

3.4.4 Polisacáridos

Los hongos son una fuente importante de diferentes tipos de polisacáridos, la mayoría de los cuales son homoglicanos (polisacáridos que contienen un único tipo monosacárido) o heteroglicanos (polisacáridos que contienen dos o más tipos de monosacáridos) y son capaces de combinarse con proteínas para producir peptidoglicanos o complejos proteína-polisacárido (Hesham, El Enshasyand and Hatti-Kaul, 2013). Así mismo, dentro de los polisacáridos se diferencian dos grupos: los estructurales o Intrapolisacáridos (IPS) y los excretados por el microorganismo al medio exterior o Exopolisacáridos (EPS). Los EPS son polímeros de monosacáridos (>20) de alto peso molecular, sintetizados intracelularmente y posteriormente excretados (Vega, 2016). Estos compuestos pueden ser lineales o presentar ramificaciones. Los polisacáridos más abundantes son los β -glucanos los cuales son polisacáridos no celulósicos constituidos por unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos y con ramificaciones β -1-3 o β -1-6 (Suárez, 2010). Son aislados principalmente de la pared celular de las células fúngicas (aproximadamente la mitad de la biomasa de la pared celular está constituida de β -glucanos), aunque también pueden ser excretados al medio. Ejemplos de algunos de estos compuestos se presentan en la tabla 3-4.

Tabla 3-4: Estructuras de algunos β -glucanos aislados de micomicetos.

HONGO	β -GLUCANO	ESTRUCTURA	REF.
<i>Ganoderma lucidum</i>	Ganoderan		(Zhu <i>et al.</i> , 2015) (Xia <i>et al.</i> , 2014) https://patents.google.com/patent
<i>Lentinula edodes</i>	Lentinan		(Zhu <i>et al.</i> , 2015) https://en.wikipedia.org/wiki/Lentinan
<i>Poria cocos</i>	Pachyman		(Wang <i>et al.</i> , 2014) https://patents.google.com/patent
<i>Grifola frondosa</i>	Grifolan		(Zhu <i>et al.</i> , 2015) https://www.slideshare.net/ammarbabar18/glucan-chemistry
<i>Coriolus versicolor</i>	Krestin		(Zhu <i>et al.</i> , 2015) (Pandya, Dhuldhaj and Sahay, 2018)

Esta clase de compuestos son los principales responsables de las actividades anticancerígena e inmunomoduladora atribuidas a los hongos (Vannucci *et al.*, 2013). Los polisacáridos fúngicos se describen con frecuencia como "modificadores de la respuesta biológica" (BRM's por sus siglas en inglés). Poseen la capacidad de desencadenar una reacción no específica, por lo general del sistema inmune, y estas reacciones pueden ir dirigidas contra células tumorales, infecciones virales o bacterianas e inflamaciones. Provocan también el aumento de la síntesis de las hormonas y de células del sistema inmune del huésped. Se ha descrito su capacidad para reducir los niveles de colesterol y azúcar en la sangre, actuando como fibras dietéticas no digeribles, y también actúan como antioxidantes y eliminadores de radicales libres, como moléculas hepatoprotectoras y desintoxicantes. Sus propiedades antitumorales difieren grandemente con su composición química y su configuración, así como en las propiedades físicas tales como solubilidad en agua, tamaño de las moléculas, grado de ramificación y la forma. El estudio de los mecanismos de su acción biológica han puesto de manifiesto el papel que cumplen en la terapia contra el cáncer, la estimulación del sistema inmune (Marshall and Nair, 2009), actividad profiláctica contra la quimioterapia/radioterapia (Russell and Paterson, 2008), y actividad antimicrobiana (Odiba *et al.*, 2014).

El β -glucano más conocido a nivel mundial es el lentinan aislado de *L. edodes* (Shiitake), polisacárido de 27,5 kDa que es utilizado en Japón como una medicina anticancerígena (Suárez Arango and Nieto, 2013). Este polisacárido, con estructura helicoidal triple, fue aislado por primera vez a finales de 1960 en Japón. Su estructura corresponde a un β -1-3-D-glucano con ramificaciones β -1-6, y se reportó como inmunomodulador y anticancerígeno. Cabe aquí anotar que los polisacáridos fúngicos pueden existir en forma simple o como triple hélice, siendo esta última conformación la más estable y a la que se le atribuye las actividades antes mencionadas (Hesham, El Enshasyand and Hatti-Kaul, 2013).

Adicionalmente a las acciones inmunestimuladoras y anticáncer presentadas, que son las más importantes, hay un buen número de estudios tanto *In vitro* como *In vivo* que han puesto en evidencia algunas propiedades biológicas adicionales como son: antitumoral, antioxidante, anti-inflamatoria y antinociceptiva (Ruthes, Ribeiro and Lacomini, 2015). Igualmente, varias investigaciones han determinado que los β -glucanos fúngicos exhiben

actividad antibacteriana *In vitro* contra bacterias Gram- positivas y Gram-negativas y específicamente con un potente efecto antibacteriano contra *Bacillus megaterium*, *Enterococcus phoeniculicola* y *Klebsiella pneumoniae* (Zhu *et al.*, 2015). Parece ser que la efectividad de los β -glucanos depende de la presencia de enlaces β -(1-3) o β -(1-6), pero poco se sabe acerca de cómo debería ser el carácter de las ramificaciones (Bae, I *et al.*, 2013).

3.5 Metodología

3.5.1 Extracción y caracterización de los metabolitos de interés

Los metabolitos estudiados se seleccionaron con base en la actividad biológica reportada en la literatura, ya que esta puede ser la responsable de la respuesta favorable de las plántulas durante los procesos de bio-endurecimiento. En este orden de ideas corresponderían a ácidos grasos, compuestos triterpenoidales, fitohormonas y exopolisacáridos. Todos los procedimientos de extracción y caracterización se realizaron con el sustrato sólo (sustrato virgen), el micelio del hongo y el sustrato proveniente del co-cultivo (sustrato agotado).

- **Extracción, determinación y cuantificación de los constituyentes de la fracción grasa (ácidos grasos y compuestos triterpenoidales)**

La obtención de los metabolitos de baja polaridad se realizó mediante extracción con disolventes asistida por ultrasonido empleando DCM y de manera exhaustiva (reacción negativa de Liebermann-Burchard). El disolvente se eliminó por rota-evaporación. Posteriormente los extractos fueron caracterizados por CG-EM en un cromatógrafo marca Hewlett Packard 6890 con una columna capilar ZB-5 (30 m, 0,25 mm D.I., 0,25 μ m), acoplado a un espectrómetro de masas Hewlett Packard 5973 con fuente de ionización de

70 eV, bajo las siguientes condiciones: Helio 1,1 mL/min; modo Splitless; temperatura del inyector 300 °C; rampa de calentamiento 60 °C 1 min: 7,4 °C/min hasta 310 °C - 10 min. Los componentes de cada extracto fueron determinados mediante comparación con la biblioteca del equipo y análisis del patrón de fragmentación dado por los espectros de masas. Su cuantificación se efectuó por las áreas relativas en los cromatogramas de gases.

De manera complementaria se realizó un análisis por CCD utilizando como fase móvil: DCM: acetato de etilo (8:2) y revelando con ZnCl₂.

- **Extracción y cuantificación de polisacáridos y β -glucanos**

La extracción de estos metabolitos se realizó en las tres matrices (micelio, sustrato virgen y sustrato agotado) de acuerdo a la metodología empleada por Shcherba & Babitskaya en el 2004. La muestra seca se sometió a extracción asistida por agitación magnética durante 1 hora empleando como disolvente agua destilada (300 mL) a ebullición. La extracción se realizó de forma exhaustiva (coloración negativa a la prueba de Dubois).

El extracto se filtró y se concentró hasta alcanzar un volumen de 200 ml. y se procedió a dejarlo a 6 °C durante 48 horas. Pasado el tiempo estipulado se añadieron 50 ml de etanol frío (6°C) y se dejó reposar a 6 °C por espacio de 1 hora para precipitación total de los carbohidratos. El precipitado se centrifugó en condición de refrigeración (8°C) a 10000 rpm durante 10 min. Los pellets formados se separaron de la fase acuosa descartando el sobrenadante y luego se secaron a 40 °C hasta peso constante. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

El contenido de Polisacáridos totales (PS) se determinó empleando el método colorimétrico de Dubois modificado (Ávila Núñez *et al.*, 2012). Los cálculos se realizaron a partir de una curva de calibración con glucosa en un rango de concentraciones de 10 μ g/ml a 100 μ g/ml con 5 niveles (Vega, 2016). Se estableció el contenido de β -glucanos por el método colorimétrico de Nitschke modificado (Semedo, Karmali and Fonseca, 2015). Se trabajó una curva de calibración con β -glucanos (70% de pureza) de *Ganoderma*

lucidum suministrados por la empresa PROGAL BT, con un rango de concentraciones de 56 µg/mL a 280 µg/mL con 6 niveles.

- **Extracción, detección y/o cuantificación de fitohormonas**

La extracción de estos metabolitos se efectuó a cada una de las tres matrices (sustrato virgen, micelio de *P. ostreatus* Var. Columbinus y sustrato agotado) con base en el método modificado reportado por Ünyayar et al (Ünyayar, Topcuoglu and Ünyayar, 1996) presentado en la figura 3.4.

- Cromatografía en Capa Delgada (CCD)

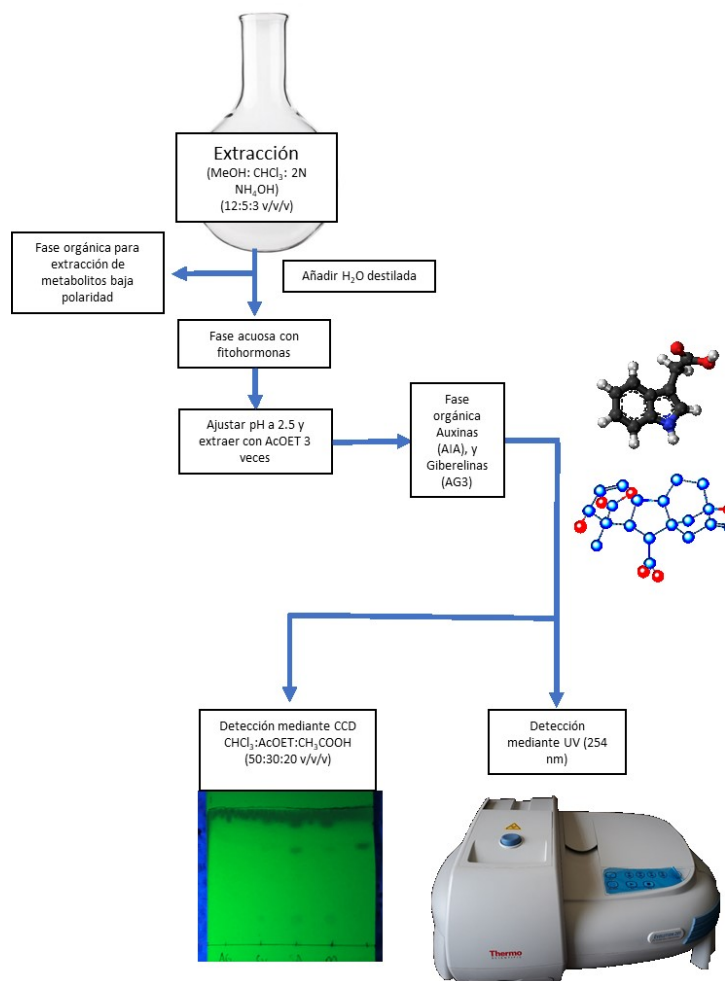
La Cromatografía en Capa Delgada (CCD) se realizó en cromatoplasmas Alugram SIL G/UV254 Macherey Nagel, empleando como revelador universal para las auxinas UV a 254 y 365 nm. Para el caso de las giberelinas, estas se detectaron asperjando con una solución de ácido sulfúrico : etanol (95:5) el cromatograma seco y calentándolo a 120°C durante 10 minutos y posterior observación bajo luz UV a 254nm(MacMillan and Suter, 1963). Los patrones se prepararon a una concentración de 1 µg / mL, disueltos en metanol.

- Espectrofotometría-U.V.

Para realizar la cuantificación de las fitohormonas detectadas en los diferentes extractos se efectuó el barrido entre 200 y 380 nm utilizando un equipo marca Thermoscientific modelo Evolution 201, para cada uno de los patrones (AIA y AG3) empleados con la finalidad de determinar los picos de máxima absorción para cada fitohormona. Una vez determinadas las λ de máxima absorción se procedió a realizar la cuantificación de las fitohormonas presentes en las matrices, empleando 280 nm para auxinas(Sundberg, Sandberg and Crozier, 1986; Mori et al., 2017) y 203 nm para giberelinas (Linskens and

Jackson, 1987). La curva de calibración para el AIA se efectuó dentro del rango de concentración de 5-30 ppm y la del AG3 entre 0-75 ppm.

Figura 3-4: Metodología de extracción de fitohormonas (Ünyayar, Topcuoglu and Ünyayar, 1996).



3.6 Análisis Estadístico

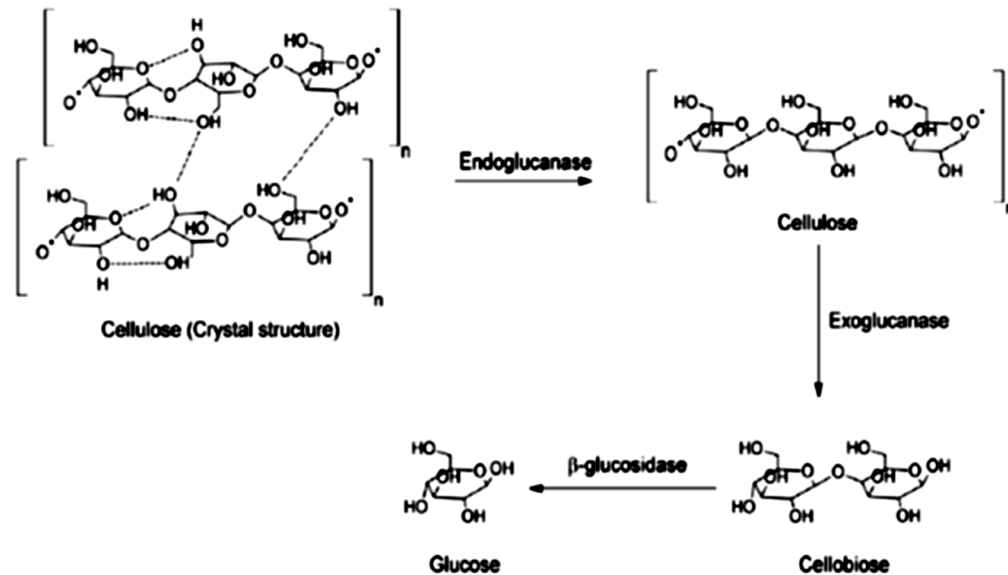
Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Se determinaron los valores promedio y la desviación estándar de los medios. Las diferencias significativas de medias se evaluaron por medio de un análisis ANOVA utilizando el programa Excel.

3.7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como se había indicado anteriormente, de los resultados obtenidos en la realización de los co-cultivos y la determinación de la viabilidad de las plántulas de orquídea, permitieron concluir que los hongos basidiomicetos son excelentes mediadores en el proceso de bio-endurecimiento. Así mismo, se infirió que, debido tanto a la ausencia de plagas y enfermedades como al buen desarrollo de las plántulas, los mediadores en el proceso deberían ser aquellos fungimetabolitos con bioacciones antimicrobianas, antifúngicas, antivirales y de promoción de crecimiento. Sin embargo, no se puede dejar de lado el efecto que “*per se*” presenta el desarrollo del hongo en el sustrato empleado para el bio-proceso. Es así como el bio-ensayo realizado con el control (corteza de *Pinus patula* como sustrato) puso de manifiesto la no viabilidad de las plántulas, lo que permitió determinar que este sustrato no proporcionó los nutrientes y compuestos requeridos para el desarrollo de las mismas durante el periodo de adaptación, hecho que puede ser debido a que ellas requieren de una buena proporción de carbohidratos utilizables para su paso de heterotrofia a autotrofia.

De lo anterior es muy fácil deducir que el sustrato empleado parece servir sólo como soporte nutricionalmente inerte que actúa únicamente como lugar de anclaje. Esto es debido a que el pino forma parte de los muchos materiales lignocelulósicos que existen en la naturaleza, que para poder ser aprovechados por las plantas se requiere que sean convertidos química o biológicamente. Los descomponedores más eficientes de la madera y otras sustancias lignocelulósicas naturales son los hongos de la pudrición (blanca, parda o suave). Es esta característica lo que ha llevado a la realización de una gran cantidad de investigaciones dedicadas al problema de convertir estos materiales naturales en una forma utilizable (Carlile, Watkinson and Gooday, 2001). Los hongos descomponedores tienen la habilidad de despolimerizar los materiales lignocelulósicos gracias a la producción de las celulasas, dejando al final del proceso la glucosa (Figura 3.5), la cual queda disponible para ser empleada por las plantas. El sistema de celulasa está constituido por tres componentes: endoglucanasa, exoglucanasa y β - glucosidasa (Yoon *et al.*, 2014).

Figura 3-5: Mecanismo de la hidrólisis de celulosa mediante el complejo celulasa. (Yoon *et al.*, 2014)



Tomado de: Wan Yoon et al, 2014

La hidrólisis del sustrato lignocelulósico se divide en primaria y secundaria. La hidrólisis primaria ocurre generalmente en la superficie del sustrato fraccionando las cadenas de la celulosa en azúcares solubles, con grado de despolimerización menor de 6, los que por acción de la exoglucanasa se transforman en celobiosa que por la hidrólisis secundaria se convierte en glucosa. Con base en lo indicado anteriormente se puede deducir que el desarrollo del micelio “acondiciona” el sustrato para que las plántulas puedan disponer de carbohidratos aprovechables.

Aunado a lo anterior, otro factor que pudo haber contribuido a la mortalidad de las plántulas en el ensayo control es el hecho de la pérdida de humedad en el sustrato, apreciación que está en concordancia con lo reportado por Franco y colaboradores en 2007 (Franco *et al.*, 2007), quienes indican que las altas tasas de mortalidad entre las

plantas que crecen sobre corteza de pino son debidas posiblemente a la baja retención de humedad en este sustrato, lo que impide un desarrollo radicular adecuado y fuerte anclaje del sistema radicular, lo que sugiere que el pino no es un sustrato favorable en el proceso de endurecimiento de orquídeas, resultado que, como dichos autores reportan, difiere del alcanzado por Mendizábal en 2001 quien considera a la corteza de pino triturada como uno de los mejores sustratos orgánicos para la propagación de orquídeas epífitas. Queda claro que, aunque el sustrato de corteza de pino es un excelente sustrato para propagación *In vivo*, no es ideal durante el proceso de endurecimiento y aporta una función principalmente de anclaje.

Sin embargo, los demás efectos evidenciados en el bio-endurecimiento no pueden ser explicados con base en los aspectos antes mencionados, de manera que se realizó el análisis correspondiente a los bioactivos aportados al sustrato por el micelio.

A continuación, se presenta la discusión sobre la selección del hongo con el mejor potencial en bio-endurecimiento, la extracción y determinación de los posibles fungimetabolitos mediadores en el bio-proceso, que corresponden a aquellos que fueron biosintetizados por el hongo y posteriormente excretados al sustrato.

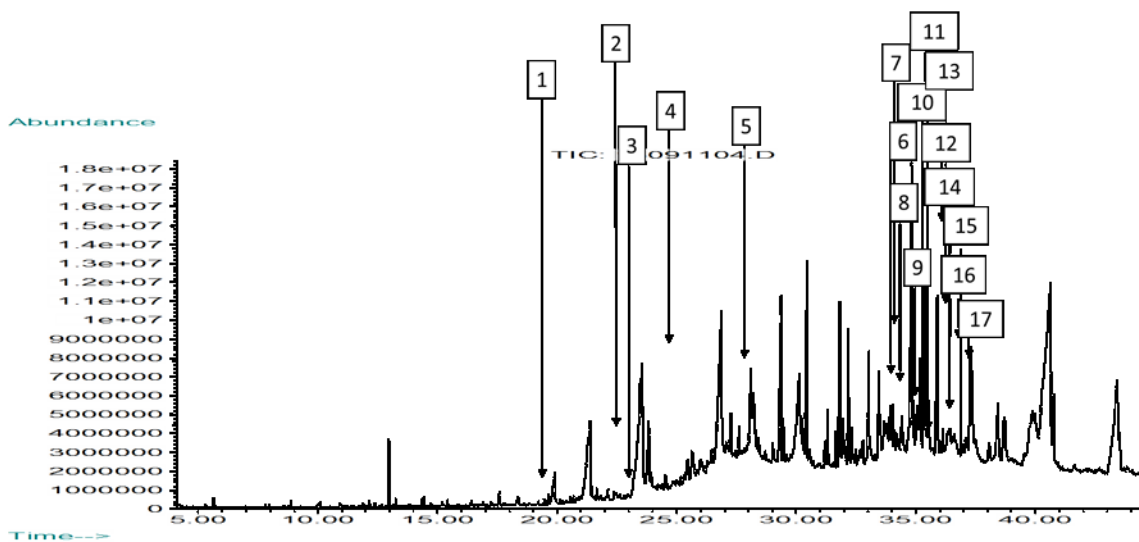
3.7.1 Selección del hongo con el mayor potencial para el proceso de bio-endurecimiento, Ácidos grasos y compuestos de carácter triterpenoidal

Como bien se indicó en el capítulo 2 esta selección se realizó con base a dos parámetros: Tiempo de colonización del sustrato y producción de compuestos bioactivos. Para este último se tomó como referencia aquellos metabolitos que podrían proporcionar las mismas acciones que son deseables en un proceso de endurecimiento convencional es decir acción sobre plagas y enfermedades, lo que direccionó el estudio a compuestos con actividad antifúngica y antimicrobiana. Del amplio espectro de compuestos con actividad

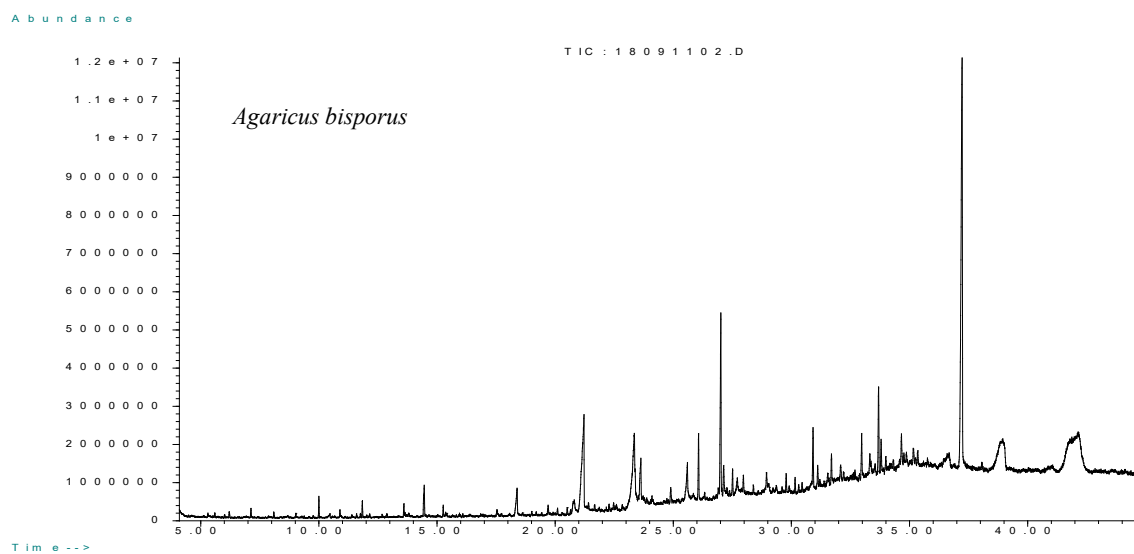
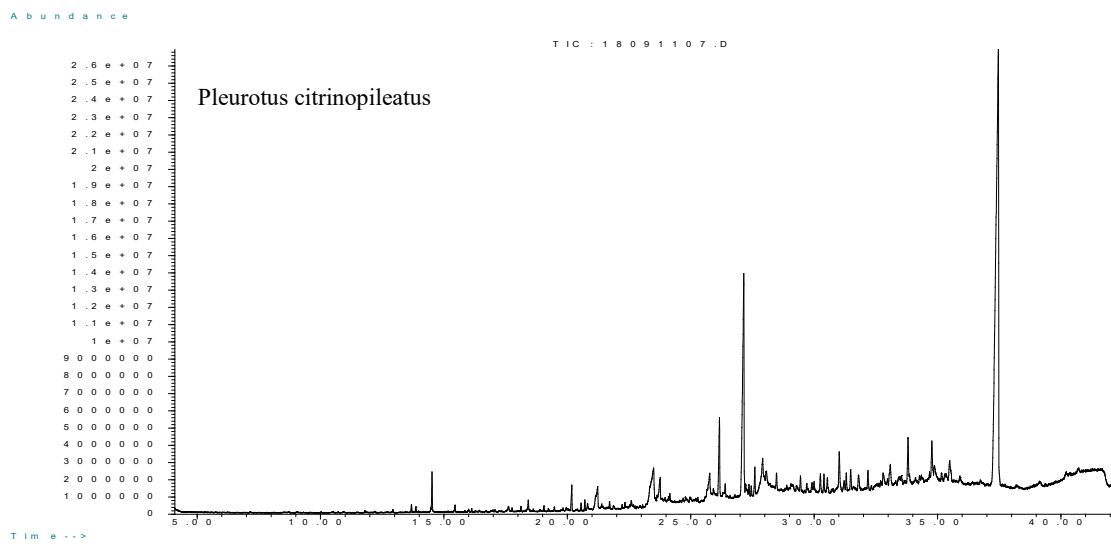
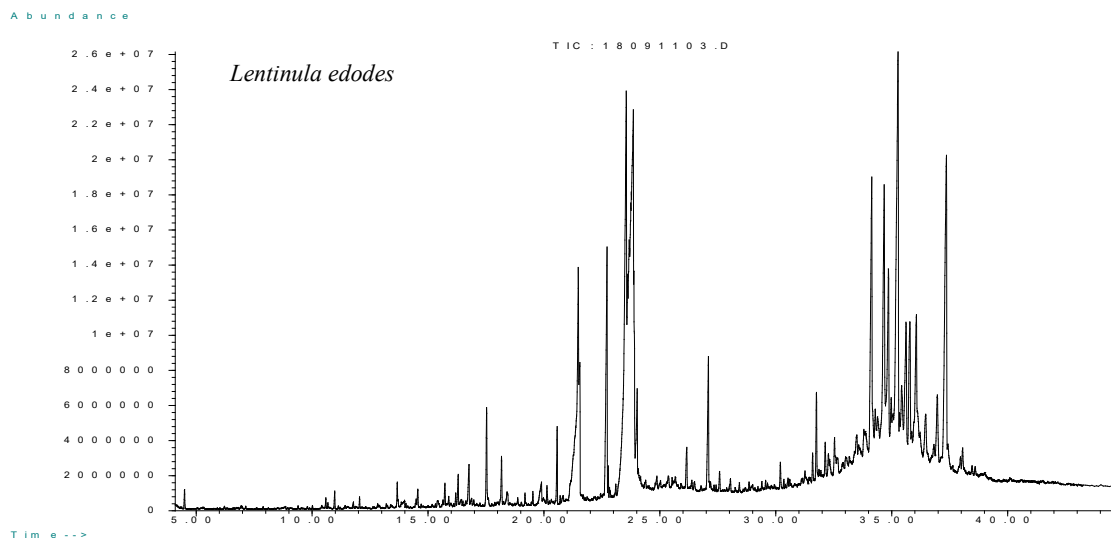
biológica sintetizados por los macrohongos son los ácidos grasos y los compuestos con carácter triterpenoidal los que exhiben las acciones antes mencionadas. Lo anterior hizo que el estudio químico se centrara en la fracción grasa de los hongos evaluados.

En lo referente al tiempo de colonización del micelio en el sustrato (corteza de *Pinus patula*) los resultados presentados en el capítulo anterior permitieron muy fácilmente la selección del hongo considerando este aspecto. Con respecto a la producción de bioactivos de baja polaridad (fracción grasa) la selección se realizó mediante la observación de los respectivos cromatogramas de gases (Fig. 3.6), analizando las zonas correspondientes a los ácidos grasos (tr entre 20 y 26 min.) y a los compuestos triterpenoidales, específicamente esteroides y triterpenoides tetracíclicos (tr entre 30 y 40 min.). La determinación estructural de estos compuestos, diecisiete en total (Tabla 3.5), realizada con base en los picos diagnósticos presentes en sus espectros de masas (ANEXO A) permitió corroborar, utilizando como indicador de la capacidad como mediador la producción de los bioactivos de interés y la concentración de los mismos (Grafica 3-1), que es el *P. ostreatus* Var. *Colombinus* el macromicete con mayor potencial para mediar en procesos de bio-endurecimiento.

Figura 3-6: Cromatogramas de Gases de la fracción grasa de los hongos evaluados.



92 Estudio de la factibilidad del empleo de Hongos Macromicetos como mediadores en el bio-endurecimiento de Plántulas de orquídea



Gráfica 3-1. Contenido (%) de los metabolitos de baja polaridad en cada uno de los hongos estudiados.

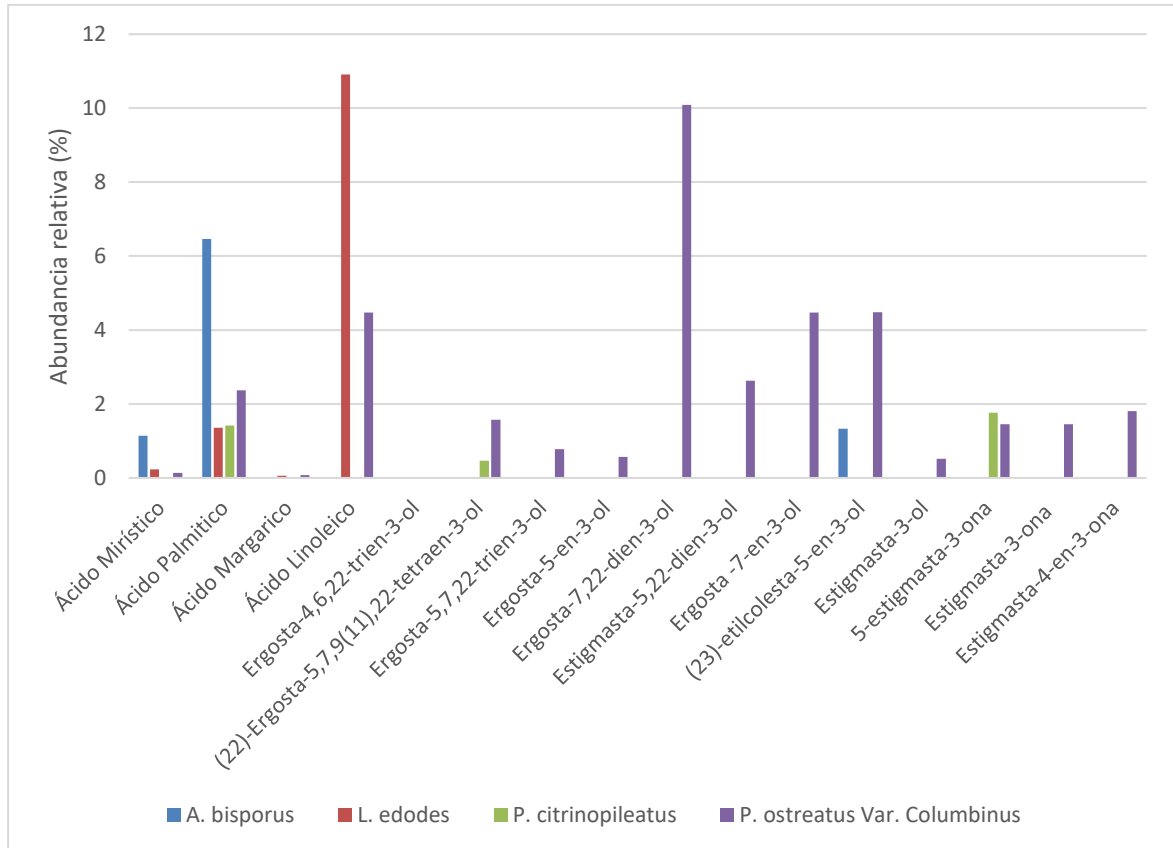


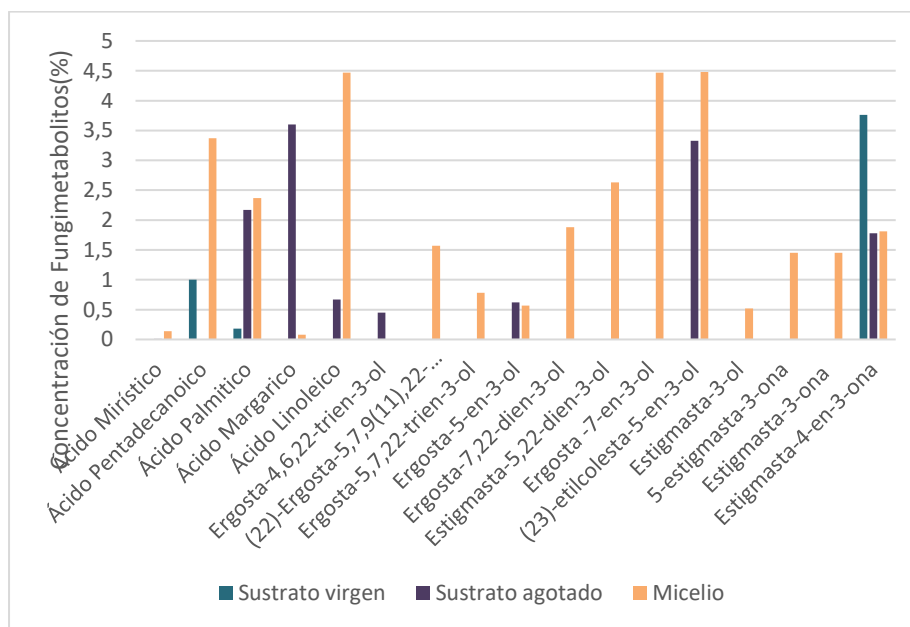
Tabla 3-5: Compuestos constituyentes de la fracción grasa y sus fragmentaciones características en Espectrometría de Masas.

No.	Nombre del compuesto	Tr	M+	Fórmula condensada	Fragmentos característicos
1	Ácido Mirístico	18,4	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	(M+) 228, (M+-CH ₃ -CH ₂) 199, (M+-CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂) 157, (arreglo de Mclaferty) 60
2	Ácido Palmítico	21,2	256	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	(M+) 256, (M+-CH ₃) 241, (M+-CH ₂ -CH ₂) 213, (arreglo de Mclaferty) 60
3	Ácido Margárico	22,4	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	(M+) 270, (M+-CH ₃ -CH ₂) 241, 8M+-CH ₃ -CH ₂ -CH ₂) 227, (arreglo de Mclaferty) 60
4	Ácido Linoleico	23,6	280	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	(M+) 228, (M+-CH ₃ -CH ₂) 199, (M+-CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂) 157, (arreglo de Mclaferty) 60
5	(22)-Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol	33,5	394	C ₂₈ H ₄₂	(M+-H ₂ O) 376, (M+-CH ₃) ₄ 335, (M+-H ₂ O-Cadena lateral) 238
6	Ergosta-4,6,22-trien-3-ol	33,1	396	C ₂₈ H ₄₄ O	(M+) 396, (M+-CH ₃) 381, (M+-CH ₃ -OH) 363, (M+-H ₂ O-Cadena lateral) 253
7	Ergosta-5,7,22-trien-3-ol	33,8	396	C ₂₈ H ₄₄ O	(M+) 396, (M+-CH ₃) 381, (M+-CH ₃ -OH) 363, (M+-H ₂ O-Cadena lateral) 253
8	Ergosta-7,22-dien-3-ol	34,1	398	C ₂₈ H ₄₆	(M+-H ₂ O) 382, ((M+-CH ₃) ₄) 340, (M+-H ₂ O-Cadena lateral) 255.
9	Ergosta-5-en-3-ol	34,03	400	C ₂₈ H ₄₈ O	(M+-H ₂ O) 382, ((M+-CH ₃) ₄) 340, (M+-H ₂ O-Cadena lateral) 255
10	Estigmasta-4-en-3-ona	35,9	412	C ₂₉ H ₄₈ O	(M+) 412, (M+-cadena lateral) 271, (M+-CH ₃) 397, (M+-Fisión anillo D) 229.
11	(23)-ethylcholest-5-en-3-ol	34,8	414	C ₂₉ H ₅₀ O	(M+-H ₂ O) 396, (M+-CH ₃) ₃ -CH ₂) 355, (M+-H ₂ O-Cadena lateral) 262
12	5-estigmasta-3-ona	35,2	414	C ₂₉ H ₅₀ O	(M+) 414, (M+-cadena lateral) 273, (M+-CH ₃) 399, (M+-Fisión anillo D) 231.

3.7.2 Estudio comparativo de los fungimetabolitos de baja polaridad

Dado que, con base en la viabilidad de las plántulas en el co-cultivo y la producción de bioactivos, ya se había concluido que el hongo con el mayor potencial para ser empleado en bio-endurecimiento es *P. ostreatus* Var. Columbinus, se procedió al análisis comparativo de los metabolitos presentes en las tres matrices (micelio, sustrato virgen y sustrato agotado), con la finalidad de determinar cuáles son los metabolitos excretados por el hongo que pueden ser los responsables del resultado obtenido en el bio- proceso. Al efectuar la correlación de los metabolitos determinados en la fracción grasa de cada matriz, así como de su contenido (Gráfica 3-2) se ven claramente diferencias, ya que se presentan algunos metabolitos comunes en las tres matrices mientras que otros son propios de una determinada matriz.

Gráfica 3-2. Contenido de metabolitos secundarios de baja polaridad en las tres matrices analizadas.



Con relación a los ácidos grasos, los ácidos linoleico, margárico y mirístico están presentes tanto en el micelio como en el sustrato agotado más no en el sustrato virgen, lo que permite inferir que el micelio está excretando estos metabolitos. Por otro lado, está el caso del ácido palmítico, el cual se encuentra en las 3 matrices, pero su concentración comparada con sustrato virgen es 13 veces mayor en el caso del micelio y 12 veces mayor en el caso del sustrato agotado, lo que permite deducir que una parte importante de ese ácido graso está siendo excretado por el micelio, enriqueciendo funcionalmente el sustrato.

Hay que tener en cuenta que en lo referente a los metabolitos de carácter triterpenoidal la corteza de pino contiene Estigmasta-4-en-3-ona y se nota la ausencia de esteroides como el β -sitosterol y el hidroxil- β -sitosterol común a la mayoría de los pinos (Valentín *et al.*, 2010).

Por otro lado, el ergosta-4,6,22-trien-3-ol fue determinado únicamente en el sustrato agotado, hecho que establece que este metabolito fue excretado en su totalidad por el micelio hacia el sustrato. Para el caso del ergosta-5-en-3-ol y el (23)-etilcolesta-5-en-3-ol, estos fueron detectados tanto en micelio como en el sustrato agotado, pero no en el sustrato virgen. Lo anterior indica que dichos compuestos fueron producidos por el hongo y excretados al sustrato.

En este punto se puede concluir que los fungimetabolitos excretados por el hongo al sustrato corresponden a los ácidos linoleico, margárico y palmítico y los compuestos triterpenoidales ergosta-5-en-3-ol, (23)-etilcolesta-5-en-3-ol y ergosta-4,6,22-trien-3-ol, posicionándolos como posibles mediadores en el bio-endurecimiento. Retomando el hecho de que las plántulas no fueron atacadas por fitopatógenos cabe aquí el revisar las bioacciones presentadas por los metabolitos antes indicados con el objetivo de determinar si ellos son los responsables del efecto presentado en el bio-proceso.

En este orden de ideas se tiene que el ácido linoleico está reportado con actividad biocida contra bacterias y como inhibidor del desarrollo de hongos fitopatógenos como lo son *Alternaria solani* y *Fusarium oxysporum* (Liu *et al.*, 2008), hongos fitopatógenos generalistas de orquídeas y en el caso particular de *F. oxysporum* una de las principales causas de pérdida de orquídeas comerciales del género *Cattleya* (Pedroso-de-moraes *et*

al., 2011). A su vez, el ácido margárico exhibe actividad como inhibidor del hongo fitopatógono *Phytophthora infestans* (Liu *et al.*, 2008). Es bien conocido que múltiples especies del género *Phytophthora* son patógenas importantes en orquídeas, especialmente para especies de híbridos del género *Cattleya* (Tsai *et al.*, 2006), es importante mencionar que el híbrido evaluado en el ensayo de bio-endurecimiento con macro hongos LC Irene Finney pertenece al generó *Cattleya*.

En cuanto al ácido palmítico también esta reportado como anti fúngico, como se aprecia en la investigación realizada por Liu *et al.* en 2008, quienes evaluaron la actividad antifúngica de ácidos grasos, dentro de los que se encontraban el ácido palmítico y el ácido linoleico, contra 4 especies fitopatogenas: *A. solani*, *C. lagenarium*, *F. oxysporum* f. sp. cucumerinum y *F. oxysporum* f. sp. Lycopersici, encontrando que los ácidos grasos saturados como el palmítico, mostraron actividad antifúngica más fuerte que los ácidos grasos insaturados. Los autores sugieren que estos compuestos podrían ser aplicables para explorar enfoques alternativos en el control integrado de fitopatógenos.

Adicional a lo anterior en bioensayos realizados por otros investigadores se demostró que una mezcla de ácido palmítico con otros ácidos grasos incrementó el desarrollo de plántulas de tomate y cohombro. Con la excepción del ácido oleico, todos los ácidos evaluados por ellos demostraron tener actividad antifúngica frente al menos uno de los hongos fitopatógenos ensayados, siendo la actividad más fuerte la presentada por el ácido palmítico (Bae *et al.*, 2013).

Otros estudios también han reportado que el ácido margárico, exhibe actividad inhibitoria contra el hongo fitopatógono *Phytophthora infestans* (Liu *et al.*, 2008) y afecta el crecimiento y germinación de una amplia gama de hongos(Avis and Bélanger, 2001).

De acuerdo con lo anterior la presencia de los ácidos palmítico, linoleico y margárico en el sustrato agotado puede contribuir a generar un entorno libre de patógenos fúngicos, o por lo menos a restringir el desarrollo de algunos trascendentales en el cultivo de orquídeas.

Con relación a los compuestos triterpenoidales el (23)-etilcolest-5-en-3-ol es un esteroles con actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* y

Escherichia coli (Yusoff *et al.*, 2017). Por otro lado el Ergost-5-en-3-ol también ha sido reportado por tener actividad antimicrobiana (Mujeeb, Bajpai and Pathak, 2014; Jebastella and M, 2015).

Arditti y colaboradores, a partir de extractos de pseudobulbos infectados con *Risooctonia repens* (hongo endófito de orquídeas), demostraron una relación entre la producción de fitoalexinas y la presencia de esteroides, entre ellos el ergosta-5-en-3-ol. Los autores evaluaron la actividad antifúngica de una mezcla entre ergosta-5-en-3-ol y otros esteroides y encontraron inhibición en la infección y desarrollo de *Candida lipolytica* y *Saccharomyces cerevisia*, ambos organismos modelo utilizados para medir actividad antifúngica (Arditti *et al.*, 1975).

Aunque no se encontraron reportes sobre la actividad biológica de ergosta-4,6,22-trien-3-ol, cabe mencionarlo, aún sin confirmar su función, ya que fue excretado hacia el sustrato por el hongo.

De acuerdo con lo anterior, para el caso particular de los metabolitos de carácter triterpenoidal, el (23)-etilcolest-5-en-3-ol y el ergosta-5-en-3-ol, dadas sus actividades biológicas antes mencionadas, pueden estar atacando posibles patógenos de las plántulas de orquídeas. Esto, sumado con las bio-acciones reportadas para los ácidos grasos dan las bases para confirmar la hipótesis de que estos fungimetabolitos, excretados por el hongo al sustrato, son los de mayor potencial para ser considerados como unos de los responsables de los excelentes resultados observados durante el proceso de bio-endurecimiento realizado.

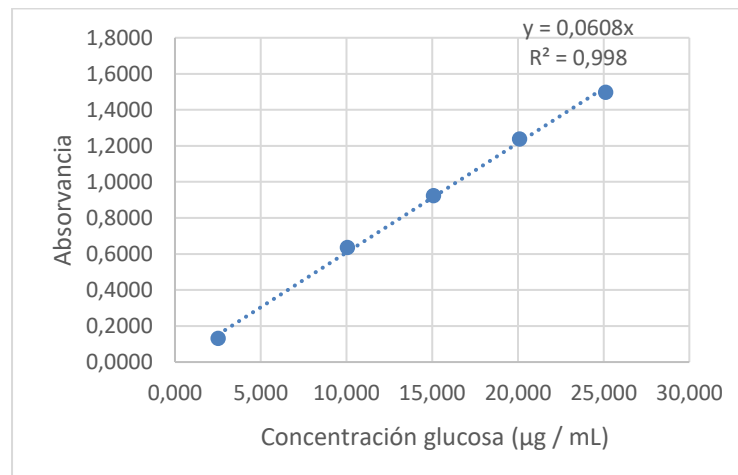
En este punto no debe dejarse de lado que si bien los exo-metabolitos como tales ejercen su acción antibacteriana y antifúngica, la misma malla micelial del hongo actúa como una barrera física, impidiendo que en el lugar ocupado por ella sea colonizado por otros microorganismos potencialmente perjudiciales para las plántulas.

3.7.3 Cuantificación de carbohidratos totales y β -glucanos

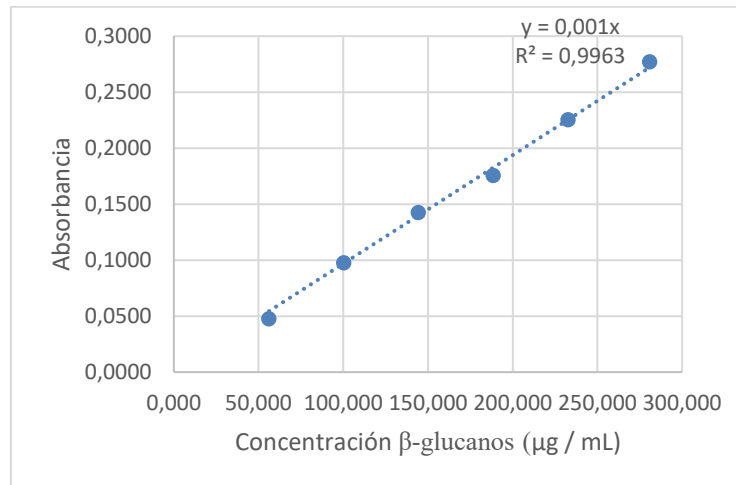
En este punto es necesario hacer la claridad de que los carbohidratos totales corresponden a los exopolisacáridos (EPS) que son aquellos excretados por el hongo y por lo tanto aportados al sustrato y utilizables por las plántulas y los intrapolisacáridos (IPS) que forman parte de la biomasa del hongo y no aprovechables por las plántulas. La misma apreciación se tiene para los β -glucanos.

Como se indicó la cuantificación de los carbohidratos totales y β -glucanos se efectuó colorimétricamente mediante el empleo de curvas de calibración con glucosa y β -glucanos respectivamente (Gráficas 3-3 y 3-4.).

Gráfica 3-3. Curva de Calibración para Glucosa por el método de Dubois.

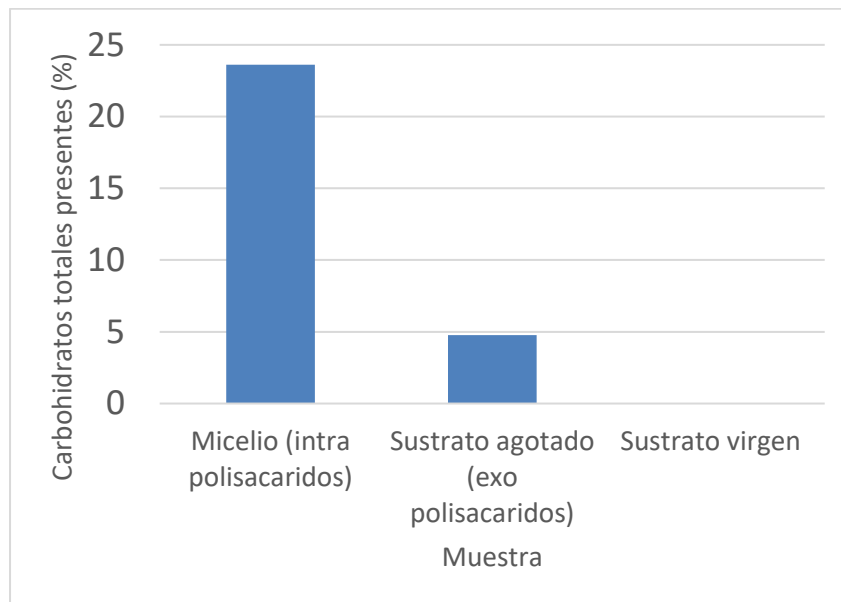


Gráfica 3-4. Curva de Calibración para β -glucanos por el método de Nitschke modificado.

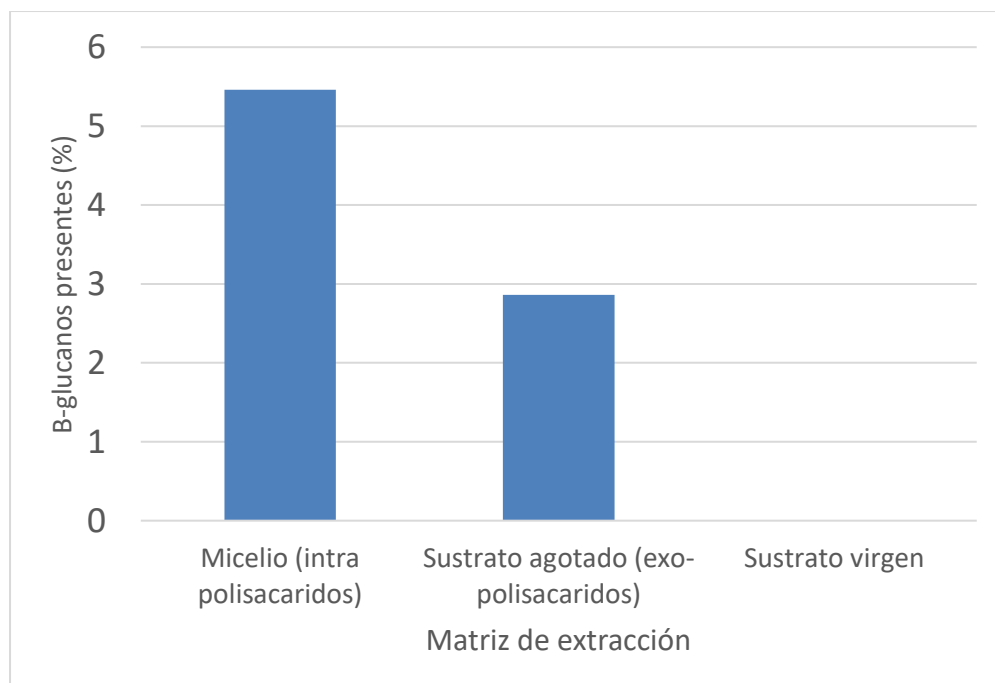


Para el caso de los carbohidratos totales presentes en el extracto de micelio, sustrato virgen y sustrato agotado los valores de concentración en porcentaje se presentan en la gráfica 3-5, mientras que los valores obtenidos en porcentaje de β -glucanos están consignados en la gráfica 3-6.

Gráfica 3-5. Contenido de carbohidratos totales en las tres matrices.



Gráfica 3-6. Contenido de β -glucanos en las tres matrices.



Del análisis de las gráficas anteriores se deduce fácilmente que el micelio aportó carbohidratos al sustrato en una concentración total del 4,76% de los cuales el contenido de β - glucanos corresponde a 2,86%. Cabe aquí anotar que estos compuestos estaban ausentes en el sustrato de corteza de pino, lo que permite ver que fueron excretados desde el micelio al sustrato agotado.

Es bien conocido que de forma natural las raíces de las plantas toman sustancias por medio de sus raíces cuando crecen en cultivos tradicionales (Yamada *et al.*, 2011) o *In vitro* (Hew and Mah, 1989), lo que les permite obtener compuestos importantes para su desarrollo del sustrato en el cual se cultiven.

En este orden de ideas se puede afirmar que las plántulas de orquídea, que están desarrollándose sobre el sustrato micogenizado poseen la capacidad de absorber algunos de los metabolitos excretados por el hongo al sustrato, dentro de los cuales están los carbohidratos, compuestos que se constituyen, en primera instancia, como fuente de carbono complementaria a la obtenida por la fotosíntesis propia de las plántulas, contribuyendo al proceso de adaptación y desarrollo de las mismas. De igual manera los azúcares excretados por el hongo pueden incidir en forma directa en la microfauna presente en el entorno natural, la cual inevitablemente termina por colonizar el sustrato en el cual se desarrollaron las plántulas, propiciando un entorno que evidentemente (basándose en la salud de las plántulas obtenidas durante el bio-ensayo) es propicio para el desarrollo de las orquídeas evaluadas, debido posiblemente al crecimiento de cianobacterias de los géneros *Anabaena*, *Nostoc*, *Scytonema* y *Calothrix*, de las cuales a pesar de que no hay muchos estudios han sido aisladas a partir de raíces de orquídeas y se cree que pueden influir en la fijación de nitrógeno y ocupar nichos disponibles a potenciales patógenos (Tsavkelova, 2011). No se debe dejar de lado la aparición de bacterias de los géneros *Bacillus*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Pantoea* entre otras. Estas bacterias han demostrado tener una alta especificidad y su ecología sobre o dentro del tejido de las orquídeas ha sido descrita como compleja y dinámica. Adicionalmente, estas bacterias son conocidas por producir altas cantidades de sustancias reguladoras del crecimiento de plantas, en especial auxinas, lo que puede estar mediando en su función

benéfica. Por otro lado metabolizan algunas sustancias fitotóxicas que producen las cianobacterias presentes en las raíces de las orquídeas (Tsavkelova, 2011).

De otra mano, ya que una parte importante de los carbohidratos excretados por el hongo fueron β -glucanos, cabe hablar un poco sobre las acciones que este tipo de polisacáridos producen sobre las plantas. En estudios efectuados sobre plantas inoculadas con bacterias productoras β -glucanos se encontró que estos metabolitos exhiben actividad como elicitores de la resistencia de plantas, efecto atribuido a que los B-glucanos bacterianos manipulan la producción de señales fito-hormonales incrementando el desarrollo del sistema radicular en comparación con plantas sin inoculo. De igual manera se reportó una mayor producción de biomasa en las plantas inoculadas, efecto conectado con un cambio en el potencial osmótico del sistema raíz-suelo-agua (Ashraf, Hasnain and Berge, 2006) producido por los β -glucanos, que se puede ver traducido a un efecto de tolerancia general a estrés hídrico y/o salino. Un efecto similar se evidenció con β -glucanos provenientes de micorrizas, corroborando la posibilidad de un cambio en cuanto al potencial osmótico del sistema raíz-suelo, posibilitando extrapolar este efecto benéfico a un caso de estrés hídrico, no solo en casos de salinidad en suelos, sino inclusive por pérdida de agua en general, como es el caso durante la adaptación de plántulas de orquídea propagadas *In vitro* (Feng *et al.*, 2002). Los conceptos antes expuestos proporcionarían una explicación plausible a la no desecación de las plántulas cultivadas en sustrato micogenizado evidenciada en el proceso de bio-endurecimiento efectuado en la investigación presentada en este documento.

Así mismo, se encuentran investigaciones que han arrojado como resultado que los β -glucanos pueden actuar como reguladores de la susceptibilidad de las plantas a patogenicidad de hongos y virus, como es el caso del hongo fitopatógeno *Phytophthora infestans* y que dicho efecto es debido a una estimulación temprana de los mecanismos de defensa de las plantas relacionado con un sistema de señalización mediado por los β -glucanos del hongo. De acuerdo con lo anterior, algunos β -glucanos y específicamente β -glucanos fúngicos pueden actuar como elicitores desatando una señal temprana en las plantas estimulando la producción de fitoalexinas, las cuales disminuyen la virulencia del patógeno en la planta (Andreu *et al.*, 1998) (Singh, Wood and Hodgson, 1970). Se ha demostrado que además los elicitores fúngicos inducen la síntesis rápida de ácido salicílico

mejorado las actividades intercelulares de quitinasas y glucanasas produciendo activación de la resistencia a los patógenos(Sathiyabama and Balasubramanian, 2018),

Con la certeza de que los β -glucanos fúngicos son elicitores de la producción de fitoalexinas(Mithofer *et al.*, 1996) y de la biosíntesis de AAS y de que las plantas son capaces de absorber tanto los β -glucanos como otros carbohidratos excretados al sustrato agotado por el hongo(Jones, Hodge and Kuzyakov, 2004) es más que predecible que dichos fungi-exo-metabolitos son mediadores en el proceso de adaptación de las plántulas durante el proceso de endurecimiento y aún más, que pueden ser benéficos, no solo durante el proceso de aclimatación, sino durante todo su desarrollo.

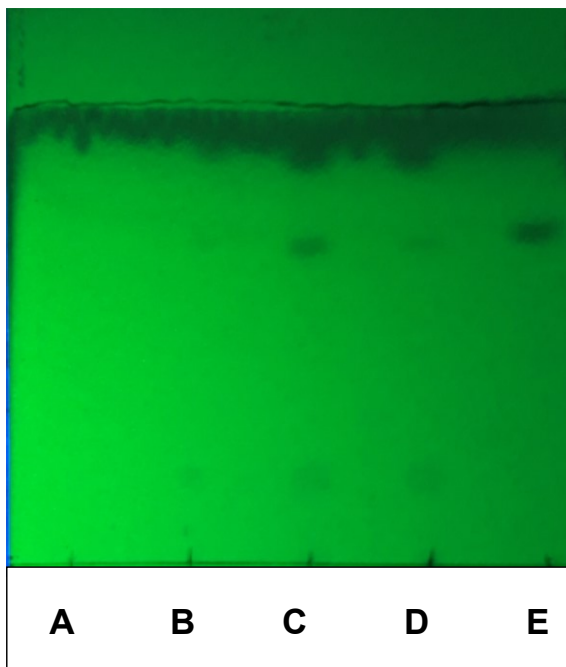
3.7.4 Detección y cuantificación de fitohormonas

Los extractos obtenidos mediante la aplicación del método de Ünyayar et al modificado se analizaron por dos técnicas: cromatografía en capa delegada (CCD) y espectroscopia Ultravioleta. La CCD se utilizó para hacer una identificación cualitativa del tipo de fitohormona presente y la espectroscopia para la determinación cuantitativa de las fitohormonas detectadas por la técnica anterior, mediante la determinación de las λ_{\max} para los patrones de AIA (auxina) y ácido giberélico (giberelina) y las posteriores curvas de calibración para los mismos.

- Detección de fitohormonas por CCD

El estudio cromatográfico por CCD permitió, mediante co-cromatografía con patrones, determinar la presencia y / o ausencia de fitohormonas en las matrices. La figura 3-7 permite observar que el extracto de micelio y sustrato agotado contienen Auxinas, específicamente AIA, mientras que en el del sustrato virgen dicho compuesto está ausente.

Figura 3-7: Cromatograma correspondiente a los extractos de las diferentes matrices estudiadas.



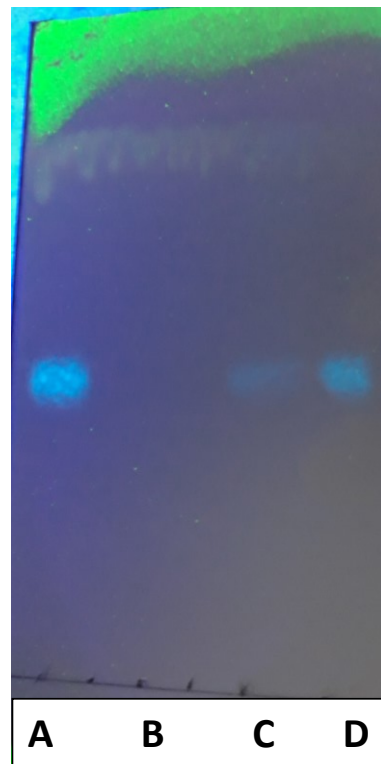
A) Patrón de ácido giberélico Phytotechlab para cultivo de tejidos de plantas. **B)** Extracto de Sustrato virgen. **C)** Extracto de micelio de *P. ostreatus* Var. *Columbinus*. **D)** Extracto de Sustrato agotado. **E)** Patrón de Ácido Indol acético de Phytotechlab para cultivo de tejidos. Solvente: Ácido acético: Acetato de etilo : Cloroformo (2:3:5).

Con base en el hecho de que el extracto de sustrato virgen no presentó mancha con el Rf del AIA se deduce claramente que esta fitohormona está siendo sintetizada por el micelio del hongo y excretada al sustrato.

Dado que el patrón del AG₃ no es visible bajo la longitud de onda de 254 nm y requiere de un pretratamiento para absorber a dicha longitud de onda (MacMillan and Suter, 1963; Díaz *et al.*, 2013), se procedió a realizar un nuevo cromatograma y asperjarlo con ácido sulfúrico en solución etanólica. Después del calentamiento requerido, como se indicó en la metodología, se hicieron visibles al UV las manchas correspondientes al AG₃. La observación del cromatograma permitió determinar la presencia del AG₃ en los extractos de micelio y sustrato agotado, pero no en el extracto de sustrato virgen (Figura 3-8). Adicionalmente, de la inspección visual de la intensidad de las manchas para cada una de las fitohormonas, teniendo presente que se aplicaron con la misma concentración tanto los

extractos como los patrones, se deduce con facilidad que es mayor el contenido en micelio que en sustrato agotado.

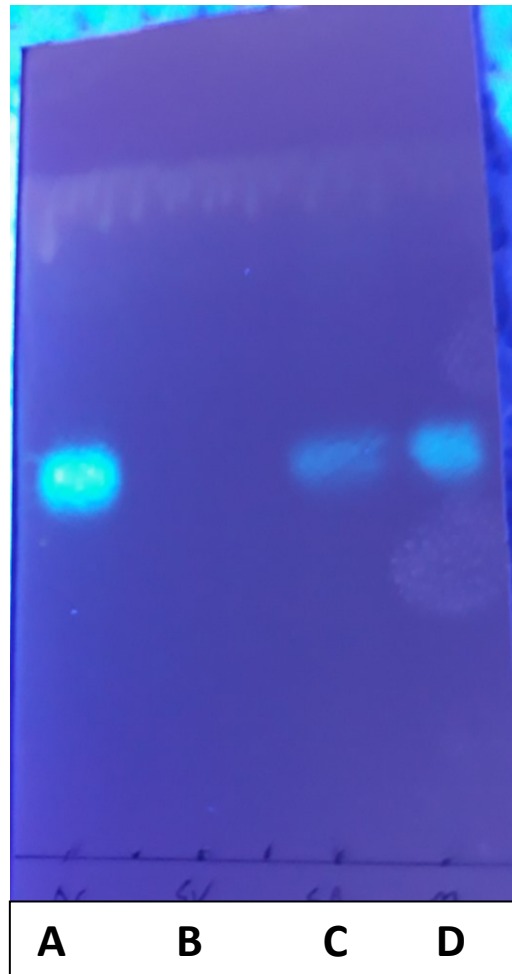
Figura 3-8: Cromatograma correspondiente a los extractos de las diferentes matrices estudiadas revelado con Luz UV 254 nm con pretratamiento.



A) Patrón de ácido giberélico Phytotechlab para cultivo de tejidos de plantas. **B)** Extracto de Sustrato virgen. **C)** Extracto de Sustrato agotado. **D)** Extracto de micelio de *P. ostreatus* Var. Columbinus. Solvente: Ácido acético: Acetato de etilo: Cloroformo (2:3:5).

El mismo cromatograma fue observado bajo UV de 365 nm y se corroboraron las manchas lo cual puede observarse en la figura 3-9.

Figura 3-9: Cromatograma correspondiente a los extractos de las diferentes matrices estudiadas revelado con Luz UV 365 nm con pretratamiento.



A) Patrón de ácido giberélico Phytotechlab para cultivo de tejidos de plantas. **B)** Extracto de Sustrato virgen. **C)** Extracto de Sustrato agotado. **D)** Extracto de micelio de *P. ostreatus* Var. Columbinus.

Las giberelinas que poseen un grupo C₇-hidroxilo presentan una mancha azul bajo ambas longitudes de onda (MacMillan and Suter, 1963) como es el caso del patrón empleado (AG₃) y de la fitohormona presente en los extractos de micelio y sustrato agotado.

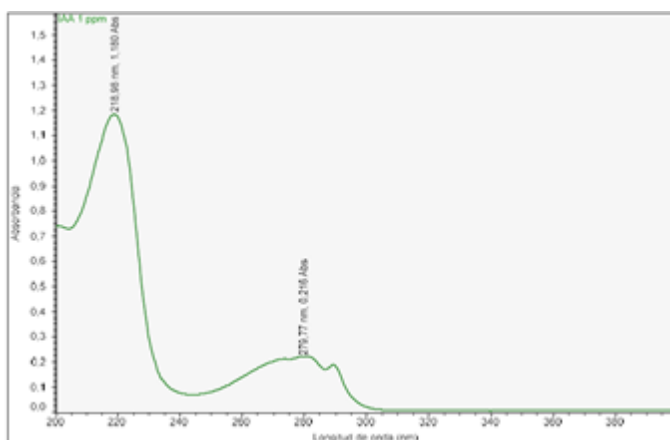
- Espectrometría UV de fitohormonas

Para realizar la cuantificación de las fitohormonas detectadas en los diferentes extractos se efectuó el barrido entre 200 y 380 nm., para cada uno de los patrones (AIA y AG₃)

empleados en el ensayo, con la finalidad de determinar los picos de máxima absorción para cada fitohormona y efectuar la posterior cuantificación de ellas en los extractos.

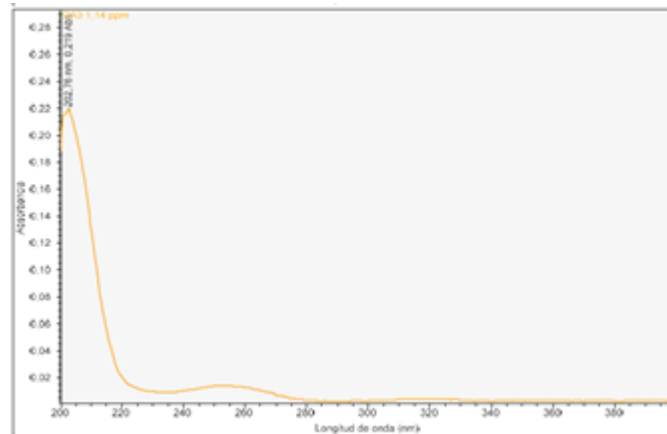
Como puede observarse en la gráfica 3-7 el AIA presentó 2 picos, uno a 219 nm y otro a 280 nm. Si bien el primero corresponde a la λ_{\max} , para la cuantificación se tomó la λ de 280 nm que corresponde al pico generado por la absorción del grupo indólico (transiciones de los enlaces $\pi \rightarrow \pi^*$), que es el más característico de las giberelinas (Valderrama et al., 2017), motivo por el cual es el utilizado generalmente (Sundeberg, Sandberg and Crozier, 1986; Mori *et al.*, 2017)

Gráfica 3-7. Espectro UV del AIA (1 ppm en metanol) obtenido por barrido entre 200 y 380 nm.



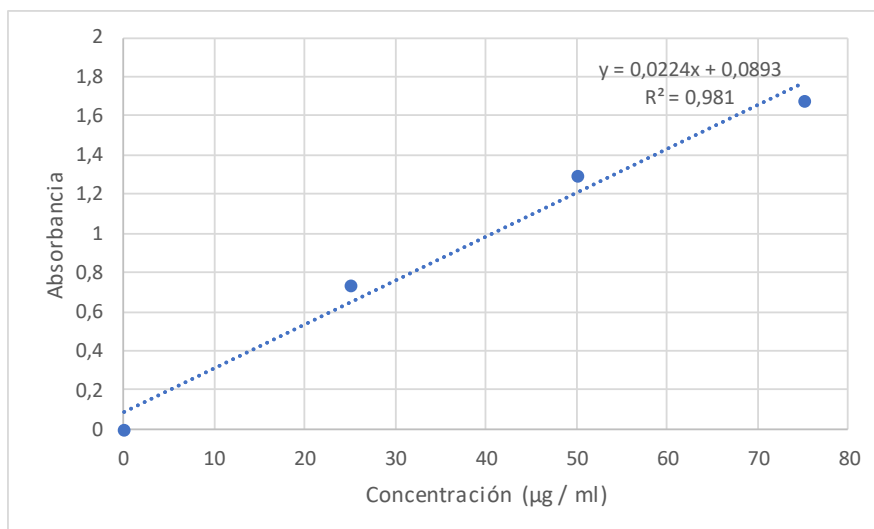
En la gráfica 3-8 se ve que el AG₃ presenta una λ_{\max} a 203 nm.

Gráfica 3-8. Espectro UV del AG₃ (1 ppm en metanol) obtenido por barrido entre 200 y 380 nm.

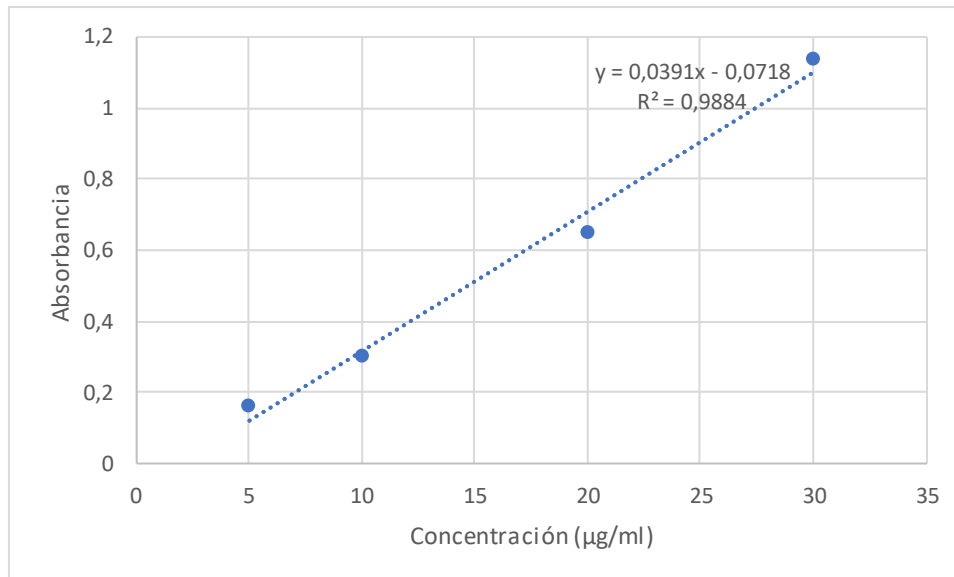


Habiendo definido los picos de máxima absorción para cada fitohormona se procedió a hacer las curvas de calibración a 280 nm para AIA y 203 nm para AG₃.(Gráficas 3-9 y 3-10).

Gráfica 3-9. Curva de calibración de absorbancia a 203 nm con 4 concentraciones de patrón de AG₃.



Gráfica. 3-10. Curva de calibración de absorbancia a 280 nm con 4 concentraciones de patrón de AIA.



Como resultado de la cuantificación de las fitohormonas en los extractos de las matrices que las contienen (tablas 3-6 y 3-7) se encontró que en ambos casos el extracto de micelio presentó concentraciones levemente mayores que el extracto del sustrato agotado, lo que se correlaciona totalmente con lo inicialmente observado en los cromatogramas en capa delgada.

Tabla 3-6: Absorbancia y concentración a 203 nm de las tres matrices evaluadas.

Muestra	Absorbancia promedio	Concentración según absorbancia (µg / ml)	Extracto Peso seco (mg)	Peso seco muestra (g)	Concentración en peso seco de muestra (µg / mg)
Sustrato agotado	3,940	176,0	25	9,388	4,686
Micelio	4,000	178,7	21	7,651	4,904
Sustrato virgen	0	0	10,2	10	0

Tabla 3-7: Absorbancia y concentración a 280 nm de las tres matrices evaluadas.

Muestra	Absorbancia promedio	Concentración según absorbancia (ug/ml)	Peso extracto seco (mg)	Peso seco muestra (g)	Concentración en peso seco de muestra (µg / mg)
Sustrato agotado	3,142	80,4	25	9,388	2,142
Micelio	3,193	81,7	21	7,651	2,243
Sustrato virgen	0	0	10,2	10	0

Al comparar las concentraciones obtenidas en este estudio con las reportadas por Türker en el 2005 podemos apreciar que, en el caso de las giberelinas, la concentración obtenida es marcadamente menor que la reportada para *P. ostreatus* (4.9 µg / mg y 30 µg / mg respectivamente), mientras que para el caso del AIA la concentración obtenida en este estudio fue mayor que la reportada por Türker (2.24 µg / mg y 0.18 µg / mg respectivamente). Es importante indicar que los extractos que utilizó Türker fueron obtenidos a partir de carpóforos colectados en bosques o comprados en mercados, mientras que los extractos obtenidos en este estudio fueron obtenidos a partir de micelio crecido sobre corteza de pino. De manera general es aceptado que la producción de metabolitos secundarios es dependiente tanto de las condiciones ambientales en las que se desarrollan los organismos (Gutiérrez-Lomelí *et al.*, 2012) como del estadio de desarrollo, siendo este hecho especialmente marcado para hongos (Chegwin-Angarita and Nieto-Ramírez, 2014), lo que permite explicar las diferencias entre las concentraciones reportadas y las determinadas en este estudio.

Las principales investigaciones sobre estas sustancias han sido ensayos biológicos donde plantas o tejidos de plantas son sometidos a tratamientos con estas sustancias (Brenner, 1981). Por otro lado, mediante protocolos de cultivo de tejidos de plantas es posible afirmar que estas sustancias presentan actividad inclusive en muy bajas concentraciones y pueden pasar de ser estimuladoras del desarrollo (a bajas concentraciones) a ser inhibidoras del mismo (a altas concentraciones)(Gaspar *et al.*, 1996). Lo anterior se

menciona para visualizar más fácilmente que, aunque parecen concentraciones muy bajas de las sustancias activas aportadas por el micelio al sustrato, las mismas trabajan precisamente a dichas concentraciones

En lo referente al extracto de sustrato virgen no presentó absorbancia a las longitudes de onda seleccionadas, lo cual es totalmente concordante con lo observado en las pruebas de CCD en donde ni el AIA ni el AG₃ fueron detectados, indicando que la corteza de pino empleada como sustrato para el co-cultivo de las orquídeas no contiene estas fitohormonas.

Aunque algunos investigadores brindan información sobre la presencia de fitohormonas en la corteza de árboles, por ejemplo Soriano y Bottini 1992 quienes reportan que las concentraciones de AG₃ en corteza de árbol de durazno (*Prunus persica* L.) oscilo entre 0.0025 y 0.0125 µg / g (Soriano and Bottini, 1992) y otros determinan el contenido de giberelina entre 0.5 y 1 µg / g de corteza(Dathe *et al.*, 2017), si se considerará la posibilidad de que estos compuestos formaran parte de la corteza de pino utilizada en el estudio, el tratamiento dado a este sustrato para ser empleado en el cultivo descarta la posibilidad de que las fitohormonas estén presentes, debido a que es compostada durante meses antes de ser empacada en costales y almacenada y/o transportada desde los llanos orientales de Colombia hacia (en este caso) el municipio de Chía. Posterior a su compra la corteza de pino fue esterilizada bajo presión con vapor caliente por medio de autoclave a 150 libras de presión durante 1 hora. Siendo que las giberelinas son inestables a altas temperaturas (Perea Dallos and Tirado Perea, 2011) se considera que deberían haberse degradado (Pryce, 1973).

Por otro lado, el AIA es foto lábil, Yamakawa y colaboradores reportaron en 1979 que al someter AIA durante 12 días a intensidades lumínicas de 2800 lux de luz azul el 90% de esta fitohormona se descomponía (Yamakawa *et al.*, 1979), por lo que después de haber sido compostado y volteado durante meses en el llano oriental de Colombia donde la intensidad lumínica debe ser superior a la intensidad normal de bosque tropical (debido a que es sabana) la cual se reporta que llega hasta 80,000 lux (Brinkmann, 1961), se

asumiría que dichas sustancias se encontrara ausentes, lo cual se corroboró mediante las pruebas de CCD y espectrofotometría.

El análisis de los resultados arrojados en esta parte de la investigación previamente expuestos llevó a determinar que efectivamente hay dos fitohormonas, el AG₃ y el AIA en el sustrato agotado y que dichos metabolitos son biosintetizados por el hongo y excretados en parte a la corteza de pino, la cual no los poseía, proporcionándole así características funcionales adecuadas para el endurecimiento de las plántulas.

3.8 DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

A manera de discusión general y con base en los resultados obtenidos en la investigación y presentados a lo largo de este documento fue posible comprobar como los macromicetes en general exhiben un gran potencial para fungir como mediadores en procesos de bio-endurecimiento de plántulas de orquídeas, potencial que en el caso particular del *Pleurotus ostreatus* Var. *Columbinus* es debido a la producción por parte del hongo de ácidos grasos y compuestos triterpenoidales específicos, los cuales fueron excretados al sustrato, excreción que para algunos de ellos fue parcial y total para otros, proporcionando gracias a sus bioacciones nuevas características funcionales al sustrato que al ser aprovechadas por las plántulas llevaron a un exitoso proceso de endurecimiento. Pero no sólo los metabolitos antes mencionados son los únicos responsables del resultado, sino que junto con ellos el hongo aportó exopolisacáridos y fitohormonas que intervinieron también en el bio-proceso. Es esta diversidad de fungimetabolitos lo que convierte a los macromicetes en biorremediadores integrales haciéndolos más atractivos para iniciar la implementación de una nueva y limpia tecnología si se tiene en cuenta las ventajas que el bio-endurecimiento con estos organismos presenta frente a las otras técnicas empleadas, las cuales se pueden visualizar de una manera rápida y global en la tabla 3-8.

Tabla 3-8: Comparación entre endurecimiento convencional, bio-endurecimiento reportado y bio-endurecimiento con macromycetes.

Problema de las vitro-plantas al salir a endurecimiento	Tratamiento endurecimiento convencional	Desventajas del tratamiento convencional	Tratamiento de Bio-endurecimientos reportados	Desventaja de los tratamientos de Bio-endurecimiento reportados	Bio-endurecimiento con Macromycetes	Ventaja de tratamiento con macromycetes
Deshidratación de plantas por incapacidad de cerrado de estomas	Riegos constantes y cortos, sustrato retenedor de agua, disminución de radiación solar, confinamiento en túnel	Gasto de recurso hídrico, aumento de problemas fitosanitarios relacionados a alta humedad,	Producción de auxinas para desarrollo radicular,	Estimulo a otros organismos fitopatógenos.	Formación de red micelial retenedora de humedad sin disminuir aireación del sustrato, producción de otras fitohormonas como AG3 que estimulan respuesta a estrés hídrico,	Reducción del agua requerida, estimulación de actividad de estomas,
Susceptibilidad a plagas y enfermedades	Aplicación rutinaria de agroquímicos,	Incremento en los costos, afectación ambiental, riesgo de salud de trabajadores,	Procesos de competencia, estímulo de mecanismos de defensa de la planta,	Alta especificidad huésped-hospedero, requerimientos complejos de condiciones para simbionte o acompañante.	Procesos de competencia por red micelial, producción de sustancias antifúngicas, antibacterianas y antimicrobianas (triterpenoidales, ácidos grasos), estímulo de respuesta de defensa de la planta (β -glucanos).	Reducción o reemplazo de agroquímicos, amplio rango de sustratos y condiciones de desarrollo, generalistas, Reducción de costos,
Desarrollo lento de las plantas	Aplicación de fertilizantes,	Incremento de costos, afectación ambiental por eutrofización,	Producción de fitohormonas con auxinas,	Especificidad en la relación huésped- hospedero, efecto diferencial simbiote/patógeno y riesgo biológico.	Aporte de carbohidratos al sustrato, producción de fitohormonas.	Incremento en el desarrollo de manera general,

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

De acuerdo con lo encontrado a lo largo de esta investigación los hongos macromicetos *Pleurotus ostreatus* Var. *Columbinus*, *Pleurotus citrinopileatus*, *Lentinula edodes*, *Laetiporus sulphureus* y *Agaricus bisporus*, son verdaderos agentes bio-endurecedores promisorios para orquídeas de los géneros *Cattleya*, *Miltoniopsis* y *Catasetum*, siendo el *Pleurotus ostreatus* Var. *Columbinus* el que presenta el mayor potencial para el empleo en el bio-proceso debido a su rápido crecimiento y la amplia gama de metabolitos bioactivos que biosintetizó y excretó al sustrato; constituyéndose este resultado en el primer reporte sobre el empleo de macromicetes en bio-endurecimiento.

Los fungimetabolitos que se compaginan con los resultados obtenidos en las plántulas co-cultivadas con *Pleurotus ostreatus* Var. *Columbinus* corresponden a los ácidos grasos palmítico, oleico y margárico, a los compuestos triterpenodales ergosta-5-en-3-ol y (23)-etilcolesta-5-en-3-ol junto con los exopolisacáridos y las fitohormonas AIA y AG₃, siendo el bio-endurecimiento observado consecuencia de la combinación de sus bioacciones.

La detección de los posibles mediadores y el conocimiento de sus actividades biológicas ampliamente reportadas como son antimicrobianas, fungistáticas y promotoras de crecimiento de plantas (fitohormonales) proporcionan a los macromicetes la cualidad de ser bio-endurecedores integrales, ya que ellos aportan aquellos compuestos que en las técnicas aplicadas hasta el presente provienen de diferentes fuentes.

El bio-endurecimiento mediado por macrohongos exhibe ventajas frente a las técnicas convencionales tales como evitar el uso de sustancias costosas y tóxicas (fungicidas, bactericidas e insecticidas) y disminuir el gasto del recurso hídrico. En el primer aspecto

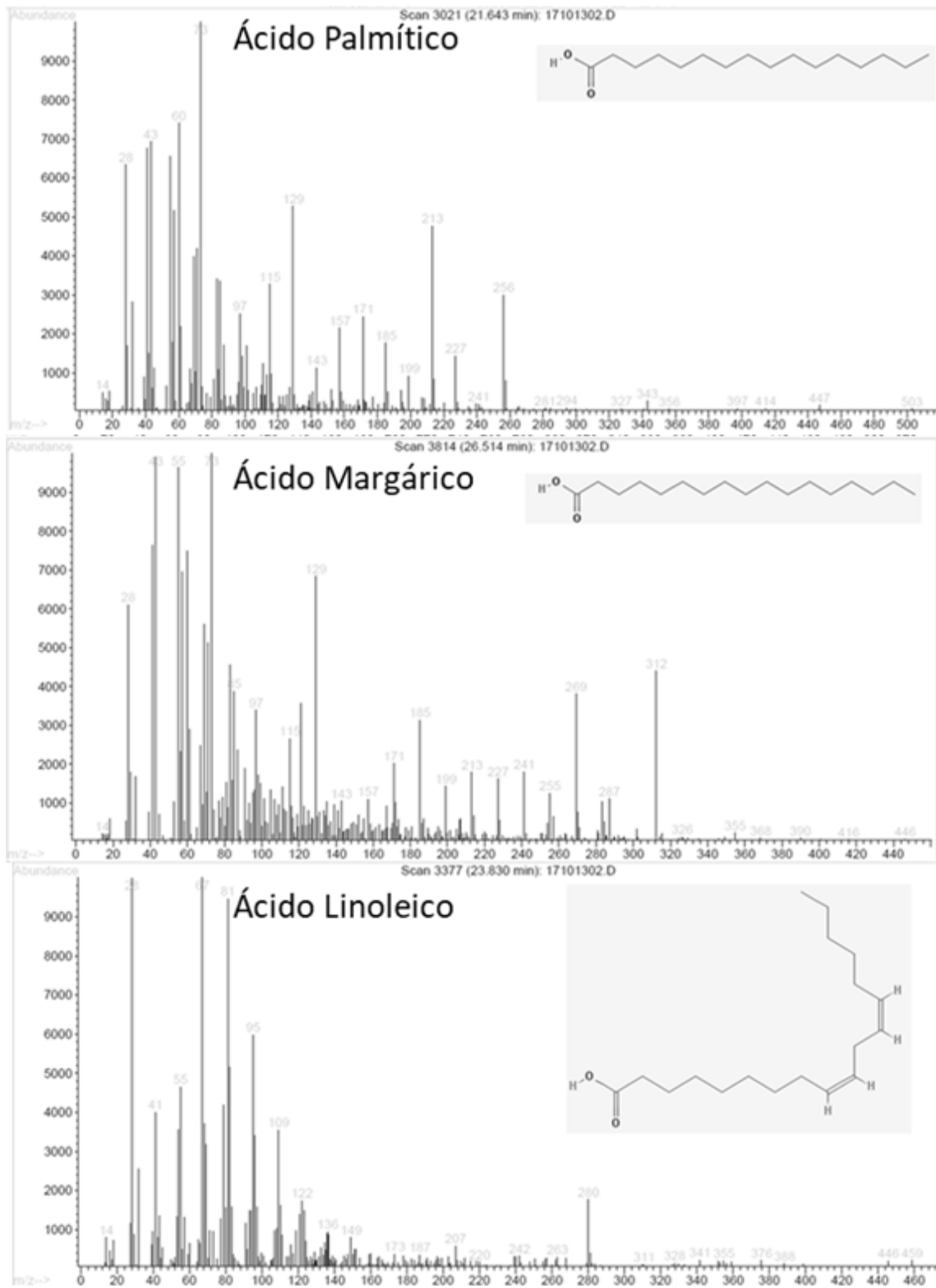
mediante la producción de antibióticos y fungistáticos y en el segundo por la acción directa de la red micelial. La unión de estas características se constituye en la base para el desarrollo de una novedosa técnica eco-amigable.

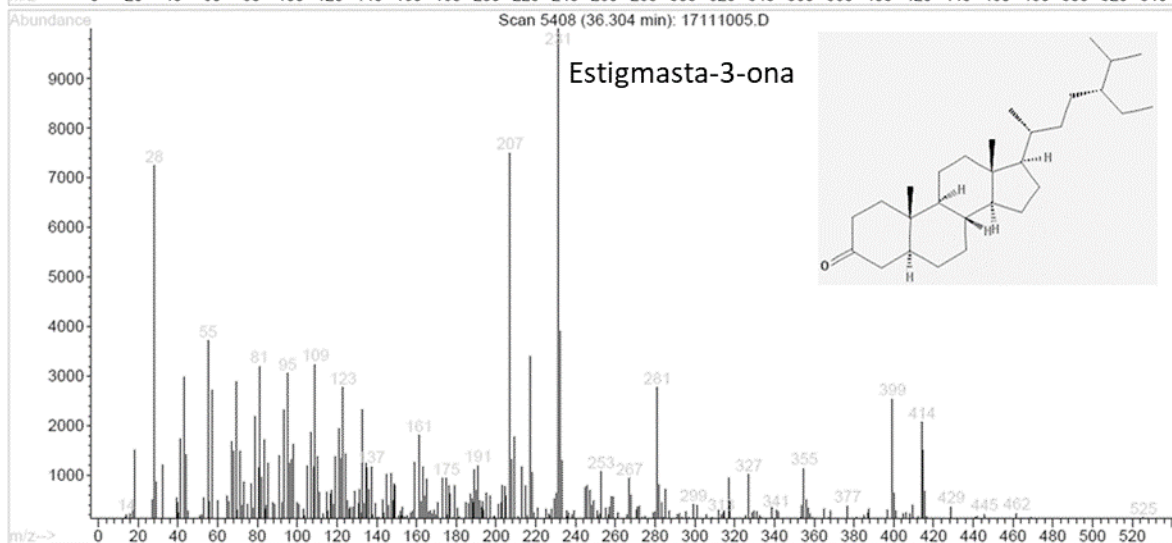
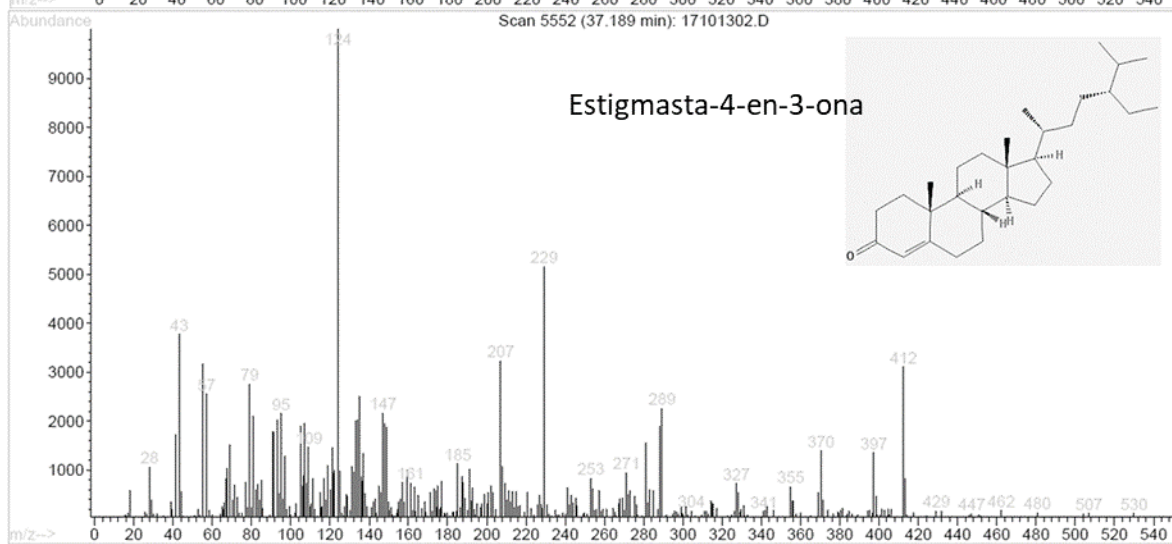
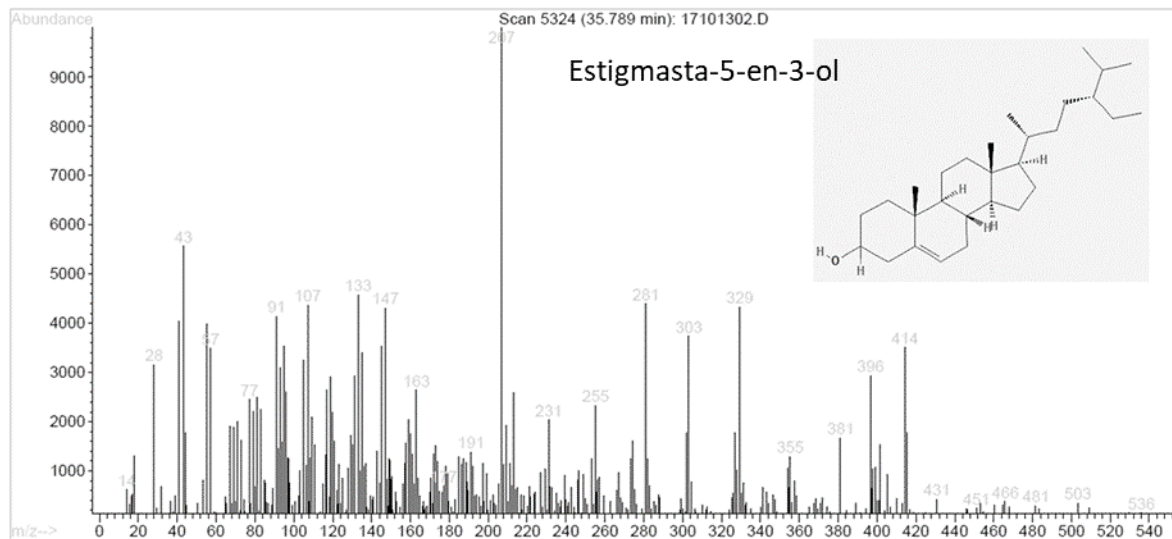
Los efectos evidenciados durante el co-cultivo fueron generales para todas las orquídeas evaluadas, lo que hace del bio-endurecimiento mediado por macromicetos un proceso con ventajas frente a las técnicas que emplean bacterias, hongos endófitos y HFM, que se caracterizan por su especificidad.

4.2 Recomendaciones

- Realizar ensayos de actividad biológica con cada uno de los extractos correspondientes a las cuatro clases de fungimetabolitos potencialmente responsables de la acción bio-endurecedora, con la finalidad de determinar cuál grupo incide en mayor proporción. El resultado obtenido permitiría seleccionar de forma más certera otros macromicetos para utilizar en el bio-proceso.
- Determinar los efectos sinérgicos de los extractos para corroborar si la acción bio-endurecedora es efectivamente el producto de la combinación de las bioacciones.
- Aplicar el proceso de co-cultivo a otras especies de orquídeas para confirmar si la técnica puede ser empleada de forma genérica.
- Determinar el potencial de los macromicetos para otras plantas de interés obtenidas por micro-propagación.

A. Anexo: Espectros de masas de metabolitos de baja polaridad.





Bibliografía

Aggarwal, S. et al. (2012) 'In vitro symbiotic seed germination and molecular characterization of associated endophytic fungi in a commercially important and endangered Indian orchid *Vanda coerulea* Griff. Ex Lindl.', *European Journal of Environmental Sciences*, 2(1), pp. 33–42. Available at: <http://www.ejes.cz/index.php/ejes/article/view/77>.

Andreu, A. et al. (1998) 'Effect of glucans from different races of *Phytophthora infestans* on defense reactions in potato tuber', *European Journal of Plant Pathology*, 104(8), pp. 777–783. doi: 10.1023/A:1008602910733.

Arditti, J. et al. (1975) 'Orchid Phytoalexins. II. Isolation and Characterization of Possible Sterol Companions', *American Journal of Botany*, 62(7), pp. 738–742.

Arditti, J. (2008) *Micropropagation of Orchids*. Second. Oxford: Publishing, Blackwell.

Ashraf, M., Hasnain, S. and Berge, O. (2006) 'Effect of exo-polysaccharides producing bacterial inoculation on growth of roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants grown in a salt-affected soil', *International Journal of Environmental Science and Technology*, 3(1), pp. 43–51. doi: 10.1007/BF03325906.

Avila, I. and Nieto, I. (2009) *Estudio de los Compuestos Polifenolicos, con Énfasis en Flavonoides, del hongo *Lentinula edodes* y Determinación de la Actividad Antioxidante*. Universidad Nacional de Colombia.

Ávila Núñez, R. et al. (2012) 'Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease', *Multiciencias*, 12(2).

Avis, T. J. and Bélanger, R. R. (2001) 'Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid cis-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*', *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), pp. 956–960. doi: 10.1128/AEM.67.2.956-960.2001.

Bae, I, Y. et al. (2013) 'Correlation of branching structure of mushroom β -glucan with its physiological activities', *Food Research International*, 51, pp. 195–200.

Banik, M. T., Burdsall, H. H. and Volk, T. J. (1998) 'Identification of groups within *Laetiporus sulphureus* in the United States based on RFLP analysis of the nuclear ribosomal DNA', *Folia Cryptogamica estonica*, 33(January 1998), pp. 9–14.

- Bidartondo, M. I. and Read, D. J. (2008)** 'Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development', *Molecular Ecology*, 17(16), pp. 3707–3716. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03848.x.
- Bonfante, P. and Genre, A. (2010)** 'Mechanisms underlying beneficial plant - Fungus interactions in mycorrhizal symbiosis', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 1(4), pp. 1–11. doi: 10.1038/ncomms1046.
- Bose, A., Shah, D. and Keharia, H. (2013)** 'Production of indole-3-acetic-acid (IAA) by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* under submerged condition of *Jatropha* seedcake', *Mycology*. Taylor & Francis, 4(2), pp. 103–111. doi: 10.1080/21501203.2013.823891.
- Brenner, M. L. (1981)** 'Modern Methods for Plant Growth Substance Analysis', *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 32, pp. 511–538.
- Brinkmann, W. L. F. (1961)** 'Light Environment in Tropical Rain Forest of Central Amazonia', *Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia*, 1, pp. 37–49.
- Brizuela, M. A., García, L. and Pérez, L. (1998)** 'Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios', *Revista Iberoamericana de Micología*, 15, pp. 69–74.
- Calderón, E., Constantino, E. and Farfán, J. (2006)** Libro rojo de plantas de Colombia. Volumen 3: Orquídeas, Primera Parte., Libro rojo de plantas de Colombia. Volumen 3: Orquídeas, Primera Parte. Serie de Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia.
- Carlile, M., Watkinson, S. and Gooday, G. (2001)** 'Fungi and Biotechnology', in *The Fungi*. Second, pp. 461–542.
- Chadwick, A. A. and Chadwick, A. E. (2006)** *The Classic Cattleya*. Portland: Timber Press.
- Chan, W., Heredia, P. and Rodriguez, R. (2016)** 'Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática ligninolítica de macromicetos del estado de Veracruz, México', *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 32(3), pp. 339–351. doi: 10.20937/RICA.2016.32.03.08.
- Chanclud, E. and Morel, J. (2016)** 'Review Plant hormones: a fungal point of view', 7(20 16), pp. 1289–1297.
- Chandra, S. et al. (2010)** 'Acclimatization of tissue cultured plantlets: From laboratory to land', *Biotechnology Letters*, 32(9), pp. 1199–1205. doi: 10.1007/s10529-010-0290-0.
- Chang, S.-T., Gantulga, G. and Adhikary, S. K. . (2018)** *Training Manual on Mushroom Cultivation Technology*, United Nations- Nations UNIES Economic and Social Commission for Asia and the Pacific Asian. doi: 10.1097/MD.0000000000009779.

- Chegwin-Angarita, C. and Nieto-Ramírez, I. J. (2014)** 'Effect of non-conventional carbon sources on the production of triterpenoids in submerged cultures of pleurotus macrofungi', *Journal of the Chilean Chemical Society*, 59(1), pp. 2287–2293. doi: 10.4067/S0717-97072014000100010.
- Cruz, S. C., Sánchez, J. E. and Mora, J. V. (2017)** 'Agaricus bisporus production on substrates pasteurized by self-heating', *AMB Express*. Springer Berlin Heidelberg, 7. doi: 10.1186/s13568-017-0438-6.
- Darwin, C. (1877)** *The Various Contrivances by Which Orchids are Fertilized by Insects*. 2nd edn. Edited by L. Editorial. Londres: European Union.
- Das, A. et al. (2013)** 'Cocultivation of *Piriformospora indica* with Medicinal Plants: Case Studies'. doi: 10.1007/978-3-642-33802-1.
- Dathe, W. et al. (2017)** 'Gibberellins, Abscisic Acid, and Related Inhibitors in Branches and Bleeding Sap of Birch (*Betula pubescens* Ehrh.)', *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*. Elsevier Masson SAS, 173(3), pp. 238–248. doi: 10.1016/s0015-3796(17)30487-0.
- Davies, P. J. (1987)** 'The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions', in Davies, P. J. (ed.) *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 1–11. doi: 10.1007/978-94-009-3585-3_1.
- Deb, C. R. and Imchen, T. (2010)** 'An Efficient In vitro Hardening Technique of Tissue Culture Raised Plants', *Biotechnology*, 9(1), pp. 79–83. doi: 1682-2978.
- Desbois, A. P. and Smith, V. J. (2010)** 'Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), pp. 1629–1642. doi: 10.1007/s00253-009-2355-3.
- Díaz, L. E. et al. (2013)** 'Residuo Agrícola De Cebolla Larga Como Fuente De Ácido Giberélico Agricultural Welsh Onion Waste As a Source of Gibberellic Acid', *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 16(2), pp. 369–377.
- Díaz, L. P. et al. (2010)** 'Aclimatización de Phalaenopsis y Cattleya obtenidas por micropropagación', *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(2), pp. 27–40.
- Doga, H. H. (2013)** 'Evaluation of phenolic compounds, antioxidant activities and fatty acid composition of *Amanita ovoidea* (Bull.) Link. in Turkey', *Journal of Food Composition and Analysis*, 31, pp. 87–93.
- During, H. and Harst, M. (1996)** 'Stomatal behavior, photosynthesis and photorespiration of in vitro- grown grapevines: Effects of light and CO₂', *Vitis*, 35(4), pp. 163–167.

- Echeverri, A. P., Jaramillo, J. and Villegas, F. (2011)** Manuel de Cultivo de Orquídeas. Quinta. Edited by S. C. de Orquideología. Medellín: Sociedad Colombiana de Orquideología.
- Fajardo, J. et al. (2007)** Quality declared planting material Protocols and standards for vegetatively propagated crops, Quality declared planting material Protocols and standards for vegetatively propagated crops. FAO.
- Feng, G. et al. (2002)** 'Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots', *Mycorrhiza*, 12(4), pp. 185–190. doi: 10.1007/s00572-002-0170-0.
- Franco, M. et al. (2007)** 'Hardening of the national flower of Colombia, the threatened *Cattleya trianae* (Orchidaceae), from in vitro culture with previous invigoration phase', *Internationa Journal of Tropical Biology*, 55(2), pp. 681–691.
- Galdiano Junior, R. F. et al. (2011)** 'Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered brazilian orchid, and their role in acclimatization', *Revista Brasileira De Ciencia Do Solo*, 35(3), pp. 729–737. doi: 10.1590/S0100-06832011000300008.
- Gaspar, T. et al. (1996)** 'Plant Hormones and Plant Growth Regulators in Plant Tissue Culture', *In vitro Cell. Dev. Biol-PLant*, 32(December), pp. 272–289.
- Gepp, V. and Mondino, P. (2011)** 'Control químico'.
- Goyal, S., Ramawat, K. G. and Mérillon, J. M. (2016)** 'Different Shades of Fungal Metabolites: An Overview Shaily', in *Fungal Metabolites*, pp. 183–190. doi: 10.1007/978-3-319-19456-1.
- Grienke, U., Peintner, U. and Rollinger, J. (2014)** 'European medicinal polypores – A modern view on traditional uses', *Journal of Ethnopharmacology*, 154, pp. 564–583.
- Gründemann, C. et al. (2015)** 'Comparative chemical and biological investigations of β -glucan-containing products from shiitake mushrooms', *Journal of Functional Foods*. Elsevier Ltd, 18, pp. 692–702. doi: 10.1016/j.jff.2015.08.022.
- Guar, A. and Adholeya, A. (1999)** 'Mycorrhizal effects on the acclimatization, survival, growth and chlorophyll of micropropagated *Syngonium* and *Draceana* inoculated at weaning and hardening stages', *Mycorrhiza*, 9, pp. 215–219.
- Guillemin, J., Gianinazzi, S. and Trouvelot, A. (1992)** 'Screening of arbuscular endomycorrhizal fungi for establishment of micropropagated pineapple plants', *Agronomie*, 12(10), pp. 831–836. doi: 10.1051/agro:19921016.

- Gutiérrez-Lomelí, M. et al. (2012)** 'Natural Products Extracts: Terpenes and Phenolics', in EBSCO (ed.) *Biotechnological Production of Plant Secondary Metabolites*. Orhan: Bentham Science, pp. 21–35.
- Gyawali, R. and Ibrahim, S. A. (2014)** 'Natural products as antimicrobial agents', *Food Control*, 46(0), pp. 412–429. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047>.
- Hajong, S., Kumaria, S. and Tandon, P. (2013)** 'Effect of plant growth regulators on regeneration potential of axenic nodal segments of *Dendrobium chrysanthum* wall. ex lindl.', *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15(SUPPL), pp. 1425–1435.
- Hallmann, J. and Sikora, R. A. (2011)** 'Endophytic Fungi', in *Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: Building Coherence between Microbial Ecology and Molecular Mechanisms*, Progress in Biological Control. Bonn, pp. 227–258. doi: 10.1007/978-1-4020-9648-8.
- Haque, E. et al. (2016)** 'Terpenoids with Antifungal Activity Trigger Mitochondrial Dysfunction in *Saccharomyces cerevisiae*', *Microbiology*, 85(4), pp. 436–443. doi: 10.1134/S0026261716040093.
- Hartmann, H. and Kester, D. (1989)** *Propagación de Plantas*. Tercera. Edited by Continental. Mexico: Prentice Hall.
- Heneghan, M. N. et al. (2016)** 'Functional analysis of *Agaricus bisporus* serine proteinase 1 reveals roles in utilization of humic rich substrates and adaptation to the leaf-litter ecological niche', *Environmental Microbiology*, 18(12), pp. 4687–4696. doi: 10.1111/1462-2920.13350.
- Hesham, A., El Enshasyand, R. and Hatti-Kaul (2013)** 'Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications', *Trends in Biotechnology*, 31(12).
- Hew, C. S. and Mah, T. C. (1989)** 'Sugar uptake and invertase activity in *Dendrobium* tissues', *New Phytologist*, 111, pp. 167–171.
- Honrubia, M. (2009)** 'Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años', *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 66, pp. 133–144. doi: 10.3989/ajbm.2226.
- Hossain, M. M. et al. (2013)** 'Improved ex vitro survival of asymbiotically raised seedlings of *Cymbidium* using mycorrhizal fungi isolated from distant orchid taxa', *Scientia Horticulturae*. Elsevier B.V., 159, pp. 109–112. doi: 10.1016/j.scienta.2013.05.003.
- Jain, S. C., Singh, B. and Jain, R. (2001)** 'Antimicrobial activity of triterpenoids from *Heliotropium ellipticum*', *Fitoterapia*, 72, pp. 666–668.

- Jebastella, J. and M, R. A. (2015)** 'Bioactive components of *Cynodon dactylon* using ethanol extract', *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(12), pp. 2388–2391.
- Jones, D. L., Hodge, A. and Kuzyakov, Y. (2004)** 'Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition', *New Phytologist*, 163(1), pp. 459–480. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01130.x.
- Kaur, H., Anand, M. and Goyal, D. (2011)** 'Optimization of potting mixture for hardening of in vitro raised plants of *Tylophora indica* to ensure high survival percentage', 1(2), pp. 83–88.
- Keller, A. C., Maillard, M. P. and Hostettmann, K. (1996)** 'Antimicrobial steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola*', *Phytochemistry*, 41(4), pp. 1041–1046. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00762-8](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(95)00762-8).
- Khan, M. A. and Tania, M. (2012)** 'Nutritional and Medicinal Importance of Pleurotus Mushrooms: An Overview', *Food Reviews International*, 28(3), pp. 313–329. doi: 10.1080/87559129.2011.637267.
- Knudson, L. (1922)** 'Nonsymbiotic Germination of Orchid Seeds', *The Botanical Gazette*, 73(1), pp. 1–25.
- Kong, W. S. (2004)** 'Description of Commercially Important Pleurotus Species', in Seoul (ed.) *Mushroom Growers' Handbook 1: Oyster Mushroom Cultivation*. Mushworld, pp. 54–61.
- Latif, A. et al. (2015)** 'Phytohormones enabled endophytic fungal symbiosis improve aluminum phytoextraction in tolerant *Solanum lycopersicum* : An examples of *Penicillium janthinellum* LK5 and comparison with exogenous GA 3', *Journal of Hazardous Materials*. Elsevier B.V., 295, pp. 70–78. doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.04.008.
- Liao, C. H. et al. (2008)** 'Induction of premature senescence in human lung cancer by fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae*', *Food and Chemical Toxicology*, 46(5), pp. 1851–1859. doi: 10.1016/j.fct.2008.01.044.
- Linskens, H. F. and Jackson, J. F. (1987)** *High Performance Liquid Chromatography in Plant Sciences*. 1st edn. Edited by Springer-Verlag Berlin. Berlin: Springer-Verlag Berlin. doi: 10.1007/978-3-642-82951-2.
- Liu, J. et al. (2013)** 'In vitro and in vivo antioxidant activity of ethanolic extract of white button mushroom (*Agaricus bisporus*)', *Food and Chemical Toxicology*, 51, pp. 310–316.
- Liu, S. et al. (2008)** 'Biological Control of Phytopathogenic Fungi by Fatty Acids', *Mycopathologia*, 166, pp. 93–102. doi: 10.1007/s11046-008-9124-1.

- MacMillan, J. and Suter, P. J. (1963)** 'Thin Layer Chromatography of the Gibberellins', *Nature*, 197(23), pp. 790–790.
- Mao, Y., Mao, J. and Meng, X. (2013)** 'Extraction optimization and bioactivity of exopolysaccharides from *Agaricus bisporus*', *Carbohydrate Polymers*, 92, pp. 1602–1607.
- Marshall, E. and Nair, N. G. (Tan) (2009)** 'Make money by growing mushrooms', *FAO Diversification Booklet*, 7, p. 10.
- Mehrpavarva, M. Mohammadi, E. et al. (2016)** 'Antifungal activity of essential oils against mycelial growth of *Lecanicillium fungicola* var. *fungicola* and *Agaricus bisporus*', *Industrial Crops and Products*, 2, pp. 391–398.
- Meng, T. X. et al. (2012)** 'The Melanin Biosynthesis Stimulating Compounds Isolated from the Fruiting Bodies of *Pleurotus citrinopileatus*', *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, 2, pp. 151–157.
- Miles, P. G. and Chang, S. T. (2004)** *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. United States of America.
- Mithofer, A. et al. (1996)** 'Suppression of fungal beta-glucan-induced plant defence in soybean (*Glycine max* L) by cyclic 1,3-1,6-beta-glucans from the symbiont *Bradyrhizobium japonicum*', *Planta*, 199(2), pp. 270–275. doi: 10.1007/BF00196568.
- Mori, I. C. et al. (2017)** 'Phytohormones in red seaweeds: A technical review of methods for analysis and a consideration of genomic data', *Botanica Marina*, 60(2), pp. 153–170. doi: 10.1515/bot-2016-0056.
- Morrison, E. N. et al. (2015)** 'Detection of phytohormones in temperate forest fungi predicts consistent abscisic acid production and a common pathway for cytokinin biosynthesis', *Mycologia*. Taylor & Francis, 107(2), pp. 245–257. doi: 10.3852/14-157.
- Mosquera-espinosa, A. T. et al. (2013)** 'The double life of *Ceratobasidium*: orchid mycorrhizal fungi and their potential for biocontrol of *Rhizoctonia solani* sheath blight of rice', *Mycologia*, 105(1), pp. 141–150. doi: 10.3852/12-079.
- Mujeeb, F., Bajpai, P. and Pathak, N. (2014)** 'Phytochemical Evaluation, Antimicrobial Activity, and Determination of Bioactive Components from Leaves of *Aegle marmelos*', *Biomed Research International*, p. 11. doi: 10.1155/2014/497606.
- Müller, A. et al. (2013)** 'Growing poplars for research with and without mycorrhizas.', *Frontiers in plant science*, 4(August), p. 332. doi: 10.3389/fpls.2013.00332.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962)** 'A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures', *Physiol. Plant*, pp. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

- Mycelia (1999)**. Available at: <http://www.mycelia.be/en/strain-list/m-2502-pleurotus-citrinopileatus> (Accessed: 9 November 2018).
- National Association of Professional Environmentalists (2012)** 'the Impacts of the Flower Industry on Environment and Peoples Livelihoods in Uganda', (June), pp. 1–52.
- Nelson, P. E., Desjardins, A. E. and Plattner, R. D. (1993)** 'Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance', *Annual review of phytopathology*, 31(1), pp. 233–252. doi: 10.1146/annurev.py.31.090193.001313.
- Nowak, J. (1998)** 'Benefits of in vitro "biotization" of plant tissue cultures with microbial inoculants', *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 34(2), pp. 122–130. doi: 10.1007/BF02822776.
- Odiba, J. et al. (2014)** 'Antimicrobial activity of isolated Stigmast- 5-en-3 β -ol (β - Sitosterol) from Honeybee', *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)*, 5(12), pp. 908–918.
- Olmos, S., Luciani, G. and Galeano, E. (2010)** Parte IV: Métodos de propagación y conservación de germoplasma. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Segunda. Consejo Argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología.
- Ordoñez, N. F., Otero, J. T. and Diez, M. C. (2012)** Efecto de hongos endófitos de orquídeas del grupo *Rhizoctonia* y otros endófitos cultivables sobre el desarrollo de plantas de *Vanilla planifolia* JACKS. Universidad Nacional de Colombia.
- Orquideología, S. C. de (2011)** Manual de Cultivo de Orquídeas. Edited by A. P. Echeverri, J. Jaramillo, and F. Villegas. Medellín.
- Ortega-Loeza, M. et al. (2011)** 'Acclimatization of the endangered Mexican epiphytic orchid *Laelia speciosa*', *European Journal of Environmental Sciences*, 1(2), pp. 48–54.
- Otero, J. T. and Paul, B. (2009)** 'Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epifitas', *Acta Agronomica*, 58(4), pp. 270–276.
- Özcan, B. (2001)** 'GA 3 , ABA and Cytokinin Production by *Lentinus tigrinus* and *Laetiporus sulphureus* Fungi Cultured in the Medium of Olive Oil Mill Waste', *Turkish Journal of Biology*, 25, pp. 453–462.
- Pacheco, G. et al. (2006)** 'Influence of substrates and in vitro preconditioning treatments on ex vitro acclimatization of *Arachis retusa*', *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 41(1), pp. 165–169. doi: 10.1590/S0100-204X2006000100023.
- Pandya, U., Dhuldhaj, U. and Sahay, N. S. (2018)** 'Bioactive mushroom polysaccharides as antitumor: an overview', *Natural Product Research*.

Paterson, R. R. M. (2006) 'Ganoderma - A therapeutic fungal biofactory', *Phytochemistry*, 67(18), pp. 1985–2001. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.07.004.

Pedroso-de-moraes, C. et al. (2011) 'Response of Cattleya Hybrids for *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cattleyae* Foster', 54(April), pp. 267–271.

Perea Dallos, M. and Tirado Perea, A. (2011) Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro (Manual de Prácticas de Laboratorio). 1st edn. Edited by Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Pérez-Moreno, J. and Martín-Reyes, M. (2014) 'Edible Ectomycorrhizal Mushrooms: Biofactories for Sustainable Development', in Cham (ed.) *Biosystems Engineering: Biofactories for Food Production in the Century XXI*. Springer.

Pérez, U. A. (2011) Evaluación de un sistema para la Micorrización In vitro en plantas de mora Castilla (*Rubus glaucus*). Universidad Javeriana.

Petrovic, J. et al. (2013) '*Laetiporus sulphureus*, edible mushroom from Serbia: Investigation on volatile compounds, in vitro antimicrobial activity and in situ control of *Aspergillus flavus* in tomato paste', *Food and Chemical Toxicology*, 59, pp. 297–302.

Pii, Y. et al. (2015) 'Microbial interactions in the rhizosphere : beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process . A review', *Biol Fertil Soils*, 51, pp. 403–415. doi: 10.1007/s00374-015-0996-1.

Popova, M. et al. (2009a) 'Antibacterial triterpenes from the threatened wood-decay fungus *Fomitopsis rosea*', *Fitoterapia*. Elsevier B.V., 80(5), pp. 263–266. doi: 10.1016/j.fitote.2009.02.008.

Pryce, R. J. (1973) 'Decomposition of Aqueous Solutions of Gibberellic Acid on Autoclaving', *Phytochemistry*, 12, pp. 507–514. doi: 10.1007/bf02928124.

Pryce, T. M. et al. (2003) 'Rapid identification of fungi by sequencing the ITS1 and ITS2 regions using an automated capillary electrophoresis system', *Medical Mycology*, 41(6), pp. 369–381.

Rasmia, D. (2015) 'Morphology , physiology and anatomy in vitro affected acclimatization ex vitro date palm plantlets : A Review', *International Journal of Chemical, Environmental & Biological Sciences (IJCEBS)*, 3(2), pp. 183–190. doi: 2320–4087.

Rasmussen, H. N. et al. (2015) 'Germination and seedling establishment in orchids: A complex of requirements', *Annals of Botany*, 116(3), pp. 391–402. doi: 10.1093/aob/mcv087.

- Ríos, J. L. et al. (2012)** 'Lanostanoids from fungi: A group of potential anticancer compounds', *Journal of Natural Products*, 75(11), pp. 2016–2044. doi: 10.1021/np300412h.
- Romberg, M. (2016)** 'Morphological Identification of Microfungi-Workshop', in National Plant Diagnostic Network.
- Roveda, G. et al. (2007)** 'Efecto de las micorrizas arbusculares sobre la aclimatación y endurecimiento de microplántulas de mora (*Rubus glaucus*)', *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 8(1), pp. 28–36.
- Russell, M. and Paterson, R. (2008)** 'Cordyceps - A traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory', *Phytochemistry*, 69(7), pp. 1469–1495. doi: 10.1016/j.phytochem.2008.01.027.
- Ruthes, A. C., Ribeiro, F. and Lacomini, M. (2015)** 'd-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches', *Carbohydrate Polymers*, 117, pp. 753–761.
- Sahay, N. S. and Varma, A. (1999)** '*Piriformospora indica*: A new biological hardening tool for micropropagated plants', *FEMS Microbiology Letters*, 181(2), pp. 297–302. doi: 10.1016/S0378-1097(99)00542-X.
- Sánchez de Prager, M. (2007)** *Las Endomicorrizas: Expresión bioedáfica de importancia en el trópico*. Palmira: Banco de la República.
- Sathiyabama, M. and Balasubramanian, R. (2018)** 'Protection of groundnut plants from rust disease by application of glucan isolated from a biocontrol agent *Acremonium obclavatum*', *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V, 116, pp. 316–319. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.04.190.
- Schultes, R. E. and Hofmann, A. (2000)** *Plantas de los Dioses*. 2nd edn. Mexico.
- Semedo, M. C., Karmali, A. and Fonseca, L. (2015)** 'A high throughput colorimetric assay of β -1, 3-D-glucans by Congo red dye', *Journal of Microbiological Methods*. Elsevier B.V., 109, pp. 140–148. doi: 10.1016/j.mimet.2014.12.020.
- Singh, R. P., Wood, F. A. and Hodgson, W. A. (1970)** 'The Nature of Inhibition by a Polysaccharide from *Phytophthora infestans*', *Phytophthora Infestans*, pp. 1566–1569.
- Sociedades, S. D. E. (2016)** *Desempeño del sector floricultor*.
- Soriano, M. D. and Bottini, R. (1992)** 'Gibberellin A3 levels in bark and flower buds of peach (*Prunus persica* L.) before leaf fall', *Agriscientia*, IX(2), pp. 3–8.

- Srivastava, D., Gayatri, M. C. and Sarangi, S. K. (2015)** 'In vitro seed germination and plant regeneration of an epiphytic orchid *Aerides ringens* (Lindl .) Fischer', *Indian Journal of Biotechnology*, 14(October), pp. 574–580.
- Stamets, P. (2005)** MYCELIUM RUNNING. Berkeley: Ten Speed Press.
- Suárez Arango, C. and Nieto, I. J. (2013)** 'Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: Una alternativa en la obtención de nutracéuticos', *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1), pp. 1–8. doi: 10.1016/j.riam.2012.03.011.
- Suárez, C. (2010)** Obtención In vitro de micelio de hongos comestibles, Shiitake (*Lentinula edodes*) y orellanas (*Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*) a partir de aislamientos de cuerpos fructíferos, para la producción de semilla. Universidad Nacional de Colombia.
- Suárez, C. (2012)** Utilización de la fermentación líquida de *Lentinula edodes* (shiitake), para la producción de metabolitos secundarios bioactivos y evaluación de su potencial empleo en la producción de un alimento funcional. Universidad Nacional de Colombia Programa.
- Sundeberg, B., Sandberg, G. and Crozier, A. (1986)** 'Purification of Indole-3-acetic acid in plant extracts by immunoaffinity chromatography', *Phytochemistry*, 25(2), pp. 295–298.
- Tayz, L. and Zeiger, E. (2006)** *Plant Physiology*. 4th edn. Edited by University of California. California: Sunderland.
- Teixeira da Silva, J. A. et al. (2015)** 'Symbiotic in vitro seed propagation of Dendrobium: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development', *Planta*, 242(1), pp. 1–22. doi: 10.1007/s00425-015-2301-9.
- Thomas, J. et al. (2010)** 'Influence of beneficial microorganisms during in vivo acclimatization of in vitro-derived tea (*Camellia sinensis*) plants', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 101(3), pp. 365–370. doi: 10.1007/s11240-010-9687-7.
- Tokul-Olmez, O. et al. (2013)** 'Fatty acid profile of four Ganoderma species collected from various host trees with chemometric approach', *Food Research International*, 51, pp. 195–200.
- Tsai, H. et al. (2006)** 'Detection of orchid Phytophthora disease by nested PCR', *Botanical Studies*, 47, pp. 379–387.
- Tsvakelova, E. (2011)** 'Bacteria Associated with Orchid Roots', in *Bacteria in Agrobiology: Plant Growth Responses*, pp. 399–403. doi: 10.1007/978-3-642-20332-9.
- Türker, M. et al. (2005)** 'Determination of Phytohormones Level in Some Dried and Fresh Macrofungi Taxa', *Phyton*, 45, pp. 145–158.

Umata, H. (1998) 'A new biological function of Shiitake mushroom, *Lentinula edodes*, in a myco-heterotrophic orchid (*Erythrorchis ochobiensis*), *Mycoscience*, 39, pp. 85–88.

Ünyayar, S., Topcuoglu, F. and Ünyayar, A. (1996) 'A Modified Method for Extraction and Identification of Indole-3-Acetic Acid (IAA), Gibberellic Acid (GA3), Abscisic Acid (ABA) and Zeatin Produced by *Phanerochaete chrysosporium* ME446', *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 22(3–4), pp. 105–110.

Ünyayar, S., Topcuoglu, Ş. F. and Bozcuk, S. (2016) 'Abscisic acid production by *Pleurotus florida* cultured in various conditions and its relation to growth', 9978(September). doi: 10.1080/07929978.1997.10676665.

Valentín, L. et al. (2010) 'Bioresource Technology Scots pine (*Pinus sylvestris*) bark composition and degradation by fungi: Potential substrate for bioremediation', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 101(7), pp. 2203–2209. doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.052.

Valentino, M. J. G. and Galvez, C. T. (2015) 'Auxin-like and Gibberellic acid- like activity of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer and *Volvariella volvacea* Fr. on Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Seedlings', *Advances in Environmental Biology*, 9(October), pp. 361–367.

Vannucci, L. et al. (2013) 'Immunostimulatory properties and antitumor activities of glucans (review)', *International Journal of Oncology*, 43, pp. 357–364.

Vasane, S. R. and Kothari, R. M. (2006) 'Optimization of secondary hardening process of banana plantlets (*Musa paradisiaca* L. var. grand nain)', in *Indian Journal of Biotechnology*, pp. 394–399.

Vega, C. (2016) Comparación de la producción de metabolitos secundarios bioactivos con dos fuentes de carbono en la fermentación líquida de una especie de *Pleurotus* y su uso potencial en un alimento de tipo funcional. Universidad Nacional de Colombia.

Verma, S., Yadav, K. and Singh, N. (2011) 'Optimization of the Protocols for Surface Sterilization, Regeneration and Acclimatization of *Stevia rebaudiana* Bertoni', 11(2), pp. 221–227.

Vilsack, T. and Clark, C. Z. F. (2010) 'Census of Horticultural Specialties (2009)', Usda.Gov, 3(December), pp. 1–595. Available at: papers2://publication/uuid/FB6B726A-B11C-47FB-9A8A-AA16AB3CCCF1.

Wang, X. et al. (2014) 'A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China', *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 151, pp. 279–285. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.11.062.

Xia, Q. et al. (2014) 'A comprehensive review of the structure elucidation and biological activity of triterpenoids from *Ganoderma spp*', *Molecules*, 19(11), pp. 17478–17535. doi: 10.3390/molecules191117478.

Yamada, K. et al. (2011) 'Monosaccharide absorption activity of Arabidopsis roots depends on expression profiles of transporter genes under high salinity conditions', *Journal of Biological Chemistry*, 286(50), pp. 43577–43586. doi: 10.1074/jbc.M111.269712.

Yamakawa, T. et al. (1979) 'Stability of indole-3-acetic acid to autoclaving, aeration and light illumination', *Agricultural and Biological Chemistry*, 43(4), pp. 879–880. doi: 10.1080/00021369.1979.10863551.

Yoon, L. W. et al. (2014) 'Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production', *Biomass and Bioenergy*. Elsevier Ltd, 67, pp. 319–338. doi: 10.1016/j.biombioe.2014.05.013.

Yoshikawa, K. et al. (2002) 'New Lanostanoids, Elfvingic Acids A–H, from the Fruit Body of *Elfvingia appplanata*', *Journal of Natural Products*, 65(4), pp. 548–552. doi: 10.1021/np0103160.

Yusoff, E. et al. (2017) 'GC-MS analysis of some volatile constituents extracted from stem of *Euphorbia tirucalli* Linn .', *Arch Orofac Sci*, 12, pp. 36–44.

Zaragoza, N. (2013) "Efecto de extractos de origen fúngico en la germinación asimbiótica in vitro de *Guarianthe aurantiaca* (Bateman ex Lindl.) Dressler et W. E. Higgins y *Euchile mariae* (Ames) Withner x *Euchile citrina* (La Llave et Lexarza) Withner (Orchidaceae). Universidad Nacional Autónoma de México.

Zhu, F. et al. (2015) 'Beta-glucans from edible and medicinal mushrooms: Characteristics, physicochemical and biological activities', *Journal of Food Composition and Analysis*, 41, pp. 165–173.

Zjawiony, J. K. (2004) 'Biologically Active Compounds from Aphylophorales (Polypore) Fungi 1', *Journal of Natural Products*, 67, pp. 300–310. doi: 10.1021/np030372w.

Zjawiony, J. K. and Zjawiony, J. K. (2004) 'Biologically Active Compounds from Aphylophorales (Polypore) Fungi Biologically Active Compounds from Aphylophorales (Polypore) Fungi 1', 67(2), pp. 300–310. doi: 10.1021/np030372w.