



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA
“PRESIDENTE JUÁREZ”**

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Aislamiento y caracterización de hongos
micorrizógenos promotores de germinación y
desarrollo de protocormos de *Vanilla planifolia***

Que presenta:

Ing. Froylán Navarro Álvarez

**Como requisito para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Biológicas**

Directora de tesis:

Dra. Ana Tztzqui Chávez Bárcenas

Uruapan, Michoacán, México. Marzo, 2024

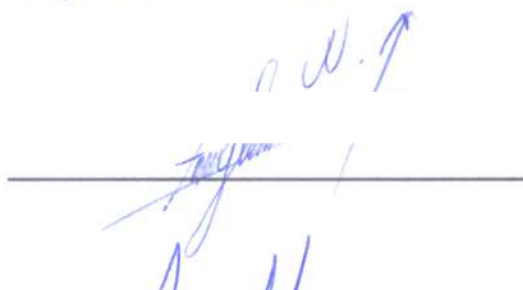


DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

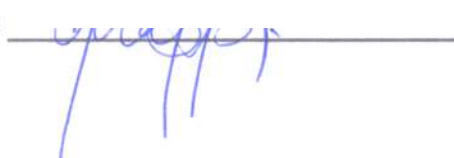
Declaración de originalidad El presente documento es producto del trabajo original de investigación de **Froylán Navarro Álvarez**, estudiante del Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas y respetando siempre los más altos estándares éticos solicitados por la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Todos los datos de la investigación reportada en el presente documento de tesis (excepto los indicados explícitamente en el texto), fueron obtenidos por **Froylán Navarro** durante el periodo que fue estudiante de la Maestría en Ciencias Biológicas, bajo la Dirección de la **Dra. Ana Tztzqui Chávez Bárcenas**.

Uruapan, Mich., a 21 de febrero de 2024.

Ing. Froylán Navarro Álvarez



Dra. Ana Tztzqui Chávez Bárcenas



Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas, UMSNH

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

DRA. MARTHA ELENA PEDRAZA SANTOS
COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
PRESENTE

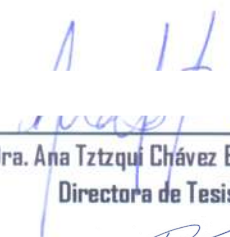
Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Aislamiento y caracterización de hongos micorrizógenos promotores de germinación y desarrollo de protocormos de *Vanilla planifolia*" presentado por el Ing. Froylán Navarro Álvarez con Número de Matrícula 1584870A, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestro en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

ATENTAMENTE

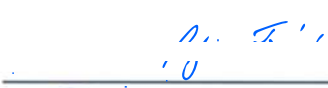
Morelia, Michoacán, a 21 de febrero de 2024

COMITÉ SINODAL


Dra. Ana Tztzqui Chávez Bárcenas
Directora de Tesis


Dra. Martha Elena Pedraza Santos
Vocal I


Dr. Pedro Antonio López.
Presidente


Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía
Vocal 2


Dr. José Luciano Morales García
Vocal 3

Agradecimientos

A la vida, por darme la oportunidad de vivir esta hermosa experiencia.

A mi madre por el apoyo, por su amor y por enseñarme a superarme de forma honrada, honesta y dedicar tiempo a la mejora constante de mi persona. A mi familia, por su cariño, por apoyarme y ayudarme en el proceso de mi formación.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por el apoyo económico brindado para mi estancia desarrollando esta investigación.

A mi directora, la Dra. Ana Tztzqui Chávez Bárcenas, por enseñarme lo bonito que es investigar, por guiarme con tanto cuidado buscando la mejor formación profesional para mí, por apoyarme durante todo este proceso e incitar en mí el gusto por la investigación científica.

A mi comité sinodal; la Dra. Martha, Dra. Sylvia, Dr. Pedro y el Dr. Luciano, por el apoyo, la dedicación y atención prestada para la realización de este proyecto. Al Dr. Isaac, por ser un magnífico mentor y amigo, por sus consejos y ayudar en mi formación personal y profesional. A Lilí y los administrativos que nos ayudan durante todos los procesos de la maestría.

A mis compañeros de laboratorio Brenda, Diana, Priscila, Jorge, Axel, Anita, Alhelí y Ricardo, por los momentos de alegría, compañerismo, aprendizaje y diversión que tuvimos el tiempo que convivimos.

A mis amigos Yareli, Michelle Bravo, Diana, Karina, Roberto, Michelle Navarro, Yazmín, Ángel, Mónica, Jorge, Mariano, Alejandra, Azura, sé que faltan muchos más, gracias a todos, por formar parte de esta experiencia, durante este periodo de mi vida.

CONTENIDO

Resumen	1
Abstract.....	3
I. Introducción	4
II. Revisión de literatura	7
Distribución mundial de orquídeas	7
Distribución de la subfamilia <i>Vanilloideae</i>	8
Distribución de <i>V. planifolia</i> en México	9
Importancia económica	11
Clasificación taxonómica	12
Morfología de <i>V. planifolia</i>	12
Morfología y anatomía radicular de <i>V. planifolia</i>	17
Morfología y anatomía de las semillas de <i>V. planifolia</i>	21
Métodos de propagación	23
Generalidades de la simbiosis micorrízica	23
Micorriza orquideoide	25
Germinación simbiótica de las orquídeas.....	27
III. Objetivos	30
Objetivo General	30
Objetivos Específicos	30
Hipótesis.....	30
IV. Materiales y Métodos.....	31
Material Biológico	31
Descripción morfológica del material vegetal	31
Vainillas de Orizaba, Veracruz.....	31
Vainillas de El Para, Guerrero	32
Colecta de semillas y raíces.....	33
Tinción de raíces y protocormos de vainilla.....	34
Aislamiento de hongos promotores de germinación de semillas y desarrollo de plántulas de <i>V. planifolia</i>	34
Desinfestación de raíces para el sistema de co-cultivo	35
Escarificación y desinfestación de semillas de vainilla	35
Establecimiento del protocolo de desinfestación de protocormos	36

Estrategias para el aislamiento de hongos a partir de protocormos simbióticos y raíces adultas colonizadas	37
Nomenclatura de los aislados	40
Caracterización molecular de los hongos aislados.....	41
<i>Extracción de DNA</i>	41
<i>Amplificación del rDNA-ITS</i>	42
<i>Análisis filogenéticos</i>	43
Caracterización morfológica de aislados	44
Bioensayo de germinación simbiótica con los aislados identificados	44
Diseño experimental y análisis estadístico	45
Evaluación de los procesos de germinación y desarrollo de semillas de <i>V. planifolia</i> en condiciones simbióticas.....	46
V. Resultados y Discusión	48
Las raíces de plantas adultas de vainilla contienen hongos endófitos y formadores de micorriza orquideode	48
Germinación de semillas y de desarrollo de protocormos de <i>V. planifolia</i> en presencia de raíces de vainillas adultas.....	51
El origen de las raíces de vainilla en el co-cultivo repercute en la eficiencia de germinación y desarrollo de protocormos de <i>V. planifolia</i>	52
Los protocormos de <i>V. planifolia</i> desarrollados en co-cultivo presentan simbiosis micorrízica	55
Aislamiento de hongos asociados a los protocormos de <i>V. planifolia</i>	57
Caracterización molecular de los aislados.	58
Las secuencias amplificadas de los aislados <i>Vpl5P</i> y <i>Vpo11R</i> , se agrupan filogenéticamente con ITSs de hongos del complejo <i>Rhizoctonia</i>	59
La secuencia amplificada de las regiones ITS perteneciente al aislado <i>Vpol2P</i> , se agrupa filogenéticamente con hongos del género <i>Exophiala</i>	62
Identidad de los aislados	64
Los aislados obtenidos de protocormos de <i>V. planifolia</i> y raíces de vainillas adultas son endófitos similares a hongos micorrizógenos orquideoides.	65
Las semillas de <i>V. planifolia</i> germinaron y desarrollaron protocormos.....	69
Los hongos <i>T. cumulopuntiioides</i> y <i>Rhizoctonia</i> sp. AG-G. promovieron la germinación de semillas y desarrollo de protocormos de <i>V. planifolia</i>	72
VI. Conclusiones	80
VII. Bibliografía	81
Anexos	93
Secuencias ITS para búsqueda BLAST	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Ecorregiones prioritarias del mundo (verde claro).....	7
2. Distribución de la subfamilia Vanilloideae.....	9
3. Distribución de poblaciones silvestres de <i>V. planifolia</i> en México.	10
4. Producción de vainilla	11
5. Descripción morfológica de <i>V. planifolia</i>	16
6. Diagramas de raíces de orquídeas epífitas	17
7. Anatomía radicular terrestre de <i>Vanilla</i> spp.....	19
8. Etapas de desarrollo embrionario de <i>V. planifolia</i>	22
9. Esquema de tipos de asociaciones micorrizógenas	24
10. Descripción morfológica de la vainilla de Veracruz en floración.	32
11. Corte transversal de raíces de las plantas de vainilla adulta establecidas en invernadero.	48
12. Estructuras micorrízicas generadas en <i>V. planifolia</i>	50
13. Desarrollo de <i>V. planifolia</i> cultivadas en co-cultivo simbiótico.	52
14. Curva acumulada de germinación y desarrollo de <i>V. planifolia</i> en co-cultivo con raíces de <i>V. planifolia</i> y <i>V. pompona</i>	53
15. Tinción de estructuras micorrízicas en protocormos de <i>V. planifolia</i>	56
16. Electroforesis de productos de PCR en gel de agarosa (1 %).	59
17. Árbol filogenético generado con las secuencias de rDNA-ITS de los aislados <i>Vpo15P</i> y <i>Vpo11R</i> junto a secuencias del complejo de hongos <i>Rhizoctonia</i>	61
18. Árbol filogenético generado con las secuencias de rDNA-ITS del aislado <i>Vpl2P</i> junto a secuencias del género <i>Exophiala</i>	63
19. Morfología colonial de los aislados.....	65
20. Micelio de <i>Rhizoctonia</i> sp.....	67
21. Micelio de <i>Tulasnella</i> sp.	68
22. Micelio de <i>Exophiala</i> sp.....	69
23. Germinación simbiótica de <i>V. planifolia</i> en dos sistemas de co-cultivo.	70
24. Desarrollo de protocormos de <i>V. planifolia</i> en dos sistemas de co-cultivo .	71
25. Curva acumulada de germinación y desarrollo de protocormos de <i>V. planifolia</i> . Uruapan, Michoacán, 2024.	73
26. Curva acumulada de germinación y desarrollo de protocormos de <i>V. planifolia</i> . Uruapan, Michoacán, 2024.	77
27. Producto de electroforesis de la extracción de DNA genómico.	94

28. BLAST de la secuencia del aislado <i>Vpo/2R</i>	98
29. BLAST de la secuencia del aislado <i>Vpo/4R</i>	98
30. BLAST de la secuencia del aislado <i>Vpo/11R</i>	98
31. BLAST de la secuencia del aislado <i>Vpo/5P</i>	99
32. BLAST de la secuencia <i>Vpo/2P</i>	99

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Clasificación taxonómica de <i>Vanilla planifolia</i>	12
2. Desinfestación de protocormos de vainilla para el aislamiento de hongos simbióticos asociados..	37
3. Estrategias utilizadas para el aislamiento de hongos endófitos de <i>Vanilla</i> spp..	37
4. Estrategias que permitieron aislar distintos morfotipos de hongos a partir de protocormos y raíces de vainilla.	57
5. Identidad de los aislados por comparación de secuencias de rDNA-ITS mediante BLAST.....	64
6. Resultados de germinación por semana de semillas de <i>V. planifolia</i> . Uruapan, Michoacán, 2024.	75
7. Resultados del desarrollo de protocormos por semana de <i>V. planifolia</i> . Uruapan, Michoacán, 2024.	76
8. Resultados del análisis de varianza (MANOVA) en la evaluación semanal de germinación acumulada de semillas de <i>V. planifolia</i> . Uruapan, Michoacán, 2022	93
9. Resultados del análisis de varianza para efectos entre y dentro de sujetos en la evaluación semanal de germinación acumulada de semillas de <i>V. planifolia</i> . Uruapan, Michoacán, 2022.	93
10 Resultados del análisis de varianza (MANOVA) en la evaluación semanal de protocormos acumulados de <i>V. planifolia</i> . Uruapan, Michoacán, 2022	93
11. Resultados del análisis de varianza para efectos entre y dentro de sujetos en la evaluación semanal de protocormos acumulados de <i>V. planifolia</i> . Uruapan, Michoacán, 2022	93
12. Resultados del análisis de varianza (MANOVA) en la evaluación semanal de protocormos fotosintéticos acumulados de <i>V. planifolia</i> . Uruapan, Michoacán, 2022	93
13. Resultados del análisis de varianza para efectos entre y dentro de sujetos en la evaluación semanal de protocormos fotosintéticos acumulados de <i>V. planifolia</i> . Uruapan, Michoacán, 2022	94
14. Resultados del análisis de varianza (MANOVA) factorial en la evaluación semanal de germinación acumulada de semillas de <i>V. planifolia</i> . Uruapan, Michoacán, 2024	99
15. Resultados del análisis de varianza factorial para efectos entre y dentro de sujetos en la evaluación semanal de germinación acumulada de semillas de <i>V. planifolia</i> . Uruapan, Michoacán, 2024	99

16. Resultados del análisis de varianza (MANOVA) factorial en la evaluación semanal de protocormos acumulado de <i>V. planifolia</i> . Uruapan, Michoacán, 2024	100
17. Resultados del análisis de varianza factorial para efectos entre y dentro de sujetos en la evaluación semanal de protocormos acumulados de <i>V. planifolia</i> . Uruapan, Michoacán, 2024	100
18. Resultados del análisis de varianza (MANOVA) en la evaluación semanal de germinación acumulada de semillas de <i>V. planifolia</i> en medio HMO. Uruapan, Michoacán, 2024	100
19. Resultados del análisis de varianza para efectos entre y dentro de sujetos en la evaluación semanal de germinación acumulada de semillas de <i>V. planifolia</i> en medio HMO. Uruapan, Michoacán, 2024	100
20. Resultados del análisis de varianza (MANOVA) en la evaluación semanal de germinación acumulada de semillas de <i>V. planifolia</i> en sustrato de turba canadiense. Uruapan, Michoacán, 2024	101
21. Resultados del análisis de varianza para efectos entre y dentro de sujetos en la evaluación semanal de germinación acumulada de semillas de <i>V. planifolia</i> en sustrato de turba canadiense. Uruapan, Michoacán, 2024	101
22. Resultados del análisis de varianza (MANOVA) en la evaluación semanal de desarrollo acumulado de protocormos de <i>V. planifolia</i> en medio HMO. Uruapan, Michoacán, 2024	101
23. Resultados del análisis de varianza para efectos entre y dentro de sujetos en la evaluación semanal de desarrollo acumulado de protocormos de <i>V. planifolia</i> en medio HMO. Uruapan, Michoacán, 2024	101
24. Resultados del análisis de varianza (MANOVA) en la evaluación semanal de desarrollo acumulado de protocormos de <i>V. planifolia</i> en sustrato de turba canadiense. Uruapan, Michoacán, 2024	101
25. Resultados del análisis de varianza para efectos entre y dentro de sujetos en la evaluación semanal de desarrollo acumulado de protocormos de <i>V. planifolia</i> en sustrato de turba canadiense. Uruapan, Michoacán, 2024	102

Resumen

La vainilla mexicana (*Vanilla planifolia*) es la especie con mayor contenido de vainillina y la más demandada en el mercado. México es el centro de origen de esta orquídea. Pese a su importancia, *V. planifolia* está catalogada en peligro de erosión genética por su difícil propagación sexual y condiciones específicas para su germinación. El objetivo del presente trabajo consistió en aislar y caracterizar hongos micorrizógenos orquideoides (HMO) promotores de la germinación y desarrollo de protocormos de *V. planifolia* a partir de raíces de plantas adultas de *V. planifolia* y *Vanilla pompona*. Para ello, se verificó la presencia de estructuras micorrízicas por tinción con azul de tripano. Después, se estableció un sistema de co-cultivo en sustrato para estudiar la progresión de la germinación y etapas tempranas del desarrollo de *V. planifolia* en presencia de raíces colonizadas por HMO. Las semillas en co-cultivo con raíces presentaron hasta un 100 % de germinación a los 50 días después de la siembra (DDS), 97 % de desarrollo de protocormos y un 29 % de protocormos fotosintéticos. En ausencia de raíces colonizadas, sólo se observó un 50 % de germinación a los 120 DDS. Para aislar HMO se usaron protocormos desarrollados en co-cultivo y raíces adultas de vainilla. El análisis de la secuencia entre los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 permitió identificar a los aislados con características de HMO como *Rhizoctonia* sp. AG-G, *Tulasnella cumulopuntioides* y *Exophiala pisciphila*. El co-cultivo de semillas de *V. planifolia* con *T. cumulopuntioides* tuvo los porcentajes de germinación y desarrollo de protocormos más altos, seguido de *Rhizoctonia* sp. AG-G. Mientras que el hongo identificado como *E. pisciphila* no promovió la germinación. Concluimos que los HMO

que colonizan los sistemas radiculares de plantas adultas de vainilla tienen la capacidad de promover la germinación y el desarrollo temprano de *V. planifolia*.

Palabras Clave: complejo *Rhizoctonia*, germinación simbiótica, HMO, microorganismos benéficos.

Abstract

Mexican vanilla (*Vanilla planifolia*) is the species with the highest vanillin content and the most demanded in the market. Mexico is the center of origin of this orchid. Despite its importance, *V. planifolia* is listed as endangered by genetic erosion due to its difficult sexual propagation and specific conditions for germination. The aim of this work was to isolate and characterize orchid mycorrhizal fungi (OMFs) isolated from the roots of adult plants of *V. planifolia* and *Vanilla pompona* that promote germination and development of protocorms of *V. planifolia*. The presence of mycorrhizal structures was verified by trypan blue staining. Subsequently, a substrate co-culture system was established to study the germination progression and early stages of development of *V. planifolia* in the presence of OMFs colonized roots. Seeds in co-cultivation with roots showed up to 100% germination at 50 days after sowing (DAS), 97% protocorm development and 29% photosynthetic protocorms. Only 50% of germination was observed at 120 DAS when colonized roots were absent. To isolate OMFs, protocorms developed in co-culture with colonized vanilla roots were used. Analysis of the sequence between ITS1 and ITS4 oligonucleotides were used to identify isolates with OMF characteristics as *Rhizoctonia* sp. AG-G, *Tulasnella cumulopuntioides* and *Exophiala pisciphila*. Co-cultivation of seeds of *V. planifolia* with *T. cumulopuntioides* had the highest germination and protocorm development percentages, followed by *Rhizoctonia* sp. AG-G. While the fungus identified as *E. pisciphila* did not promote germination. We conclude that OMFs that colonize the root systems of vanilla adult plants have the capacity to promote germination and early development of *V. planifolia*.

Key words: beneficial microorganisms, OMF, *Rhizoctonia* complex, symbiotic germination.

I. Introducción

Las orquídeas son de las plantas más evolucionadas del planeta, forman parte de una familia de plantas cosmopolita que se distribuye en casi todo el globo terráqueo, excepto en las zonas árticas del planeta (McCormick et al., 2018).

Cuentan con estrategias de reproducción únicas, como una íntima cooperación con polinizadores que pueden ser específicos, dependiendo de la especie de orquídea. Además, el establecimiento de asociaciones simbióticas con hongos es indispensable para la germinación natural de sus semillas, ya que estas carecen de endospermo y reservas de carbono y energía convencionales para completar su proceso germinativo (Sathiyadash et al., 2012).

El género *Vanilla* se distribuye por el continente americano, principalmente en zonas tropicales. México es el centro de origen de la especie *Vanilla planifolia* considerada la orquídea con mayor cantidad de vainillina y por lo tanto altamente apreciada en el mercado mundial, es utilizada como una especia fina en la gastronomía, industria refresquera, industria cosmética, como aromatizante y también se estudian sus cualidades farmacéuticas para su uso potencial en la elaboración de medicamentos (Villanueva, 2017). México es el tercer productor de vainilla a nivel mundial con un total de 589 t producidas (FAOSTAT, 2020). Sin embargo, la producción de vainilla en México es amenazada por el cambio climático y el cambio de uso de suelo para la producción de ganado, además de limitaciones en las estrategias de selección y propagación de materiales con características agronómicas deseables (Bello et al., 2015).

En la producción de vainilla se valoran características de las plantas que tienen beneficios comerciales, como la acumulación de mayor contenido de vainillina y otros compuestos de naturaleza fenólica, responsables del sabor y aroma característicos (Cervantes et al., 2018; Herrera-Cabrera et al., 2018). Otras características deseables en la selección de plantas para producción son un desarrollo más precoz, mayores tasas de rendimiento (Ramos-Castellá et al., 2016) y plantas con resistencia al ataque de patógenos como *Fusarium oxysporum* (Koyyappurath et al., 2016).

La reproducción sexual es la estrategia de propagación que propicia heterogeneidad genética y promueve la variabilidad (Debouk et al., 2008), lo cual es ideal para seleccionar y propagar caracteres sobresalientes; no obstante, la mayor parte de las plantas en los vainillales son obtenidas por medio de propagación vegetativa, debido a que la reproducción sexual requiere de polinizadores específicos o polinización artificial, además de que la germinación de las semillas, ya sea en condiciones naturales o *in vitro*, es complicada (Bello et al., 2015). Es por ello que los vainillales cuentan con poca variabilidad genética.

La especie *Vanilla planifolia* es considerada la orquídea con mayor contenido de vainillina respecto a otras especies de vainilla en el mercado como *Vanilla pompona* y *Vanilla tahitensis*. El 95 % de la producción mundial de vainilla es abastecida por la especie *V. planifolia* (Bory et al., 2008; Ramos-Castellá et al., 2016).

Pese a su importancia económica, *V. planifolia* (Pr) se encuentra catalogada en peligro de erosión genética bajo la norma NOM-059-SEMARNAT-2010, debido a la pérdida de individuos en su hábitat silvestre (Villanueva, 2017), lo cual acrecienta la apremiante

necesidad de promover estrategias de propagación sexual efectivas, estudios ecológicos estiman que existen estas estrategias.

Los hongos micorrizógenos orquideoides son una alternativa viable para la germinación exitosa de las semillas de vainilla, pueden incrementar el porcentaje de germinación y promover el incremento de variabilidad genética. Además, de que pueden ayudar a las plantas a soportar condiciones de estrés biótico y abiótico como son la tolerancia a estrés hídrico y la inducción de mecanismos de defensa ante el ataque de patógenos en condiciones naturales (Alomia et al., 2017; Beltrán-Nambo et al., 2018), por lo que el propósito de la presente propuesta de investigación es la selección de simbiontes fúngicos que promuevan la germinación y desarrollo temprano de *Vanilla* sp., con potencial para ser utilizados en estrategias de propagación sexual.

II. Revisión de literatura

Distribución mundial de orquídeas

La familia Orchidaceae es la segunda familia de plantas vasculares más grande del reino vegetal con mayor número de especies registradas después de Asteraceae (Zhao et al., 2021), es representativa de alrededor de un 10 % de las plantas angiospermas (plantas con flores) reportadas a 2021 con un estimado de 30,000-35,000 especies de orquídeas (Li, Yang, et al., 2021) repartidos en 880 géneros (Tsulsiyah et al., 2021).

Es una familia cosmopolita que se encuentra distribuida en la mayoría del globo terráqueo, exceptuando las zonas árticas del planeta, sin embargo, la mayor concentración de biodiversidad se agrupa en las zonas intertropicales (Figura 1), siendo éstas zonas prioritarias para programas de conservación de orquídeas (Tejeda-Sartorius et al., 2017).

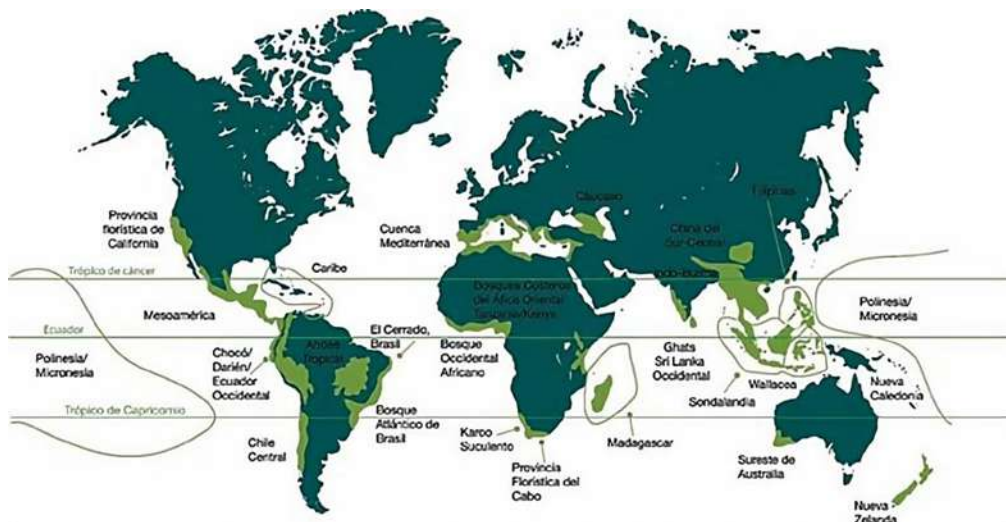


Figura 1. Ecorregiones prioritarias del mundo (verde claro). Regiones con excepcionales concentraciones de especies endémicas (entre ellas, orquídeas) sometidas a pérdidas de su hábitat (Tomado de: Tejeda-Sartorius et al., 2017).

La orquídeoflora de México, comparada con otros países tropicales, es muy bien conocida, gracias a los muchos recolectores que visitaron México en el siglo XIX y a grandes esfuerzos de investigadores asociados al grupo del Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología (AMO) (Tejeda-Sartorius et al., 2017). Se reconocen 1,260 especies de orquídeas, distribuidas en 170 géneros, con un porcentaje de endemismo del 40 % (Dressler, 2005).

La principal característica morfológica que define a esta familia es la singularidad de sus estructuras florales, las cuales poseen una amplia gama de formas y tamaños, sin embargo, todas ellas han evolucionado de tal manera que el androceo y el gineceo están fusionados en una estructura denominada “columna” ubicada en el centro de la flor y un pétalo modificado llamado labelo que suele ser la parte más vistosa de la flor (Téllez, 2011).

Orchidaceae se organiza en 5 subfamilias diferentes (Apostasioideae, Cypripedioideae, Vanilloideae, Orchidoideae y Epidendroideae) (Luo et al., 2014), cada una se clasifica según características morfológicas distintivas, además, el apoyo de herramientas moleculares ha sido determinante y ha facilitado el reconocimiento de especies aportando evidencia del parentesco entre subfamilias (Havkin-Frenkel & Belanger, 2019).

Distribución de la subfamilia *Vanilloideae*

La subfamilia Vanilloideae incluye un total 15 géneros reportados y cerca de 250 especies, tienen una distribución amplia, aunque la mayoría de las especies son tropicales (Téllez, 2011), dentro de los géneros más destacables que se agrupan en

esta subfamilia, se encuentran; *Pseudovanilla* y *Vanilla* (Havkin-Frenkel & Belanger, 2019) (Figura 2).

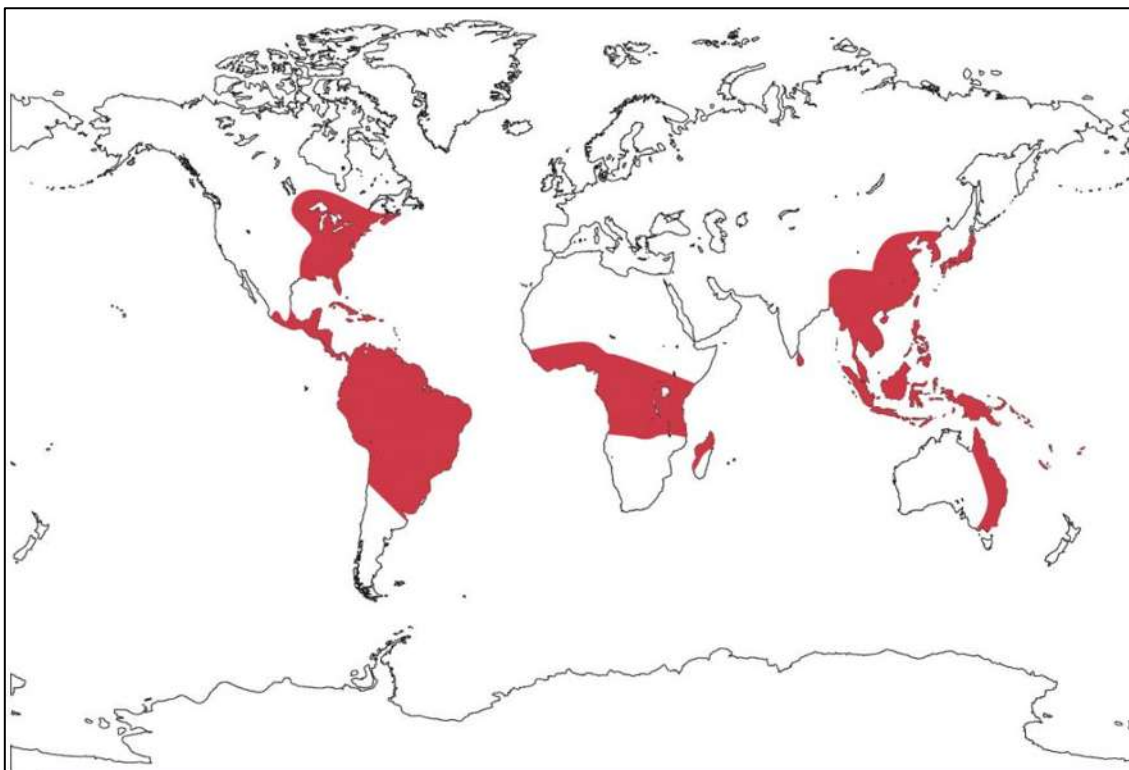


Figura 2. Distribución de la subfamilia Vanilloideae. Las zonas rojas presentan la mayor incidencia de la subfamilia Vanilloideae (Tomado de: Téllez, 2011).

Distribución de *V. planifolia* en México

V. planifolia es una orquídea que se desarrolla en zonas tropicales, México es considerado el centro de origen de este cultivo y posible centro de domesticación (Soto, 2009), además, México cuenta con la denominación de origen “VAINILLA DE PAPANTLA” que protege la producción de vainilla en los estados de Veracruz y Puebla, abarca el proceso artesanal de beneficiado del fruto así como protege los extractos y derivados como: el extracto natural de vainilla y el extracto natural concentrado de vainilla; las oleorresinas de vainilla, vainilla en polvo y vainilla molida, que hayan sido elaboradas a partir de las vainas (DOF, 2009).

Soto (2009) en sus estudios de vainillas mexicanas en el territorio mexicano reporta densidades poblacionales silvestres de *V. planifolia* que estiman que se encuentra 1 individuo por cada 2-30 km en el norte del Estado de Oaxaca, en el área comprendida por las Sierras Mazateca y Chinanteca, así como registros de poblaciones silvestres en la Selva Lacandona y la Selva del Ocote, Chiapas, en el norte de Yucatán y Quintana Roo (Soto, 2009) (Figura 3).



Figura 3. Distribución de poblaciones silvestres de *V. planifolia* en México. Los círculos negros indican individuos silvestres, los círculos blancos indican individuos que se desconoce si son silvestres (Tomado de: Soto, 2009).

Esta especie nativa de México se encuentra en peligro de erosión genética y se encuentra catalogada en peligro de extinción en la categoría de protección especial debido a la pérdida de individuos silvestres (DOF, 2010).

México es el centro más grande de diversidad de la especie *Vainilla planifolia*, esta es la especie más consumida alrededor del mundo, debido al alto contenido de vainillina (Herrera-Cabrera et al., 2018), el 95 % de la producción global de vainilla es abastecida

por la especie *V. planifolia*, el 5 % restante es proporcionado por las especies *Vanilla pompona* y *Vanilla tahitensis* (Ramos-Castellá et al., 2016).

Importancia económica

La vainilla es un cultivo apreciado por el alto contenido de vainillina en las cápsulas de esta orquídea; en el 2020 Madagascar se condecoró como el productor número uno a nivel mundial, con una producción de 2, 975 t, en una extensión de 74,847 ha, seguido de Indonesia con 2306 t en 14,057 ha, México se consolidó como el tercer productor de vainilla con 589 t en 1,035 ha, Papua Nueva Guinea con 405 t en 1,793 ha y China con 433 t en 2,615 ha (Figura 4 A) (FAOSTAT, 2020).

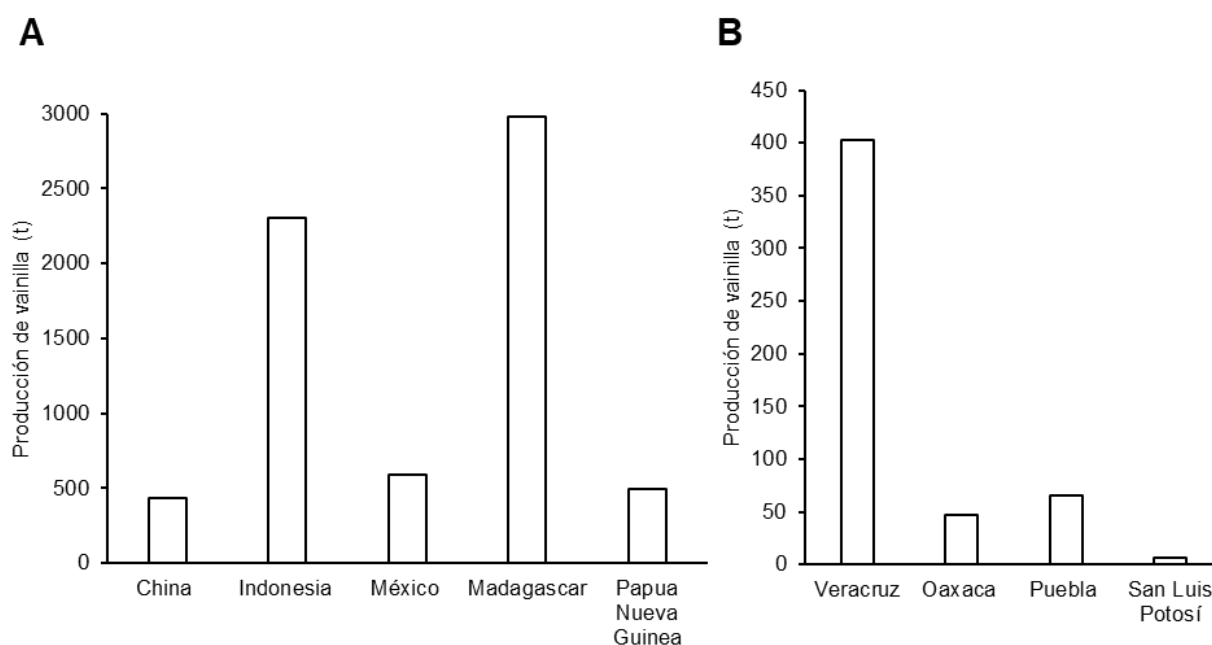


Figura 4. Producción de vainilla. A) Producción mundial de vainilla en 2020, B) Producción nacional de vainilla en 2019. Datos obtenidos de FAOSTAT, (2020) y SIAP (2019).

La producción nacional de vainilla es encabezada por el Estado de Veracruz, con un total 403, 07 t, Puebla prosigue en producción con un total de 65,06 t, Oaxaca con 46,7

t y por último el estado de San Luis Potosí cubriendo una producción de 7,03 t (Figura 4 B) (SIAP, 2019).

Clasificación taxonómica

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Vanilla planifolia*. Tomado de: Havkin-Frenkel & Belanger, (2019).

Dominio	Eukarya
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliópsida
Orden	Asparagales
Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Vanilloideae
Género	<i>Vanilla</i>
Especie	<i>Vanilla planifolia</i>

Morfología de *V. planifolia*

Descripción original, de acuerdo con Soto (2009).

Hemiepífitas, ramificadas, hasta de 12 m de alto y 120 m de largo. Tallos 6.5-2(-13) mm de grosor; teretes lisos, verde oscuro, inconspicuamente punteados de verde blanquecino; entrenudos de 6-15.5 cm de largo. Hojas subsésiles a subpeciadas, subdísticas; lámina 8.5-23 x 2-7.6 cm, elíptica-oblonga, angostamente oblonga, raramente ovada, ampliamente elíptica u oblanceolada, algo oblicua, con los márgenes frecuentemente paralelos (e.g. cv. 'Mansa'), base obtusa o redondeada, abruptamente acuminada o subacuminada en el ápice; coriáceo-carnosa, haz verde intenso a pálido, lustroso, envés más pálido; el pecíolo acanalado, algo torcido, de 8-18 x 7-9 mm. Inflorescencia de 4-26.5 cm de largo, un racimo helicoidal, muy raramente ramificado, candelabroiforme, con 7-35(-70)

flores; pedúnculo 1.5-5 cm de largo, 5-7 mm de grosor, carnosos, teretes, con brácteas subdísticas, cimbiformes, recurvadas, triangular-ovadas, subagudas, marginadas, raramente subfoliosas, hasta de 13(-50) x 9(-20) mm; raquis 3.5-21 cm de largo, 7-8 mm de grosor. Brácteas 5-10 x 3-4 mm, sésiles, ampliamente ovadas o triangular-ovadas, agudas abajo, las distales obtusas-redondeadas, cóncavas, carnosas y rígidas. Ovario 40-57 mm de largo, 3.5-4 mm de grosor, arqueado en la base, recto, terete, liso, verde, blanco en la base, con nectarios extraflorales. Flores c. 62-64 mm de alto, 39 mm de ancho, sucesivas, algo vistosas, 1-2(-3) abiertas a la vez, segmentos variablemente extendidos, más frecuentemente con los tépalos formando un ángulo de casi 40° respecto a la columna, efímeras, tépalos verdes pálido a verde blanquecino, brillantes, labelo amarillo pálido-crema con café ocre en la garganta y las papilas (e.g. cv. 'Mansa'), o totalmente verde-crema, papilas distales verdes, columna verde-blanquecina; fragancia débil, herbácea, con notas blancas y variablemente con olor a canela. Sépalo dorsal 52-60 x 9-12 mm, angostamente elíptico a oblanceolado, ápice subagudo, redondeado, subcaliptrado, ligeramente cóncavo, base atenuada-subunguiculada, canaliculada. Sépalos laterales 52-60 x 10-13.5 mm, angostamente elípticos a oblanceolados, oblicuos, ápice subagudo, subcaliptrado, base atenuada-subunguiculada, casi planos, ligeramente canaliculados basalmente, márgenes ligeramente involutos. Pétalos 51-58.5 x 9-11 mm, largamente oblanceolados, oblicuos, algo arqueados, ápice ligeramente reflexo, obtuso-

redondeado, oblicuo, emarginado, ligeramente engrosado, base atenuada; cóncavos, canaliculados en la base; quilla abaxial muy conspicua, plana, terminando en un proceso libre, cilíndrico, ascendente, de c. 2 mm de largo. Labelo 47-55 x 23-26 mm, fusionado a los márgenes de la columna c. 28-35 mm, largamente tubular-infundibuliforme, muy cóncavo-cimbiforme, ligeramente sigmoide e inflado; la uña de 15-17 x 4 mm, pubescente, tricomas cortos, amarillos a ocre; lámina obovada-flabelada, trilobada en contorno general, las venas ramificadas en el tercio distal y ligeramente engrosadas; los lóbulos laterales 20-27 x 8-10.5 mm, oblicuamente triangular-flabelados, márgenes ampliamente ondulados, denticulados hacia el lóbulo medio, dientes generalmente de menos de 0.6 mm de largo; lóbulo medio de c. 4-5 x 9 mm, extendido-deflexo a recurvado, aproximadamente subcuadrado transversalmente oblongo, emarginado a profundamente bilobado, el margen ondulado-crenado; callo penicilado a 26-37 mm de la base, 4.8-6 x 4-4.5 mm, formado por c. 8 escamas, flabeladas, premorsas, amarillo pálido, continuo hacia el ápice con 2 hileras conspicuas de papilas y otras 2-4 hileras menos conspicuas; ápice extremo engrosado y acojinado. Columna 38-45 mm de largo, 2.5 mm de ancho, ápice dilatado, c. 3.5 mm de ancho; trígona-semiterete, superficie ventral plana, sulcada hacia la base, muy pilosa; con alas de 2 x 4 mm, flabeladas a obscuramente lobado-erosas, agudas a redondeadas. Antera c. 3 x 3 mm, ovado-cordiforme o elipsoide. Polen formando una masa granulosa, amorfa, pegajosa. Estigma trilobado,

los lóbulos laterales emergentes, c. 1 x 1 mm, oblongos, ligeramente divergentes uno de otro; rostelo c. 3 x 2 mm, una lámina convexa, trapezoidal, cubriendo y paralela a los lóbulos laterales. Cápsula 10-17(-30) cm de largo, 7-10 mm de grosor, recta o ligeramente arqueada, cilíndrica, largamente subclavada, algo trígona, conspicuamente 2-3 sulcada a lo largo de las líneas carpelares (en muchos especímenes silvestres) o lisa (cv. 'Mansa'), fuertemente fragante cuando madura. $2n = 32$ (Figura 5) (Soto, 2009).

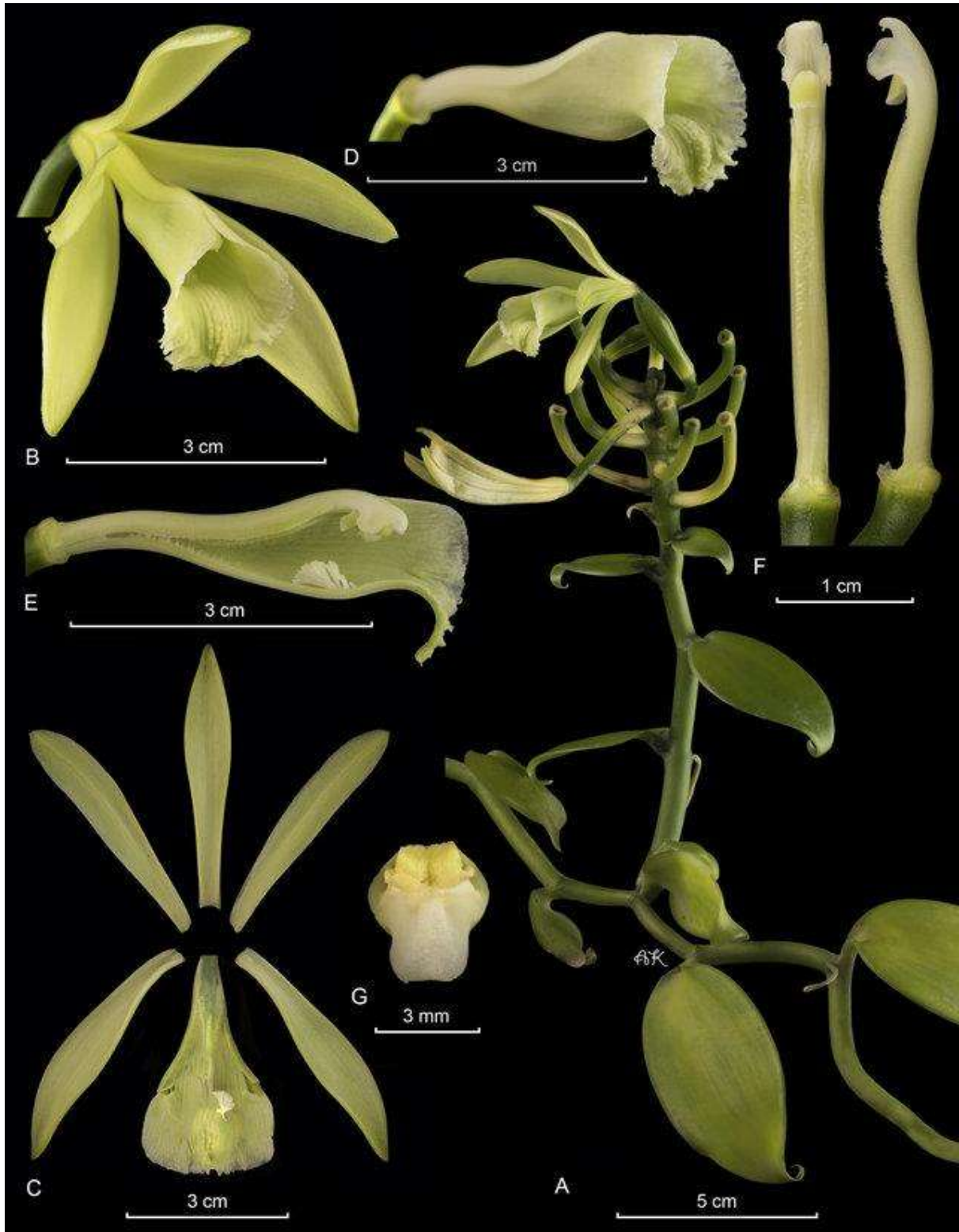


Figura 5. Descripción morfológica de *V. planifolia*. Simbología: A) Hábito hemiepífito, B) Flor, C) Perianto disecado, aplanado, D) Vista lateral del labio, E) Vista lateral del labio y la columna, F) Columna, vista ventral y lateral, G) Gorro de antera y polinia (Tomado de Karremans et al., 2020).

Morfología y anatomía radicular de *V. planifolia*

En general las orquídeas presentan diferencias estructurales morfológicas y anatómicas en su raíz, dependiendo del hábito de crecimiento de la orquídea, las orquídeas rupícolas y epífitas sustituyeron la epidermis radicular por un tejido esponjoso compuesto por varios estratos de células muertas, llamado velamen, este tejido tiene como funciones absorber y retener la humedad ambiental, proteger de la radiación a la zona cortical de la raíz y también se sugiere que sirve como nicho para el establecimiento de bacterias y hongos endófitos (Figura 6) (Thangavelu & Muthu, 2017).

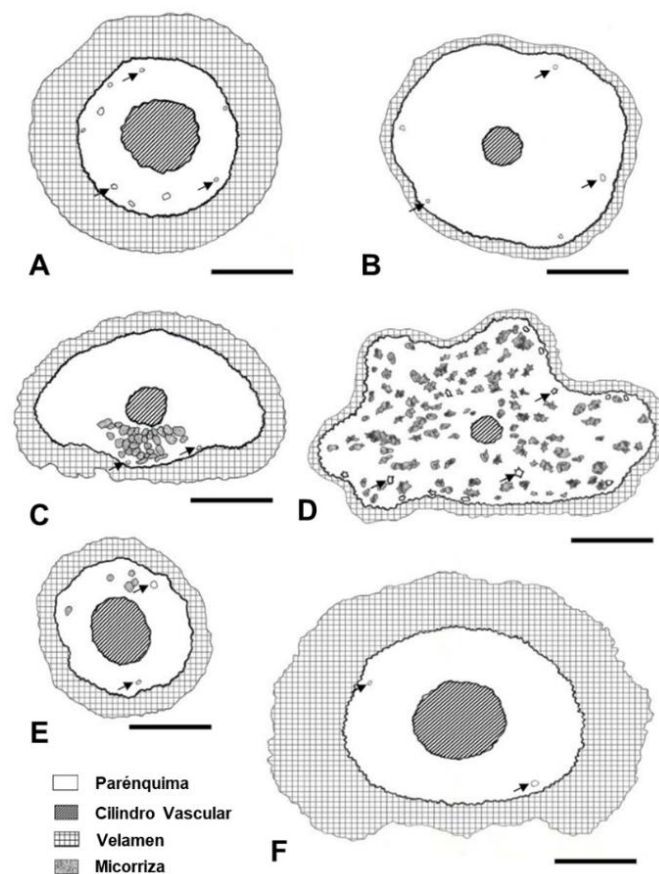


Figura 6. Diagramas de raíces de orquídeas epífitas. A) *Enciclia patens*, B) *Epidendrum saxatile*, C) *Sofronitis pumila*, D) *Polystachia estrellensis*, E) *Avicula delanio*, F) *Scaphyglottis modesta*. Las flechas indican idioblastos con ráfidos. (barras = 1 mm en 5-8; y 0,4 mm en 9-10 (Tomado de: Moreira & Dos Santos, 2008).

En orquídeas hemiepífitas se puede desarrollar el velamen en raíces adventicias que se encuentran en contacto con la corteza de los árboles, orquídeas hemiepífitas como *Epidendrum radicans*, desarrollan velamen, por su parte, *V. planifolia* mantiene la estructura radicular de una planta monocotiledónea con una epidermis uniseriada y células epidérmicas que se pueden diferenciar en pelos absorbentes (Deseo et al., 2020).

La epidermis es uniseriada producto de divisiones anticlinares, algunas células se diferencian en pelos absorbentes, con una pared celular más delgada, la función más estudiada de los pelos radiculares es la de ampliar el rango de absorción de agua y sales minerales para favorecer la nutrición de la planta (Figura 7 A) (Stern & Judd, 1999).

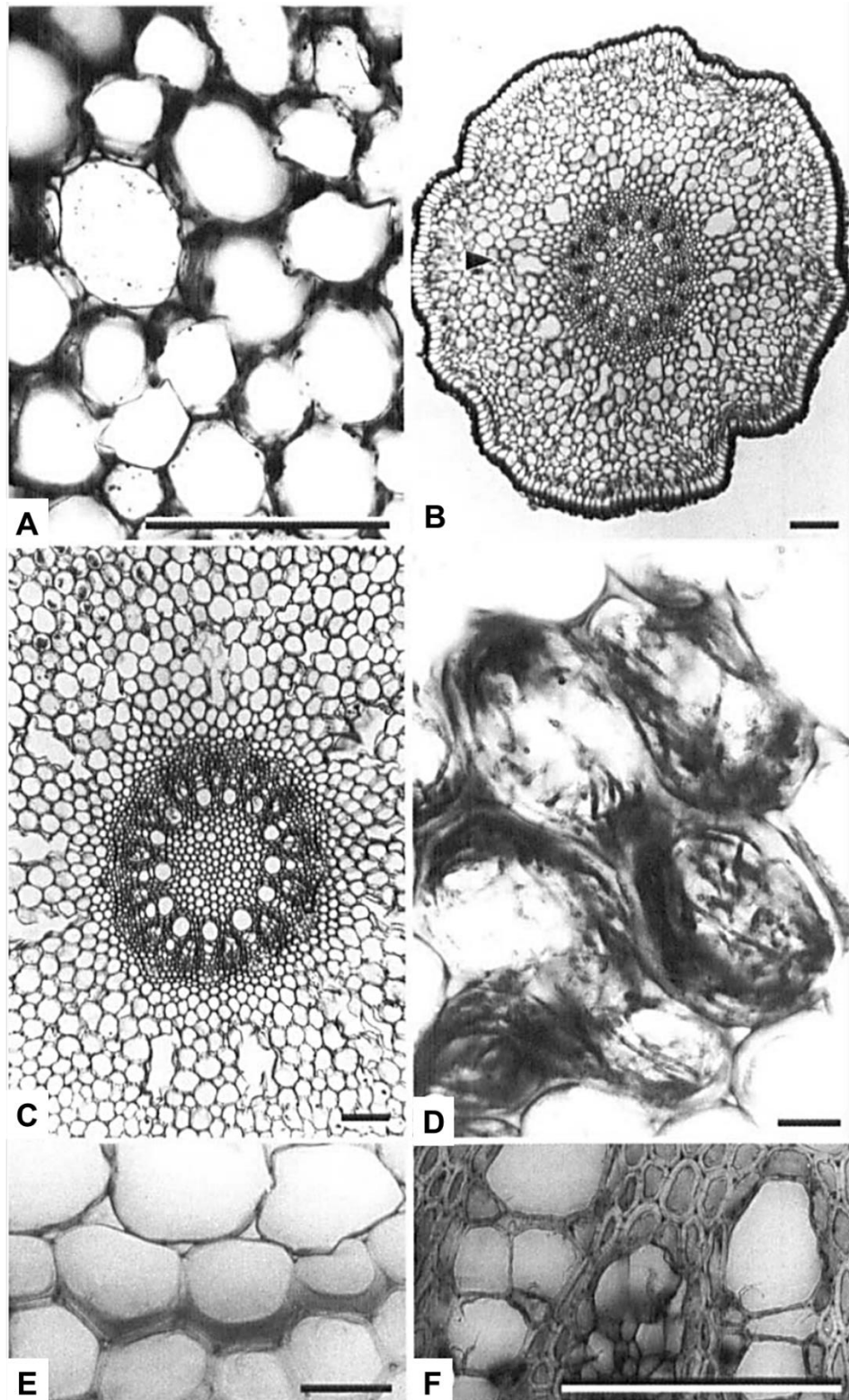


Figura 7. Anatomía radicular terrestre de *Vanilla* spp. A) Células corticales, B) Corte transversal de raíz, C) Cilindro vascular, D) Pelotones desarrollados en la zona cortical, E) Células de endodermis lignificadas en "U", F) Haces vasculares alternos (Tomado de: Stern & Judd, 1999).

Después de la epidermis, sigue la exodermis, este estrato celular es uniseriado, producto de divisiones anticlinales; sin embargo, a diferencia de la epidermis, las células exodérmicas están compuestas por paredes celulares más gruesas y en la parte que delimita con las células del córtex radicular se encuentran zonas con lignificaciones en “U”, estas lignificaciones sirven a la planta como estrategia para mantener la turgencia de la raíz en condiciones de estrés hídrico, además, de ser necesario la exodermis puede sustituir la función de la epidermis (Figura 7 B, C y D) (Stern & Judd, 1999).

La zona cortical (Figura 7 B, C y D), abarca el mayor volumen radicular, se compone por células de parénquima, con vacuolas grandes que sirven para el almacenamiento de sustancias de reserva, en esta zona se desarrollan los hongos micorrizógenos orquideoides (Jiménez-Peña et al., 2018), el micelio del hongo penetra a través de los estratos celulares superiores y en la zona cortical desarrolla los patrones anatómicos característicos de la simbiosis micorrizógena, que consisten en hifas hiperenrolladas de manera desordenada, estas estructuras tienen por nombre, “pelotones” (Stern & Judd. 1999).

En la zona central de la raíz se encuentran el cilindro vascular, este se delimita por células de paso, células uniseriadas que contienen la banda de Caspary y células de endodermis que contienen lignificaciones en “U” que impiden el paso de agua al cilindro vascular, las células de paso a su vez están conectadas con células de tonoplasto, estas células tienen la capacidad para diferenciarse y dar origen a nuevas raíces laterales. También están conectadas a los arcos de protoxilema y metaxilema,

de manera alternada al floema, separados por la médula del cilindro vascular, compuesta por células de esclerénquima (Garcez & Bonates, 2015).

Morfología y anatomía de las semillas de *V. planifolia*

Las semillas de orquídea son de tamaño microscópico, llegan a medir unas cuantas micras, se componen por una delgada cubierta seminal que consta de una capa de células, la testa o cubierta seminal puede ser lisa o reticulada, el embrión es ovoide casi esférico, abarca alrededor del 2.5 % de la semilla, el 80 % se compone de aire (Arditti, 2022).

Los embriones de orquídea se conforman por una esfera de células indiferenciadas, que dan origen a una plántula, la histodiferenciación ocurre después de la germinación, a diferencia del resto de plantas angiospermas donde la diferenciación de tejidos ocurre al mismo tiempo en que se forma la semilla (Yeung, 2022).

Las semillas de orquídea carecen de endospermo, este tejido contiene reservas alimenticias como almidón, proteínas y lípidos que abastecen al embrión heterótrofo durante el proceso germinativo hasta la generación de una plántula hasta que esta es fotosintéticamente activa, y puede generar sus propios fotosintatos (Yeung et al., 2019).

Las semillas del género *Vanilla* a diferencia del resto de orquídeas están protegidas por una cubierta seminal altamente lignificada (Alomía et al., 2016), se cree que esta adaptación puede deberse a un mecanismo de dispersión de la semilla, los frutos y semillas que son aromáticos son digeridos por animales y en su tracto digestivo son escarificadas, posteriormente son excretadas y dispersadas (Pansarin, 2021).

Las semillas de *V. planifolia* miden alrededor de 286.08 de largo a 232.17 μm de ancho (Reyes-López et al., 2014), estudios de la composición de semillas de *V. planifolia* han demostrado que contienen una pequeña cantidad de gránulos de almidón y lipoproteínas (Figura 8) (Yeh et al., 2021).

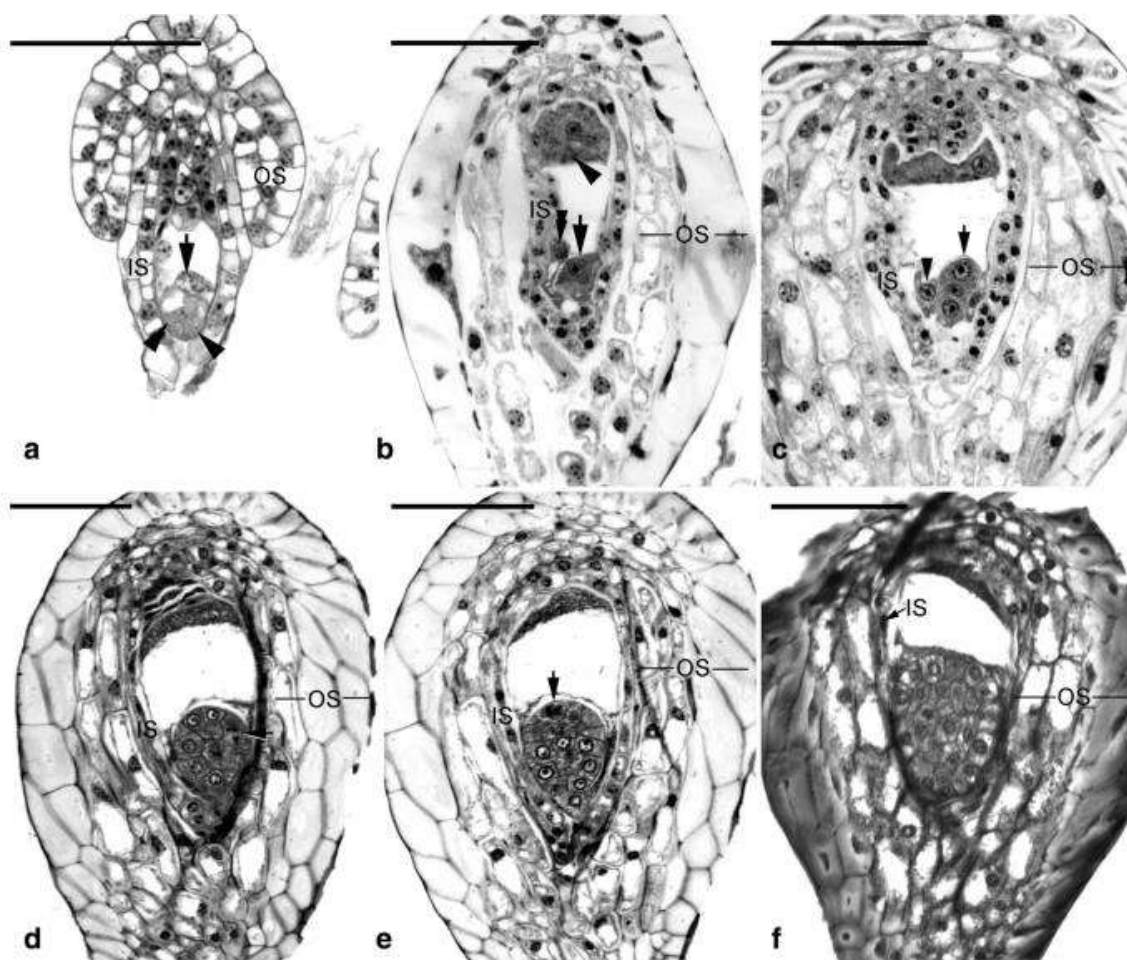


Figura 8. Etapas de desarrollo embrionario de *V. planifolia*. A) Un saco embrionario maduro que muestra el cigoto, incluido el óvulo (flecha) y dos sinérgidos (puntas de flecha), B) A los 30 días después de la fecundación (DDF), el cigoto (flecha) tenía un citoplasma denso y las células antípodas degeneradas (punta de flecha) en el extremo chalazal. En esta especie, el endospermo no se desarrolló y se pudo observar un núcleo de endospermo degenerado (doble punta de flecha), C) Micrografía de luz que muestra un proembrión de tres células (flecha) y un núcleo de endospermo degenerado (punta de flecha) junto al cigoto, D) Hacia el 45 DDF, se produjo una división anticlinal (flecha) en la capa celular más externa, lo que resultó en la formación del embrión de forma globular, E) Micrografía de luz que muestra un embrión globular temprano con una división anticlinal adicional (flecha). Esta especie no tenía un suspensor distinto durante el desarrollo del embrión, F) Micrografía de luz que muestra una sección longitudinal a través de un embrión globular a los 60 DDF. La capa más externa de la cubierta exterior de la semilla (OS) se lignificó. Simbología: La cubierta exterior de la semilla (OS) se estaba alargando y no había encerrado la cubierta interior de la semilla (IS). Barra de escala = 100 μm (Tomado de: Yeh et al., 2021).

Métodos de propagación

Las vainillas, al igual que el resto de las orquídeas comparten características que dificultan su germinación, el método de propagación más utilizado consiste en multiplicar de manera clonal donde esquejes de vainilla de medio metro son obtenidos a partir de una planta madre, las yemas axilares en contacto con el sustrato que se encuentran entre los nudos del esqueje se diferencian en raíces laterales, estas desarrollan pelos radiculares, este método de propagación propicia la homogeneidad genética, ya que las plantas hijas contienen el mismo acervo genético de la planta madre (INIFAP, 2014).

Otro método de propagación menos empleado es por medio de reproducción sexual. Flores de vainilla son polinizadas, el ovario se transforma en una cápsula verde dehiscente, semillas lignificadas se extraen para germinar (INIFAP, 2014), de manera natural las orquídeas germinan gracias a la simbiosis que generan con hongos micorrizógenos orquideoides, también se emplean medios de cultivo suplementados con azúcares, sales minerales y vitaminas que sustituyen la función del micobionte (Yung-I & Chee-Tak, 2018).

Generalidades de la simbiosis micorrízica

Las micorrizas se encuentran entre las relaciones simbióticas más prolíferas e importantes dentro de las interacciones biológicas, se estima que alrededor del 80 % de las plantas terrestres se asocian con hongos micorrizógenos (Martin, 2017), ayudan a regular el flujo de carbono orgánico, el tránsito de minerales, así como la proliferación y distribución de especies vegetales, esta asociación ocurre en cerca de 340 000 plantas terrestres y 50 mil taxones de hongos diferentes (Genre et al., 2020).

Las asociaciones micorrizógenas generan patrones anatómicos radiculares característicos, que permiten clasificarlos, acorde a la estructura que generan, se clasifican como ectomicorizas; a aquellos hongos que desarrollan micelio en los espacios intercelulares de la zona epidérmica y cortical, ectoendomicorizas; aquellos que desarrollan micelio en la zona cortical y colonizan algunas células epidérmicas como la micorriza monotropoide y arbutoide, y por último, endomicorizas; micobiontes que desarrollan micelio dentro de las células corticales de la raíz, estos últimos se dividen en micorriza arbuscular, ericoide y orquideoide (Brundrett & Tedersoo, 2018).

A continuación, se muestra un esquema general de asociaciones micorrizógenas generado por (Gryndler et al., 2004) (Figura 9).

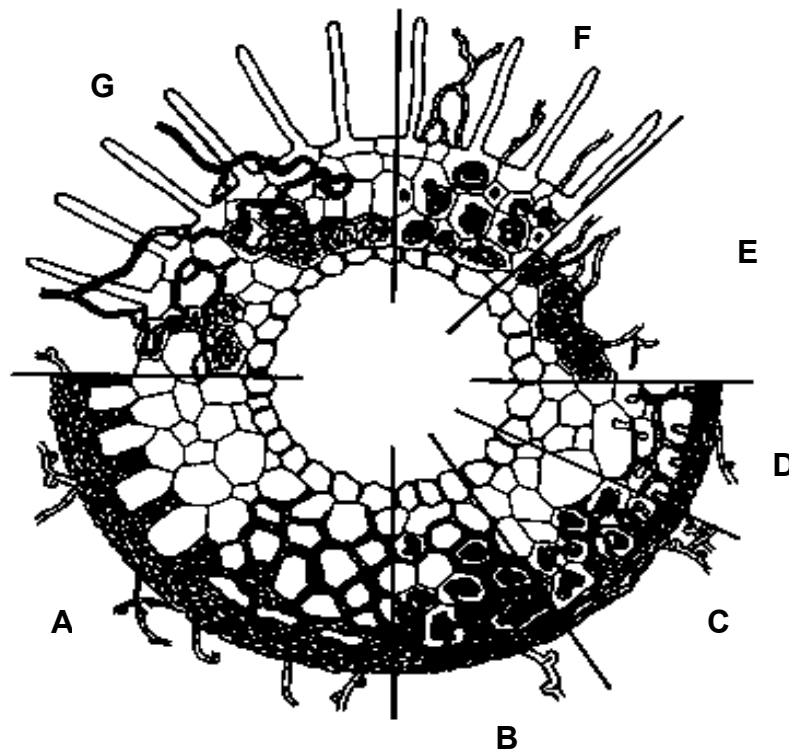


Figura 9. Esquema de tipos de asociaciones micorrizógenas. A) Ectomicoriza, B) Ectoendomicoriza, C) Micorriza arbutoide, D) Micorriza monotropoide, E) Micorriza ericoide, F) Micorriza orquideoide, G) Micorriza arbuscular (Tomado de: Gryndler et al., 2004).

Micorriza orquideoide

Las orquídeas se han posicionado como una familia cosmopolita por su distribución prácticamente en todos los continentes del planeta (McCormick et al., 2018), exceptuando las zonas árticas (Jain et al., 2021). Parte del éxito evolutivo de las orquídeas, su diversificación y distribución se debe a que contienen semillas volátiles que lograron colonizar lugares a distancias grandes (Li, Wu, et al., 2021), pero también a la relación que guardan con diferentes tipos de hongos, que les proporcionan una fuente de carbono durante la germinación, así como mayor resistencia al ataque de patógenos y estrés abiótico (Brundrett & Tedersoo, 2018; Li, Wu, et al., 2021).

La relación simbiótica que guardan las orquídeas con microorganismos del reino Fungi data del periodo Cretácico, esta asociación simbiótica involucra hongos saprófitos facultativos de las Familias *Tulasnelaceae* y *Ceratobasidiaceae*, también algunos géneros de hongos pertenecientes a la familia Serendipitaceae y *Pezizales*, (Sarsaiya et al., 2019) reportaron un registro de 200 géneros de orquídeas que guardan relaciones simbióticas con hongos endófitos fúngicos, incluso se ha descubierto que especies de orquídeas aclorófilas pueden formar simbiosis con grupos de ectomicorrizas, estas les ayudan a regular la adquisición del nitrógeno y carbono orgánico (Sarsaiya et al., 2019).

Los hongos hospederos de esta relación simbiótica se caracterizan por crear hiper enrollamientos hifales desordenados mejor conocidos como “pelotones” dentro de una célula cortical de la raíz (Jiménez-Peña et al., 2018). El hongo puede colonizar otras partes de la raíz, como el velamen, el cual es una sección que consta de células muertas compuesta principalmente por moléculas de celulosa que sirve como nicho

para el hongo, mientras que a la orquídea le sirve como protección contra el ataque de patógenos (Navarro, 2021).

Debido a que muchas orquídeas viven en condiciones extremas, en sustratos carentes de nutrientes y algunas incapaces de realizar correctamente sus funciones fotosintéticas, por habitar a la sombra de las copas de árboles, utilizan estrategias de obtención de carbono y nutrientes en muchas ocasiones asociadas a la interacción con hongos micorrizógenos (Jiménez-Peña et al., 2018). Se sabe que la mayoría de los hongos simbios de orquídeas poseen mecanismos enzimáticos que les permiten degradar azúcares complejos como la celulosa en otros más simples, los cuales pueden ser aprovechados por el embrión para su desarrollo (Adamo et al., 2020; Dashtaban et al., 2010). Las orquídeas presentan cuatro estrategias para la obtención de carbono y nutrientes que le permiten sostener sus procesos metabólicos, que son la micoheterotrofia, micofagia, mixoheterotrofia y autotrofia (Smith & Read, 2008).

La micoheterotrofia es una estrategia que ocurre durante la germinación y crecimiento de sus plántulas, esta fase de obtención de fuentes de carbono a partir de otros organismos es obligada en todas las especies de orquídeas, al ser carentes de reservas alimenticias para germinar (Dearnaley, 2007). Las hifas dentro de las células del córtex radicular transportan biomoléculas que pueden ser traslocadas a la orquídea (Bellino et al., 2014). Las orquídeas pueden utilizar este mecanismo de alimentación, no únicamente durante la fase germinativa, sino incluso durante toda su vida, como en el caso de las orquídeas aclorofílicas o algunas terrestres (Smith & Read, 2008).

Por su parte, la micofagia hace referencia a la capacidad de la orquídea para lisar y fagocitar los pelotones existentes en las células del córtex radicular, este proceso es

apoyado por enzimas uricasas, quitinasas, peptidasas, oxidasas y catalizadores dentro de la vacuola, facilitando la degradación y descomposición del pelotón. Se ha reportado que el proceso puede tardar entre 30 a 40 horas (Rasmussen & Rasmussen, 2009), una vez instalado el hiper enrollamiento hifal dentro de la célula, las células corticales que fagocitan a los pelotones se conocen como “células digestivas” y se diferencian de las células hospedadoras, en que estas últimas sólo mantienen dentro de su citoplasma a los pelotones sin degradarlos, ni digerirlos (Mukerji K. et al., 2002).

La mixoheterotrofia es utilizada por orquídeas principalmente epífitas y litófitas, en ellas la obtención del carbono se da por dos fuentes, la fotosíntesis realizada por la misma planta y el carbono obtenido a través de la relación del hongo que habita en las raíces de la orquídea (Jacquemyn et al., 2017). Algunas orquídeas adultas utilizan esta estrategia cuando las condiciones del medio ambiente son poco favorables (Bellino et al., 2014).

En la autotrofia, la obtención de carbono se da directamente a través del proceso de fotosíntesis de la planta, las orquídeas adultas en condiciones favorables utilizan principalmente este medio de obtención de carbono. Bajo estas circunstancias la orquídea puede aportar mayor cantidad de fotoasimilados como hidratos de carbono y vitaminas al hongo (Zhang et al., 2018).

Germinación simbiótica de las orquídeas

Existe una estrecha coevolución entre las orquídeas y sus hongos hospederos, la evidencia molecular indica que durante el proceso de la germinación en las semillas de orquídea existe una regulación en la actividad de genes recíprocos en ambos simbiontes (Miura et al., 2023) esto genera, por un lado, la ausencia de glioxisomas y

endospermo en las semillas de la orquídea y, por otro lado, la secreción de alexinas y fenoles para la comunicación química entre ambos simbios (Mukerji et al., 2002).

La germinación solamente ocurre cuando la semilla se encuentra en un ambiente favorable con humedad relativa alta, iluminación favorable y presencia de materia orgánica; en estas condiciones la semilla es colonizada por hongos micorrizógenos que abastecen a las plántulas jóvenes con azúcares y nutrientes hasta que sean autótrofas (Arditti, 1967).

Una vez que el hongo entra en contacto con la semilla, ésta utiliza los pocos azúcares que contiene para generar glioxisomas capaces de degradar los lípidos del suspensor, con esto puede generar metabolitos de resistencia como fitoalexinas de naturaleza fenólica que detienen el crecimiento del hongo (Peterson et al., 1998). El hongo excreta enzimas que desactivan los metabolitos producidos por la semilla de la planta y penetra el suspensor de la semilla, rizoides y tricomas, la semilla difunde fenoles que guían a las hifas hacia las células parenquimáticas del embrión (Yeung et al., 2019), se tiene conocimiento sobre el limitado crecimiento del micobionte en las células parenquimáticas que coloniza, ya que sólo es capaz de invadir células basales de los protocormos Selosse et al. (2011), en la germinación simbiótica de *Odontoglossum crispum* X *adranæ* y Leroux et al. (1997), en el desarrollo protocolario en la especie *Cypripedium acaule*, reportaron colonización en dicha zona, donde el hongo desarrolla los hiper enrollamientos hifales conocidos como pelotones, la orquídea es capaz de digerir los pelotones con ayuda de enzimas uricasas, quitinasas, peptidasas, oxidasas y catalizadores dentro de la vacuola, facilitando la descomposición del pelotón (Tsulsiyah et al., 2021).

El proceso de lisis y degradación de los pelotones concluye en biomoléculas sueltas en el citoplasma que posteriormente se incorporarán a diferentes rutas metabólicas para la nutrición celular de la orquídea (Sathiyadash et al., 2020).

Con el aporte nutricional del hongo el embrión tiene la suficiente energía y nutrimentos para desencadenar su metabolismo y comenzar la división celular y aumento de volumen, esta fase es completamente micoheterotrófica ya que el embrión depende de lo que le provea el hongo para un desarrollo exitoso (Sathiyadash, 2020).

Finalmente, con el aporte nutricional del hongo, la semilla finaliza el proceso de germinación, el protocormo se desarrolla, comienza a tonarse fotosintético, dependiendo de la especie de orquídea (Alghamdi, 2019) y las células meristemáticas dan origen al promeristemo apical y se diferencian láminas foliares fotosintéticamente activas y una radícula desarrollada (Hernández-Muñoz et al., 2017).

III. Objetivos

Objetivo General

Aislar y caracterizar hongos promotores de la germinación y desarrollo de protocormos de *V. planifolia*.

Objetivos Específicos

1. Seleccionar raíces de *V. planifolia* y *V. pompona* con colonización micorrízica.
2. Aislar hongos micorrízicos de raíces de *V. planifolia*, *V. pompona* y protocormos de *V. planifolia* germinados en co-cultivo con raíces de *V. planifolia* y *V. pompona*.
3. Identificar molecular y morfológicamente los aislados con potencial para la germinación de *V. planifolia*.
4. Evaluar la capacidad de los aislados para promover la germinación y desarrollo de protocormos de *V. planifolia*.

Hipótesis

Hongos micorrizógenos orquideoides que colonizan plantas adultas de *V. planifolia* y *V. pompona* promueven la germinación simbiótica y desarrollo de protocormos de *V. planifolia*.

IV. Materiales y Métodos

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Interacciones Planta-Ambiente, de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” en el municipio de Uruapan, Michoacán, México.

Material Biológico

Las plantas de vainilla fueron obtenidas de vainillales de Veracruz y Guerrero y propagadas en un invernadero privado ubicado en el municipio de Uruapan, bajo las siguientes coordenadas: 19°23'59"N 102°03'23"O (Google Earth, 2022).

Descripción morfológica del material vegetal

Se hizo una identificación morfológica de las especies de vainilla procedentes de Orizaba, Veracruz y El Para, Guerrero, auxiliándose de las claves de identificación generadas por Soto (2009) para la identificación de especies de vainillas mexicanas. Las vainillas de Veracruz correspondieron a *V. planifolia* y las vainillas procedentes de Guerrero a *V. pompona*.

Vainillas de Orizaba, Veracruz

V. planifolia presentó las siguientes características morfológicas: planta hemiepífita, ramificada, hasta de 12 m de alto y 120 m de largo. Tallos 6.5- 2mm de grosor, hojas subsésiles a subpecioladas, subdísticas; lámina 8.5-23 x 2-7.6 cm, elíptica-oblonga (Figura 11 A y D). Inflorescencia de 4-26.5 cm de largo, un racimo helicoidal, tépalos verdes pálido a verde blanquecino, brillantes, labelo amarillo pálido-crema con café ocre en la garganta y las papilas o totalmente verde-crema, papilas distales verdes, columna verde-blanquecina (Figura 11 B, C y E). Cápsula ligeramente cilíndrica, 10-

17 (-30) cm de largo 7-10 mm de grosor recta a ligeramente arqueada, algo trigona, sulcada a lo largo de las líneas carpelares, fuertemente fragante (Figura 10 F).

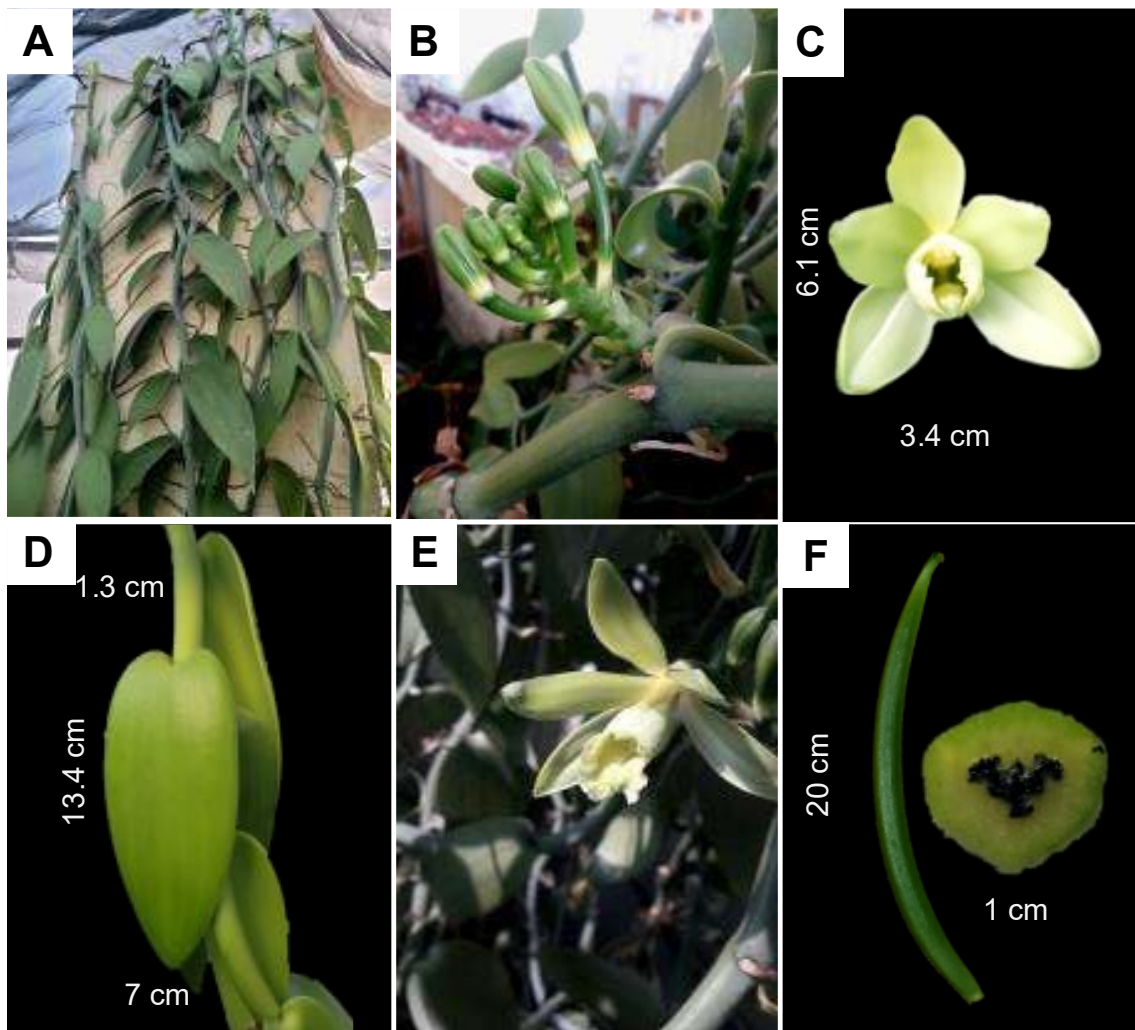


Figura 10. Descripción morfológica de la vainilla de Veracruz en floración. A) Hábito de crecimiento hemiepífita, lianas ramificadas, B) Inflorescencia racimo helicoidal, C) Flor de vainilla, vista frontal, D) Lámina foliar, nervadura paralela, hojas y tallos carnosos, E) Vista lateral flor de vainilla, labelo ondulado y dentado, F) Cápsula de vainilla, ligeramente arqueada, ligeramente cilíndrica.

Vainillas de El Para, Guerrero

V. pompona presentó las siguientes características morfológicas: planta hemiepífita, poco ramificada, hasta de 9 m de alto y 18 m de largo. Tallos 10- 32 mm de grosor, hojas subsésiles, subdísticas; lámina 11-31 x 5-9.2 cm, elíptica-ovalada color verde pálido. Inflorescencia de 8-15 cm de largo, un racimo helicoidal, tépalos amarillo pálido

a amarillo, brillantes, labelo amarillo, flores fragantes. Cápsula trigona, gruesa, arqueada de 7 a 14 cm de largo y 1 mm de grosor, fuertemente fragante.

Colecta de semillas y raíces

La obtención de semillas se llevó a cabo autopolinizando flores de *V. planifolia* considerando las recomendaciones de Lozano (2014), etiquetando las flores con su respectiva fecha de polinización.

Para la colecta de raíces, se utilizaron 10 plantas de vainilla adultas previamente obtenidas por medio de propagación vegetativa, seis plantas fueron obtenidas de una planta madre procedente de Orizaba, Veracruz identificada como *V. planifolia* y las cuatro restantes de otra planta madre procedente del Estado de Guerrero, identificada como *V. pompona* las plantas de vainilla se colocaron en bolsas de vivero negras con una capacidad de 20 L en sustrato de tierra pino-encino. Las plantas se marcaron de acuerdo con la siguiente nomenclatura: Letra V, correspondiente a “*Vanilla*”; seguida de dos letras para epíteto específico, *pl* o *po*, haciendo referencia a *planifolia* o *pompona*, respectivamente; finalmente un número correspondiente a cada individuo, es decir: *Vpol1*, *Vpol2*, *Vpol3*, *Vpol4*, *Vpol5*, *Vpol6* para las plantas de Veracruz y *Vpo1*, *Vpo2*, *Vpo3* y *Vpo4* para las plantas de Guerrero.

Cabe mencionar que actualmente solo la planta *Vpol1* ha generado flores y frutos por autopolinización, de la cual se cosecharon 20 cápsulas 4 meses después de la polinización.

Para evaluar la presencia de estructuras micorrízicas en simbiosis con las plantas de vainilla se colectaron raíces de cada planta, para lo cual se seleccionaron cuatro raíces apicales de 5 cm de largo a una profundidad máxima de 10 cm, en cuatro zonas de la

planta en dirección a los puntos cardinales, se almacenaron en tubos de 50 mL a 4 °C para su tinción y posterior observación bajo el microscopio óptico.

Tinción de raíces y protocormos de vainilla

Para la tinción de tejidos colonizados con hongos micorrizógenos se utilizó el protocolo de Phillips & Hayman, (1970), con modificaciones (Navarro, 2021). Se hicieron cortes transversales de raíz de alrededor de 30 µm y se colocaron en mallas de tul inorgánico con un poro de exclusión de 0.04 mm² para su posterior procesamiento. Las bolsas de tul con los cortes de raíz se colocaron en frascos de vidrio, en ellos se vertió KOH (2.5 %) con la intención de clarear los tejidos, posteriormente se colocaron en autoclave a 15 kPa durante 10 min, después, se decantó la solución de clareo y se agregó HCl al 1% durante 5 min y se aplicó azul de tripano (azul de tripano 0.05 %, Ác. Acético 26.6 %, Glicerol 33.3 %), los frascos con los cortes de raíz se colocaron en una plancha de calor a 80°C durante 15 minutos.

El escrutinio de estructuras micorrízicas se hizo por observación bajo microscopio óptico (Leica Primo Star).

Aislamiento de hongos promotores de germinación de semillas y desarrollo de plántulas de *V. planifolia*

Se utilizó el sistema de co-cultivo generado para el aislamiento de hongos micorrizógenos de *Epidendrum radicans* (Navarro, 2021) con modificaciones. Para ello se colocaron 3 g de turba canadiense en frascos de vidrio de 160 mL y se esterilizaron por tindalización a 120 kPa de presión durante 1 h, tres días consecutivos. Sobre el sustrato se colocaron 50 discos de 0.5 mm de grosor de las raíces desinfestadas de vainillas adultas, se cubrieron con un filtro de nylon estéril con 0.003 mm² de exclusión

y se humectaron con 10 mL de agua destilada estéril. Sobre el filtro de nylon se colocaron 100 semillas de *V. planifolia*. Como tratamiento testigo se utilizaron frascos de co-cultivo in vitro sin raíces, un frasco correspondió a una unidad experimental.

Los tratamientos para evaluar fueron: 1) Control (sin raíces), 2) raíces de las plantas *Vpo1-Vpo6*, 3) raíces de las plantas *Vpo1-Vpo4*, cada frasco de co-cultivo fue considerado como una unidad experimental, cada tratamiento contó con 12 repeticiones, en un diseño completamente al azar.

Desinfestación de raíces para el sistema de co-cultivo

Raíces de las plantas en las que se observó presencia de estructuras micorrízicas fueron cortadas en fragmentos de 1 cm, se lavaron con agua corriente y se colocaron en tubos de 50 mL con 10 mL de etanol y se mantuvieron con agitación a 60 r.p.m. durante 2 min, después se decantó el sobrenadante y enjuagó en tres ocasiones con agua destilada estéril, a continuación, se aplicó una solución de NaClO (6 %) durante 1 min, nuevamente se decantó el sobrenadante y se enjuagaron las raíces tres veces con agua destilada estéril.

Escarificación y desinfestación de semillas de vainilla

Se colectaron cápsulas de *Vpo1* de cuatro meses después de la polinización, se desinfestaron superficialmente impregnando etanol (96 %) y se flamearon durante 30 s, posteriormente se sumergieron en solución de hipoclorito de sodio comercial (NaClO 0.6 %) durante 15 minutos. A continuación, se cortaron los extremos de las cápsulas y se dividieron en cuatro secciones longitudinales (Torres-González et al., 2018).

Con ayuda de pinzas y bisturí se colectaron semillas maduras de *V. planifolia* (semillas con tegumento lignificado) bajo las características descritas por Yeh et al. (2021) en sus estudios sobre la germinación asimbiótica de *V. planifolia* en relación con el tiempo de colecta de la semilla. Las semillas fueron escarificadas con base en el protocolo propuesto por Alomía et al. (2017), protocolo utilizado para retirar la testa y observar la viabilidad de embriones de *Vanilla* spp., para lo cual las semillas se colocaron sobre una lámina de papel compuesta por granos finos de óxido de aluminio (lija de agua No. 240), sobre las semillas se colocó otra lámina de óxido de aluminio del mismo calibre y se frotaron durante 60 s. Una vez escarificadas, las semillas fueron colocadas en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se desinfestaron agregando 0.5 mL de solución de NaClO (0.9 %) y se mantuvieron en agitación constante durante 15 min, se decantó la solución y se hicieron 3 enjuagues con agua destilada estéril (Hernández-Muñoz et al., 2017).

Para el aislamiento de hongos se utilizó medio de cultivo HMO (Modified Oats Medium; Clements et al., 1996) con un pH 6.0 adicionado con solución antibiótica (eritromicina 1% y estreptomicina 1 %).

Establecimiento del protocolo de desinfestación de protocormos

Se colectaron protocormos de *V. planifolia* germinadas en los frascos de co-cultivo con raíces en tubos de Eppendorf, se desinfestaron por medio de inmersión en etanol e NaClO bajo las siguientes concentraciones y tiempos (Cuadro 2):

Cuadro 2. Desinfestación de protocormos de vainilla para el aislamiento de hongos simbióticos asociados. Se evaluaron 13 tratamientos de desinfestación. Las soluciones de desinfestación utilizadas fueron etanol (EtOH) e hipoclorito de sodio (NaClO). El porcentaje de la solución y tiempo de incubación utilizados se indican para cada tratamiento. X indica que no se utilizó esa solución en el tratamiento.

Tratamiento	EtOH	NaClO
1	X	X
2	70 % / 2 min	X
3	70 % / 2 min	10 % / 1 min
4	70 % / 2 min	10 % / 5 min
5	70 % / 2 min	20 % / 1 min
6	70 % / 2 min	20 % / 5 min
7	X	10 % / 1 min
8	X	10 % / 5 min
9	X	20 % / 1 min
10	X	20 % / 5 min
11	70 % / 2 min	100 % / 1 min
12	X	100 % / 1 min
13	100 % / 2 min	100 % / 1 min

Estrategias para el aislamiento de hongos a partir de protocormos simbióticos y raíces adultas colonizadas

Se utilizaron varias estrategias para el aislamiento de hongos endófitos procedentes de los protocormos de vainilla generados en co-cultivo, con la finalidad de obtener mayor diversidad de morfotipos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Estrategias utilizadas para el aislamiento de hongos endófitos de *Vanilla* spp. Se utilizaron siete estrategias cuyas variantes fueron la naturaleza y tratamiento del inóculo utilizado, el método de desinfestación y el medio de cultivo en el que se sembró el inóculo, Etanol (EtOH), hipoclorito de sodio (NaClO).

Estrategia	Inóculo	Desinfestación	Medio
1	Protocormos completos	EtOH 100 % / 2 min, NaClO 6 % / 1 min	HMO
2	Protocormos macerados	NaClO 0.6 % / 1min	HMO
3	Suspensión con protocormos macerados	NaClO 0.6 % / 1min	HMO
4	Protocormos completos	NaClO 1.2 % / 1 min	HMO

5	Protocormos completos incubados en medio líquido	NaClO 0.6 %/ 1min	HMO
6	Protocormos completos	NaClO 0.6 %/ 1min	HMO adicionado con: *Extracto de vainilla *Semillas molidas de vainilla *Raíces de vainilla
7	Cortes transversales de raíz de vainilla	EtOH 100 %/2 min, NaClO 6 %/ 2 min	HMO

Estrategia 1

Como estrategia inicial se consideró utilizar el protocolo propuesto por Navarro, (2021) para el aislamiento de hongos micorrizógenos en *E. radicans*. Se colectaron cinco protocormos de *V. planifolia* germinadas en los frascos de co-cultivo con raíces, se desinfestaron por medio de inmersión en etanol (100 %) durante 2 min y NaClO (6 %) durante 1 min, seguido de tres enjuagues de agua destilada estéril. Posteriormente se colocaron en cajas Petri con medio y se mantuvieron una semana en oscuridad a una temperatura de $26 \pm ^\circ\text{C}$ (Cuadro 3).

Estrategia 2

Se tomaron tres protocormos de los frascos de co-cultivo se desinfestaron con NaClO (0.6 %) durante 1 min, seguido de tres enjuagues de agua destilada estéril, se decantó el sobrenadante, finalmente, los protocormos fueron homogenizados con un micropistilo estéril, la mezcla obtenida se estrió con un asa bacteriológica en cajas de Petri con medio de cultivo (Cuadro 3).

Estrategia 3

Se tomaron tres protocormos de los frascos de co-cultivo se desinfectaron con NaClO (0.6 %) durante 1 min, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril, los protocormos fueron macerados en 1 mL de agua destilada estéril con un micropistilo, el precipitado de la suspensión restante se colocó en matraces con medio HMO líquido, se mantuvieron en agitación constante a 160 rpm a 28°C durante 5 días (Cuadro 3).

Estrategia 4

Se tomaron 10 protocormos de los frascos de co-cultivo se desinfectaron con NaClO (1.2 %) durante 1 min, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril, los protocormos fueron cultivados en medio HMO una semana en oscuridad a 26 °C durante 5 días (Cuadro 3).

Estrategia 5

Se tomaron tres protocormos de los frascos de co-cultivo se desinfectaron con NaClO (0.6 %) durante 1 min, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, posteriormente, se colocaron en matraces con medio HMO líquido, se mantuvieron en agitación constante a 160 rpm; 28 °C durante 5 días, el micelio se filtró con ayuda de una maya estéril, seis masas de micelio con un crecimiento particular, fueron analizadas mediante preparaciones rápidas de azul de tripano (0.05 %), las masas de micelio fueron enjuagadas con agua destilada estéril 10 veces, posteriormente se disgregaron las hifas con ayuda de vórtex, en cajas de Petri con medio se colocó una gota de la solución de hifas disgregadas en cinco puntos equidistantes y un punto central de la caja (Cuadro 3).

Estrategia 6

Se prepararon tres variantes del medio HMO con componentes adicionales: variante 1) $1\text{ gr}\cdot\text{L}^{-1}$ de semillas de vainilla maduras trituradas, variante 2) $1\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ de extracto de vainilla sintético, variante 3) $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de raíces de vainillas adultas. Se sembraron tres protocormos en una caja de Petri por cada variante al protocolo (Cuadro 3).

Estrategia 7

Se utilizaron raíces de plantas adultas colonizadas de vainilla de Veracruz y Guerrero, cortes de 1 cm de largo fueron lavados con agua corriente y se colocaron en tubos de 50 mL con 10 mL de etanol, se mantuvieron con agitación a 60 rpm durante 2 min, después se decantó el sobrenadante y se enjuagó en tres ocasiones con agua destilada estéril, a continuación, se aplicó una solución de Etanol al 100 % durante 2 min, nuevamente se decantó el sobrenadante y se incubaron en NaClO (6 %) durante 2 min, se enjuagaron las raíces tres veces con agua destilada estéril, se hicieron cortes transversales de raíz que fueron examinados con ayuda de microscopio de vista estereoscópica de la marca Leica EZ4, los cortes transversales con pelotones en la zona cortical fueron seleccionados y sembrados en medio HMO, los aislados obtenidos fueron purificados a través de la siembras consecutivas de punta de hifa, hasta la obtención de cultivos axénicos (Cuadro 3).

Nomenclatura de los aislados

Los aislados se marcaron de acuerdo con la siguiente nomenclatura: *Vpl*, correspondiente a “*V. planifolia*” o *Vpo* para “*V. pompona*”; finalmente un número correspondiente a cada aislado, es decir: *Vpl2*, *Vpl4*, *Vpl5*, para las plantas de *V.*

planifolia y *Vpo*, (*Vpo3P*, *Vpo11*), para las plantas de *V. pompona*, finalmente, se añadió la letra P (Protocormo) o R (Raíz) para indicar la fuente de la cual fue aislado el hongo es decir; *Vpl2P*, *Vpl5P*, *Vpo3P* Y *Vpl2R*, *Vpl4R*, *Vpo11R*. Aquellos morfotipos considerados como contaminantes, fueron descartados para la caracterización morfológica, molecular y su uso en experimentos posteriores.

Caracterización molecular de los hongos aislados

Previamente a la extracción de DNA, se preparó medio de cultivo HMO líquido adicionado con solución de antibióticos (eritromicina 1 % y estreptomicina 1 %), bloques de medio de cultivo de 0.5 cm con hifas de los diferentes aislados fueron incubados en matraces con 50 mL del medio líquido, los matraces se colocaron en una incubadora con agitación orbital de la marca Lumistell IRO-70, en condiciones oscuras a 160 rpm, a una temperatura de 28 °C durante una semana.

Extracción de DNA

La extracción de DNA se hizo con base en el protocolo CTAB (Clarke, 2009), con modificaciones. Se colocaron aproximadamente 250 mg de micelio fresco en un tubo de Eppendorf con 250 µL de reactivo CTAB, se maceró con micropistilo estéril en un homogeneizador de la marca Heidolph RZR1. Se agregaron 250 µL de CTAB a la mezcla y se colocó en incubación a 60 °C durante 30 min en un baño seco (MCR DB-005). Posteriormente, se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min en una centrífuga Thermo Scientific™ Biofuge primo R, se recuperaron 400 µL de sobrenadante y se agregaron 400 µL de cloroformo-isoamílico (24:1), se homogeneizó con un agitador de la marca Vortex Genie 2. Después, se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min, se recuperó la fase acuosa, el DNA se precipitó con 2 volúmenes de isopropanol y se

centrifugó a 13 000 rpm durante 5 min. Se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol (70 %), se centrifugó a 13 000 rpm durante 3 min, se decantó el sobrenadante y se secó la pastilla a 60 °C durante 5 min, se resuspendió con 20 µL de agua bidestilada estéril con RNAsa ($1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$).

Los productos de la extracción de DNA genómico fueron visualizados por medio de electroforesis en un gel de agarosa (1 %) de la marca Certified™ Molecular Biology Agarose, con SB como buffer de corrida. Se utilizaron 3 µL de DNA genómico y marcador de peso molecular de 1 Kb DNA marca Invitrogen, la pureza del DNA se analizó utilizando 1.5 µL del DNA blanco en un espectrofotómetro Thermo Scientific Nano-Drop 2000c.

Amplificación del rDNA-ITS

La amplificación de los fragmentos de rDNA se realizó mediante PCR Touchdown, para las mezclas de reacción se utilizaron 10 µL de *Go taq®* Green Master Mix, X2 (Promega), 0.5 µM de oligos, 1 µL de DMSO (CH_3SOCH_3), 6 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de DNA genómico ($100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), el volumen final para la reacción fue de 20 µL. La amplificación de los fragmentos de rDNA se llevó a cabo utilizando el oligo “forward” ITS1 (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) y el oligo “reverse” ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) (White et al., 1990). Las condiciones para la amplificación fueron programadas en un termociclador BIO-Products Select Cyclor, con una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguidos de 10 ciclos de 95 °C, 30 segundos; 60 °C, 30 segundos; una temperatura de extensión de 72 °C, durante 1 minuto, posterior a los primeros 10 ciclos de amplificación, los productos de PCR se sometieron a otros 20 ciclos a 95 °C, 30 segundos; 55 °C, 30 segundos y una

temperatura de extensión de 72 °C durante 5 min. Se utilizó un control positivo con DNA de un hongo utilizado anteriormente para su amplificación y un control negativo con agua bidestilada estéril en lugar de DNA.

La resolución de los amplicones se realizó por medio de electroforesis en un gel de agarosa (1 %), con SB como buffer de corrida, se utilizaron 2 µL del producto de PCR. La concentración de los amplicones fue cuantificada utilizando 1.5 µL en un espectrofotómetro en la longitud de onda de 260 nm. La secuenciación de los amplicones se llevó a cabo en ambos sentidos (5'-3' y 3'-5') por el laboratorio Humanizing Phenomics 120, Psomagen.

Análisis filogenéticos

Con la finalidad de obtener una secuencia consenso de cada uno de los aislados, se efectuaron alineamientos entre las secuencias 5'-3' y 3'-5' provenientes de cada individuo, para finalmente obtener 1 secuencia por aislado y evitar posibles ambigüedades en las secuencias de nucleótidos. Una vez generadas las secuencias, se compararon con la base de datos del GenBank (NCBI) con el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) y se seleccionaron las secuencias que tuvieran altos porcentajes de homología.

Para la construcción de árboles genéticos se utilizaron secuencias que representaran diferentes clados y grupos representativos para los géneros de hongos estudiados, para la generación de los árboles se realizaron alineamientos múltiples con el programa MEGA11 versión 11.0.13 (Tamura et al., 2021).

La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Máxima Verosimilitud compuesta y el modelo General de Tiempo Reversible (Nei & Kumar, 2000). Los árboles iniciales

para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-Joining y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas mediante el modelo General de Tiempo Reversible y luego seleccionando la topología con un valor logarítmico de verosimilitud superior. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11 versión 11.0.13 (Tamura et al., 2021).

La estabilidad de la topología del árbol fue sustentada en un Bootstrap de 1000 repeticiones. Para enraizar los árboles se utilizaron las secuencias de *Botryobasidium botryosum* con número de acceso DQ267124 y *Neophaeococcomyces catenatus* con número de acceso AF050277.

Caracterización morfológica de aislados

Se montaron microcultivos húmedos, para lo cual se colocó un bloque de 0.5 cm de medio HMO con hifas del aislado sobre un portaobjetos dentro de una caja de Petri que en su interior contenía agua destilada estéril, los microcultivos se dejaron crecer en condiciones oscuras durante 10 días, posteriormente, se retiró el bloque de medio y se aplicó azul de tripano (0.05 %), las preparaciones fueron observadas bajo microscopio óptico de la marca Leica DM500 y se caracterizaron usando las claves taxonómicas de Sneh et al. (1998), la medición de estructuras se llevó a cabo con un micrómetro ocular WALTER WF 10x DIN/18.

Bioensayo de germinación simbiótica con los aislados identificados

Con la finalidad de evaluar el potencial de los aislados, para promover la germinación y desarrollo de *V. planifolia*, se montaron de manera simultánea dos bioensayos de co-cultivo. El primer bioensayo consistió en frascos con turba canadiense tindalizada, como los anteriormente mencionados para el aislamiento de hongos micorrizógenos

orquideoides a partir de protocormos de *V. planifolia*, estos fueron humectados con 9 mL de agua destilada estéril y 1 mL de solución nutritiva con la siguiente concentración de sales en mg·L (200 Ca (NO₃)₂ 4 H₂O; 200 KH₂ PO₂; 100 KCl; 100 Mg SO₄ 7 H₂O), concentraciones de sales descritas en la elaboración de medio de cultivo HMO (Modified Oats Medium; Clements et al., 1996), además, se adicionado con 1 g·L⁻¹ de peptona (Bacto™ Peptone). Para el segundo experimento, se montaron frascos de vidrio con 15 mL medio HMO gelificado, adicionado con 1 g·L⁻¹ de peptona (Bacto™ Peptone). En los frascos se colocaron discos de 0.5 cm de diámetro de medio con micelio de los aislados *T. cumulopuntiioides*, *Rhizoctonia* sp. AG-G, *E. pisciphila* o 50 cortes transversales de raíces previamente desinfectadas con etanol al 100 % durante 2 min e NaClO al 6 % durante 1 min. Un frasco correspondió a una unidad experimental, cada uno contenía en su interior 100 semillas de *V. planifolia*, como tratamiento control se utilizaron frascos de co-cultivo sin aislado, ni raíces de vainilla, los tratamientos a evaluar fueron: C-) Control negativo (sin aislado, ni raíces de vainilla), T) aislado *T. cumulopuntiioides*, R) aislado *Rhizoctonia* sp. AG-G, E) aislado *E. pisciphila*, C+) control positivo (con raíces de vainilla como inóculo), se incubaron a 26°C, a 40 µmol s⁻¹ m², bajo un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, cada tratamiento contó con 10 repeticiones, dispuestos en un diseño experimental completamente al azar.

Diseño experimental y análisis estadístico

La aleatorización de cada uno de los experimentos se realizó utilizando el comando PROC PLAN, para una aleatorización sin restricciones de los tratamientos, utilizado

para un diseño experimental completamente al azar, con ayuda del programa SAS ® OnDemand for Academics versión 3.81 (SAS, 2012-2020).

Evaluación de los procesos de germinación y desarrollo de semillas de *V. planifolia* en condiciones simbióticas.

Para el experimento de co-cultivo de semillas de *V. planifolia* con las raíces de *V. planifolia* (*Vpl*) y *V. pompona* (*Vpo*), durante un periodo de 10 semanas se contabilizó el número de individuos en los siguientes estados de desarrollo, las variables evaluadas fueron: 1) ruptura de testa, 2) protocormo y 3) protocormo fotosintético, con los datos obtenidos se realizó un análisis de la varianza multivariado (MANOVA) de medidas repetidas (Ruiz de Villa, 2004) con el procedimiento PROC GLM, para la comparación entre grupos se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha \leq 0.01$; $n=12$).

Para la evaluación del potencial de los aislados promotores de la germinación y desarrollo de *V. planifolia*, durante un periodo de nueve semanas se contabilizó el número de individuos en los siguientes estados de desarrollo: 1) ruptura de testa y 2) protocormo, con los datos obtenidos se realizó un MANOVA de medidas repetidas analizando por separado cada uno de los experimentos, de manera complementaria los bioensayos se analizaron conjuntamente con un MANOVA de medidas repetidas con arreglo factorial 2x5, el factor experimento (Exp) con dos niveles: medio HMO o turba canadiense, y el factor tratamiento (Trat) con cinco niveles: C-) control negativo (sin aislado, ni raíces de vainilla), T) aislado *Tulasnella cumulopuntioides*, R) aislado *Rhizoctonia* sp. AG-G, E) aislado *Exophiala pisciphila*, C+) control positivo (con raíces de vainilla como inóculo), los procedimientos estadísticos se realizaron con PROC

GLM, las variables evaluadas fueron: 1) ruptura de testa y 2) desarrollo de protocormos. La comparación entre grupos se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha \leq 0.01$; $n=10$), además se analizaron ambos experimentos de manera separada, tomando en cuenta como fuente de variación únicamente a los tratamientos.

V. Resultados y Discusión

Las raíces de plantas adultas de vainilla contienen hongos endófitos y formadores de micorriza orquideoide

Las raíces de plantas adultas de vainilla establecidas en invernadero presentaron estructuras características de la micorriza orquideoide (Figura 11).

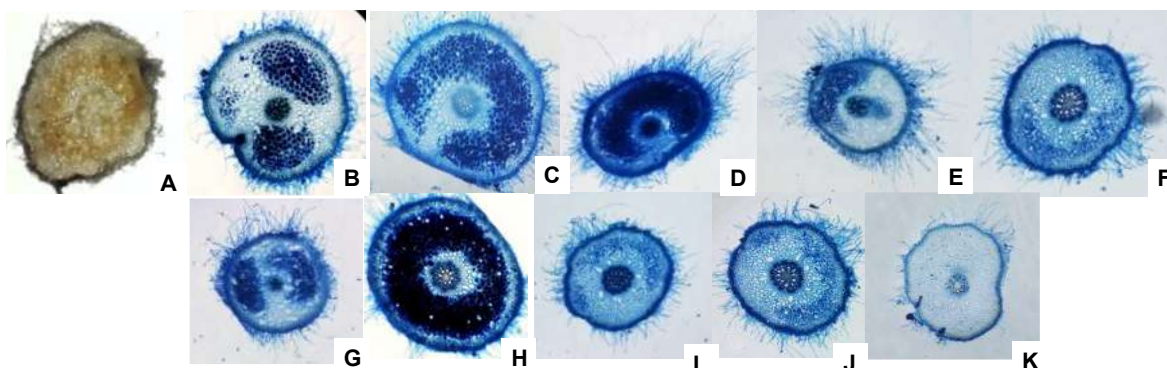


Figura 11. Corte transversal de raíces de las plantas de vainilla adulta establecidas en invernadero. A) Raíz sin teñir, B) Raíz de *Vpo1*, C) Raíz de *Vpo2*, D) Raíz de *Vpo3*, E) Raíz de *Vpo4*, F) Raíz de *Vpo5*, G) Raíz de *Vpo6*, H) Raíz de *Vpo1*, I) Raíz de *Vpo2*, J) Raíz de *Vpoo3* y K) Raíz de *Vpo4*.

La presencia de estructuras micorrízicas en las raíces adultas de las vainillas de *V. planifolia* y *V. pompona* indica que estas orquídeas mantienen relaciones simbióticas con hongos micorrizógenos en etapas posteriores a la germinación. Las raíces de *Vpo4*, fueron las únicas que no presentaron signos de colonización. En la orquídea europea *Limodorum abortivum* se estudió que la presencia del HMO está relacionada con la obtención de carbono y se concluyó que esta orquídea se alimenta preferentemente del carbono obtenido por medio del hongo simbiote (Bellino et al.,2014). También se determinó que, en etapas adultas, la actividad fotosintética de *L. abortivum* es complementaria para compensar las limitaciones del hongo para aportar carbono; además, se demostró que el aporte de carbono por el hongo

simbionte durante la germinación es importante para el ciclo de vida de esta orquídea (Bellino et al., 2014). Estudios de micorrizas y modos tróficos en orquídeas demuestran mediante análisis de isótopos estables que la orquídea *Epipactis neerlandica* adquiere nitrógeno (^{15}N) y carbono (^{13}C) por medio de la simbiosis con HMO pertenecientes a Tulasnellaceae y Ceratobasidiaceae (Jacquemyn et al. 2017). Además de estos dos grupos comunes, reportaron la presencia de asociaciones entre ocho especies de orquídeas con hongos conocidos por establecer asociaciones micorrízicas del tipo ectomicorriza que se clasificaron dentro de las familias Cortinariaceae, Tuberaceae y Pezizaceae (Jacquemyn et al. 2017). Por lo que la presencia de las estructuras micorrízicas observadas en las plantas de *V. planifolia* y *V. pompona* podría estar relacionadas con la adquisición de nutrientes y carbono.

En los tejidos radiculares se observaron hifas colonizando la mayor parte del córtex radicular, (Figura 12 A y B). En el interior de las células de la epidermis y en los pelos radiculares, además de hifas septadas, se observó el desarrollo de conglomerados celulares morfológicamente identificados como células monilioides (Figura 12 C y D).

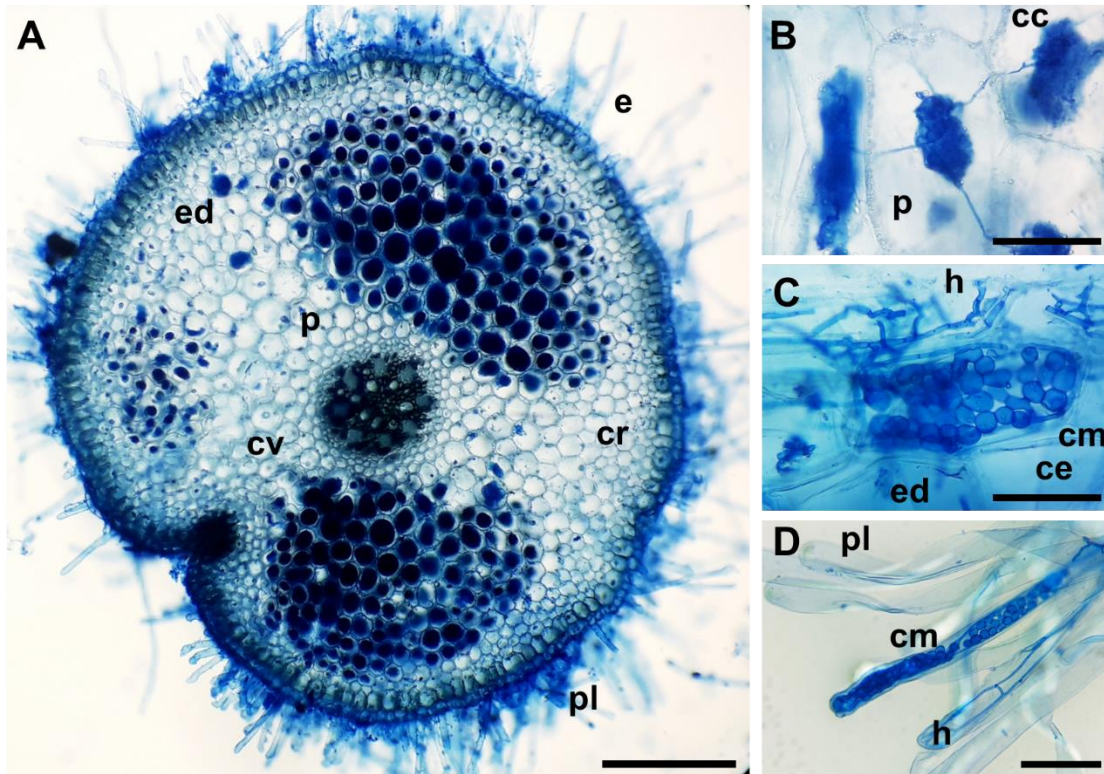


Figura 12. Estructuras micorrízicas generadas en *V. planifolia*. A) Sección transversal de raíz, B) Pelotón generado en células corticales, C) Células moniliodes dentro de una célula epidérmica, D) Presencia de hifas septadas y células moniliodes en pelos radiculares. Simbología: cc: célula cortical, ce: célula epidérmica, cm: células moniliodes, cr: córtex radicular, cv: cilindro vascular, e: epidermis ed: exodermis, h: hifa septada, p: pelotón, pl: pelo radicular. Las barras de escala representan 100 μm en A y 50 μm en B, C y D.

Los pelotones característicos de la micorriza orquideoide (Figura 12 A y B), procedían de hifas septadas encontradas en pelos radiculares y células epidérmicas que incrementaban en tamaño y densidad de hifas a medida que la colonización progresaba hacia las capas más internas de células corticales (Figura 12 C Y D). Se observó que los pelotones están conectados con otros pelotones que están en células adyacentes a través de hifas intercorticales. El pelotón es la estructura característica de la micorriza orquideoide (Smith & Read, 2008). Estudios de co-cultivo de la especie *Epidendrum radicans* con un hongo identificado como *Ceratobasidium* sp., describieron la presencia de hifas septadas y células moniliodes en el velamen de las

raíces (Navarro, 2021). En la orquídea terrestre *Spathoglottis plicata* se observaron micelio y células moniloides en pelos radiculares (Sathiyadash et al., 2020). En *V. planifolia* y *V. pompona* se observaron micelio y células moniloides dentro de células epidérmicas y pelos radiculares.

Germinación de semillas y de desarrollo de protocormos de *V. planifolia* en presencia de raíces de vainillas adultas

Las semillas colocadas en los frascos de co-cultivo (Figura 13 A-D) mostraron un desarrollo similar de acuerdo con las etapas del proceso de germinación simbiótica ilustradas para diferentes especies Colombianas de vainilla por Alomía et al. (2017), las semillas del tratamiento testigo (sin co-cultivo de raíces de plantas adultas) alcanzaron la etapa correspondiente a “ruptura de testa” (Figura 13 E); sin embargo, a la fecha no se han diferenciado a protocormos. Las semillas del tratamiento de co-cultivo con raíces maduras de *V. planifolia* (Figura 13 F) se han desarrollado desde ruptura de testa, hasta la formación de protocormos en diferenciación (Figura 13 A-D), las semillas del tratamiento de co-cultivo con raíces maduras de *V. pompona* (Figura 13 G), se han desarrollado desde ruptura de testa, hasta la formación de protocormos fotosintéticos (Figura 13 A-C).

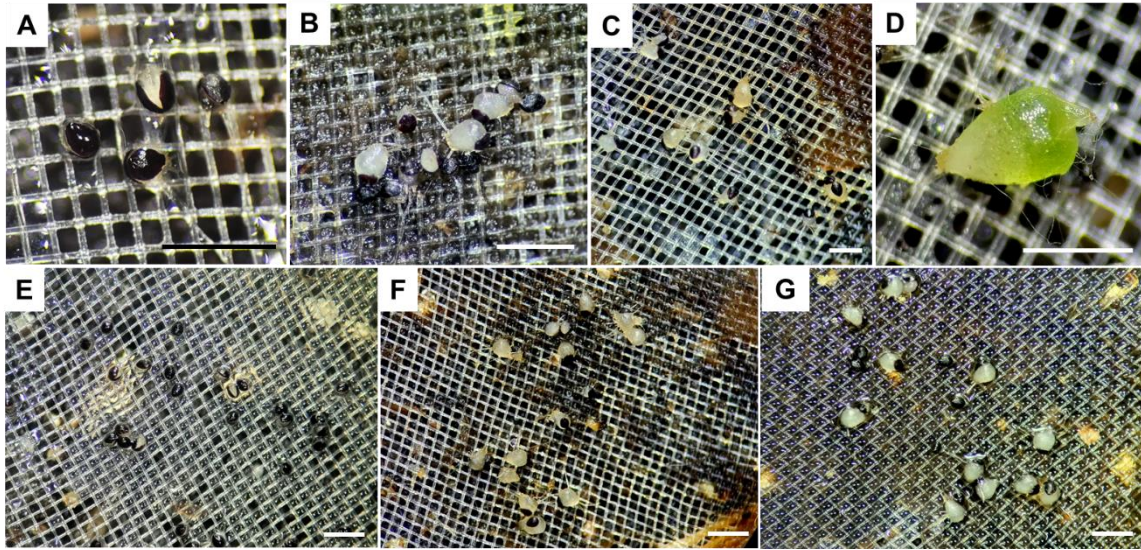


Figura 13. Desarrollo de *V. planifolia* cultivadas en co-cultivo simbiótico. Ruptura de testa o tegumento seminal (A), Protocormo con rizoides (B), Protocormo fotosintético (C), Protocormo en diferenciación (D), Tratamiento Control (E), Co-cultivo con raíces de *V. planifolia* (F), Co-cultivo con raíces de *V. pompona* (G). Las barras de escala representan 1000 μm

El origen de las raíces de vainilla en el co-cultivo repercute en la eficiencia de germinación y desarrollo de protocormos de *V. planifolia*.

Las semillas de *V. planifolia* germinaron a los 50 días después de la siembra (DDS), el análisis de varianza múltivariado (MANOVA) reveló diferencias altamente significativas durante las semanas que se evaluó el experimento para la variable germinación con la aplicación de las raíces de vainillas adultas de *V. planifolia* y *V. pompona*, además, se observa que el tiempo y la interacción del tiempo y tratamiento, tuvieron efecto en la expresión de la variable germinación ($\alpha \leq 0.01$).

Las semillas de *V. planifolia* presentaron diferencias entre los tratamientos a través de las 10 semanas, las semillas co-cultivas con raíces de *V. planifolia* germinaron en un 100 % a partir de la semana 4, las semillas co-cultivadas con raíces de vainillas de *V. pompona* presentaron el 96.75 % de germinación a partir de la semana 6, el tratamiento control sin raíces, comenzó a germinar a partir de la quinta semana, el

máximo porcentaje de germinación se logró durante la semana 10 con una media porcentual de 48.67 (Figura 14 A).

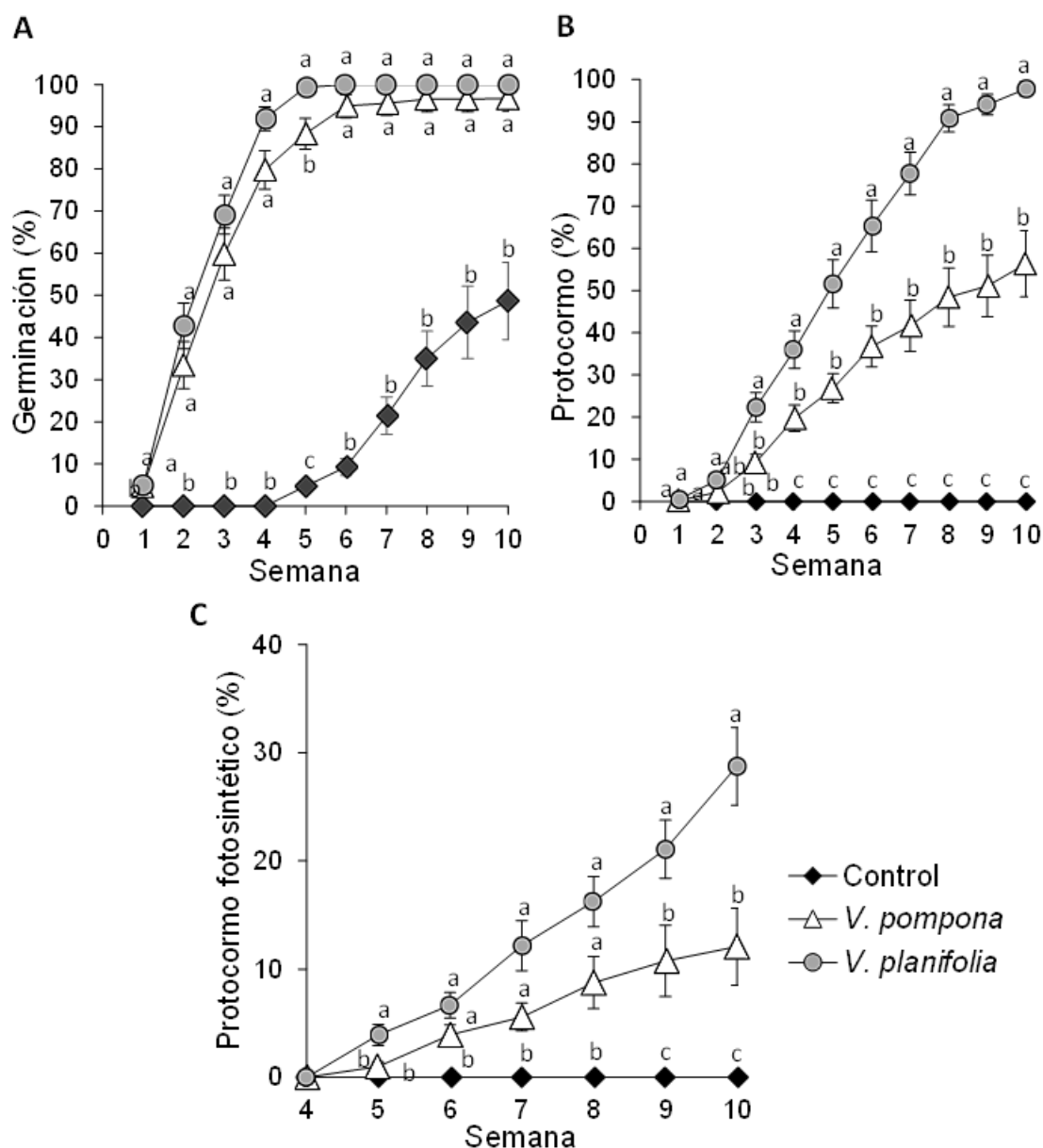


Figura 14. Curva acumulada de germinación y desarrollo de *V. planifolia* en co-cultivo con raíces de *V. planifolia* y *V. pompona*. A) Curva acumulada de germinación, B) Curva acumulada de protocormos, C) Curva acumulada de protocormos fotosintéticos. Las barras de error indican el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey; $\alpha \leq 0.01$; $n=12$).

El desarrollo de protocormos se visualizó a partir de la semana 1. Las semillas co-cultivadas con raíces de *V. planifolia* y *V. pompona* desarrollaron protocormos en 100

y 50 % respectivamente en la semana 10, lo que resultó estadísticamente diferente (Tukey; $\alpha \leq 0.01$), el tratamiento control no mostró este estado de desarrollo (Figura 14 B).

El desarrollo de protocormos fotosintéticos se visualizó a partir de la semana 5. Las semillas co-cultivadas con raíces de *V. planifolia* y *V. pompona* desarrollaron un 30 y 10 % respectivamente en la semana 10, lo que resultó estadísticamente diferente (Tukey; $\alpha \leq 0.01$), el tratamiento control no mostró este estado de desarrollo (Figura 14 C).

Las raíces de especies adultas de orquídeas se encuentran colonizadas por una gran variedad de hongos endófitos que generan asociaciones micorrízicas generalmente con hongos del género polifilético *Rhizoctonia* (Tulasnellaceae, Ceratobasidiaceae, *Thanatephorus* y Serendipitaceae), estos hongos son capaces de promover la germinación de semillas de orquídea, sin embargo se han aislado otros géneros de hongos que no pertenecen al género de hongos anteriormente mencionado y en raíces adultas de orquídeas que también generan estas asociaciones micorrízicas (Zhao et al., 2021). Estudios previos de germinación simbiótica *in situ* de la especie *Rhynchostele cervantesii* demuestran que es posible germinar semillas con cultivos trampa usando raíces de orquídeas adultas (Cruz, 2014), estos estudios ecológicos se han realizado con la finalidad de aislar hongos micorrizógenos orquideoides capaces de promover la germinación de las semillas (Rasmussen & Whigham, 1993). Las orquídeas mantienen relaciones simbióticas con hongos diferentes y que pueden cambiar a lo largo de su ciclo de vida, primeros estadios de desarrollo en protocormos y plántulas de orquídea (Zhao et al., 2021). Las semillas de *V. planifolia* en co-cultivo

con raíces colonizadas de vainillas adultas germinaron y se desarrollaron hasta la formación de protocormos fotosintéticos, posiblemente los hongos que colonizan las raíces tengan la capacidad de promover la germinación y desarrollo de protocormos de esta especie.

Los protocormos de *V. planifolia* desarrollados en co-cultivo presentan simbiosis micorrízica.

Semillas en ruptura de testa y protocormos de *V. planifolia* obtenidos en las cámaras de co-cultivo fueron teñidos utilizando el protocolo establecido para la tinción de raíces maduras. El tratamiento control no mostró formación de micelio fúngico en la zona parenquimática del embrión (Figura 15 A), las semillas germinadas muestran que el embrión únicamente posee rizoides (Figura 15 D). Las semillas co-cultivadas con raíces de vainillas adultas de *V. planifolia* (*Vpl*) y *V. pompona* (*Vpo*) (Figura 15 B y C, respectivamente), mostraron colonización fúngica en la zona basal, los pelotones característicos de esta asociación micorrízica se desarrollaron en la zona parenquimática únicamente (Figura 15 E y F), la protodermis y zona meristemática no presentaron signos de colonización.

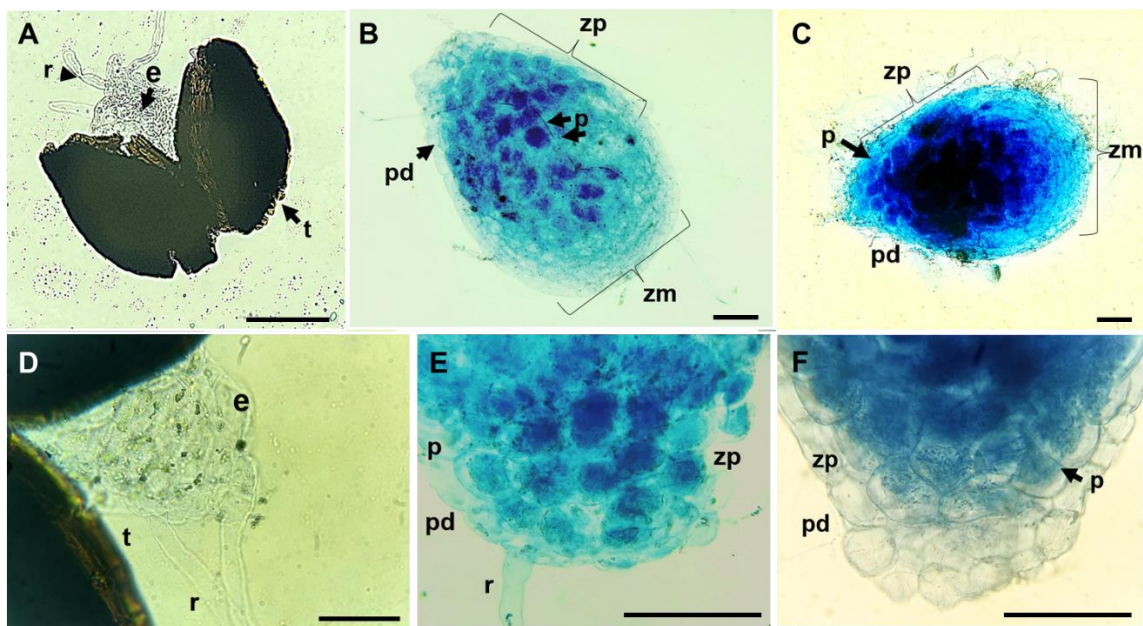


Figura 15. Tinción de estructuras micorrízicas en protocormos de *V. planifolia*. A) Semilla de tratamiento control en ruptura de testa (germinación asimbiótica), B) Protocormo co-cultivado con raíces de vainillas adultas de *V. planifolia* (*Vpl*), C) Protocormo co-cultivado con raíces de vainillas adultas de *V. pompona* (*Vpo*), D) Semilla en ruptura de testa del tratamiento control, E) Zona basal de protocormo germinado en co-cultivo con raíces de *Vpl*, F) Zona basal de protocormo germinado en co-cultivo con raíces de *Vpo*. Simbología: r: rizoide, e: embrión, t: cubierta seminal o testa, pd: protodermis, p: pelotón, zp: zona parenquimática, zm: zona meristemática. Las barras de escalar representan 100 μ m en A, B y C; 50 μ m en D, E y F.

El protocormo es una estructura de células poco diferenciadas característica de Orchidaceae, se conforma principalmente por células de meristema y parénquima, en este último grupo de células se establece la simbiosis entre el protocormo y el hongo, (Yeung, 2022). Se lleva a cabo el intercambio de nutrientes; la adquisición de carbono y nitrógeno orgánico por medio de micoheterotrofia que consiste en el intercambio de nutrientes en células hospedadoras sin fagocitar al pelotón (Mukerji K. et al., 2002) o por medio de micofagia donde la adquisición de nutrientes es por medio de la lisis y digestión del pelotón en las células digestivas (Mukerji K. et al., 2002). Los protocormos de *V. planifolia* teñidos con azul de tripano muestran colonización micorrízica en la zona basal, posiblemente utilicen estos mecanismos reportados para sustentar el proceso germinativo y desarrollo, hasta formar plántulas con láminas foliares y

radículas funcionales. Estudios moleculares de la orquídea *Serapias vomeracea* y el hongo *Tulasnella calospora* indican que durante la germinación simbiótica y desarrollo, el embrión es abastecido de elementos como carbono orgánico, utilizado para la producción de energía, nitrógeno para la elaboración de proteínas y azufre; elemento que únicamente puede ser incorporado a moléculas orgánicas por medio de la fotosíntesis o suministrado por el hongo simbiote, un elemento esencial para el desarrollo (De Rose et al., 2023).

Aislamiento de hongos asociados a los protocormos de *V. planifolia*

Se aislaron 20 hongos cultivables, morfotipos diferentes fueron obtenidos utilizando las siguientes estrategias de aislamiento:

El tratamiento de desinfestación de protocormos de la estrategia 4 con NaClO 1.2 % durante 1 min permitió aislar a *Vpl5P*, el aislado *Vpo3P* se obtuvo con la estrategia 5, con la estrategia 6 se aisló *Vpl2P* al adicionar extracto de vainilla ($1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$) al medio de cultivo HMO, por último, con la estrategia 7 usando raíces de vainilla adultas incubadas en etanol al 100 % durante 2 min y NaClO al 6% 1 min se obtuvieron los aislados *Vpl2R*, *Vpl4R* y *Vpo11R* (Cuadro 4).

Cuadro 4. Estrategias que permitieron aislar distintos morfotipos de hongos a partir de protocormos y raíces de vainilla. Resultado de incubación en etanol (EtOH) e Hipoclorito de sodio (NaClO), donde NO, representa que no se obtuvo aislado), Variante 1) extracto de vainilla, Variante 2) semillas molidas de vainilla, Variante 3) raíces de vainilla Vol2R) aislado de *V. planifolia* 2 radicular, *Vpl4R*) aislado de *V. planifolia* 4 radicular, aislado de *V. pompona* 11 radicular, *Vpl5P*) aislado de *V. planifolia* 5 de protocormo, *Vpl2P*) aislado de *V. planifolia* 2 de protocormo, *Vpo3P*) aislado de *V. pompona* 3 de protocormo.

Estrategia	Medio	Desinfestación	Inóculo	Aislado obtenido
1	HMO	EtOH 100% /2min, NaClO 6 %/ 1 min	Protocormo completo	Ninguno

2	HMO	NaClO 0.6 %/ 1min	Protocormo macerado	Ninguno
3	HMO	NaClO 0.6 %/ 1min	Suspensión con protocormos macerados	Ninguno
4	HMO	NaClO 1.2 %/ 1 min	Protocormo completo	<i>Vpl5P</i>
5	HMO	NaClO 0.6 %/ 1min	Protocormos completos incubados en medio líquido	<i>Vpo3P</i>
6	HMO Variante 1 Variante 2 Variante 3	NaClO 0.6 %/ 1min	Protocormo completo	<i>Vpl2P</i>
7	HMO	EtOH 100 %/2 min/, NaClO 6 % / 2 min	Cortes transversales de raíz de vainilla	<i>Vpl4R</i> <i>Vpl2R</i> <i>Vpo11R</i>

Caracterización molecular de los aislados.

Las condiciones utilizadas para la PCR Touchdown generaron amplicones observados como bandas íntegras de peso molecular aproximado a 500-600 pb y que no muestra amplificación inespecífica en gel de agarosa (Figura 16).

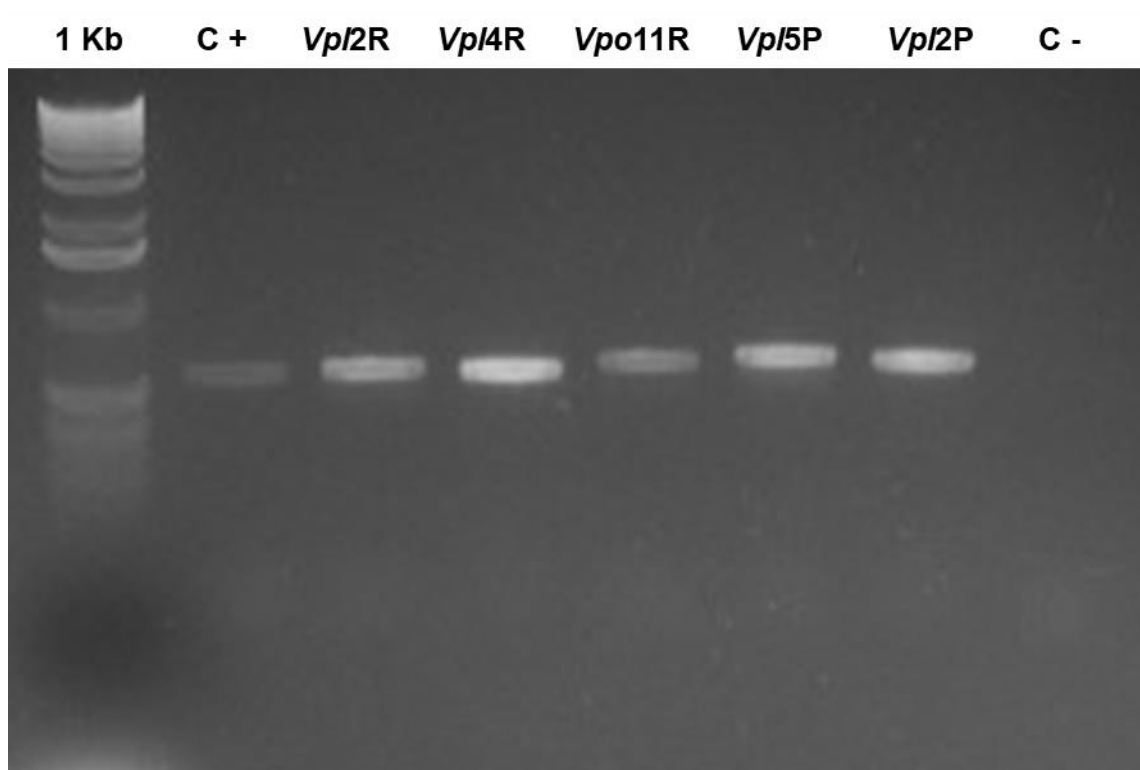


Figura 16. Electroforesis de productos de PCR en gel de agarosa (1 %). 1 Kb) Marcador molecular de 1 Kb, C +) Control positivo (DNA de *Fusarium solani* previamente amplificada), Vpl2R) Aislado de *V. planifolia* 2 radicular, Vpl4R) Aislado de *V. planifolia* 4 radicular, Vpo11R) Aislado de *V. pompona* 11 radicular, Vpl5P) Aislado de *V. planifolia* 5 de protocormo, Vpl2P) Aislado de *V. planifolia* 2 de protocormo, C -) Control negativo.

Las secuencias amplificadas de los aislados Vpl5P y Vpo11R, se agrupan filogenéticamente con ITSs de hongos del complejo *Rhizoctonia*

De los amplicones de Vpl5P y Vpo11R se obtuvieron secuencias de 509 y 596 nucleótidos, respectivamente.

El análisis filogenético reveló que Vpl5P y Vpo11R pertenecen al complejo de hongos *Rhizoctonia*, definido como un grupo de hongos heterogéneo, con alta plasticidad, lo que ha permitido al grupo generar estrategias para actuar como saprófitos, patógenos u hongos simbioses de orquídeas (Zhao et al., 2021).

Rhizoctonia es reconocido como el complejo de hongos más ampliamente reportado como simbiontes promotores de la germinación de orquídeas (Sathiyadash et al., 2020).

Se muestra el árbol con la probabilidad logarítmica más alta (-6191.11). El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon se muestra junto a las ramas. El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en número de sustituciones por sitio. Este análisis involucró 16 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 938 posiciones en el conjunto de datos. El análisis filogenético reveló que el aislado *Vp15P* es similar a *Rhizoctonia* sp. AG-G (*Rhizoctonia fragariae*) con una longitud de rama de 0.06 y un porcentaje de frecuencia del 99 %, este grupo de hongos son binucleados que se agrupan en grupos de anastomosis (AG), los grupos de anastomosis se generan por la fusión de hifas entre grupos genéticamente compatibles, los grupos fueron generados por primera vez en Japón por Ogoshi et al. (1979) y Ogoshi et al. (1985). La secuencia de *Vp15P*, se agrupó con *Rhizoctonia* sp. AG-G, en el clado de especies de *Rhizoctonia* binucleadas y concuerda con las características citológicas observadas (Figura 17).

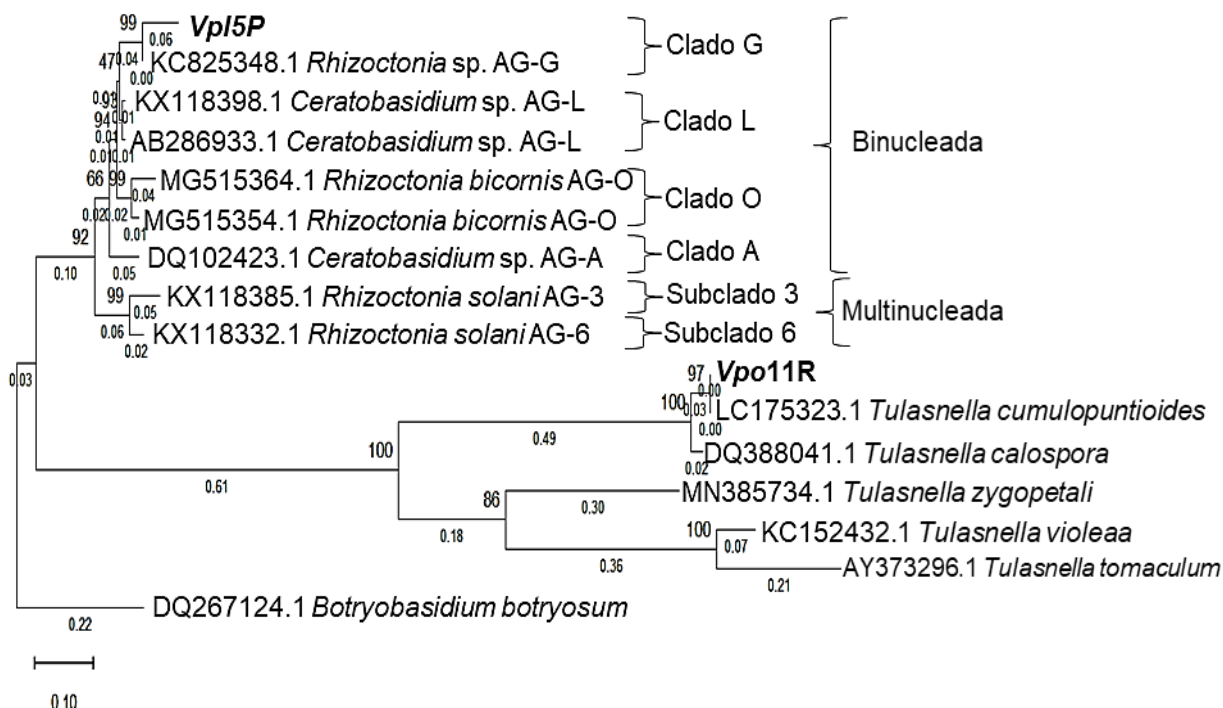


Figura 17. Árbol filogenético generado con las secuencias de rDNA-ITS de los aislados *Vp15P* y *Vp11R* junto a secuencias del complejo de hongos *Rhizoctonia*. Se construyó utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta, bajo el modelo General de Tiempo Reversible. Los aislados analizados están en negritas. Los números sobre las ramas representan los valores de Bootstrap obtenidos a partir de 1000 réplicas, los números debajo de las ramas indican la distancia genética. La barra de escala corresponde a 0.10 sustituciones por suposiciones de nucleótido. Los análisis evolutivos se hicieron con el programa MEGA11 (Tamura et al., 2021).

Por su parte, el aislado *Vp11R*, fue genéticamente similar a *Tulasnella cumulopunctioides*, con un porcentaje de frecuencia de 97 % y una longitud de rama de 0.00 (Figura 25), este hongo se reportó por primera vez como micorrizógeno de orquídeas aislado de *Spiranthes sinensis* var. amoena reportado por Fujimori et al. (2018), morfológicamente, la especie está descrita como un basidiomicete septado, binucleado, con micelio irregular, hailiano, presencia de células moniloides globulosas a subglobulosas.

La familia *Tulasnellaceae* es perteneciente al complejo de hongos *Rhizoctonia*, ejemplares como *Tulasnella calospora*, *Tullasnella violea*, son reconocidos como simbiontes promotores de la germinación de orquídeas terrestres (Tedersoo, 2017).

La secuencia amplificada de las regiones ITS perteneciente al aislado *Vp12P*, se agrupa filogenéticamente con hongos del género *Exophiala*

A partir del aislado *Vp12P* identificado morfológicamente como *Exophiala* sp. se obtuvo una secuencia de 623 nucleótidos.

El análisis filogenético muestra que el aislado *Vp12P* es similar a *E. pisciphila*, un hongo filamentoso, septado, color marrón oscuro, con presencia de estructuras como conidióforos, anélides y conidios, la reproducción del aislado ocurre de manera asexual.

Se muestra el árbol con la probabilidad logarítmica más alta (-2100.34). El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon se muestra junto a las ramas. El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en número de sustituciones por sitio. Este análisis involucró 9 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 608 posiciones en el conjunto de datos final, *Vp12P* se agrupa con *E. pisciphila* con un porcentaje de frecuencia del 97 % y una longitud de rama estimada en 0.002 (Figura 18).

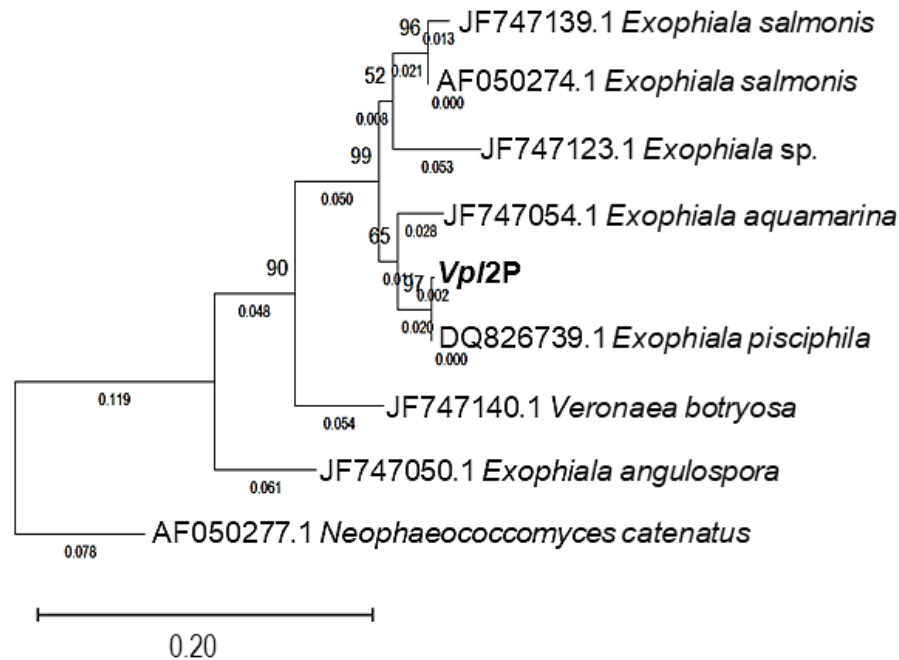


Figura 18. Árbol filogenético generado con las secuencias de rDNA-ITS del aislado *VpI2P* junto a secuencias del género *Exophiala*. Se construyó utilizando el método de máxima verosimilitud, bajo el modelo General de Tiempo Reversible. El aislado analizado está en negritas. Los números sobre las ramas representan los valores de Bootstrap obtenidos a partir de 1000 réplicas, los números debajo de las ramas indican la distancia genética. La barra de escala corresponde a 0.20 sustituciones por suposiciones de nucleótido. Los análisis evolutivos se hicieron con en el programa MEGA11 (Tamura et al., 2021).

El género *Exophiala* está reportado como un grupo de hongos filamentosos que también exhiben crecimiento como levaduras, son hongos septados oscuros, que están reportados, como promotores del crecimiento vegetal e inductores a tolerancia. *E. pisciphila* coloniza raíces de *Zea mays*, las plantas hospederas generaron tolerancia al estrés por metales pesados en el suelo, desarrollaron más raíces y tallos (Li et al., 2011), plantas de *Cucumis sativus* en condiciones de estrés por salinidad del suelo con NaCl inoculadas con *Exophiala sp.*, mostraron mayor tolerancia a la concentración de NaCl de 120 mM, mayor contenido de clorofila y mayor área foliar, en contraste con las plantas que no se inocularon con *Exophiala* (Khan et al., 2011), en orquídeas como y *Cephalanthera damasonium* y *C. longifolia* se ha reportado a la

especie *Exophiala salmonis*, como un hongo endófito micorrízico en etapas adultas (Pecoraro et al., 2017). *E. pisciphila* se aisló de un protocormo de *V. planifolia* en co-cultivo con raíces adultas de esta especie de orquídea, posiblemente. *E. pisciphila* establece simbiosis con vainillas adultas.

Identidad de los aislados

De los cinco hongos aislados, *Vpl5P*, *Vpo11R* y *Vpo2P* corresponden a especies previamente reportadas como hongos micorrizógenos orquideoides, mientras que *Vpl2R* y *Vpl4R*, correspondientes a *Penicillium steckii* y *Talaromyces funiculosus*, respectivamente, no han sido reportadas como micorrizógenas o simbiontes de orquídeas. *Vpl5P* y *Vpl2P*, fueron obtenidos a partir de protocormos de *V. planifolia* germinados en co-cultivo con raíces de *V. planifolia* y *V. pompona*, mientras que *Vpo11R* se aisló directamente de raíces de *V. pompona* adulta (Cuadro 5).

Cuadro 5. Identidad de los aislados por comparación de secuencias de rDNA-ITS mediante BLAST. Resultado de la identidad de los aislados y función reportada donde *Vpl2R*) corresponde al aislado 2 de raíces de *V.planifolia*, *Vpl4R*) aislado 4 de raíces de *V.planifolia*, *Vpl5P*) aislado 5 de protocormo de *V. planifolia*, *Vpo11R*) aislado 11 de raíces de *V. pompona*, *Vpl2P*) aislado2 de protocormo de *V. planifolia*

Aislado	Especie	Función reportada	Fuente
<i>Vpl2R</i>	<i>Penicillium steckii</i>	Endófito	(Chen et al., 2021; Vega et al., 2006; Zakaria & Aziz, 2018)
<i>Vpl4R</i>	<i>Talaromyces funiculosus</i>	Patógeno	(Liu et al., 2021; Salazar-Cerezo et al., 2018)
<i>Vpl5P</i>	<i>Rhizoctonia</i> sp. AG-G	Micorrízico	Haselwandter et al., 2006; Sneh et al., 1998; Soelistijono et al., 2020

Vpo11R	<i>Tulasnella</i> <i>cumulopuntioides</i>	Micorrízico	(Adamo et al., 2020; Fujimori et al., 2019; Ghirardo et al., 2020; Rammitsu et al., 2021)
Vpl2P	<i>Exophiala</i> <i>pisciphila</i>	Micorrízico	(Pecoraro et al., 2017)

Estos resultados sugieren que el aislamiento a partir de protocormos permite la selección más directa de hongos simbioses que el aislamiento a partir de raíces, donde se puede encontrar mayor diversidad de hongos no simbióticos.

Los aislados obtenidos de protocormos de *V. planifolia* y raíces de vainillas adultas son endófitos similares a hongos micorrizógenos orquideoides.

Los aislados *Vpl5P*, *Vpo11R* y *Vpl2P*, presentaron morfotipos similares a *Rhizoctonia* sp., *Tulasnella* sp. y *Exophiala* sp., hongos reportados como simbiontes de orquídea (Figura 19).



Figura 19. Morfología colonial de los aislados. A) Aislado *Vpl5P*, B) Aislado *Vpl2P*, C) Aislado *Vpo11R*. La barra de escala representa 1 cm.

El aislado *Vpl5P*, creció hasta llenar la caja de Petri dos días después de la siembra (DDS), presentó crecimiento aéreo de hifas, con micelio color crema que posteriormente se tornó color ámbar (Figura 19 A).

El aislado *Vp/2P* tardó 1 mes en crecer hasta llenar la caja de Petri, la coloración del micelio fue marrón oscuro, capas densas de hifas, con presencia de hifas aéreas color gris (Figura 19 B).

El aislado *Vpo11R* tardó 10 días en crecer hasta llenar la caja, el crecimiento de hifas fue ralo, sin micelio aéreo e hifas hialinas (Figura 19 C).

Las características morfológicas del aislado *Vp/5P* corresponden al género *Rhizoctonia* sp., de acuerdo con las claves morfológicas de Sneh et al. (1998). Con micelio cilíndrico, incoloro, liso, hifas septadas de $6.2 \pm 2 \mu\text{m}$ de ancho y un largo de septo que varió de 13 a $26 \mu\text{m}$ de largo, además se observaron anastomosis entre las hifas (Figura 20 A), se aprecian dos núcleos celulares por septo (Figura 20 B), el crecimiento hifal forma ángulos de 90° y 45° (Figura 20 A, B y C).

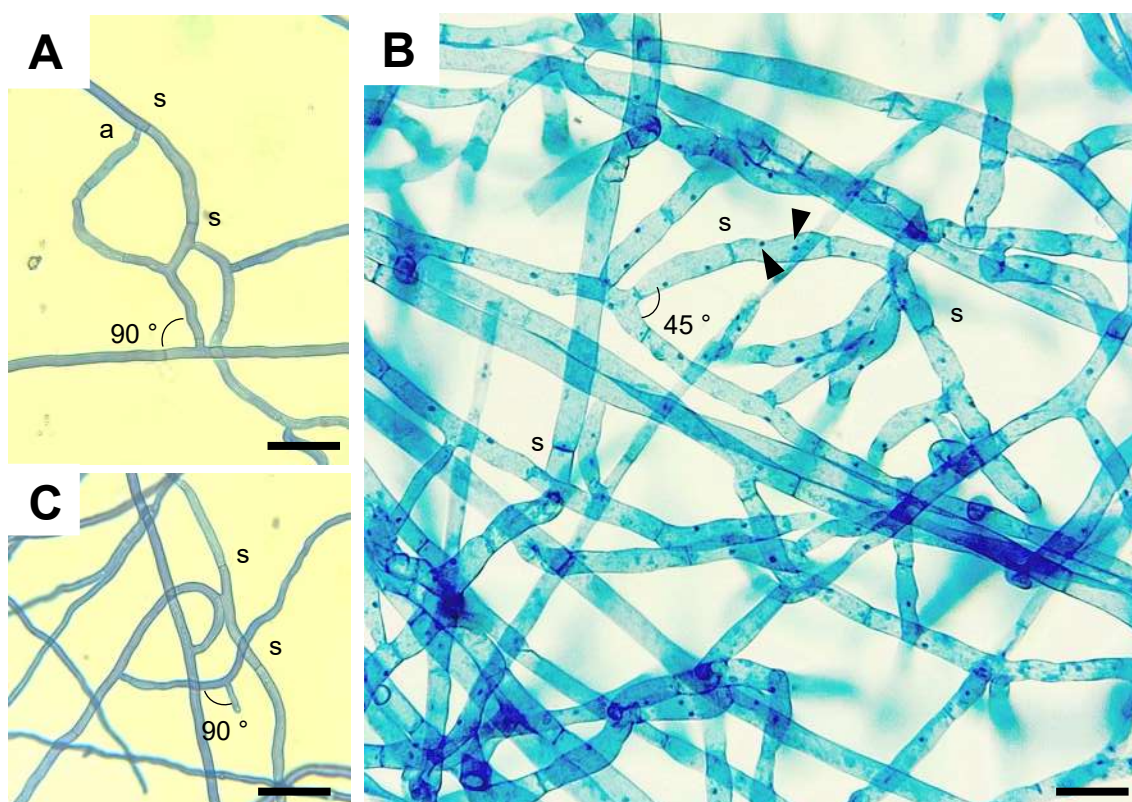


Figura 20. Micelio de *Rhizoctonia* sp. A) Hifas septadas que presentan anastomosis, B) Hifas septadas binucleadas jóvenes que forman ángulos de 45°, C) Hifas maduras que forman ángulos de 90°. Simbología: a) anastomosis (fusión de hifas), s) septo. Las puntas de flecha señalan los núcleos celulares. La barra de escala representa 10 µm.

El morfotipo no presentó esclerocios, una estructura de resistencia característica del género.

El género de hongos *Rhizoctonia* es el más reportado como hongo simbionte de orquídeas, además se reconoce su papel en la germinación de semillas de orquídea, son organismos de distribución cosmopolita, los teleomorfos de este género de hongos son considerados socios importantes para el establecimiento de orquídeas (Tedersoo, 2017).

El aislado *Vpo11R* corresponde al género *Tullasnella* sp. (Sneh et al., 1998), con micelio hialino, irregular, cilíndrico, hifas de 2-4 µm de ancho y un largo de septo de 8 a 14 µm de largo formando ángulos de 45° (Figura 21 A), células moniloides globulares a semiglobulares, binucleadas de $12 \pm 3 \times 12 \pm 3$ µm (Figura 21 B y C), esclerocios de hasta 108 µm conformados con 10 a 67 células moniloides (Figura 21 D). *Vpl5P*, fue aislado de un protocormo *V. planifolia* de los frascos de co-cultivo con raíces de *V. planifolia*. y *Vpo11R*, fue aislado directamente de raíces de una *V. pompona* adulta, lo que sugiere que estas orquídeas establecen simbiosis con HMO promotores de la germinación en etapas adultas (Zhao et al., 2021).

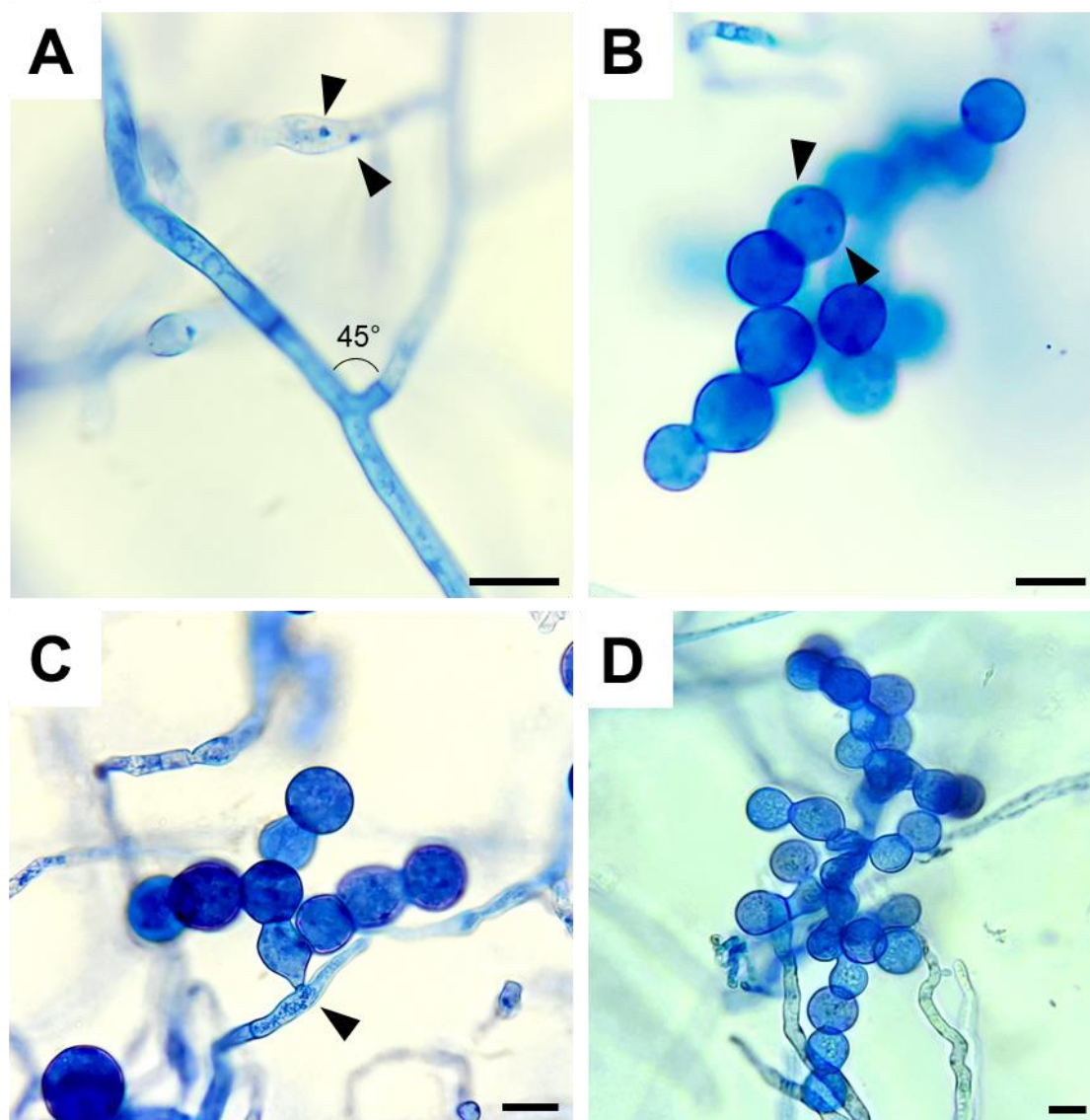


Figura 21. Micelio de *Tulasnella* sp. A) Hifas septadas binucleadas, micelio irregular B) Células monilioides binucleadas, C) Hifa madura con crecimiento de células monilioides en crecimiento D) Cuerpo de células monilioides maduro. Las puntas de flecha señalan los núcleos celulares. La barra de escala representa 10 µm.

El aislado Vp/2P presenta características similares al género *Exophiala* sp. Exhibe crecimiento tanto filamentoso como levaduriforme, con pigmentación oscura en las paredes celulares. Las características morfológicas concuerdan con las expuestas por Vicente et al. (2014), en sus estudios de identificación morfológica y molecular de *Exophiala* spp.

El micelio de 2 μm y 26 μm de largo, septado, uniforme, color marrón oscuro, característico de este género por la síntesis de melanina; conidióforos globulares, de alrededor de 55 μm de largo y 12 μm de ancho, con conidios de 3 x 3 μm en la punta terminal (Figura 22 A y B), producción lateral estructuras diferenciadas como anélides con un conidio por anélide (Figura 22 C), el anélide con 14 μm de largo, junto al conidio se unen en una estructura llamada “botella”, las cuales se unen a través de un “cuello de botella” de 4 μm (Figura 22 D).

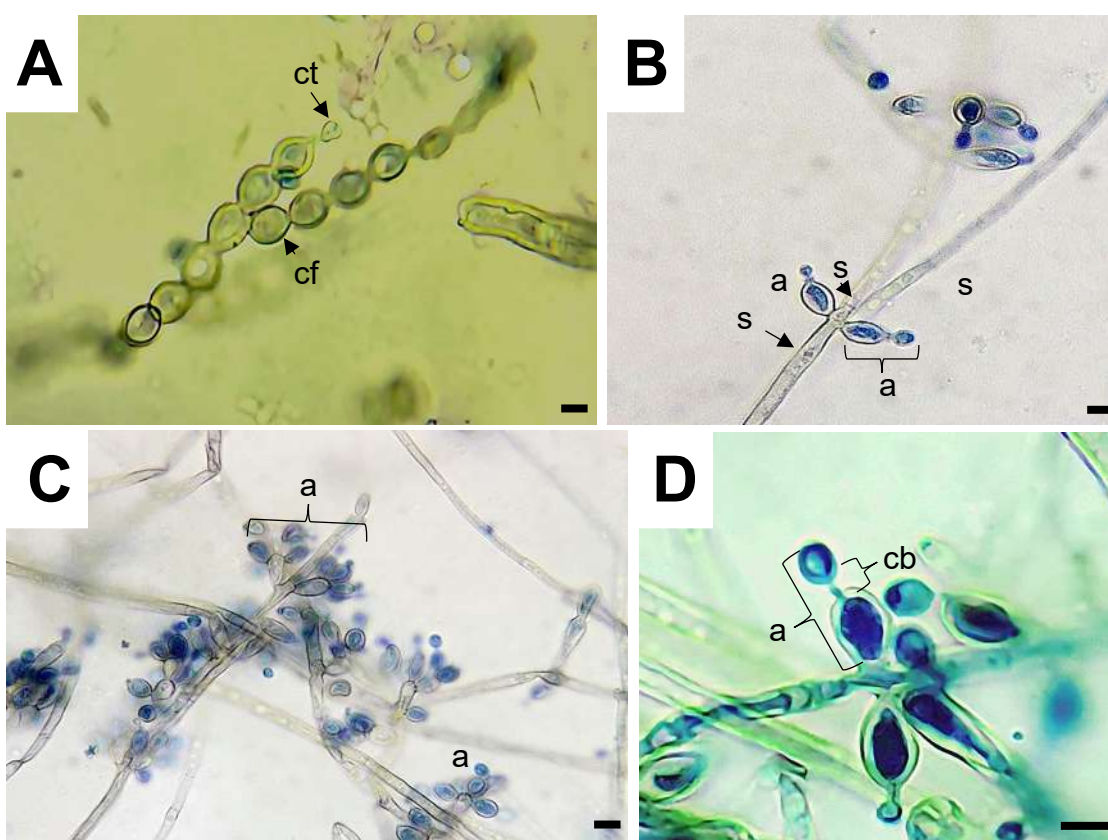


Figura 22. Micelio de *Exophiala* sp. A) Conidióforo con conidio terminal, B) Hifa septada, C) Producción lateral de anélides, D) Anélide formando cuello de botella con conidio. La barra de escala representa 10 μm . Simbología: a) anélide, cb) cuello de botella, ct) conidio terminal, cf) conidióforo, s) septo. La barra de escala representa 10 μm .

Las semillas de *V. planifolia* germinaron y desarrollaron protocormos

Las semillas de *V. planifolia* colocadas en los frascos de co-cultivo con medio HMO sin hongo (C-) y con *E. pisciphila* (Ep) no presentaron germinación (Figura 23 A y B), las

semillas de *V. planifolia* co-cultivadas en medio HMO con *Rhizoctonia* sp. AG-G (Rh) y *T. cumulopuntiioides* (Tc) y el control positivo (C+) si germinaron (Figura 23 C, D y E).

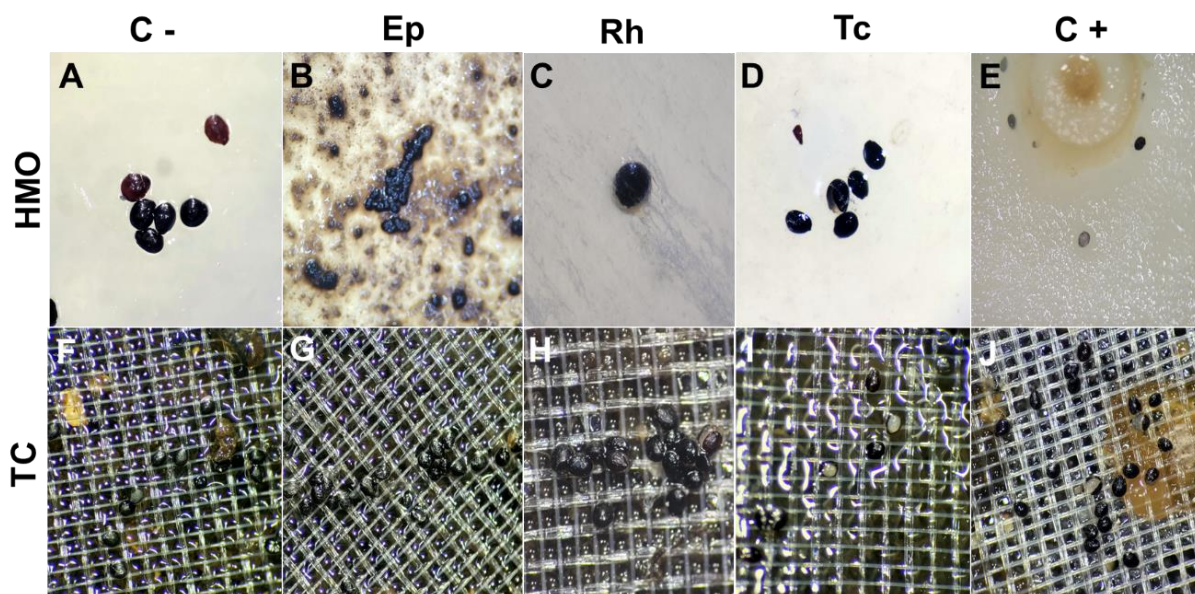


Figura 23. Germinación simbiótica de *V. planifolia* en dos sistemas de co-cultivo. A) Semillas co-cultivadas sin hongo en medio HMO, B) Semillas co-cultivadas con *E. pisciphila* en medio HMO, C) Semillas co-cultivadas con *Rhizoctonia* sp. AG-G en medio HMO, D) Semillas co-cultivadas con *T. cumulopuntiioides* en medio HMO, E) Semillas co-cultivadas con raíces de plantas adultas de vainilla en medio HMO, F) Semillas co-cultivadas sin hongo en turba canadiense, G) Semillas co-cultivadas con *E. pisciphila* en turba canadiense, H) Semillas co-cultivadas con *Rhizoctonia* sp. AG-G en turba canadiense, I) Semillas co-cultivadas con *T. cumulopuntiioides* en turba canadiense, J) Semillas co-cultivadas con raíces de plantas adultas de vainilla en turba canadiense. Simbología: HMO) co-cultivo en medio de cultivo HMO, TC) co-cultivo en turba canadiense, C+) Control positivo, C-) Control negativo, Ep) *E. pisciphila*, Rh) *Rhizoctonia* sp. AG-G, Tc) *T. cumulopuntiioides*.

Las semillas de *V. planifolia* colocadas en los frascos de co-cultivo con sustrato de turba canadiense sin hongo (C-) y con *E. pisciphila* (Ep) no presentaron germinación (Figura 23 F y G), las semillas de *V. planifolia* co-cultivadas en sustrato de turba canadiense con *Rhizoctonia* sp. AG-G (Rh) y *T. cumulopuntiioides* (Tc) y el control positivo (C+) presentaron germinación (Figura 23 H, I y J).

Las semillas de *V. planifolia* colocadas en los frascos de co-cultivo con medio HMO sin hongo (C-) y con *E. pisciphila* (Ep) no presentaron desarrollo de protocormos (Figura 24 A y B), las semillas de *V. planifolia* co-cultivadas en medio HMO con *Rhizoctonia*

sp. AG-G (Rh) y *T. cumulopuntoides* (Tc) y el control positivo (C+) presentaron desarrollo de protocormos (Figura 24 C, D y E).

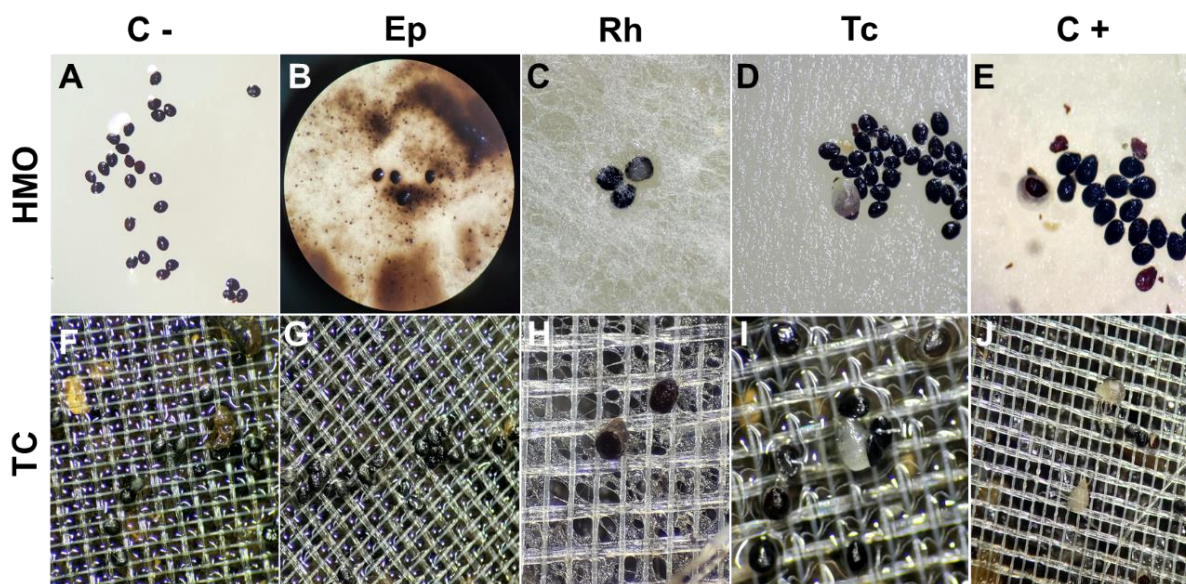


Figura 24. Desarrollo de protocormos de *V. planifolia* en dos sistemas de co-cultivo. A) Semillas co-cultivadas sin hongo en medio HMO, B) Semillas co-cultivadas con *E. pisciphila* en medio HMO, C) Semillas co-cultivadas con *Rhizoctonia* sp. AG-G en medio HMO, D) Semillas co-cultivadas con *T. cumulopuntoides* en medio HMO, E) Semillas co-cultivadas con raíces de plantas adultas de vainilla en medio HMO, F) Semillas co-cultivadas sin hongo en turba canadiense, G) Semillas co-cultivadas con *E. pisciphila* en turba canadiense, H) Semillas co-cultivadas con *Rhizoctonia* sp. AG-G en turba canadiense, I) Semillas co-cultivadas con *T. cumulopuntoides* en turba canadiense, J) Semillas co-cultivadas con raíces de plantas adultas de vainilla en turba canadiense. Simbología: HMO) co-cultivo en medio de cultivo HMO, TC) co-cultivo en turba canadiense, C+) Control positivo, C-) Control negativo, Ep) *E. pisciphila*, Rh) *Rhizoctonia* sp. AG-G, Tc) *T. cumulopuntoides*.

Las semillas de *V. planifolia* colocadas en los frascos de co-cultivo con sustrato de turba canadiense sin hongo (C-) y con *E. pisciphila* (Ep) no presentaron desarrollo de protocormos (Figura 24 F y G), las semillas de *V. planifolia* co-cultivadas en sustrato de turba canadiense con *Rhizoctonia* sp. AG-G (Rh) y *T. cumulopuntoides* (Tc) y el control positivo (C+) presentaron desarrollo de protocormos (Figura 24 H, I y J).

Los hongos *T. cumulopuntii* y *Rhizoctonia* sp. AG-G. promovieron la germinación de semillas y desarrollo de protocormos de *V. planifolia*

Análisis de los experimentos por separado

El análisis de la varianza multivariado (MANOVA) reveló efectos altamente significativos para los tratamientos, así como un efecto significativo en la variable tiempo, a lo largo de las 9 semanas posteriores al inicio de la germinación de semillas ($\alpha \leq 0.01$). Las semillas empezaron a germinar a los 40 DDS, la germinación de las semillas de *V. planifolia* fue asincrónica.

La comparación de medias de Tukey mostró diferencias altamente significativas en el porcentaje de germinación durante las 9 semanas ($\alpha \leq 0.01$) al co-cultivar en medio HMO. En la semana 9, *T. cumulopuntii* (Tc) mostró el mayor porcentaje de germinación con 38.10 %, estadísticamente igual al co-cultivar con raíces de vainilla (C+) con 35.50 %, y diferente al co-cultivar con *Rhizoctonia* sp. AG-G (Rh) con 22.30 %, las semillas co-cultivadas en el control negativo sin raíces, ni hongo (C-) y con *E. pisciphila* (Ep) no germinaron (Figura 25 A). La comparación de medias de Tukey mostró diferencias altamente significativas en el porcentaje de germinación durante las 9 semanas ($\alpha \leq 0.01$) al co-cultivar en medio HMO. En la semana 9, el control positivo (C+) co-cultivado con raíces de vainilla en turba canadiense, mostró el mayor porcentaje de germinación con 54.33 %, estadísticamente diferente al co-cultivar con *T. cumulopuntii* (Tc) con 39.44 % y *Rhizoctonia* sp. AG-G (Rh) con 26.20 %, las semillas co-cultivadas en el control negativo sin raíces, ni hongo (C-) y con *E. pisciphila* (Ep) no germinaron (Figura 25 B).

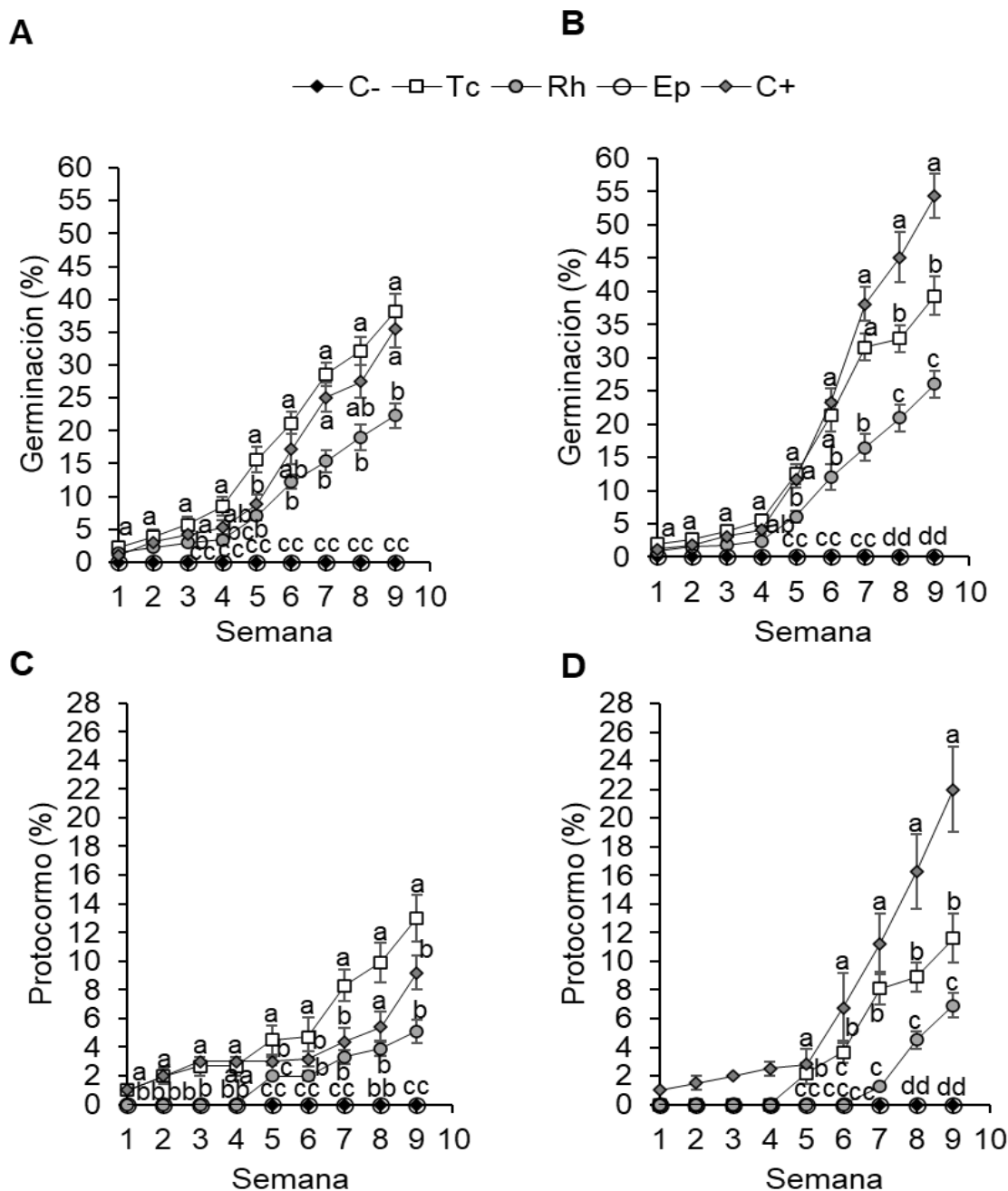


Figura 25. Curva acumulada de germinación y desarrollo de protocormos de *V. planifolia*. Uruapan, Michoacán, 2024. A) Curva acumulada de germinación en co-cultivo en medio HMO, B) Curva acumulada de germinación en co-cultivo en turba canadiense, C) Curva acumulada de protocormos en co-cultivo en medio HMO, D) Curva acumulada de protocormos en co-cultivo en turba canadiense. Simbología: C+) Control positivo, C-) Control negativo, Ep) *Exophiala pisciphila*, Rh) *Rhizoctonia* sp. AG-G, Tc) *Tulasnella cumulopunctioides*. Las barras de error indican el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey; $\alpha \leq 0.01$; $n=10$).

La comparación de medias de Tukey mostró diferencias altamente significativas en el desarrollo de protocormos durante las 9 semanas ($\alpha \leq 0.01$) al co-cultivar en medio

HMO. En la semana 9, *T. cumulopuntiioides* (Tc) mostró el mayor desarrollo de protocormos con 13 %, estadísticamente diferente al co-cultivar con raíces de vainilla (C+) con 9.20 %, y *Rhizoctonia* sp. AG-G (Rh) con 5.10 %, las semillas co-cultivadas en el control negativo sin raíces, ni hongo (C-) y con *E. pisciphila* (Ep) no presentaron este estado de desarrollo (Figura 25 C). La comparación de medias de Tukey mostró diferencias altamente significativas en el desarrollo de protocormos durante las 9 semanas ($\alpha \leq 0.01$) al co-cultivar en turba canadiense. En la semana 9, el control positivo (C+) co-cultivado con raíces de vainilla en turba canadiense, mostró el mayor desarrollo de protocormos con 22 %, estadísticamente diferente al co-cultivar con *T. cumulopuntiioides* (Tc) con 11.60 % y *Rhizoctonia* sp. AG-G (Rh) con 6.90 %, las semillas co-cultivadas en el control negativo sin raíces, ni hongo (C-) y con *E. pisciphila* (Ep) no desarrollaron protocormos (Figura 25 D).

Al analizar los datos por separado se observó efecto del experimento en el que se co-cultivaron las semillas de *V. planifolia*, los tratamientos co-cultivados con *T. cumulopuntiioides* mostraron porcentajes de germinación y desarrollo similares, de manera similar ocurrió con las semillas co-cultivadas con *Rhizoctonia* sp. AG-G, sin embargo, hubo diferencias en las semillas co-cultivadas con raíces como fuente de inóculo, el análisis factorial permitió dilucidar estas diferencias.

Análisis factorial de los experimentos

El análisis de varianza multivariado (MANOVA) factorial reveló efectos altamente significativos en las variables porcentaje de germinación y desarrollo de protocormos en los factores: experimento y tratamiento, así como un efecto altamente significativo

en la variable tiempo, a lo largo de las 9 semanas ($\alpha \leq 0.01$), también, mostró interacción entre el factor experimento y el factor tratamiento ($\alpha \leq 0.01$).

Las semillas de *V. planifolia* co-cultivadas con *T. cumulopuntiioides*, *Rhizoctonia* sp. AG-G y el control con raíces de vainilla (C+) germinaron a los 40 días después de la siembra (DDS). La comparación de medias de Tukey mostró diferencias altamente significativas en el porcentaje de germinación a lo largo de las 9 semanas ($\alpha \leq 0.01$). En la semana 9, el control positivo (C+) co-cultivado con raíces de vainilla en turba canadiense, mostró el mayor porcentaje de germinación con 54.33 %, los tratamientos co-cultivados con el hongo *T. cumulopuntiioides* (Tc) en medio HMO y turba canadiense mostraron medias de 38.10 y 39.44 % respectivamente, *Rhizoctonia* sp. AG-G (Rh) mostró un 22.30 y 26.20 % de germinación, las semillas co-cultivadas en el control negativo sin raíces, ni hongo (C-) y con *E. pisciphila* (Ep) no germinaron (Cuadro 6).

Cuadro 6. Resultados de germinación por semana de semillas de *V. planifolia*. Uruapan, Michoacán, 2024. Las semillas de *V. planifolia* presentaron diferentes porcentajes de germinación. En la tabla se observan los factores: Exp) Experimento, con dos niveles: HMO) Co-cultivo en medio de cultivo HMO y TC) Co-cultivo en turba canadiense y el factor Trat) Tratamiento, con los siguientes cinco niveles: C+) Control positivo, C-) Control negativo, Ep) *Exophiala pisciphila*, R) *Rhizoctonia* sp. AG-G, T) *Tulasnella cumulopuntiioides*, analizados durante nueve semanas. Letras distintas en columnas indican diferencias significativas (Tukey; $\alpha \leq 0.01$)

Exp	Trat	Semana								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
HMO	C-	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (c)	0.00 (c)	0.00 (d)	0.00 (c)	0.00 (d)	0.00 (d)	0.00 (e)
	Tc	2.00 (a)	3.90 (a)	3.90 (ab)	5.44 (ab)	12.50 (a)	21.30 (a)	31.60 (ab)	32.89 (b)	38.10 (b)
	Rh	1.50 (ab)	2.30 (ab)	3.00 (abc)	3.40 (bc)	7.10 (bc)	12.20 (b)	15.40 (c)	19.00 (c)	22.30 (d)
	Ep	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (c)	0.00 (c)	0.00 (d)	0.00 (c)	0.00 (d)	0.00 (d)	0.00 (e)
	C+	1.00 (ab)	3.10 (a)	4.20 (ab)	5.30 (ab)	8.80 (bc)	17.20 (ab)	25.10 (b)	27.50 (bc)	35.50 (bc)
TC	C-	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (c)	0.00 (c)	0.00 (d)	0.00 (c)	0.00 (d)	0.00 (d)	0.00 (e)
	Tc	2.30 (a)	2.90 (ab)	5.70 (a)	8.50 (a)	15.60 (a)	21.20 (a)	28.60 (b)	32.20 (b)	39.44 (b)
	Rh	0.8 (ab)	1.50 (ab)	1.80 (bc)	2.40 (bc)	6.10 (c)	12.00 (b)	16.50 (c)	20.90 (c)	26.20 (cd)
	Ep	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (c)	0.00 (c)	0.00 (d)	0.00 (c)	0.00 (d)	0.00 (d)	0.00 (e)
	C+	1.20 (ab)	1.8 (ab)	3.33 (ab)	4.33 (b)	11.70 (abc)	23.20 (a)	38.10 (a)	45.11 (a)	54.33 (a)

La comparación de medias de Tukey mostró diferencias altamente significativas en el porcentaje de protocormos a lo largo de las 8 semanas ($\alpha \leq 0.01$). En la semana 9, el

control positivo (C+) co-cultivado con raíces de vainilla en turba canadiense, mostró el mayor porcentaje de desarrollo de protocormos con 22 % al co-cultivar, los tratamientos co-cultivados con el hongo *T. cumulopuntiioides* (T) en medio HMO y turba canadiense mostraron desarrollo de protocormos en 13 y 11.60 % respectivamente, *Rhizoctonia* sp. AG-G ® mostró un 5.10 y 6.90 % de protocormos, las semillas co-cultivadas en el control negativo (C-) y con *E. pisciphila* (E) no presentaron este estado de desarrollo (Cuadro 7). Es importante mencionar que el desarrollo de protocormos se vio afectado en el C+ al co-cultivar en medio de cultivo HMO.

Cuadro 7. Resultados del desarrollo de protocormos por semana de *V. planifolia*. Uruapan, Michoacán, 2024. Los embriones se desarrollaron en protocormos. En la tabla se observan los factores: Exp) Experimento con dos niveles: HMO) Co-cultivo en medio de cultivo HMO, TC) Co-cultivo en turba canadiense, y Trat) Tratamiento, con cinco niveles: C+) Control positivo, C-) Control negativo, Ep) *Exophiala pisciphila*, Rh) *Rhizoctonia* sp. AG-G, Tc) *Tulasnella cumulopuntiioides*. Analizados durante nueve semanas. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey; $\alpha \leq 0.01$: n=10).

Exp	Trat	Semana								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
HMO	C-	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (d)	0.00 (d)	0.00 (d)	0.00 (d)	0.00 (d)
	T	2.00 (a)	2.00 (a)	2.67 (a)	2.67 (a)	4.50 (ab)	4.71 (b)	8.30 (b)	9.90 (b)	13.00 (b)
	R	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (b)	2.00 (d)	2.00 (d)	3.33 (bc)	3.88 (c)	5.10 (c)
	E	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (d)	0.00 (d)	0.00 (d)	0.00 (d)	0.00 (d)
	C+	1.00 (a)	2.00 (a)	3.00 (a)	3.00 (a)	2.50 (bc)	3.17 (c)	4.40 (bc)	5.40 (b)	9.20 (bc)
	C-	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (d)	0.00 (d)	0.00 (d)	0.00 (d)	0.00 (d)
TC	T	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (b)	2.20 (c)	3.67 (c)	8.10 (b)	8.90 (b)	11.60 (bc)
	R	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (d)	0.00 (d)	1.25 (bc)	4.50 (c)	6.90 (c)
	E	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (b)	0.0 (d)	0.00 (d)	0.00 (d)	0.00 (d)	0.00 (d)
	C+	1.00 (a)	1.50 (a)	2.00 (a)	1.50 (a)	2.8 (a)	6.75 (a)	11.22 (a)	16.25 (a)	22.00 (a)

De manera gráfica se puede observar el porcentaje de germinación y desarrollo de protocormos durante las 9 semanas en las que se evaluó el experimento, así como el cruce de los niveles de los experimentos con los tratamientos (Figura 26 A y B).

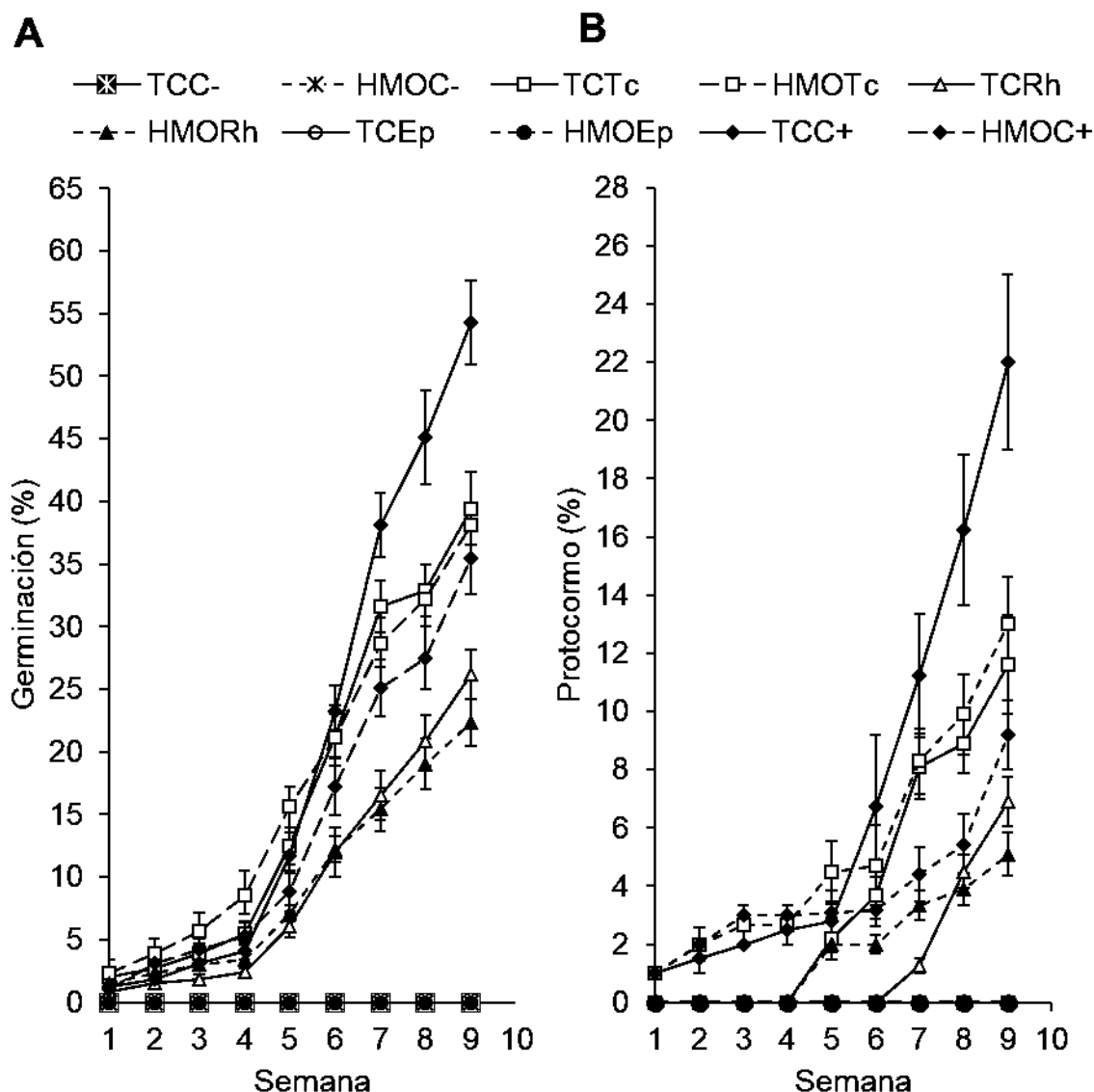


Figura 26. Curva acumulada de germinación y desarrollo de protocormos de *V. planifolia*. Uruapan, Michoacán, 2024. A) Curva acumulada de germinación, B) Curva acumulada de desarrollo en protocormos. Simbología: TCC+) Control positivo con raíces de vainilla co-cultivado en turba canadiense, TCC-) Control negativo sin hongo, ni raíces de vainilla co-cultivado en turba canadiense, CCTc) hongo *Tulasnella cumulopunctioides* co-cultivado en turba canadiense, TCRh) hongo *Rhizoctonia* sp. AG-G, co-cultivado en turba canadiense, TCEp) hongo *Exophiala pisciphila* co-cultivado en turba canadiense, HMOC+) Control positivo con raíces de vainilla co-cultivado en medio HMO, HMOC-) Control negativo sin hongo, ni raíces de vainilla co-cultivado en medio HMO, HMOTc) hongo *Tulasnella cumulopunctioides* co-cultivado en medio HMO, HMORh) hongo *Rhizoctonia* sp. AG-G, co-cultivado en medio HMO, HMOEp) hongo *Exophiala pisciphila* co-cultivado en medio HMO. Las barras de error indican el error estándar.

Algunos hongos descomponen la materia orgánica vegetal, a través de la secreción de enzimas con capacidad para descomponer la celulosa y lignina de la pared celular de la célula vegetal, la lignina es un heteropolímero difícil de desintegrar, sólo hongos

capaces de secretar peroxidasas son capaces de desintegrarla (Purahong et al., 2016). Posiblemente los hongos que colonizan las raíces de *V. planifolia* y *V. pompona* despolimerizan la lignina y esto facilita la germinación de sus semillas. Protocolos de germinación asimbiótica de *Vanilla inodora* usando HCl 1 N como agente escarificante, han obtenido porcentajes de germinación del 100 %, 22 semanas después de la siembra (SDS) (Lozano, 2014). Otros protocolos utilizan NACIO al 4 % o embriones inmaduros de *V. planifolia* y obtienen 12 y 9 % de germinación respectivamente, a las 8 SDS (Yeh et al., 2021). Las semillas de *V. planifolia* en co-cultivo con raíces, *T. cumulopuntioides* y *Rhizoctonia* sp. AG-G, germinaron a las 5 SDS, en la semana 9, germinaron hasta el 54.33 % y se obtuvo hasta 22 % de protocormos. Estudios realizados en especies de vainillas Colombianas demuestran que las vainillas nativas mantienen relaciones simbióticas con hongos caracterizados molecularmente como *Ceratobasidium* spp., e incluso, semillas expuestas a este hongo lograron germinar hasta en un 80 % (Alomia et al., 2017). Claves de identificación generadas para hongos *Rhizoctonia*, en estados anamórficos y teleomórficos clasifican a las especies de *Rhizoctonia* en clados de anastomosis como multinucleados y binucleados, estos últimos son diferentes a los hongos de la especie *Rhizoctonia solani* (Sneh et al., 1998) un fitopatógeno de importancia económica (Misawa & Kurose, 2019). Se hipotetiza que estos hongos se abastecen del nitrógeno en forma de amonio que contienen las semillas de orquídea, aparentemente es un compuesto que ayuda a establecer la simbiosis para dar lugar a la germinación simbiótica, evidencia molecular indica que el hongo *T. calospora* es incapaz de transportar nitratos, únicamente transportadores de amonio (Dearnaley & Cameron, 2016). Otros autores mencionan la importancia de compuestos fenólicos difusibles que atraen a los hongos (Pulido & Flanagan, 2020)

como las fitoalexinas, orgánulos donde se lleva a cabo la peroxidación de lípidos que contienen las semillas de orquídea (Martin, 2017; Peterson et al., 1998). La germinación simbiótica en especies como *E. secundum* ha demostrado ser exitosa, logrando hasta un 60 % de plántulas con hojas a los 60 días siendo co-cultivadas con *Ceratobasidium* sp. (Durán-López et al., 2019). En estudios de la influencia de hongos sobre la germinación simbiótica de especies de orquídeas terrestres y epífitas, se analizaron los diferentes factores que determinan el éxito de la germinación simbiótica, mostrando estos que la fuente de carbono, la presencia o ausencia de luz y la especificidad de los simbiontes tiene efectos significativos en la germinación (Alghamdi, 2019). Además estudios de co-cultivo realizados en *Prasophyllum* sp. con *Ceratobasidium* sp., demuestran que el comportamiento del simbionte cambia dependiendo de la fuente de carbono suministrada, así como de la cantidad, el crecimiento micelial fue mayor al aumentar la cantidad de glucosa en el medio, lo que propició que el hongo se comportara como saprófito, al disminuir la cantidad de glucosa, el hongo formó una relación simbiótica con las semillas y germinaron hasta en un 39.7 % (Freestone et al., 2022). En *V. planifolia* el medio en que germinaron las semillas, influyó en la germinación y desarrollo de protocormos, posiblemente algún compuesto de la turba canadiense estimule la germinación o facilite la adquisición de carbono o nitrógeno orgánico.

VI. Conclusiones

Las orquídeas adultas de *V. planifolia* y *V. pompona* mantienen relaciones simbióticas con hongos micorrizógenos orquideoides. Las raíces de estas plantas son colonizadas en la epidermis, pelos radicales y en la zona cortical donde se desarrollan los pelotones característicos de la asociación simbiótica.

La germinación de *V. planifolia* y *V. pompona* se promueve hasta en un 100 % en presencia de raíces colonizadas de plantas adultas, además el desarrollo de protocormos, la generación de protocormos fotosintéticos y protocormos en diferenciación resultan más eficientes y precoces a lo reportado en trabajos de germinación asimbiótica de *Vanilla* spp. La germinación y desarrollo de protocormos de *V. planifolia* es más eficiente cuando son co-cultivadas con raíces de la misma especie, colonizadas por hongos micorrizógenos.

El aislamiento de hongos micorrizógenos promotores de la germinación es más factible a partir de protocormos colonizados que a partir de raíces, debido a la presencia de hongos de diversos comportamientos nutricionales en las raíces adultas de *Vanilla* spp., de los tres hongos aislados de especies previamente reportadas como simbiontes de orquídeas.

Existen diversos componentes de las raíces adultas colonizadas que interaccionan con el sustrato de turba canadiense y permiten una mayor promoción de la germinación de *V. planifolia* que la presencia individual de los hongos micorrizógenos aislados, o que el co-cultivo con las mismas raíces en medio HMO.

VII. Bibliografía

- Adamo, M., Chialva, M., Calevo, J., Rose, S. De, Girlanda, M., Perotto, S., & Balestrini, R. (2020). The dark side of orchid symbiosis: Can *Tulasnella calospora* decompose host tissues? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9). <https://doi.org/10.3390/ijms21093139>
- Alghamdi, S. A. (2019). Influence of mycorrhizal fungi on seed germination and growth in terrestrial and epiphytic orchids. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(3), 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.10.021>
- Alomia, Y. A., Mosquera-E, A. T., Flanagan, N. S., & Otero, J. T. (2017). Seed viability and symbiotic seed germination in *Vanilla* spp. (Orchidaceae). *Research Journal of Seed Science*, 10(2). <https://doi.org/10.3923/rjss.2017.43.52>
- Alomía, Y. A., Muñoz, E., Acosta-Rangel, A. M., & Tupac Otero, J. (2016). Morphometric analysis of *Vanilla* seeds (orchidaceae) by microscopic techniques. *Lankesteriana*, 16(1). <https://doi.org/10.15517/lank.v16i1.23501>
- Arditti, J. (1967). Factors affecting the germination of orchid seeds. In J. Arditti (Ed.), *The Botanical Review* (Vol. 33, Issue 1, pp. 1–29). Springer on behalf of New York Botanical Garden Press.
- Arditti, J. (2022). Orchids - discoverers and firsts. *South African Journal of Botany*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.01.029>
- Bellino, A., Alfani, A., Selosse, M., Guerrieri, R., Borghetti, M., & Baldantoni, D. (2014). Nutritional regulation in mixotrophic plants: new insights from *Limodorum abortivum*. *Oecología*, 175(3), 875–885.
- Bello, J., García-García, G., & Iglesias-Andreu, L. (2015). In vitro conservation of vanilla (*Vanilla planifolia* jacks.) under slow growth conditions. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 38(2), 165–171.
- Beltrán-Nambo, M. de los A., Martínez-Trujillo, M., Montero-Castro, J. C., Salgado-Garciglia, R., Otero-Ospina, J. T., & Carreón-Abud, Y. (2018). Fungal diversity in the roots of four epiphytic orchids endemic to Southwest Mexico is related to

- the breadth of plant distribution. *Rhizosphere*, 7, 49–56.
<https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.07.001>
- Brundrett, M. C., & Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*. 220 (4), 1108–1115.
<https://doi.org/10.1111/nph.14976>
- Cervantes, A., Lima, M., Delgado, A., Herrera, B. E., Arévalo, G. A., Soto, R. M., García, C., & Arévalo, M. (2018). Quality evaluation of *Vanilla planifolia* (Jacks. ex Andrews) beans from the Huasteca Potosina, México. *Nova Scientia*, 10(21), 360–378. <https://doi.org/10.21640/ns.v10i21.1586>
- Chen, C. M., Chen, W. H., Tao, H. M., Yang, B., Zhou, X. F., Luo, X. W., & Liu, Y. H. (2021). Diversified Polyketides and Nitrogenous Compounds from the Mangrove Endophytic Fungus *Penicillium steckii* SCSIO 41025. *Chinese Journal of Chemistry*, 39(8), 2132–2140.
<https://doi.org/10.1002/cjoc.202100226>
- Clarke, J. D. (2009). Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) DNA miniprep for plant DNA isolation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4(3).
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot5177>
- Clements, M., Muir, H., & Cribb, P. (1996). A Preliminary Report on the Symbiotic Germination of European Terrestrial Orchids. *Royal Botanic Gardens, Kew*, 41(2), 437.
- Cruz, J. (2014). Desarrollo de una trampa in situ para el aislamiento micorrízico de una orquídea epífita del Parque Nacional el Tepozteco. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México].
- Dashtaban, M., Schraft, H., A.Syed, T., & Qin, W. (2010). Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *International Biochemistry Molecular Biology*, 1(1), 36–50.
- De Rose, S., Kuga, Y., Sillo, F., Fochi, V., Sakamoto, N., Calevo, J., Perotto, S., & Balestrini, R. (2023). Plant and fungal gene expression coupled with stable

- isotope labeling provide novel information on sulfur uptake and metabolism in orchid mycorrhizal protocorms. *Plant Journal*. <https://doi.org/10.1111/tpj.16381>
- Dearnaley, J. (2007). Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza*, 17, 475–486.
- Dearnaley, J. D., & Cameron, D. D. (2016). Nitrogen transport in the orchid mycorrhizal symbiosis-further evidence for a mutualistic association. *New Phytologist*, 213(1), 10–12. www.theplantlist.org
- Debouk, D., Ebert, A., Peralta, E., Barandiarán, M., & Ramírez, M. (2008). La importancia de la utilización de la diversidad genética vegetal en los programas de investigación agrícola en América Latina. *Recursos Naturales y Ambiente Número 53*. Informe Especial de Recursos Fitogenéticos.
- Deseo, N., De Guzman, C. C., Nuevo, P. A., & Torreta, N. K. (2020). Morpho-anatomy of Adventitious Roots of *Vanilla* (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) During Attachment to Support Post. *The Thailand Natural History Museum Journal*, 14(1).
- DOF. (2010). *Declaratoria de Protección de la Denominación de Origen “VAINILLA DE PAPANTLA.”* SEGOB. *Diario Oficial de la Federación*. Accesado de: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5082615&fecha=05/03/2009#gsc.tab=0
- DOF. (2009). *Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010*. SEGOB. *Diario Oficial de la Federación*. Accesado de: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5082615&fecha=05/03/2009
- Dressler, R. L. (2005). How many orchids specied?. *Selbyana*, 26(1,2) 155-158
- Durán-López, M. E., Caroca-Cáceres, R., Jahreis, K., Narváez-Vera, M., Ansaloni, R., & Cazar, M. E. (2019). The micorrryzal fungi *Ceratobasidium* sp. and *Sebacina vermifera* promote seed germination and seedling development of the terrestrial orchid *Epidendrum secundum* Jacq. *South African Journal of Botany*, 125, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.06.029>

- FAOSTAT. (2020, June). Producción y Áreas Determinadas para el Cultivo de Vainilla a Nivel Internacional. Accesado de: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>.
- Freestone, M., Linde, C., Swarts, N., & Reiter, N. (2022). *Ceratobasidium* orchid mycorrhizal fungi reveal intraspecific variation and interaction with different nutrient media in symbiotic germination of *Prasophyllum* (Orchidaceae). *Symbiosis*, 87(3), 255–268. <https://doi.org/10.1007/s13199-022-00874-9>
- Fujimori, S., Abe, J. P., Okane, I., & Yamaoka, Y. (2019). Three new species in the genus *Tulasnella* isolated from orchid mycorrhiza of *Spiranthes sinensis* var. *amoena* (Orchidaceae). *Mycoscience*, 60(1), 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2018.09.003>
- Garcez, & Bonates. (2015). *Anatomía ecológica da raiz de Vanilla planifolia B.D. Jackson (Orchidaceae) em dois ambientes contrastantes (viveiro e mata secundária)*.
- Genre, A. , Lanfranco, L., Perotto, S., & Bonfante, P. (2020). Unique and common traits in mycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 18, 649–660.
- Ghirardo, A., Fochi, V., Lange, B., Witting, M., Schnitzler, J. P., Perotto, S., & Balestrini, R. (2020). Metabolomic adjustments in the orchid mycorrhizal fungus *Tulasnella calospora* during symbiosis with *Serapias vomeracea*. *New Phytologist*, 228(6), 1939–1952. <https://doi.org/10.1111/nph.16812>
- Google Earth. (2022). Mapa de Uruapan. Accesado de: <https://earth.google.com/>.
- Gryndler, M., Baláž, M., Hršelová, H., Jansa, J., & Vosátka, M. (2004). *Mykorhizní symbióza: o soužití hub s kořeny rostlin*.
- Haselwandter, K., Passler, V., Reiter, S., Schmid, D. G., Nicholson, G., Hentschel, P., Albert, K., & Winkelmann, G. (2006). Basidiochrome - A novel siderophore of the orchidaceous mycorrhizal fungi *Ceratobasidium* and *Rhizoctonia* spp. *BioMetals*, 19(3), 335–343. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-6986-x>
- Havkin-Frenkel, D., & Belanger, F. (2019). *Handbook of Vanilla Science and Technology*. In Havkin-Frenkel D. & Belanger F (Eds.), *Handbook of Vanilla Science and Technology (Second Edition)*. WILEY Blackwell.

- Hernández-Muñoz, S., Pedraza-Santos, M. E., Antonio López, P., De La Cruz-Torres, E., Fernández-Pavía, P. S., Martínez-Palacios, A., & Martínez-Trujillo, M. (2017). DL50 and GR 50 determination with gamma rays (60CO) on invitro *Laelia autumnalis* protocorms. *Agrociencia*, 51, 507–524.
- Herrera-Cabrera, B., Ruiz- Hernández, J., & Delgado-Alvarado, A. (2018). Variación de aroma en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews silvestre y cultivada. *Agroproductividad*, 9(1), 10–17.
- INIFAP. (2014). Producción de vainilla en tres sistemas de producción en la Sierra Huasteca Potosina (SAGARPA, Ed.). SAGARPA.
- Jacquemyn, H., Waud, M., Brys, R., Lallemand, F., Courty, P. E., Robioneck, A., & Selosse, M. A. (2017). Mycorrhizal associations and trophic modes in coexisting orchids: An ecological continuum between auto-and mixotrophy. *Frontiers in Plant Science*, 8(1497), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01497>
- Jain, A., Sarsaiya, S., Chen, J., Wu, Q., Lu, Y., & Shi, J. (2021). Changes in global Orchidaceae disease geographical research trends: recent incidences, distributions, treatment, and challenges. In *Bioengineered* (Vol. 12, Issue 1). <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1853447>
- Jiménez-Peña, N., Sandoval-Villa, M., Volke-Haller, V. H., Pedraza-Santos, M. E., & Fernadez-Herrera, E. (2018). Colonización micorrízica de *Laelia autumnalis* (La Llave & Lex.) Lindl. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 5(15), 547. <https://doi.org/10.19136/era.a5n15.1756>
- Karremans, A. P., Chinchilla, I. F., Rojas-Alvarado, G., Cedeño-Fonseca, M., Damián, A., & Léotard, G. (2020). A Reappraisal of Neotropical *Vanilla*. With A Note On Taxonomic Inflation and The Importance of Alpha Taxonomy in Biological Studies. *Lankesteriana*, 20(3), 395–497. <https://doi.org/10.15517/lank.v20i3.45203>
- Khan, A. L., Hamayun, M., Ahmad, N., Waqas, M., Kang, S. M., Kim, Y. H., & Lee, I. J. (2011). *Exophiala* sp. LHL08 reprograms *Cucumis sativus* to higher growth

- under abiotic stresses. *Physiologia Plantarum*, 143(4), 329–343.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01508.x>
- Koyyappurath, S., Atuahiva, T., le Guen, R., Batina, H., le Squin, S., Gautheron, N., Edel Hermann, V., Peribe, J., Jahiel, M., Steinberg, C., Liew, E. C. Y., Alabouvette, C., Besse, P., Dron, M., Sache, I., Laval, V., & Grisoni, M. (2016). *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-vanillae* is the causal agent of root and stem rot of vanilla. *Plant Pathology*, 65(4), 612–625.
<https://doi.org/10.1111/ppa.12445>
- Leroux, G., Barabé, D., & Vieth, J. (1997). Morphogenesis of the protocorm of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 205, 53–72.
- Liu, S., Wang, J., Guo, N., Sun, H., Ma, H., Zhang, H., & Shi, J. (2021). *Talaromyces funiculosus*, a Novel Causal Agent of Maize Ear Rot and Its Sensitivity to Fungicides. *Plant Disease*, 105(12). <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-21-0686-RE>
- Li, T., Liu, M. J., Zhang, X. T., Zhang, H. B., Sha, T., & Zhao, Z. W. (2011). Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*. *Science of the Total Environment*, 409(6), 1069–1074.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.12.012>
- Li, T., Wu, S., Yang, W., Selosse, M. A., & Gao, J. (2021). How Mycorrhizal Associations Influence Orchid Distribution and Population Dynamics. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 12). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.647114>
- Li, T., Yang, W., Wu, S., Selosse, M. A., & Gao, J. (2021). Progress and Prospects of Mycorrhizal Fungal Diversity in Orchids. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.646325>
- Lozano, A. (2014). Establecimiento del banco de germoplasma in vitro de vainillas mexicanas [Tesis de Maestría, Universidad Veracruzana].

- Luo, J., Hou, B. W., Niu, Z. T., Liu, W., Xue, Q. Y., & Ding, X. Y. (2014). Comparative chloroplast genomes of photosynthetic orchids: Insights into evolution of the Orchidaceae and development of molecular markers for phylogenetic applications. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099016>
- Martin, F. (2017). *Molecular Mycorrhizal Symbiosis* (F. Martin, Ed.). John Wiley & Sons, inc. <http://www.wiley.com/go/permissions.www.wiley.com>.
- McCormick, M., Whigham, D., & Canchani-Viruet, A. (2018). Mycorrhizal fungi affect orchid distribution and population dynamics. *New Phytologist*, 219(4), 1207–1215.
- Misawa, T., & Kurose, D. (2019). Anastomosis group and subgroup identification of *Rhizoctonia solani* strains deposited in NARO Genebank, Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 85(4), 282–294. <https://doi.org/10.1007/s10327-019-00848-8>
- Miura, C., Pujasatria, G. C., & Kaminaka, H. (2023). Understanding the Molecular Mechanisms of Orchid Mycorrhizal Symbiosis from Genetic Information. In *Advances in Orchid Biology, Biotechnology and Omics* (pp. 1–25). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-99-1079-3_1
- Moreira, A., & Dos Santos, A. (2008). Comparative anatomy of the absorption roots of terrestrial and epiphytic orchids. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(1). <https://doi.org/10.1590/S1516-89132008000100011>
- Mukerji K., Manoharachary, C., & Chamola, B. (2002). *Tecniques in Mycorrhizal Studies*. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- Navarro, A. (2021). Aislamiento e identificación de hongos micorrizógenos promotores de germinación y desarrollo inicial de *Epidendrum radicans* Pav. ex Lindl. [Tesis de Licenciatura, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo].
- Nei M. and Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York
- Ogoshi, A. (1985) Anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia*. *Fitopatologia Brasileira*, 10, 372-390

- Ogoshi, A., Oniki, M., Sakai, R., & Ui, T. 1979. Anastomosis grouping among isolates of binucleate *Rhizoctonia*. *Transactions of the Mycological Society of Japan*. 20, 33-39
- Pansarin, E. R. (2021). Unravelling the enigma of seed dispersal in *Vanilla*. *Plant Biology*, 23(6). <https://doi.org/10.1111/plb.13331>
- Pecoraro, L., Huang, L., Caruso, T., Perotto, S., Girlanda, M., Cai, L., & Liu, Z. J. (2017). Fungal diversity and specificity in *Cephalanthera damasonium* and *C. longifolia* (Orchidaceae) mycorrhizas. *Journal of Systematics and Evolution*, 55(2), 158–169. <https://doi.org/10.1111/jse.12238>
- Peterson, L., Uetake, Y., & Zelmer, C. (1998). Fungal Simbiosis with orchid Protocorms. *Symbiosis*, 25, 29–55.
- Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 158-IN18. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(70)80110-3)
- Pulido, K. D., & Flanagan, N. S. (2020). Actividad polifenoloxidasas durante la germinación de semillas de *Rodriguezia granadensis* expuesta a endófitos aislados del estado silvestre [Tesis de Licenciatura, Universidad de Tolima]. <https://www.researchgate.net/publication/335712624>
- Rammitsu, K., Abe, S., Abe, T., Kotaka, N., Kudaka, M., Kudaka, N., Kinoshita, A., & Ogura-Tsujita, Y. (2021). The endangered epiphytic orchid *Dendrobium okinawense* has a highly specific mycorrhizal association with a single Tulasnellaceae fungus. *Journal of Forest Research*, 26(3), 215–221. <https://doi.org/10.1080/13416979.2021.1876587>
- Ramos-Castellá, A. L., Iglesias-Andreu, L. G., Martínez-Castillo, J., Ortiz-García, M., Andueza-Noh, R. H., Octavio-Aguilar, P., & Luna-Rodríguez, M. (2016). Evaluation of molecular variability in germplasm of vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson in Andrews) in Southeast Mexico: Implications for genetic

- improvement and conservation. *Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation*, 15(4), 310–320. <https://doi.org/10.1017/S1479262115000660>
- Rasmussen, H., & Rasmussen, F. (2009). Orchid Mycorrhiza: Implications of a Mycophagous Life Style". *Oikos*, 118(3), 334–345.
- Rasmussen, H., & Whigham, D. (1993). Seed ecology of dust seeds in situ: a new study technique and its application in terrestrial orchids. *American Journal of Botany*, 80, 1374–1378.
- Reyes-López, D., Flores-Jiménez, Á., Huerta-Lara, M., Arturo Kelso-Bucio, H., Hugo Avendaño-Arrazate, C., Lobato-Ortiz, R., Aragón-García, A., & Francisco López-Olguín, J. (2014). Morfometric variation of fruits and seed in four species of the genus *Vanilla*. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 1(3), 205–218. www.ujat.mx/era
- Ruiz de Villa, M. C. (2004). Análisis de medidas repetidas. *Medicina Clínica (Barc)*, 122(1), 51–58. [http://www.elsevier.es/S1001-0126\(04\)00051-0](http://www.elsevier.es/S1001-0126(04)00051-0)
- Salazar-Cerezo, S., Martínez-Montiel, N., Cruz-López, M. del C., & Martínez-Contreras, R. D. (2018). Fungal diversity and community composition of culturable fungi in *Stanhopea trigrina* cast gibberellin producers. *Frontiers in Microbiology*, 9(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00612>
- Sarsaiya, S., Shi, J., & Chen, J. (2019). A comprehensive review on fungal endophytes and its dynamics on Orchidaceae plants: current research, challenges, and future possibilities. In *Bioengineered* (Vol. 10, Issue 1, pp. 316–334). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1644854>
- SAS OnDemand for Academics. (2012-2020). *Statistical Analysis System, Version 3.81*. Cary, NC, USA.
- Sathiyadash, K., Muthukumar, T., Karthikeyan, V., & Rajendran, K. (2020). Orchid Mycorrhizal Fungi: Structure, Function, and Diversity. In *Orchid Biology:*

- Recent Trends & Challenges* (pp. 239–280). Springer Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-32-9456-1_13
- Sathiyadash, K., Muthukumar, T., Uma, E., & Pandey, R. R. (2012). Mycorrhizal association and morphology in orchids. *Journal of Plant Interactions*, 7(3), 238–247. <https://doi.org/10.1080/17429145.2012.699105>
- Selosse, M., Boullard, B., & Richardson, D. (2011). Orchids to simbiosis in a dozen years, one century ago. *Springer Science Business*. 10. 31-5., 100, 5–31.
- SIAP. (2019, June). *Producción y Áreas Determinadas para el Cultivo de Vainilla a Nivel Nacional*. Accesado de: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Smith, S., & Read, D. (2008). Mycorrhizal Symbiosis. In Elsevier (Ed.), *Mycorrhizal Symbiosis* (3ed ed.). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370526-6.X5001-6>
- Sneh, B., Burpee, L., & Ogoshi, A. (1998). *Identification of Rhizoctonia Species* (The American Phytopathological Society, Ed.; Tercera Edición). The American Phytopathological Society.
- Soelistijono, R., Utami, D. S., Daryanti, Faizin, M., & Dian, R. (2020). Short communication: Characterization of rhizoctonia-like mycorrhizae associated with five *Dendrobium* species in Java, Indonesia. *Biodiversitas*, 21(3). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210321Soto>
- Soto, A. M. (2009). *Recopilación y análisis de la información existente sobre las especies mexicanas del género Vanilla*. Herbario AMO, Instituto Chinoín, A. C.
- Stern, W., & Judd, W. (1999). Comparative vegetative anatomy and systematics of *Vanilla* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 131, 353–382.
<http://www.idealibraryxom>
- Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021). *MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version Molecular Biology and Evolution*
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Tedersoo, L. (2017). *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis* (Leho Tederoo, Ed.; Vol. 230). Springer. <http://www.springer.com/series/86>

- Tejeda-Sartorius, O., Téllez-Velasco, M., & Escobar-Aguayo, J. (2017). Conservation status of wild orchids (Orchidaceae). *Agroproductividad*, 6, 3–12.
- Téllez, M. (2011). *Diagnóstico de la familia Orchidaceae en México: (Prosthechea citrina, Prosthechea vitellina, Stanhopea tigrina, Encyclia adenocaula, Laelia speciosa, Laelia gouldiana y Rhynchostele rossii)*. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Thangavelu, M., & Muthu, S. (2017). Vegetative anatomical adaptations of *Epidendrum radicans* (Epidendroideae, Orchidaceae) to epiphytic conditions of growth. *Modern Phytomorphology*, 11, 117–130. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1078523>
- Torres-González, M. J., Aguirre-Medina, J. F., & Iracheta-Donjuan, L. (2018). Germinación de semilla y obtención de plántulas de *Vanilla planifolia* Andrews en condiciones in vitro. *Agro Productividad*, 4(2), 1–6.
- Tsulsiyah, B., Farida, T., Sutra, C. L., & Semiarti, E. (2021). Important role of mycorrhiza for seed germination and growth of *Dendrobium* orchids. In *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology* (Vol. 6, Issue 2). Universitas Gadjah Mada, Faculty of Biology. <https://doi.org/10.22146/JTBB.60805>
- Vega, F. E., Posada, F., Peterson, S. W., Gianfagna, T. J., & Chaves, F. (2006). *Penicillium* species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production. *Mycologia*, 98(1), 31–42. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832710>
- Vicente, V. A., Najafzadeh, M. J., Sun, J., Gomes, R. R., Robl, D., Marques, S. G., Azevedo, C. M. P. S., & De Hoog, G. S. (2014). Environmental siblings of black agents of human chromoblastomycosis. *Fungal Diversity*, 65(1), 47–63. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0246-5>
- Villanueva, S. (2017). Estructura genética de *Vanilla planifolia* Andrews silvestre en la península de Yucatán, México: Implicaciones para la conservación de la especie. [Tesis de Doctorado, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.].

- Yeh, C. H., Chen, K. Y., & Lee, Y. I. (2021). Asymbiotic germination of *Vanilla planifolia* in relation to the timing of seed collection and seed pretreatments. *Botanical Studies*, 62(1). <https://doi.org/10.1186/s40529-021-00311-y>
- Yeung, E. (2022). The orchid embryo —“an embryonic protocorm.” In *Botany* (Vol. 100, Issue 9, pp. 691–706). Canadian Science Publishing. <https://doi.org/10.1139/cjb-2022-0017>
- Yeung, E. C., Li, Y. Y., & Lee, Y. I. (2019). An overview of the life of an orchid protocorm – a developmental perspective. *Acta Horticulturae*, 1262. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1262.3>
- Yung-I, L., & Chee-Tak, E. (2018). *Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses-Methods and Protocols*. Springer Protocols Handbooks. <http://www.springer.com/series/8623>
- Zakaria, L., & Aziz, W. N. W. (2018). Molecular identification of endophytic fungi from banana leaves (*Musa* spp.). *Tropical Life Sciences Research*, 29(2), 201–211. <https://doi.org/10.21315/tlsr2018.29.2.14>
- Zhang, S., Yang, Y., Li, J., Qin, J., Zhang, W., Huang, W., & Hu, H. (2018). Physiological diversity of orchids. In *Plant Diversity* (Vol. 40, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.pld.2018.06.003>
- Zhao, D. K., Selosse, M. A., Wu, L., Luo, Y., Shao, S. C., & Ruan, Y. L. (2021). Orchid Reintroduction Based on Seed Germination-Promoting Mycorrhizal Fungi Derived From Protocorms or Seedlings. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.701152>

Anexos

Cuadro 8. Resultados del análisis de varianza (MANOVA) en la evaluación semanal de germinación acumulada de semillas de *V. planifolia*. Uruapan, Michoacán, 2022

FV	gl	Lambda de Wilks	Valor de <i>f</i>	Valor de α
Tiempo	9	0.007	348.760	0.0001
Trat*Tiempo	18	0.013	21.940	0.0001

Simbología: FV) Fuente de variación, gl) Grados de libertad

Cuadro 9. Resultados del análisis de varianza para efectos entre y dentro de sujetos en la evaluación semanal de germinación acumulada de semillas de *V. planifolia*. Uruapan, Michoacán, 2022.

E. Sujetos	FV	CM	CMError
Entre	Trat	152320.225**	738.577
Dentro	Tiempo	24204.760**	113.006
	Trat*Tiempo	2831.052**	

Simbología: E. Sujetos) Efecto de sujetos, FV) Fuente de variación, CM) Cuadrado medio, CMError) Cuadrado Medio del Error, Trat) Tratamiento, ^{NS}) No significativo, *) significativo ($\alpha \leq 0.05$), **) altamente significativo ($\alpha \leq 0.01$).

Cuadro 10 Resultados del análisis de varianza (MANOVA) en la evaluación semanal de protocormos acumulados de *V. planifolia*. Uruapan, Michoacán, 2022

FV	gl	Lambda de Wilks	Valor de <i>f</i>	Valor de α
Tiempo	9	0.065	39.660	0.0001
Trat*Tiempo	18	0.073	7.440	0.0001

Simbología: FV) Fuente de variación, gl) Grados de libertad

Cuadro 11. Resultados del análisis de varianza para efectos entre y dentro de sujetos en la evaluación semanal de protocormos acumulados de *V. planifolia*. Uruapan, Michoacán, 2022

E. Sujetos	FV	CM	CMError
Entre	Trat	88076.875**	934.610
Dentro	Tiempo	4083.307**	72.787
	Trat*Tiempo	2831.052**	

Simbología: E. Sujetos) Efecto de Sujetos, FV) Fuente de variación, CM) Cuadrado medio, CMError) Cuadrado Medio del Error, Trat) Tratamiento, ^{NS}) No significativo, *) significativo ($\alpha \leq 0.05$), **) altamente significativo ($\alpha \leq 0.01$).

Cuadro 12. Resultados del análisis de varianza (MANOVA) en la evaluación semanal de protocormos fotosintéticos acumulados de *V. planifolia*. Uruapan, Michoacán, 2022

FV	gl	Lambda de Wilks	Valor de <i>f</i>	Valor de α
Tiempo	6	0.232	15.490	0.0001
Trat*Tiempo	12	0.207	5.600	0.0001

Simbología: FV) Fuente de variación, gl) Grados de libertad

Cuadro 13. Resultados del análisis de varianza para efectos entre y dentro de sujetos en la evaluación semanal de protocormos fotosintéticos acumulados de *V. planifolia*. Uruapan, Michoacán, 2022

E. Sujetos	FV	CM	CMEError
Entre	Trat	2369.586**	96.468
Dentro	Tiempo	908.021**	18.237
	Trat*Tiempo	320.892**	

Simbología: E. Sujetos) Efecto de sujetos, FV) Fuente de variación, CM) Cuadrado medio, CMEError) Cuadrado Medio del Error, Trat) Tratamiento, ^{NS}) No significativo, *) significativo ($\alpha \leq 0.05$), **) altamente significativo ($\alpha \leq 0.01$).

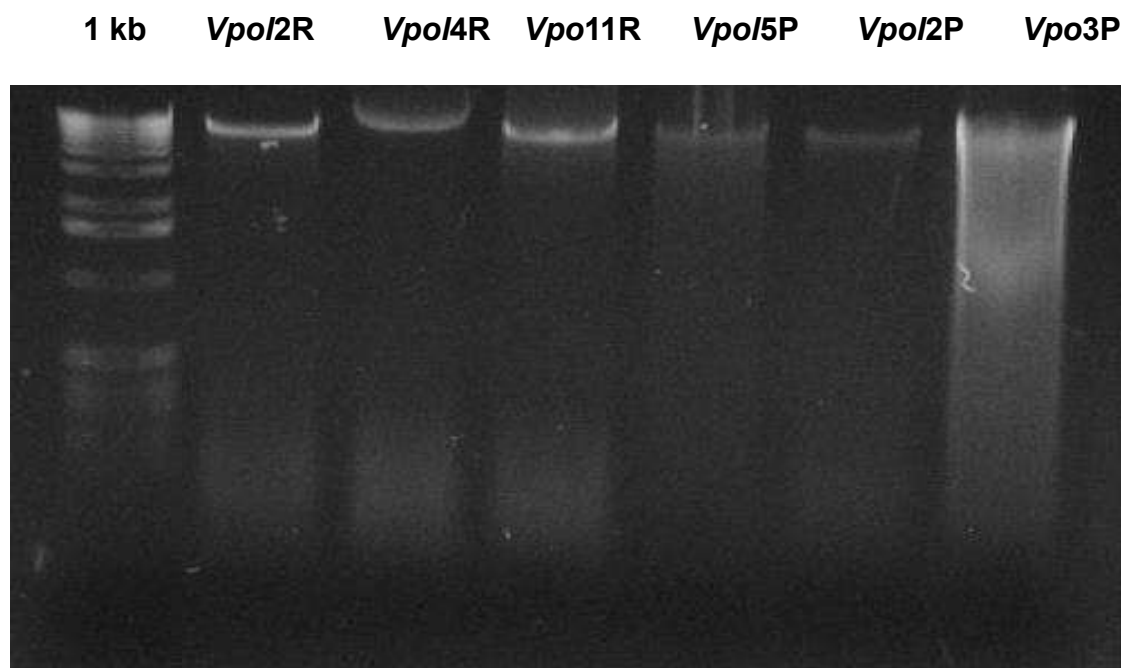


Figura 27. Producto de electroforesis de la extracción de DNA genómico. 1 kb) Marcador molecular de 1 Kb, Vpol2R) aislado de *V. planifolia* 2 radicular, Vpol4R) aislado de *V. planifolia* 4 radicular, aislado de *V. pompona* 11 radicular, Vpol5P) aislado de *V. planifolia* 5 de protocormo, Vpol2P) aislado de *V. planifolia* 2 de protocormo, Vpo3P) aislado de *V. pompona* 3 de protocormo.

Secuencias ITS para búsqueda BLAST

>Vpol2R

```
TTCGTAGGTGAACCTGCTTCTTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGA
GTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTTGCACGAACCTGTG
TTGCTTCGGCGGGCCCGCCAGGCCGCCGGGGGGCATCCGCCCCC
```


GGGCCCCGCGCCCGCCGAAGCCCCCTCTGAACGCTGTCTGAAGTTGCA
GTCTGAGACAACTAGCTAAATTAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG
GTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATT
GCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGG
TATTCCGGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACG
GCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCCCCCGCTCCGGGGGGGACGGGCCC
GAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTC
GTCACCCGCTCTTGTAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCGACCCCCAACCTT
TTATTATTTCTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCGCTGAACT
TAAGCA

>Vpol4R

GGGTGACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGCCCCTCGTGGCCCAA
CCTCCCACCCTTGTCTCTATACACCTGTTGCTTTGGCGGGCCCACCGGGGC
CACCTGGTCGCCGGGGGACGTTTCGTCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGAAGC
GCTCTGTGAACCCTGATGAAGATGGGCTGTCTGAGTACTATGAAAATTGTCA
AACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGA
ACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC
ATTTCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTGCGGTCCCCCGGGGG
CCTGCCCCGAAAGGCAGCGGCGACGTCCGTCTGGTCCTCGAGCGTATGGGG
CTTTGTCACCTCGCTCGGGAAGGACTGGCGGGGGTTGGTCACCACCACAAAA
TTTTACCACG

>Vpo11R

TGCGGAAGGATCATAGTAATCGTCTTTGACGTGCTGTTTCCGTCGTCCTCG
GGACGTTAAGGCGCTCTGGTCGAGGATAAACGACCCCTCTGACAGAGGTAA
AGCCGTCCTGTGTTACCTCTTTGCCGAGGCACACGTTAAAGATCGTTCCGC
GTTGTGAGTCTAACACCAGTTGTAACACTTTTACAACCGGTAGCGCTGGATC
CCTTGGCACGTCATTGATGAAGACCGTTGCAAATTGCGATAAAGTGATGTG
ATGCGCAAGTCCACCACTTATACGTGAATCATCGAGTTGTTGAACGCACTGC
ACCGCGCCCTAATCCGGCTGCGGTATGCCCCCTTTGAGCGTCATTGTATCCC
TTCGGGAGTCTTTTCGTTAAGACCCGAGTTCGGAGTCCTCGGTCTTTGGATC
GTGTTCTCTTAGATGCGTCGCGCCGATCGCCTGATGGGTCACTCTAATGCC
TGAGCGTGGAGTCCCTCGGAGCTGAGACGCGCTTGACCGAGTGTTGAGCT
CGCGTCGCCAAGTCCGCACGTCTTGGACGTCCGTACTACAACGCATGACCT
CATTGGGGTAGGACAACCCGCTAGACTTAAGC

>Vpol5P

ACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATGAATGTAGAGTTGGTTGTCGCTGGCC
CTTTCGGGGGTATGTGCACGCCTTCTCTTTCATCCACACACACCTGTGCA
CTTGTGAGACGGAGGGCTTTAATTAGTCTTCCGTCTATTCAACCACACAA
ACTCATTGTATTTAACTGAATGTAATTGATGTAACGCATCATTAGAACTA
AGTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG
AACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCTTGGAGCATGCCTGTTTGAGTAT
CATGAAATTCTCAAAGTAAATCTTTTGTTAATTCAACTGGTTTTGCTTTGGA
CTTGGAGGTCTTTGGCAAATTTCCCGCCGGCCCCCCTAAAAGGCTTAAC

GGGTCCATAAAAGGCTGGGTCCCCCGGGGGGATAATATTCCTTCCTTA
AGAAC

>Vpol2P

TTCGTAAGGGGTGACCTGCGGAAGGATCATTAACGAGTTAGGGTCCCTCGC
GGCCCGACCTCCCAACCCTTTGTCTACCTGACCACTGTTGCTTCGGCGA
GCCCCGTCTGTAATGGACCGCCGGGGGGTACCTTGATCGGCCCTCTGGT
CCGCGCTCGTCGATAGCCAAACTTTTAAAATCTTAACCAAACGTGTCTCA
ATCTAAGTATTATTTGTTAAATAAAAGCAAACTTTCAACAACGGATCTCTT
GGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAA
TTGCAGAATTTCAGTGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTT
TGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATCACCCCTCAAGC
CCCTGGCTTGGTGTGGACGGTTTGGTGGAGGCCCCCTCGCGGGGCCA
CCGCCCCCTCCCAAAGACAATGACGGCGGCCTCGTTGGACCCCCGGTAC
ACTGAGTTCTTCACGGGACACGTATCGGACACATGGGTTTACGGGACAC
GGTCTGCCTCCCCTCAGGGAGAATCTTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAG
GTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATC

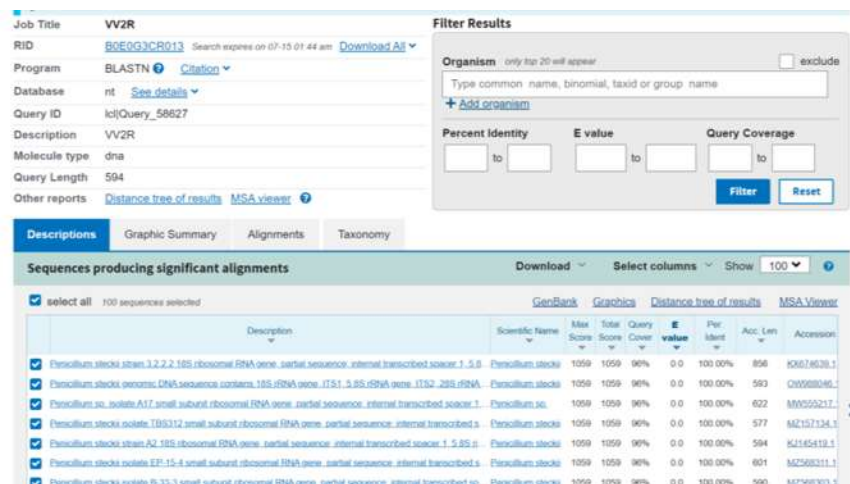


Figura 28. BLAST de la secuencia del aislado *VpoI2R*

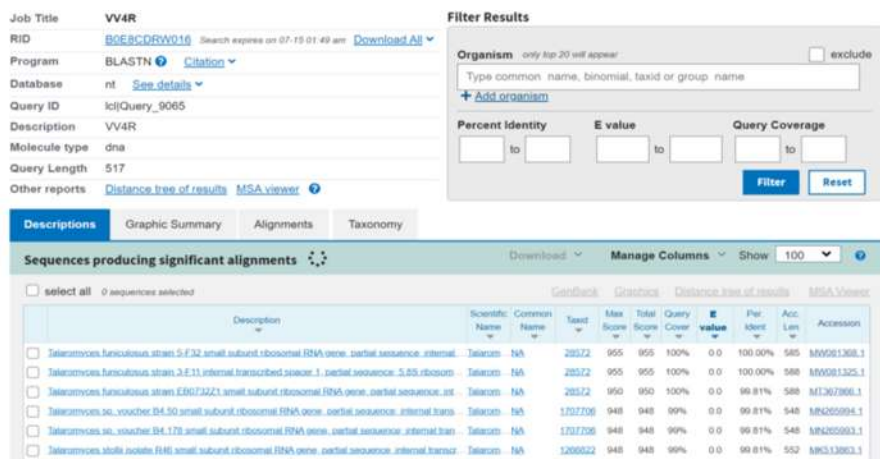


Figura 29. BLAST de la secuencia del aislado *VpoI4R*

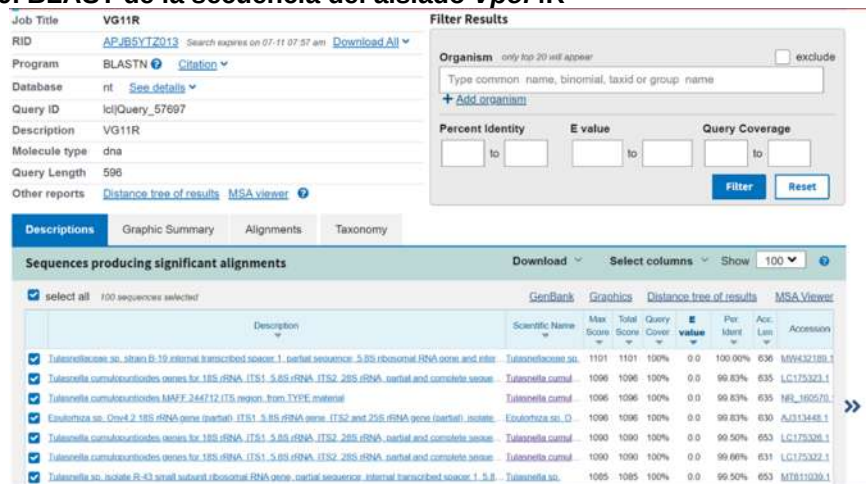


Figura 30. BLAST de la secuencia del aislado *Vpo11R*

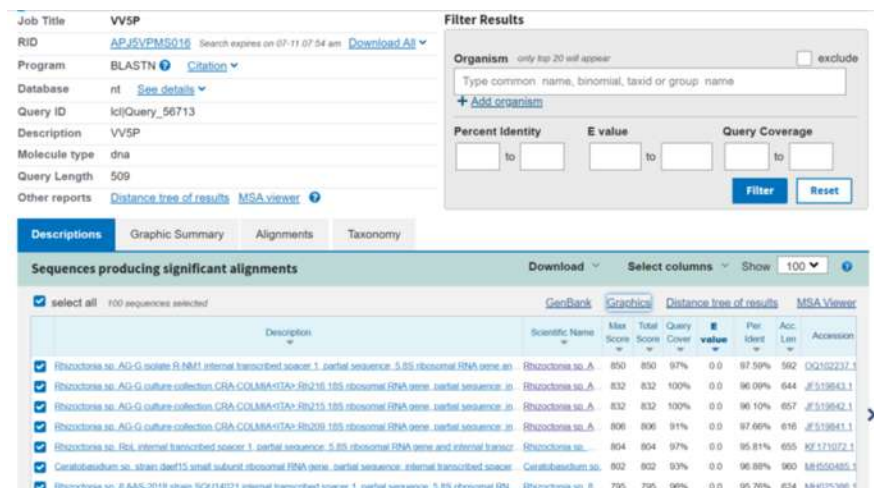


Figura 31. BLAST de la secuencia del aislado *Vpo15P*

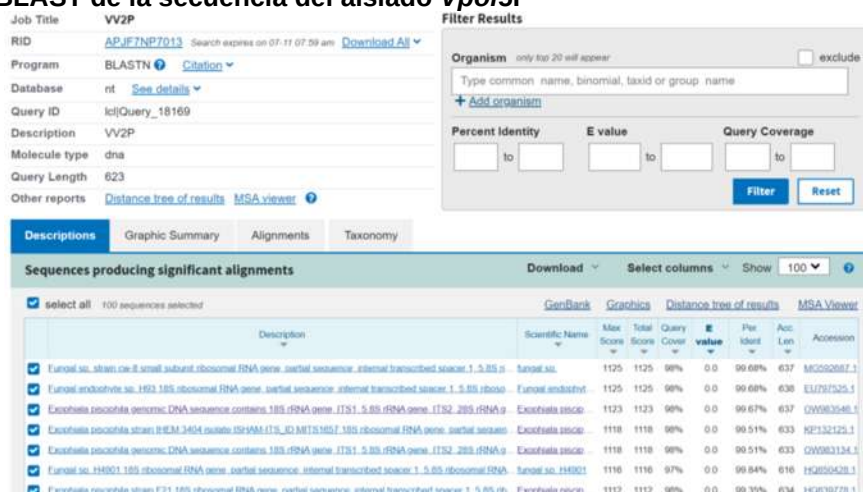


Figura 32. BLAST de la secuencia *Vpo12P*

Cuadro 14. Resultados del análisis de varianza (MANOVA) factorial en la evaluación semanal de germinación acumulada de semillas de *V. planifolia*. Uruapan, Michoacán, 2024

FV	gl	Lambda de Wilks	Valor de f	Valor de α
Ti	7	0.06	179.84	0.0001
Trat*Ti	28	0.05	297.08	0.0001
Exp*Ti	7	0.66	5.94	0.0001
Ti*Trat*Exp	28	0.45	2.56	0.0001

Simbología: Exp) Experimento, FV) Fuente de variación, gl) Grados de libertad, Ti) Tiempo, Trat) Tratamiento

Cuadro 15. Resultados del análisis de varianza factorial para efectos entre y dentro de sujetos en la evaluación semanal de germinación acumulada de semillas de *V. planifolia*. Uruapan, Michoacán, 2024

E. Sujetos	FV	CM	CMError
Entre	Trat	7739.30**	49.16
	Exp	95.19 ^{NS}	

Dentro	Trat*Exp	197.90**	8.21
	Ti	4303.98**	
	Trat*Ti	836.50**	
	Ti*Exp	92.86**	
	Ti*Trat*Exp	45.03**	

Simbología: E. Sujetos) Efecto de sujetos, FV) Fuente de variación, CM) Cuadrado medio, CMEError) Cuadrado Medio del Error, Ti) Tiempo, Trat) Tratamiento, ^{NS}) No significativo, *) significativo ($\alpha \leq 0.05$), **) altamente significativo ($\alpha \leq 0.01$).

Cuadro 16. Resultados del análisis de varianza (MANOVA) factorial en la evaluación semanal de protocormos acumulado de *V. planifolia*. Uruapan, Michoacán, 2024

FV	gl	Lambda de Wilks	Valor de <i>f</i>	Valor de α
Ti	6	0.01	1227.63	0.0001
Trat*Ti	24	0.00	64.18	0.0001
Exp*Ti	6	0.01	660.58	0.0001
Ti*Trat*Exp	18	0.00	50.29	0.0001

Simbología: Exp) Experimento, FV) Fuente de variación, gl) Grados de libertad, Ti) Tiempo, Trat) Tratamiento

Cuadro 17. Resultados del análisis de varianza factorial para efectos entre y dentro de sujetos en la evaluación semanal de protocormos acumulados de *V. planifolia*. Uruapan, Michoacán, 2024

E. Sujetos	FV	CM	CMEError
Entre	Trat	468.70**	0.71
	Exp	68.41**	
	Trat*Exp	100.41**	
Dentro	Ti	170.25**	0.30
	Trat*Ti	58.89**	
	Ti*Exp	33.07**	
	Ti*Trat*Exp	15.98**	

Simbología: E. Sujetos) Efecto de sujetos, FV) Fuente de variación, CM) Cuadrado medio, CMEError) Cuadrado Medio del Error, Ti) Tiempo, Trat) Tratamiento, ^{NS}) No significativo, *) significativo ($\alpha \leq 0.05$), **) altamente significativo ($\alpha \leq 0.01$).

Cuadro 18. Resultados del análisis de varianza (MANOVA) en la evaluación semanal de germinación acumulada de semillas de *V. planifolia* en medio HMO. Uruapan, Michoacán, 2024

FV	gl	Lambda de Wilks	Valor de <i>f</i>	Valor de α
Tiempo	7	0.05	103.94	0.0001
Trat*Tiempo	28	0.02	142.04	0.0001

Simbología: FV) Fuente de variación, gl) Grados de libertad

Cuadro 19. Resultados del análisis de varianza para efectos entre y dentro de sujetos en la evaluación semanal de germinación acumulada de semillas de *V. planifolia* en medio HMO. Uruapan, Michoacán, 2024

E. Sujetos	FV	CM	CMEError
------------	----	----	----------

Entre	Trat	3588.09**	45.77
Dentro	Tiempo	1629.01**	7.96
	Trat*Tiempo	307.29**	

Simbología: E. Sujetos) Efecto de sujetos, FV) Fuente de variación, CM) Cuadrado medio, CMEError) Cuadrado Medio del Error, Trat) Tratamiento, ^{NS}) No significativo, *) significativo ($\alpha \leq 0.05$), **) altamente significativo ($\alpha \leq 0.01$).

Cuadro 20 Resultados del análisis de varianza (MANOVA) en la evaluación semanal de germinación acumulada de semillas de *V. planifolia* en sustrato de turba canadiense. Uruapan, Michoacán, 2024

FV	gl	Lambda de Wilks	Valor de f	Valor de α
Tiempo	7	0.05	98.44	0.0001
Trat*Tiempo	28	0.03	7.23	0.0001

Simbología: FV) Fuente de variación, gl) Grados de libertad

Cuadro 21. Resultados del análisis de varianza para efectos entre y dentro de sujetos en la evaluación semanal de germinación acumulada de semillas de *V. planifolia* en sustrato de turba canadiense. Uruapan, Michoacán, 2024

E. Sujetos	FV	CM	CMEError
Entre	Trat	4324.75**	52.71
Dentro	Tiempo	2743.60**	8.47
	Trat*Tiempo	566.23**	

Simbología: E. Sujetos) Efecto de sujetos, FV) Fuente de variación, CM) Cuadrado medio, CMEError) Cuadrado Medio del Error, Trat) Tratamiento, ^{NS}) No significativo, *) significativo ($\alpha \leq 0.05$), **) altamente significativo ($\alpha \leq 0.01$).

Cuadro 22. Resultados del análisis de varianza (MANOVA) en la evaluación semanal de desarrollo acumulado de protocormos de *V. planifolia* en medio HMO. Uruapan, Michoacán, 2024

FV	gl	Lambda de Wilks	Valor de f	Valor de α
Tiempo	3	0.00	7.21	0.0001
Trat*Tiempo	12	0.00	1.9	0.0001

Simbología: FV) Fuente de variación, gl) Grados de libertad

Cuadro 23. Resultados del análisis de varianza para efectos entre y dentro de sujetos en la evaluación semanal de desarrollo acumulado de protocormos de *V. planifolia* en medio HMO. Uruapan, Michoacán, 2024

E. Sujetos	FV	CM	CMEError
Entre	Trat	266.19**	1.08
Dentro	Tiempo	33.66**	0.24
	Trat*Tiempo	21.65**	

Simbología: E. Sujetos) Efecto de sujetos, FV) Fuente de variación, CM) Cuadrado medio, CMEError) Cuadrado Medio del Error, Trat) Tratamiento, ^{NS}) No significativo, *) significativo ($\alpha \leq 0.05$), **) altamente significativo ($\alpha \leq 0.01$).

Cuadro 24. Resultados del análisis de varianza (MANOVA) en la evaluación semanal de desarrollo acumulado de protocormos de *V. planifolia* en sustrato de turba canadiense. Uruapan, Michoacán, 2024

FV	gl	Lambda de Wilks	Valor de f	Valor de α
----	----	-----------------	------------	-------------------

Tiempo	5	0.00	21	0.0001
Trat*Tiempo	20	0.00	70.59	0.0001

Simbología: FV) Fuente de variación, gl) Grados de libertad

Cuadro 25. Resultados del análisis de varianza para efectos entre y dentro de sujetos en la evaluación semanal de desarrollo acumulado de protocormos de *V. planifolia* en sustrato de turba canadiense. Uruapan, Michoacán, 2024

E. Sujetos	FV	CM	CMEError
Entre	Trat	311.50**	0.45
Dentro	Tiempo	188.25**	0.34
	Trat*Tiempo	52.97**	

Simbología: E. Sujetos) Efecto de sujetos, FV) Fuente de variación, CM) Cuadrado medio, CMEError) Cuadrado Medio del Error, Trat) Tratamiento, ^{NS}) No significativo, *) significativo ($\alpha \leq 0.05$), **) altamente significativo ($\alpha \leq 0.01$).