



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

División de Estudios de Posgrado



FACULTAD DE BIOLOGÍA

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Área temática: Interacción Planta-Microorganismo-Insecto

Aislamiento y caracterización de hongos micorrízicos asociados a orquídeas terrestres del género *Bletia* (Orchidaceae) en la Reserva Natural Barranca del Cupatitzio, del Mpio. de Uruapan, Michoacán.

T E S I S

Que como requisito para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta:

BIOL. MARÍA DE LOS ANGELES BELTRÁN NAMBO

Directoras de tesis:

DRA. YAZMIN CARREÓN ABUD
DRA. MA. DEL PILAR ORTEGA LARROCEA

MORELIA, MICHOACÁN, MEXICO, JUNIO DE 2010



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

DR. DANIEL VAL ARREOLA
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
PRESENTE

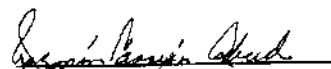
Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Aislamiento y caracterización de hongos micorrízicos asociados a orquídeas terrestres del género *Bletia* (Orchidaceae) en la Reserva Natural Barranca del Cupatitzio, del Mpio. de Uruapan, Michoacán" presentado por la BIOL. MARÍA DE LOS ANGELES BELTRÁN NAMBO, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestra en Ciencias.

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

ATENTAMENTE

Morelia, Michoacán, a 19 de febrero de 2010


MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA


Dra. Yazmín Cañón Abud


Dra. Ma. del Pilar Ortega Larrocea


Dr. Rafael Salgado Garciglia


Dra. Irene Avila Diaz


Dr. Miguel Martínez Trujillo

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL **LABORATORIO DE GENÉTICA Y MICROBIOLOGÍA** DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO, BAJO LA ASESORÍA DE LA **DRA. YAZMÍN CARREÓN ABUD** Y EN EL **LABORATORIO DE MICROCOSMOS BIOEDÁFICO** DEL INSTITUTO DE GEOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, BAJO LA ASESORÍA DE LA **DRA. MA. DEL PILAR ORTEGA LARROCEA**, CON EL APOYO DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO, EL CONSEJO ESTATAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (COECyT), EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT) Y LA UNAM A TRAVÉS DEL PROYECTO PAPIIT IN 119609.



*"Un camino de mil millas.....
comienza con un paso"*

Benjamín Franklin

Gracias por acompañar mí camino, por contribuir en mi aprendizaje y en mi enriquecimiento personal y profesional. Este trabajo es de todos.

AGRADECIMIENTOS

Éste trabajo fue financiado por La Coordinación de la Investigación Científica con el Proyecto No. 1169646, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.

A la Facultad de Biología y al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca aportada para la realización de estudios de Posgrado.

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (COECyT) por el apoyo otorgado al proyecto.

Al Patronato del Parque Nacional de Uruapan por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo en la Reserva Natural Barranca del Cupatitzio.

A las personas del Departamento de Posgrado, Dr. Ricardo Pérez Munguía, Dr. Javier Ponce Saavedra y Liliana Patricia Cerritos Barriga por la orientación y apoyo en los trámites y asuntos académicos relacionados con este proyecto.

A mis asesoras de tesis, Dra. Yazmín Carreón Abud y Ma. del Pilar Ortega Larrocea por su atinada dirección para la realización de esta investigación, por transmitirme sus conocimientos y por aportarme valiosas sugerencias. Por todo el apoyo académico y moral que me brindaron no sólo como profesionistas, sino más aún como amigas. Gracias por su paciencia.

Al Dr. Miguel Martínez Trujillo, responsable del Laboratorio de Genética y Microbiología, por sus propuestas y recomendaciones durante el trabajo de laboratorio, por formar parte de mi mesa revisora. Por las pocas pero grandes palabras que alientan y motivan.

A los otros dos integrantes de mi mesa revisora pero no por eso menos importantes, Dra. Irene Ávila Díaz y Dr. Rafael Salgado Garciglia por sus inestimables aportaciones y excelentes comentarios para el enriquecimiento de esta investigación.

A la M. en C. Monica Rangel Villafranco del Laboratorio de Microcosmos Bioedáfico de la UNAM por el invaluable apoyo otorgado durante el montaje de técnicas. Por la amistad incondicional que recibí desde el primer momento.

A la M. en C. Gloria Solís Guzmán, del Laboratorio de Genética y Microbiología. Por su ayuda en la resolución de dudas, por sus atinados comentarios y por su amistad.

A dos personas de gran calidad humana e inigualables amigas y compañeras, la M. en C. Nuria Gómez Dorantes y la Q.F.B. Yolanda Méndez Sántiz por su extraordinario respaldo en los momentos difíciles, su gran ayuda en el trabajo de campo y laboratorio y por las palabras brindadas.

Al M. en C. Gamaliel Valdivia Rojas y al Biol. Eduardo Mendoza Maya por su gran apoyo moral, su amistad y por su invaluable ayuda cuando ocupe más de dos manos para que el trabajo experimental tuviera éxito.

A todos los compañeros y amigos de Laboratorio que hacen agradable la estancia y de los que todos los días se aprende algo nuevo: Fátima, Susana, Manuel, Ale, Tere, Brenda, Marina, Consuelo, Iris, Fred, Jesús, David, Mario, Quico, Luis, Jerónimo, Paty, Maribel, Miguel, Ernesto.

Al Maestro Eliseo Vázquez y a Lety que con su inigualable apoyo y sabios consejos han hecho de mí una persona diferente. Gracias por su amistad incondicional en los momentos buenos y sobre todo en los difíciles.

A todos los compañeros y amigos de la escuela de Tai chi y Kung fu que han hecho mi recorrido más agradable.

Este trabajo lo quiero dedicar:

A mis padres por enseñarme los principios y valores con los que me he dirigido hasta hoy y debido a los cuales se me han abierto muchas puertas y he tenido grandes satisfacciones, por sus cuidados y amor incondicional....Mami...que te llegue hasta donde estas ahora.

A mis hermanos y además buenos amigos: Vicky, la sonriente y amorosa; Rulas el protector y apegado a la familia; Güerejo el alegre que hace la vida amable; Pollo el más sensible; Beba, la cariñosa, llorona e inteligente. A mis cuñados y cuñadas y a todos mis sobrinos que me han dado su cariño incondicional y para los que soy la tía buena onda (creo).

Y a todas las personas que pude no haber mencionado pero que han pasado por mi vida y la han transformado haciendo de mi una persona feliz hasta el día de hoy. A todos GRACIAS.

**ÍNDICE DE CONTENIDO**

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
I. RESUMEN	1
II. SUMMARY	3
III. INTRODUCCIÓN GENERAL	4
III.1 JUSTIFICACIÓN	6
III.2. MARCO TEÓRICO	8
III.2.1 Especificidad orquídea-hongo	9
III.2.2 Características de los principales grupos de hongos asociados	13
III.2.3 Patrones de colonización	16
III.2.4 Fenología de la colonización	23
III.3 ÁREA DE ESTUDIO	24
III.3.1 Descripción del área de estudio	25
III.3.2 Vegetación	25
III.3.3 Hongos	29
III.3.4 Geología	29
III.3.5 Suelos	29
III.3.6 Hidrología	30
III.3.7 Clima	31
III.3.8 Problemática	31
III.4 ESPECIES DE ORQUÍDEAS A ESTUDIAR	36
III.4.1 Descripción taxonómica de las especies	39



IV. HIPÓTESIS	43
V. OBJETIVOS	44
V.1 OBJETIVO GENERAL	44
V.1.1Objetivos particulares	44
VI. RESULTADOS	45
CAPITULO 1. Estudio prospectivo de la distribución y abundancia relativa de orquídeas terrestres del género <i>Bletia</i> (Orchidaceae) en sitios con diferente grado de perturbación en la Reserva Natural Barranca del Cupatitzio del Edo. de Michoacán	45
1.1a Resumen	45
1.1b Abstract	46
1.2 Introducción	46
1.3 Materiales y Métodos	49
1.4 Resultados y Discusión	51
1.5 Conclusiones	55
1.6 Literatura Citada	57
CAPITULO 2. Patrones de colonización micorrízicos en especies de <i>Bletia</i> en una Reserva Natural en Michoacán, México	59
2.1a Resumen	59
2.1b Abstract	60
2.2 Introducción	61
2.3 Materiales y Métodos	63
2.4 Resultados	66
2.5 Discusión	73
2.6 Conclusiones	75
2.7 Literatura citada	76



CAPITULO 3. Aislamiento <i>in vitro</i> y caracterización morfológica de hongos micorrízicos de orquídeas terrestres del género <i>Bletia</i> en una Reserva Natural, con fines de conservación	79
3.1a Resumen	79
3.1b Abstract	81
3.2 Introducción	81
3.3 Materiales y Métodos	85
3.4 Resultados y Discusión	90
3.5 Conclusiones	105
3.6 Literatura citada	107
VII. DISCUSIÓN GENERAL	114
VIII. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES	119
IX. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA	122
X. ANEXOS	127



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Caracterización de las zonas de estudio en la Reserva de acuerdo a calidad de sitio y grado de perturbación	51
Cuadro 2. Promedio de intensidad de la colonización micorrízica por segmento y a lo largo de la raíz	67
Cuadro 3. Porcentaje de aislamiento de hongos micorrízicos por cantidad de raíces y número de explantes analizados y cantidad de morfotipos obtenidos	91
Cuadro 4. Morfometría de los aislados de <i>Epulorhiza</i> sp obtenidos	92
Cuadro 5. Comparación de morfotipos aislados por especie y zona de colecta	104



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Células monilioides formando cadenas.	14
Figura 2. Características del género <i>Rhizoctonia</i>	15
Figura 3. Formas de crecimiento en las orquídeas y estructura de la raíz	17
Figura 4. Fenómenos de Tolipofagia y Ptiofagia	19
Figura 5. Pelotones en diferente estado de digestión	21
Figura 6. Ubicación de la Reserva Natural Barranca del Cupatitzio y áreas con que cuenta	26
Figura 7. Factores de perturbación en la Reserva Natural	32
Figura 8. Aspecto de las zonas 2 y 3 en la Reserva Natural	33
Figura 9. Algunas herbáceas de la vegetación secundaria presente en la Reserva	33
Figura 10. Ubicación de zonas de muestreo en la Reserva Natural	34
Figura 11. Aspecto de las zonas 1 y 4 en la Reserva	35
Figura 12. Especies del género <i>Bletia</i> encontradas en la Reserva Natural	38
Figura 13. <i>Bletia purpurata</i>	40
Figura 14. <i>Bletia punctata</i> (descripción)	41
Figura 15. <i>Bletia roezlii</i> (descripción)	42
Figura 16. Ubicación de las zonas de estudio	48
Figura 17. Mapa de distribución de las tres especies de <i>Bletia</i> en la Reserva	53
Figura 18. Abundancia relativa de las tres especies del género <i>Bletia</i>	55
Figura 19. Pelotones en diferente estado de digestión	65



Figura 20. Porcentajes promedio totales de los estados de digestión de pelotones en las tres especies de orquídeas estudiadas	68
Figura 21. Pelotones intactos y en diferente estado de digestión	69
Figura 22. Extensión, intensidad y estado de digestión promedio de la colonización micorrízica en la raíz por especie de orquídea	71
Figura 23. Comparación de porcentajes de colonización promedio por zona y especie	72
Figura 24. Extracción de pelotones individuales de raíces de orquídeas	87
Figura 25. Características de las hifas en los aislados afines al género-forma <i>Rhizoctonia</i>	93
Figura 26. Características típicas de hongos micorrízicos orquideoides del género-forma <i>Rhizoctonia</i>	94
Figura 27. Forma de crecimiento de los cuatro morfotipos afines a <i>Epulorhiza</i> en cultivo <i>in vitro</i>	96
Figura 28. Morfometría de las hifas en los cuatro morfotipos aislados	97
Figura 29. Características morfométricas de los morfotipos aislados de las tres especies de orquídeas analizadas	99
Figura 30. Tasas de crecimiento promedio por día y morfotipo	100
Figura 31. Crecimiento promedio de los cuatro morfotipos de hongos por especie de orquídea	101
Figura 32. Características morfométricas de los cuatro morfotipos de <i>Epulorhiza</i> sp. Dimensión de estructuras por morfotipo	102
Figura 33. Características generales de la raíz en la familia Orchidaceae	127
Figura 34. Características de la flor en la familia Orchidaceae	129
Figura 35. Clasificación taxonómica de las especies analizadas	130
Figura 36. Categorías de micorrizas en plantas vasculares	131
Figura 37. Interfase en la micorriza orquideoide	132



Figura 38. Proceso de recolección de raíces de orquídeas	136
Figura 39. Técnica de desinfestación de raíces para aislamiento de hongos micorrízicos orquideoides	137
Figura 40. Técnica para caracterización de la colonización y aislamiento de hongos micorrízicos orquideoides	138
Figura 41. Proceso de medición de tasas de crecimiento de los aislados en cultivo <i>in vitro</i>	139



I. RESUMEN

La presente investigación se realizó en la Reserva Natural Barranca del Cupatitzio del Municipio de Uruapan en el Estado de Michoacán. Esta Reserva a pesar de ser un área protegida, en la actualidad se encuentra fragmentada debido al crecimiento de la zona urbana adyacente a ella que además ha influido de manera directa o indirecta en la alteración del hábitat, ocasionando diferente impacto sobre la vegetación original y su entorno. Debido a esto y otros factores, como sucede en gran parte de nuestro país, las poblaciones naturales de orquídeas han disminuido sin que se cuente con datos precisos de su situación actual y de la interrelación que guardan con otros organismos, como lo son sus hongos micorrízicos asociados. Por lo que estudios como el presente son importantes ya que permiten tener una mejor visión sobre la contribución e importancia de estos organismos en la distribución geográfica, competencia ecológica y evolución de las orquídeas para proponer programas de conservación o reintroducción de estas plantas.

En este trabajo se determinó la distribución y abundancia relativa de tres especies de orquídeas terrestres pertenecientes al género *Bletia*: *B. roezlii*, *B. punctata* y *B. purpurata*, se generó un primer estudio diagnóstico sobre el grado de micorrización natural que presentan mediante la caracterización *in situ* de los patrones de colonización micorrízica en raíces maduras, y se realizó el aislamiento, caracterización morfológica e identificación de los hongos micorrízicos asociados en sitios con diferente grado de perturbación.

Se delimitaron cuatro zonas en la reserva en función de su grado de perturbación y calidad de sitio. Se hicieron recorridos de reconocimiento e identificación de las especies del género, durante una sola época de floración (2008).



Los resultados obtenidos muestran que los patrones de colonización micorrízica y la variedad de hongos asociados varían con la especie y grado de perturbación del hábitat. Se aislaron cuatro morfotipos de hongos micorrízicos, todos afines al género anamorfo *Epulorhiza* incluido en el género-forma *Rhizoctonia*, algunos con afinidad al teleomórfico *Tullasnela calospora*. La especie *B. roezlii* fue la que tuvo mayor distribución y abundancia para el año de muestreo y la que presentó los porcentajes de colonización más altos sobre todo en los sitios de mayor perturbación en donde se le encontró asociada con varios de los morfotipos aislados aún en una misma raíz. Es posible que el éxito adaptativo de esta especie pueda ser explicado en parte por su capacidad de asociarse con una mayor variedad de hongos. *B. purpurata* se encontró bien representada en la reserva aunque la colonización fue más heterogénea, presentando la colonización más alta en lugares poco perturbados con buena calidad de sitio. *B. punctata* fue la especie que presentó menor distribución y abundancia en la reserva, así como menor capacidad de adaptación a la transformación de su hábitat ya que en los sitios que fueron señalados con algún grado de perturbación su presencia fue escasa o nula. En estos sitios se encontró asociada con un solo morfotipo de hongo presentando porcentajes de colonización bajos. Estos resultados parecen señalar también que la distribución y capacidad de dispersión y adaptación de los hongos micorrízicos asociados pueden ser factores que han permitido la presencia y distribución de estas plantas en diferentes hábitats.



II. SUMMARY

The distribution and relative abundance of three species of terrestrial orchids of the genus *Bletia*: *B. roezlii*, *B. punctata* and *B. purpurata* were determined, a first diagnostic test of the degree of natural mycorrhization was performed through *in situ* characterization of mycorrhizal colonization patterns in mature roots, and the mycorrhizal fungi associated were isolated, characterized and identified through their morphology, the study was realized in sites with different degree of disturbance in the Nature Reserve Barranca del Cupatitzio in Uruapan, Michoacán.

Four zones were delimited in the reserve in accordance with their degree of disturbance and site quality. There were tours of recognition and identification of species of the genus, during a single flowering season (2008). The results show that the patterns of mycorrhizal colonization and diversity of the associated fungi vary with the degree of disturbance and habitat and with the species. Four morphotypes of mycorrhizal fungi were isolated, all related to the anamorphic genus *Epulorhiza* included in the genus-form *Rhizoctonia*, indicating that there is some specificity to genus level in these plants for their fungal partners.

B. roezlii was the species with greater distribution and abundance for the year of sampling, the adaptive success of this species can be explained in part by its ability to partner with a greater variety of fungi. *B. purpurata* was well represented in the Reserve although the colonization was more heterogeneous, presenting the highest colonization in undisturbed sites with good quality site. *B. punctata* was the species with a lower distribution and abundance in the Reserve and with a reduced ability to adapt to habitats perturbation, in the sites that were marked with some degree of disturbance their presence was little and on these sites the plants were found associated with a single morphotype of fungus and the colonization rates were low. These results seem to indicate that the distribution and dispersal capacity and adaptation of the associated mycorrhizal fungi may be factors that have allowed the presence and distribution of these plants in different habitats.



III. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las orquídeas son un grupo con gran diversidad de plantas de origen relativamente reciente que pertenecen a la familia Orchidaceae. Esta familia es considerada dentro de las más diversas en el mundo ya que incluye casi el 10% de las plantas con flor (Dressler 1981) con un aproximado de 25 000 especies (Jones 2006) y de las cuales al menos mil se encuentran distribuidas en diferentes estados de la República Mexicana. Para el estado de Michoacán se mencionan alrededor de 200 especies, algunas consideradas de distribución escasa o rara (Instituto de Ecología, Pátzcuaro 2008).

Las micorrizas de orquídeas son interacciones entre hongos y plantas de la familia Orchidaceae y difieren de otros tipos de micorrizas por sus características distintivas. Son consideradas una asociación benéfica y un factor que ha influenciado en la forma, función y adaptación de la familia (Zettler *et al.* 2004).

La mayoría de las especies de orquídeas en el mundo son fotosintéticas, otras constituyen un número pequeño de especies que son mico-heterotróficas a lo largo de su ciclo de vida, es decir, que necesitan de sus hongos completamente para adquirir su recurso energético y recientemente se reconoce a las mixotrofas, en donde las orquídeas fotosintéticas suplementan parte de su carbono fijado con el que deriva de los hongos micorrízicos (Dearnaley 2007). Aún así, se desconoce el grado en el cual una combinación de fototropía y micotrofia es importante para la supervivencia y competición de las orquídeas terrestres, aunque se ha observado que en especies con floración en invierno la micotrofia y la fotosíntesis se utilizan simultáneamente (Rasmussen y Whigham 2002b) y la colonización micorrízica tiene una marcada influencia en el crecimiento y desarrollo de estas plantas (Siddique y Raghuvanshi 1993).



Sin embargo, sin importar el tipo de hábitat en el que se desarrollen, las orquídeas son micótrofas facultativas ya que requieren de la estimulación de un hongo para la germinación de la semilla y/o el rápido desarrollo del protocormo en condiciones naturales. Algunas requieren hongos endofíticos e intracelulares en uno o más de sus órganos tales como raíces y cormo en algún periodo de su ciclo de vida hasta la etapa adulta (Mukerji *et al.* 2002).

Los estudios de identificación morfológica y molecular de hongos asociados a orquídeas indican que existe un amplio rango de hongos que actúan como micobiontes, pero que presentan taxa comunes, con lo que se apoya que estas plantas presentan interacciones fúngicas específicas.

Estudios más recientes indican una situación más compleja ya que algunas orquídeas fotosintéticas, aún cuando muestran un amplio rango de asociación, tienen un único hongo micorrízico dominante (Dearnaley 2007) por lo que resulta importante estudiarlas en diferentes hábitats.

En México, las orquídeas terrestres tienen como géneros más representativos a *Bletia*, *Govenia*, *Habenaria* y *Malaxis*. El centro de diversificación para el género *Bletia* se encuentra en este país, con un aproximado de 50 especies distribuidas en diferentes estados de la República (Soto 1988). Sin embargo debido a la pérdida de sus hábitats, principalmente por cambios en el uso de suelo, deforestación y erosión, las poblaciones de estas orquídeas han disminuido a través del tiempo, de manera que resulta importante la conservación de las mismas mediante programas de recuperación de hábitats y de las especies que normalmente se desarrollan en ellos.



Muchos proyectos de conservación utilizan técnicas simbióticas para la propagación de estas plantas, utilizando bancos de semillas y cultivos de hongos, y además evalúan sitios de crecimiento natural. Las especies de orquídeas consideradas raras o amenazadas se han estado propagando simbióticamente con el propósito de conservación *ex situ* o reintroducción (Rasmussen 2002a).

III. 1. JUSTIFICACIÓN

Aunque en México la familia Orchidaceae se encuentra taxonómicamente bien catalogada, son pocos los estudios que se han realizado con la finalidad de conocer la interacción que tienen estas plantas con otros organismos, como son los hongos micorrízicos que se asocian con ellas. Estos organismos son muy importantes para los procesos de germinación de la semilla, debido a lo cual las orquídeas viven en simbiosis con ellos al menos en las primeras etapas de desarrollo (Mukerji *et al.* 2002).

Y como sucede en otras partes del mundo, en este país, muchas especies de orquídeas se encuentran actualmente en alguna categoría de riesgo debido a problemas ecológicos como la fragmentación de sus hábitats naturales, la deforestación, erosión, contaminación y cambios en el uso de suelo, entre otros (Rangel-Villafranco y Ortega-Larrocea 2007). Por lo que resulta importante estudiar no sólo a estas plantas sino también a todos los organismos que interaccionan con ellas si se pretenden desarrollar programas de conservación de este recurso dada la importancia ecológica y económica que representa esta familia de plantas.

Uno de los aspectos que se deben de tomar en cuenta al momento de seleccionar especies para este tipo de programas es la facilidad de propagación o el grado de amenaza en que se encuentren (Ortega-Larrocea y Rangel-Villafranco 2007).



Se ha observado que muchas de las especies del género *Bletia* se desarrollan bien en sitios con diferente grado de perturbación, zonas pedregosas y sitios con suelos escasos y dado que muchas de ellas no se consideran amenazadas pueden ser utilizadas como plantas modelo.

Se ha demostrado también que en las orquídeas terrestres, existen distintos grados de especificidad por sus endófitos micorrízicos (especificidad taxonómica). Esta puede variar a lo largo de la vida de una orquídea (especificidad fenológica). Este fenómeno ha sido poco estudiado en las orquídeas mexicanas, así como tampoco el patrón de colonización que presentan en condiciones naturales considerando la micotrofia casi obligada que presentan la mayor parte de las orquídeas terrestres.

En el Estado de Michoacán existen más de 200 especies de orquídeas, algunas de ellas endémicas y que debido a la pérdida o perturbación de sus hábitats naturales sus poblaciones se han visto disminuidas al paso del tiempo. Se ha corroborado que ningún intento de restauración o reintroducción puede tener éxito si no se considera a los microorganismos del suelo (Batty *et al.* 2002).

A nivel mundial la reintroducción simbiótica ya es una práctica común para el rescate y conservación de especies amenazadas y para la recuperación de funciones ecológicas, sin embargo en nuestro país los programas de reintroducción de orquídeas a sus hábitats naturales no ha considerado a los hongos simbiotes (Ortega-Larrocea y González 2008). Por lo tanto resulta importante conocer la dinámica de su asociación micorrízica para que se puedan proponer proyectos de reintroducción simbiótica, dada la importancia del hongo en las etapas tempranas de desarrollo de estas plantas.



De ahí que el objetivo principal del presente trabajo sea la caracterización *in situ* y el aislamiento *in vitro* de los hongos micorrízicos presentes en las raíces maduras de plantas de algunas especies del género *Bletia* (que corresponden a orquídeas terrestres representativas en el estado de Michoacán).

Esto permitirá identificar a los componentes de esta asociación y entender su estructura y función como una primera aproximación que permita proponer en un futuro programas de conservación y restauración de este recurso.

III. 2. MARCO TEÓRICO

Las orquídeas tienen tres principales hábitats de crecimiento: suelo (terrestres), sobre otras plantas (epifitas) y sobre superficies rocosas (litofíticas) (Dearnaley 2007). Como las semillas de las orquídeas son diminutas y contienen pocas sustancias de reserva, la colonización por hongos compatibles es esencial para la germinación y para el desarrollo inicial de la semilla sobre el sustrato (Smith y Read 1997). En la interacción, las hifas fúngicas crecen en los tejidos de las orquídeas y desarrollan estructuras helicoidales dentro de las células corticales llamadas pelotones. Como se ha establecido la mayoría de las orquídeas son fotosintéticas en la madurez (Leake 2005), pero algunas requieren de hongos para complementar sus requerimientos de carbono y otros nutrientes.

Las orquídeas son económicamente importantes. Por ejemplo, el fruto de la vainilla es utilizado como saborizante en comidas y bebidas; los tejidos de *Gastrodia* son importantes en la medicina natural y además las orquídeas son un grupo muy representado en la horticultura, dejando una derrama económica de millones de dólares anualmente (Griesbach 2002).



III. 2.1 Especificidad orquídea-hongo

Se han realizado diferentes estudios sobre la especificidad entre la orquídea y sus hongos asociados encontrando diferentes modelos, razón por la cual algunos consideran que la especificidad está correlacionada con los patrones de distribución de los hongos en el ecosistema y variaciones en el hábitat, sobre todo en orquídeas micoheterotróficas. Además de que algunas evidencias indican que las orquídeas pueden cambiar de hongos asociados durante su ciclo de vida (Van der Heijden y Sanders 2003). De tal manera que en ocasiones la germinación no se lleva a cabo con micobiontes extraídos del adulto, por lo que es importante analizar y determinar las micorrizas asociadas tanto en semillas como en plantas adultas ya que si el adulto y la semilla requieren diferentes micobiontes, resulta esencial que ambos sean aislados y conservados durante cualquier programa de recuperación (Dearnaley 2007, Rasmussen 2002a).

En comparación con otros tipos de micorrizas se han realizado muy pocos estudios sobre las micorrizas de orquídeas y son muchas las especies de orquídeas que se encuentran al límite de la extinción y que requieren urgentemente de estudios ecológicos y fisiológicos. Muchas orquídeas terrestres (tanto fotosintéticas como mico-heterotróficas) aún no han sido cultivadas y algunas se encuentran amenazadas debido principalmente a la pérdida de sus hábitats (Dearnaley 2007).

A nivel internacional existen algunas investigaciones sobre micorrizas en orquídeas que han determinado la especificidad en esta asociación. En una revisión realizada por Van der Heijden y Sanders (2003) se señala que muchas orquídeas mico-heterotróficas son altamente específicas hacia su hongo asociado.



Mientras que otros estudios muestran expresión de especificidad aún cuando diversos hongos coexisten con la planta. Actualmente, la especificidad del hongo en orquídeas ha sido estudiada utilizando dos métodos: el primero consiste en el análisis de la germinación y desarrollo de la semilla con varias cepas de hongos bajo condiciones controladas en medios de cultivo monoxénicos en laboratorio, mientras que el segundo método incluye una descripción morfológica y/o aislamiento del hongo de plantas adultas desarrolladas en estado silvestre.

La gran mayoría de las aportaciones frecuentemente sugieren baja especificidad, al menos en especies fotosintéticas (Rasmussen 2002a). Sin embargo en estudios realizados con técnicas moleculares se puede conocer más la variabilidad de los endófitos que morfológicamente es muy similar (Dearnaley 2007, McCormick *et al.* 2006) y sugieren una especificidad significativa cuando se transfieren pelotones individuales a medios de cultivo puros.

La especificidad en la asociación micorrízica observada en algunas orquídeas fotosintéticas posiblemente ayuda a mejorar las tasas de germinación de la semilla y les proporciona una eficiencia fisiológica mayor. En orquídeas con prolongados periodos de latencia o especies confinadas a hábitats con poca penetración de luz, existe quizá una mayor dependencia hacia los hongos para obtención de carbono y nitrógeno (Gebauer y Meyer 2003, Cameron *et al.* 2006, Dearnaley 2007).

La mayoría de las orquídeas terrestres fotosintéticas estudiadas se asocian con hongos saprofitos, muchas de ellas se asocian con el mismo hongo en la fase juvenil y en la adulta (aunque la especie de hongo puede variar dependiendo del hábitat) y algunas especies forman asociaciones con taxa muy específicos de hongos, algunas veces con una sola especie (McCormick *et al.* 2004). De tal manera que si esta especie no está presente la orquídea no se asocia con ningún otro hongo.



Por otro lado se ha observado que en ocasiones una sola orquídea puede asociarse con múltiples hongos a la vez (oligofagas) o con un solo hongo por vez, pasando de uno a otro (monofagas), ambas estrategias pueden ser adaptaciones que aseguran la sobrevivencia de las plantas (McCormick *et al.* 2006, Rasmussen y Rasmussen 2007).

Las orquídeas de climas templados (norte o sur) han mostrado ser más dependientes de su hongo asociado que aquellas de climas cálidos. Esto considerando que muchas orquídeas tropicales y sus híbridos son actualmente propagadas utilizando técnicas de cultivos de tejidos que no requieren la germinación simbiótica. Muchas especies de orquídeas de climas templados son frecuentemente difíciles de propagar por métodos no simbióticos e incluso sus poblaciones naturales están declinando rápidamente debido a las actividades antropogénicas. La germinación, en general, es estimulada o acelerada en presencia del hongo micorrízico, pero el efecto, es menos aparente en especies tropicales que germinan mucho más rápido que sus contrapartes de climas templados del Norte (Vij *et al.* 2002, Arditti 1992). La especificidad orquídea hongo también se ha visto que es más limitada.

La mayoría de las orquídeas fotosintéticas se asocian con hongos anamórficos del género forma *Rhizoctonia* y también se ha observado que la mayoría de las simbiosis micorrízicas durante la germinación de la semilla se da con hongos de este grupo (Vij *et al.* 2002).

Rasmussen (2002a) sugirió que las orquídeas fotosintéticas se asocian con un amplio rango de micobiontes mientras que en especies micoheteroróficas el rango es más estrecho. Sin embargo algunas de estas orquídeas aun cuando se asocian con un amplio rango, presentan un solo tipo de hongo micorrízico predominante y estas asociaciones tan específicas, generalmente se dan con miembros de Tulasnellaceae y Ceratobasidiaceae en plantas epífitas.



Recientemente se han corroborado otros géneros de hongos micorrízicos de orquídeas como *Thanatoporus*. Estos micobiontes pudieron ser identificados mediante el uso de técnicas moleculares (Dearnaley 2007).

Entre las especies de orquídeas autótrofas que muestran especificidad, se encuentran los géneros *Cypripedium* y *Spiranthes* siendo los micobiontes predominantes miembros de las taxas Tulasnellaceae, Russulaceae y Ceratobacidiaceae (Van der Heijden y Sanders 2003, Dearnaley 2007).

Algunos miembros del género *Corallorhiza* sp., que es micoheterotrófico, se asocian con hongos de los Telephoraceae y Russulaceae (Van der Heijden y Sanders 2003).

Algunos otros grupos de hongos que se han encontrado formando asociaciones con orquídeas son Sebacinaceae, Pyronemataceae, Coprinaceae y Tricholomataceae (Dearnaley 2007).

En estudios moleculares realizados en orquídeas terrestres de Europa y Norteamérica, así como en orquídeas tropicales de Asia (Kristiansen *et al.* 2001) y Puerto Rico se aislaron hongos del grupo *Rhizoctonia*, todos relacionados a *Ceratobasidium* sp. de regiones templadas (Otero *et al.* 2002).

En cuanto a orquídeas terrestres en México, existen varios trabajos elaborados a partir de germinación simbiótica de semilla y análisis de desarrollo que describen aspectos en la relación planta-hongo (Ortega-Larrocea *et al.* 2004, Rangel-Villafranco *et al.* 2004).



Rangel-Villafranco y Ortega-Larrocea (2004) señalaron que las especies del género *Bletia* se desarrollan rápidamente a plántula con hongos aislados provenientes del mismo género, mientras que especies como *Dichromanthus aurantiacus* y *D. cinnabarinus* presentan un desarrollo más dependiente y específico de la simbiosis. Además de que señalan cierto grado de especificidad a nivel de género ya que plantas adultas de algunas especies de *Bletia* se asocian en medios ambientes naturales con hongos del género *Epulorhiza* mientras que especies como *Dichromanthus aurantiacus* se asocian con hongos del género *Cerathoriza* (Ortega-Larrocea y Rangel-Villafranco 2007).

III. 2. 2 Características de los principales grupos de hongos asociados

Los hongos superiores con frecuencia tienen dos nombres basados en dos grupos de características diferentes: los nombres anamórficos se apoyan en características vegetativas tales como morfología de las hifas y de las esporas asexuales, mientras que los nombres teleomórficos están basados en las características de las estructuras de reproducción sexual, como son las características micro y macroscópicas de los esporocarpos. Las estructuras sexuales generalmente proporcionan más información para la taxonomía y sistemática que las estructuras vegetativas. Sin embargo, los hongos que se incluyen en el género forma *Rhizoctonia* rara vez revelan sus basidiocarpos y por eso muchas veces se identifican por sus anamorfos.

La sistemática de estos hongos ha sido estudiada utilizando tanto características morfológicas como moleculares. Una de las características morfológicas que ha ayudado en la clasificación del grupo *Rhizoctonia* es el número de núcleos presentes en las células jóvenes. Observándose células multi, bi y uninucleadas por lo que la determinación del número de núcleos es un proceso importante para su clasificación (Sneh *et al.*1991).



La producción de cadenas de células monilioides (propágulos de resistencia asexuales) es otra característica de este género (Van der Heijden y Sanders 2003). Las células monilioides pueden presentar cadenas simples o ramificadas con una relación longitud – ancho de 1-3:1 (Fig. 1). Estas células pueden ser hialinas o café y varían en forma (lobuladas, piriformes, irregular o en forma de barril); su tamaño va de 10 x 20 a 25 x 40 μm y pueden formar esclerocios aunque en ocasiones éstos pueden no formar células monilioides y estar constituidos por hifas indiferenciadas (Sneh *et al.*1991).

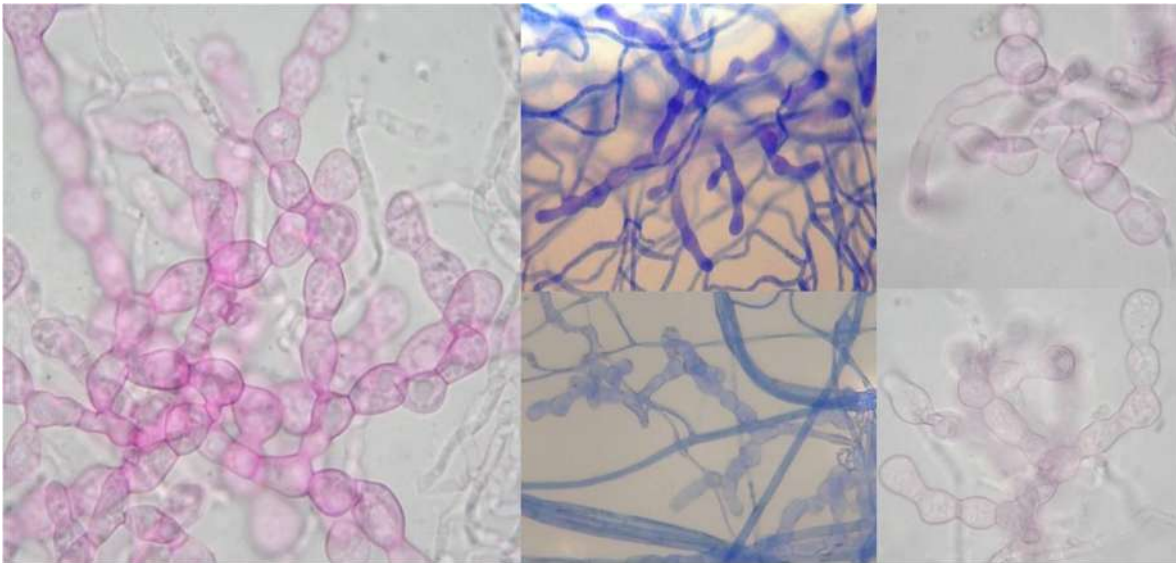


Figura 1. Células monilioides formando cadenas. Fotos A. Beltrán.

El color de las colonias y las tasas de crecimiento son también características a considerar ya que nos permiten diferenciar entre especies de este grupo. Se ha observado, por ejemplo, que algunas especies de *Epulorhiza* presentan tasas de crecimiento muy lentas mientras que en especies de *Ceratorhiza* las tasas de crecimiento son muy rápidas (Currah *et al.* 1997).



Otra característica de este género es la reacción que presentan a la polifenol oxidasa de tal manera que *Epulorhiza* es consistentemente negativa mientras que por ejemplo *Ceratorhiza* reacciona positivamente oxidando el medio de cultivo (Currah *et al.* 1997).

Rhizoctonia solani Kühn (teleomorfo *Thanatephorus cucumeris* (Frank Donk) es el anamorfo más estudiado de este género y posee las siguientes características : ramificaciones cerca del septo distal de las células en las hifas jóvenes en ángulos cercanos a los 90 °, constricción de la hifa y formación de un septo a corta distancia del punto de origen de los brazos hifales, septo doliporo y células multinucleadas en las hifas vegetativas jóvenes, manchas con pigmentación café de las hifas (Fig. 2). Las características morfológicas que nunca presenta incluyen : conexiones unidas, conidios, esclerocios diferenciados en corteza y médula, rizomorfos y otra pigmentación que no sea café. Las primeras 3 características se elevaron a nivel de género (Sneh *et al.* 1991).

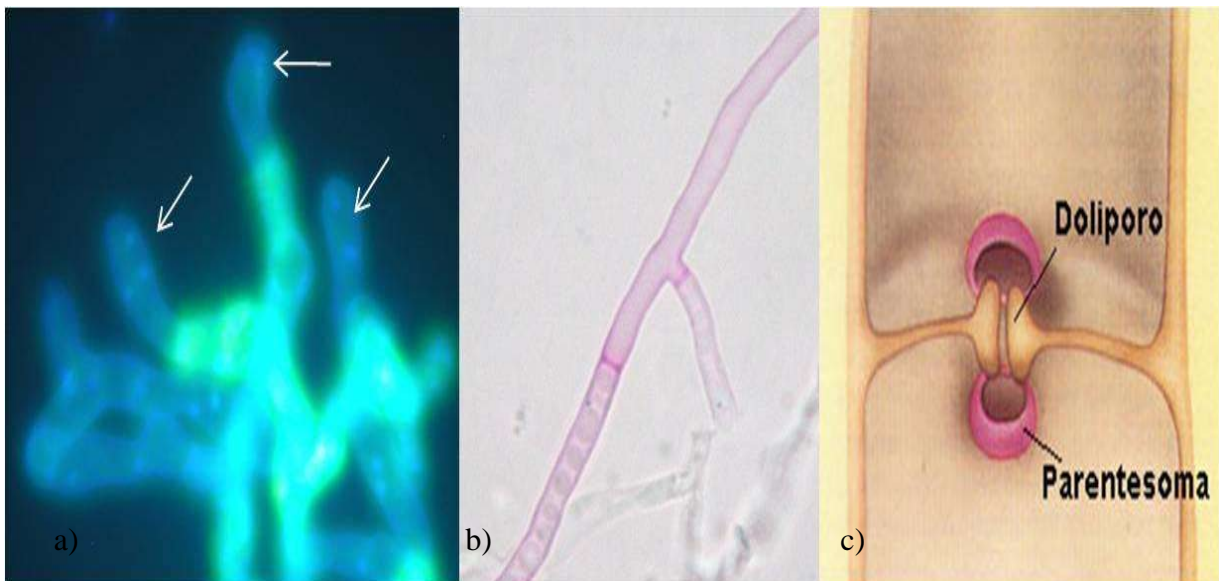


Figura 2. Características del género *Rhizoctonia*. a) Células multinucleadas; b) Ramificaciones en ángulos cercanos a 90° y septos cerca al punto de ramificación; c) septos doliporos. Fotos a y b tomadas por A. Beltrán; c tomada de <http://www.biologia.edu.ar/fung>.



El grupo de hongos conocidos como *Rhizoctonia* incluye los géneros anamórficos (asexuales) *Ceratorhiza*, *Epulorhiza*, *Rhizoctonia* y *Opadorhiza* (Moore 1988) de una variedad de hongos teleomórficos (etapas sexuales de *Ceratobasidium*, *Tulasnella*, *Thanatephorus* y *Sebacina*). Algunos de estos hongos son bien conocidos como patógenos de plantas de una gran variedad de granos y tubérculos.

Debido a que todos los hongos asociados a las orquídeas exhiben características muy similares, es difícil reconocer aislados individuales y más aun identificarlos. Sin embargo, se considera que la mayoría de las orquídeas son colonizadas por hongos de la subdivisión Basidiomycotina, clase Himenomicetos (subclase Holobasidiomycetidae) excepto por *Sebacina* sp. (subclase Phragmobasidiomycetidae). Pero en algunas especies del género *Epipactis* se han encontrado hongos Ascomicetes formando micorrizas, principalmente de los géneros *Tuber* sp., *Wilcoxina* sp. y *Phialophora* sp., aunque falta que sea corroborada su función micorrízica (Dearnaley 2007, Sneh *et al* 1991).

III. 2. 3 Patrones de colonización

La mayoría de las orquídeas tienen raíces adventicias, fibrosas y a veces tuberosas y presentan una capa de tejido esponjoso que las recubre, llamada velamen. Esta estructura resulta importante dadas sus funciones de absorción, almacenamiento de agua y sales minerales, así como en los procesos de simbiosis micorrízica (Fig. 3c) (Arditti 1992). Las raíces de algunas orquídeas además cumplen funciones fotosintéticas, sobre todo en especies de crecimiento monopodial que carecen de pseudobulbos y crecen a partir de un solo ápice vegetativo, de manera vertical. En éstas, no existen hojas y por lo tanto la raíz debe cumplir esta función, a diferencia de las especies de crecimiento simpodial que son aquellas que mantienen un crecimiento lineal y siempre cuentan con pseudobulbos, mismos que dan lugar a las hojas que son las que realizan la fotosíntesis (Fanfani 1990) (Fig.3a y b).

Sin embargo, todas estas raíces albergan hongos micorrízicos durante una o más etapas de crecimiento. En algunas especies, el córtex de las raíces es colonizado extensivamente, mientras que en otras orquídeas las masas fúngicas pueden encontrarse sólo a lo largo de la periferia. La colonización se desplaza de una célula a otra (Arditti 1992).

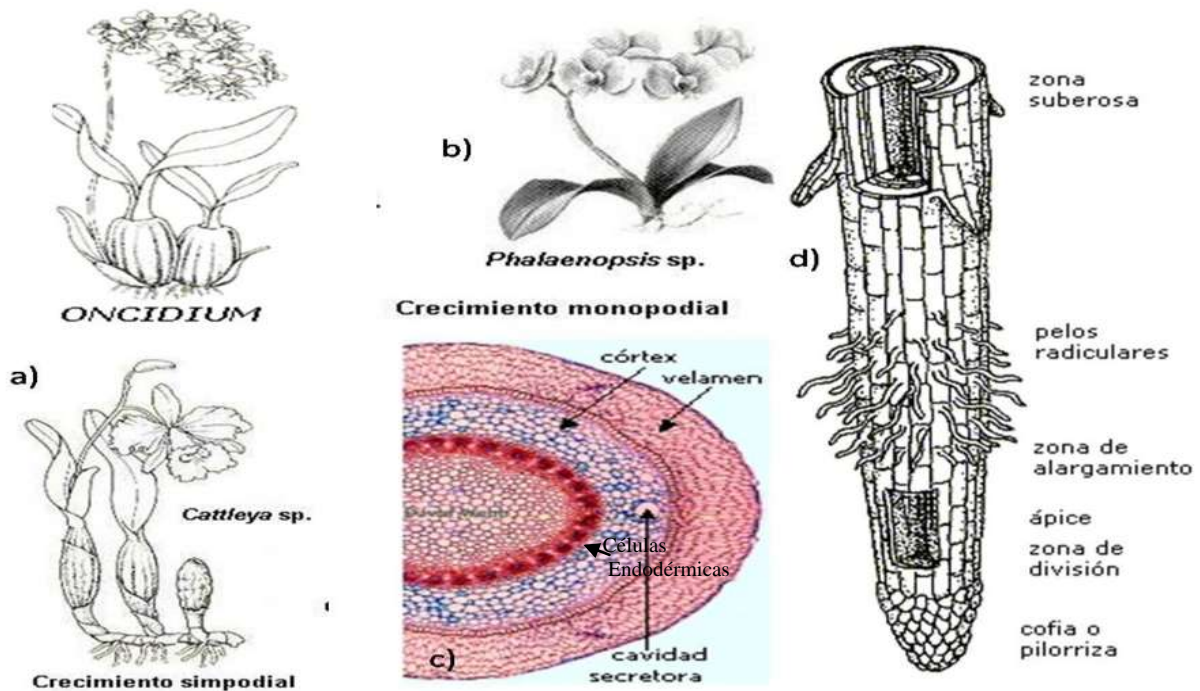


Figura 3. Formas de crecimiento en las orquídeas y estructura de la raíz. a) simpodial; b) monopodial; c) corte transversal de la raíz; d) vista longitudinal de la raíz. Tomadas de <http://orquidea.biología.com>

El hongo micorrízico es capaz de existir en el suelo, ya sea como esclerocios o como micelio activo y penetra en la planta generalmente a través de los pelos radicales o menos comúnmente por penetración directa en la epidermis radical. Las orquídeas son colonizadas por medio de hifas solitarias que pasan a través de la pared celular por simple penetración, usualmente mediante una delgada constricción de la hifa (Rasmussen 1995).



La penetración por los pelos radicales es la forma más común, sin embargo en especies de algunos géneros como *Cypripedium*, *Eria* y *Orchis*, la colonización puede ocurrir directamente por el velamen. El sitio y extensión de la penetración del hongo varía con la especie. En la mayoría de las raíces el velamen es separado del córtex por una capa exodérmica de células de pared gruesa que puede estar interrumpida por algunas células con actividad metabólica de pared delgada, denominadas células de pasaje (Fig. 3c y d). La hifa puede o no proliferar en las células del velamen/epiblema ya que las células exodérmicas de pared gruesa pueden resistir la penetración del hongo, mientras que las células de pasaje sirven como punto de penetración (Vij *et al.* 2002).

Los enrollamientos hifales se forman en la parte media del córtex en la mayoría de las células. Durante la primera fase el hongo invade tejidos vivos, durante la segunda fase el micelio formado es destruido. Después de una primera colonización y degradación de los pelotones del hongo las células de digestión de la planta pueden sufrir un máximo de tres invasiones sucesivas durante su etapa de crecimiento activo y se ha visto que el proceso desde la colonización hasta la degradación se lleva a cabo más rápidamente en estas recolonizaciones secundarias, en periodos de sólo tres o cuatro semanas. Los primeros pelotones pueden no ser digeridos por completo y sus remanentes se pueden observar como cuerpos espirales, alrededor de los cuales los nuevos pelotones se organizan (Burges 1966, Arditti 1992, Vij *et al.* 2002).

En muchas orquídeas, la raíz presenta en el córtex una capa de células adyacentes a la epidermis que funcionan como células hospederas y dos capas que funcionan como células de digestión, de tal manera que el hongo micorrízico puede permanecer vivo en las células hospederas y ser digerido posteriormente en las células de digestión (Arditti 1992). Este fenómeno es llamado tolipofagia y se presenta en casi todas las orquídeas (Fig.4a).



Las hifas que forman pelotones están normalmente en paquetes compactos y rodeados por una capa muy delgada de células en el citoplasma del hospedero lo que genera una interface entre la orquídea y el hongo que es denominada matriz interfacial (Peterson y Massicotte 2004). La composición de esta matriz depende de la edad del pelotón y se ha encontrado que en los primeros procesos de colonización la matriz carece de pectinas, celulosa y β -1,3-glucanos mientras que estos componentes de la pared están presentes cuando hay pelotones en proceso de senescencia y se encuentran rodeando las hifas en degeneración (Peterson *et al.* 1996).

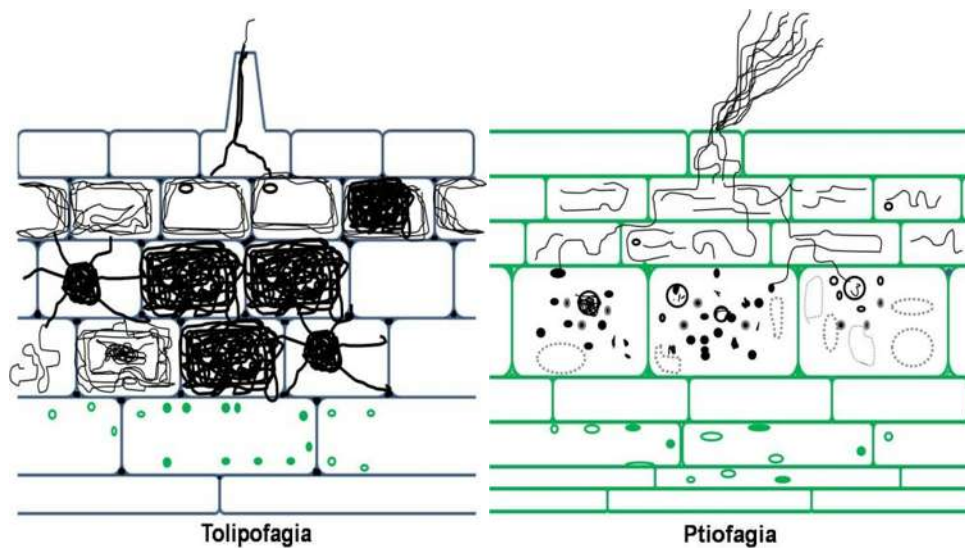


Figura 4. a) Tolipofagia; b) Ptiofagia. Modificado de Arditti (1992) por A. Beltrán.

Un fenómeno menos común es la ptiofagia que involucra el colapso de hifas individuales más que de grupos de hifas en una capa de células fagocíticas que se localizan en el córtex por debajo de dos capas de células de pasaje. En estas células, la hifa desintegrada libera citoplasma y la pared celular queda formando masas (el tisoma) que es digerido (Fig. 4b).



Durante la invasión de las raíces es posible distinguir dos fases de resistencia: la primera denominada resistencia mecánica y la segunda resistencia protoplasmática.

En la resistencia mecánica las paredes de la planta invadidas por las hifas pueden permanecer sin cambio; en ciertas orquídeas sin embargo, se observan cambios marcados en las paredes, como cierta distorsión por la presión de las hifas que crecen y pasan entre las células. Se puede observar también cierto espesamiento y las paredes adquieren una coloración amarillenta. Cuando esto pasa, la apariencia general es la de una pequeña lesión. Las células corticales adyacentes a las hifas muestran un espesamiento similar pero no tan pronunciado como las células en donde se lleva a cabo la penetración (Burges 1966, Vij *et al.* 2002).

Una vez que las hifas han sobrepasado las barreras epidérmicas o del velamen, se establecen en el córtex formando los ovillos. Es aquí cuando sucede la resistencia protoplasmática donde se observan cambios histológicos en las hifas, debido a que en esta fase se lleva a cabo una degradación activa de éstas. Las primeras etapas de digestión de las hifas son acompañadas por cambios notables en la coloración del citoplasma del hongo. Durante la colonización de las células las hifas están llenas de protoplasma y usualmente contienen gránulos de glicógeno y otros materiales que le dan cierta coloración grisácea; durante las primeras etapas de digestión el diámetro de las hifas se incrementa y las vacuolas, que primero incrementaron su número, desaparecen. El protoplasma cambia a un color amarillento debido a que ya no hay protoplasto y quedan sólo las paredes vegetales. En un hongo antes de la digestión los núcleos son pequeños y espirales con nucléolos de coloración fuerte, cuando ocurren los cambios en el citoplasma el núcleo se retrae, encoge y se vuelve irregular. Hay un incremento del material proteico en las hifas y la degradación del protoplasma continúa hasta que la hifa queda vacía, las paredes de la hifa se arrugan y colapsan.



Eventualmente las hifas son concentradas en el centro de la célula y forman la masa amarillenta denominada “cuerpo de degeneración” (Fig. 5) (Burges 1966).

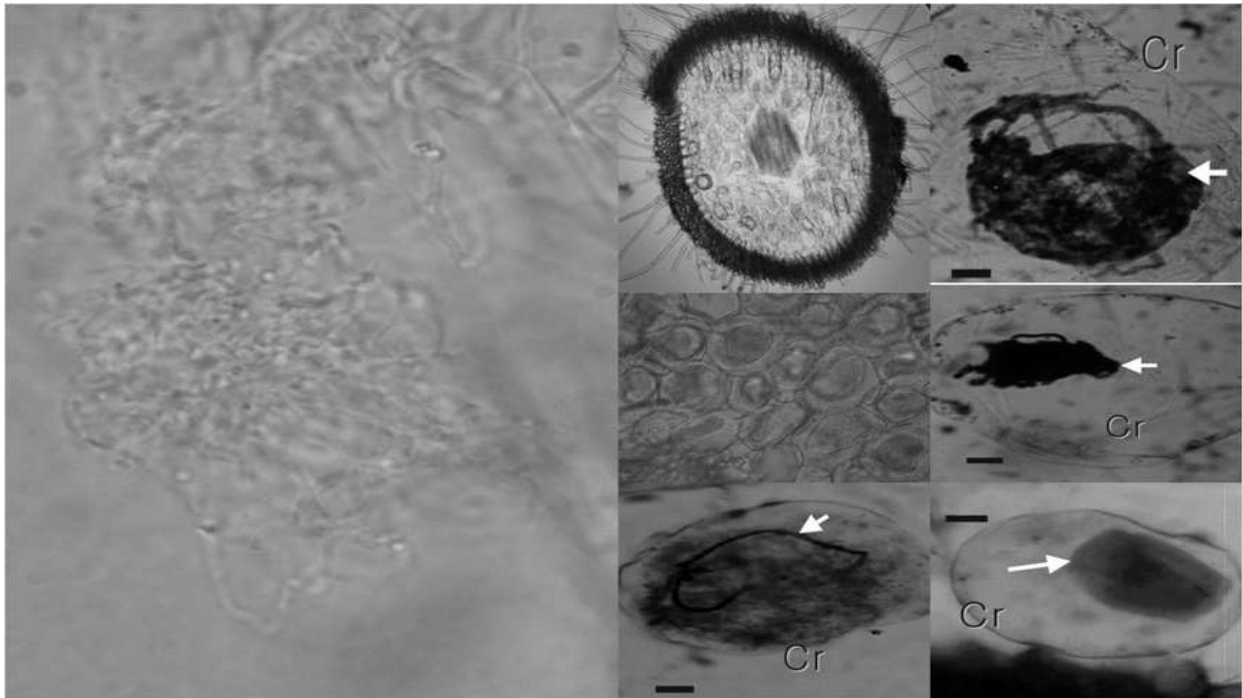


Figura 5. Pelotones en diferente estado de digestión y formación del cuerpo de degeneración (flechas). Fotos A. Beltrán y fotos con flechas tomadas de Lee 2002.

Durante estos cambios el hongo pierde su capacidad regenerativa dentro de la raíz; algunas hifas por ejemplo pierden su capacidad de crecimiento y otras generalmente en la parte externa del córtex de nuevas raíces colonizadas, son poco activas. Entre estos dos extremos hay numerosas etapas en las cuales la hifa puede tener o no actividad.



La desintegración de las hifas en la raíz es probablemente el fenómeno más relevante asociado con la colonización micorrízica y es responsable en gran medida de la diferencia entre este tipo de colonización y las formas más usuales de invasión parasítica de otros hongos hacia las plantas. Esta degradación se da por la presencia de enzimas proteolíticas en la raíz. Esto representa una ganancia en materiales orgánicos para la planta superior, o por otro lado, es quizá sólo el retorno del material tomado de la planta durante la fase parasitaria (Burges 1966, Vij *et al.* 2002).

Los pelotones usualmente persisten por un tiempo limitado, eventualmente colapsan y degeneran. No obstante, la degeneración de los pelotones ocurre principalmente en los tejidos profundos mientras que en los tejidos más superficiales permanecen aparentemente intactos y sin lisis por un tiempo considerable, lo que sugiere un fenómeno intermedio entre ptiofagia y ptolipofagia. La hifa probablemente se desliza por la superficie de los órganos colonizados a través del suelo de los alrededores (McKendrick *et al.* 2000).

Los patrones de colonización fúngica son variables observando que en orquídeas terrestres, algunas raíces pueden encontrarse densamente colonizadas y otras no presentar colonización incluso en una misma planta (Hadley y Williamson 1972, Katiyar *et al.* 1986, Cruz-Blasí 2007). El córtex de la raíz en la mayoría de las especies de climas templados se encuentra muy colonizado, mientras que en orquídeas de climas tropicales la colonización puede variar con la especie y el hábitat (Hadley 1982, Vij y Sharma 1983).

Se ha observado también que las plantas crecidas en invernadero presentan una colonización pobre en comparación con las que se desarrollan en estado silvestre, lo que sugiere una correlación directa entre la intensidad de colonización y habitat o manejo de las plantas (Vij *et al.* 2002).



Algunos otros investigadores correlacionan la distribución localizada del hongo con la extensión de contacto de la raíz con el sustrato, la relación de especificidad hongo-planta y los mecanismos de defensa de la planta (Hayman 1983). Las raíces maduras están generalmente más colonizadas que las raíces jóvenes (Hadley y Williamson 1971, Benzing 1982).

III.2.4 Fenología de la colonización

Existen pocos datos sobre la fenología de los hongos asociados con las orquídeas o sobre el impacto que pueden tener las variaciones en la temperatura estacional en la actividad del micelio externo (Rasmussen 1995, Batty *et al.* 2002).

En climas estacionales, los hongos saprófitos tienen su desarrollo óptimo en el otoño cuando la cantidad de materia orgánica aumenta con la caída de las hojas (Rasmussen 1995). Su actividad es máxima durante los meses fríos de invierno, mientras que esta actividad es limitada durante los meses secos del verano (Sivasithamparam 1993). Si se asume que los hongos simbiotes de orquídeas se comportan de manera similar a otros hongos micorrízicos entonces sólo existen cortos periodos estacionales en los cuales las condiciones del suelo y la actividad del hongo son adecuadas para ayudar a la germinación de la semilla (Batty *et al.* 2000). En estos meses la actividad de la raíz y el hongo no se ven limitados por temperaturas extremas o por sequías o anegamiento del suelo (Batty *et al.* 2002).

También se ha observado que en hábitats con estaciones secas la sobrevivencia puede resultar difícil para estos hongos, dado que *Rhizoctonia* rara vez forma esporas resistentes a la sequía y por esta razón se ha sugerido que la penetración a los tejidos de las plantas durante los periodos desfavorables podría ser el único beneficio real que el hongo obtiene de la simbiosis de la planta (Burgeff 1943, Rasmussen 1995).



Mientras que las orquídeas que mezclan fototrofia y micotrofia pueden alargar la época de crecimiento o bien tener más de una época anual de crecimiento.

Muchas orquídeas terrestres persisten solo como rizoma o tubérculos durante las estaciones secas pero sus raíces y tallos permanecen en el suelo actuando como reservorios de inóculo fúngico asegurando así una pronta colonización como sucede con otros tipos de micorrizas (Brundrett y Abbott 1995). Sin embargo, aún se requiere determinar con precisión la estrategia que utilizan los hongos micorrízicos de orquídeas para persistir en el suelo (Batty *et al.* 2002).

III. 3. ÁREA DE ESTUDIO

En el estado de Michoacán a partir de los años 30s se han decretado 42 áreas naturales con jurisdicción federal. La creación de áreas naturales protegidas comenzó en 1936 y el Parque Nacional Barranca del Cupatitzio se estableció zona protegida a partir del decreto presidencial del 2 de Noviembre de 1938. Esta reserva contaba inicialmente con una superficie de 560 ha de vegetación de bosque de pino, pino-encino y algunas cañadas de bosque mesófilo de montaña (Márquez y Escobar 2000).

Durante la década de los 50's los terrenos fueron invadidos para el establecimiento de asentamientos humanos en una superficie de 89 ha, las cuales fueron desincorporadas por decreto presidencial en 1996 y con lo cual el parque quedo dividido en dos secciones. La sección oriente consta de una superficie de 19 ha que se encuentra administrada por un patronato desde 1979, bajo un esquema recreativo que es denominada Área de Río y la sección poniente con una superficie de 452 ha que estuvo a cargo del INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias) de 1962 al año 2000 cuando fue transferida para su administración al Patronato del Parque (Márquez y Escobar 2000).



Esta sección se maneja bajo un esquema de ecoturismo e investigación y que es denominada Área de Montaña

III. 3. 1 Descripción del área de estudio

La Reserva Natural del Parque Nacional Barranca del Cupatitzio de Uruapan, Michoacán, se encuentra situada en la parte centro occidental del Estado de Michoacán en el municipio del mismo nombre, aproximadamente a 130 kilómetros de la ciudad de Morelia y colinda con el área urbana de la ciudad de Uruapan. Su ubicación geográfica (coordenadas) es 19° 25´ y 19° 26´ 19" de latitud Norte, 102° 04´ 06" y 102° 07´ 07" de longitud Oeste forma parte de la provincia fisiográfica denominada Sistema Volcánico Transversal o Cordillera Neovolcánica, en la porción sur de la llamada regionalmente Sierra Purépecha, con altitudes que van de 1960 a 2114 msnm y pendientes de 10 a 60% (Gómez-Tagle 1985) (Fig. 6).

III. 3. 2 Vegetación

La vegetación principal del área de montaña de La Reserva del Parque Nacional es bosque de pino, pino-encino, una pequeña área de bosque mesófilo y vegetación secundaria (Bello-González y Madrigal-Sánchez 1996).

La Reserva presenta una cubierta vegetal natural en su mayor parte, aunque existen áreas dedicadas a la producción de aguacate, además de encontrarse una pequeña área en donde se pueden encontrar un gran número de especies introducidas.



Ubicación del área de estudio

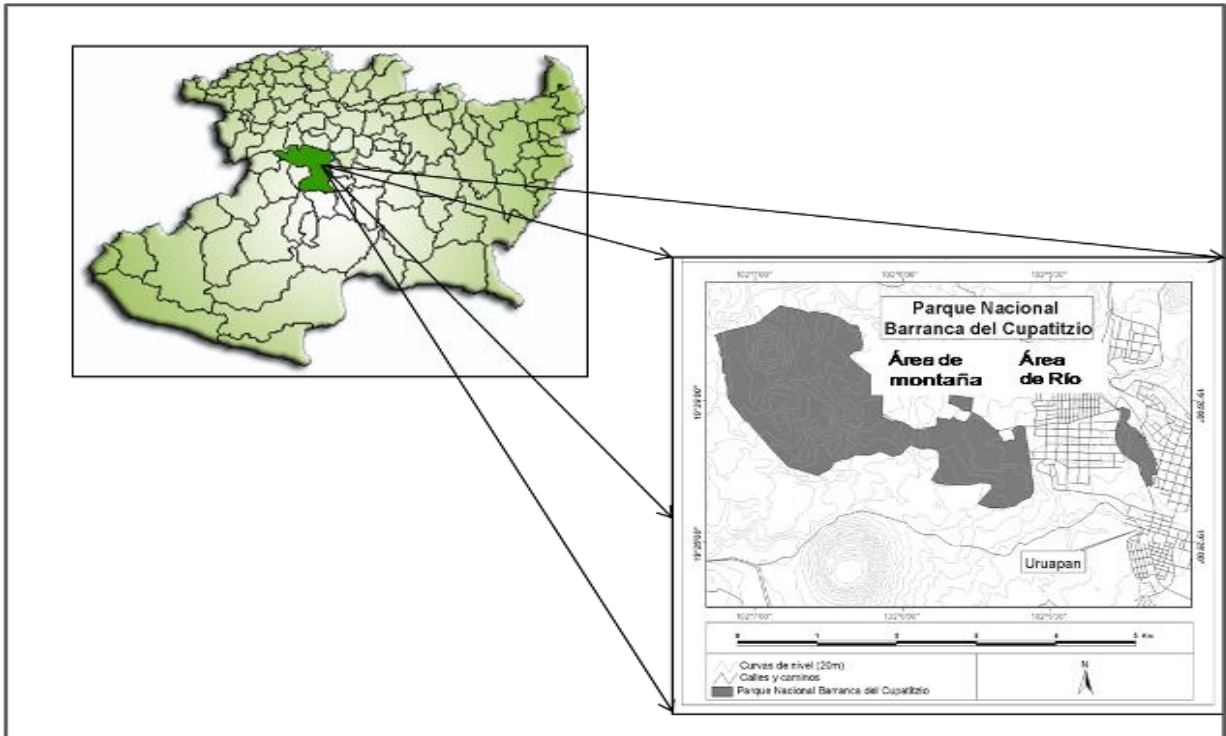


Figura 6. Ubicación de la Reserva Natural Barranca del Cupatitzio y áreas con que cuenta. (Fuente: Carta topográfica 1:50 000 y mapa de Michoacán esc. 1:75 000 INEGI. (Carta con delimitación del área cortesía de Salgado-Garciglia.)

De acuerdo al estudio realizado por Bello-González y Madrigal-Sánchez (1996) y Zavala-Álvarez (2006) el bosque de pino-encino está constituido por las especies *Pinus douglasiana*, *P. michoacana* var. *cornuta*, *P. lawsonii*, *P. leiophylla*, *P. pseudostrobus*, *P. pringlei* y *P. oocarpa*, estos tres últimos son escasos.



Otras especies de plantas presentes son: *Quercus obtusata*, *Q. castanea*, *Q. candicans*, *Q. magnoliifolia*, *Q. resinosa*; otras especies son *Ceanothus coeruleus*, *Coriaria ruscifolia*, *Melampodium perfoliatum*, *Monnina schlechtendaliana*, *Phytolacca icosandra*, *Salvia mexicana*, *Verbesina oncophora*, *Achimenes antirrhina*, *Alchemilla pringlei*, *Commelina coelestis*, *Crotalaria pumila*, *Cunila lythrifolia*, *Drymaria villosa*, *Heterotheca inuloides*, *Jaegeria hirta*, *Phaseolus acutifolius*, *Ranunculus petiolaris*, *Salvia Ivanduloides*, *Spermacoce ocymoides*, *Arbutus xalapensis*, *Bursera bipinnata*, *Lobelia laxiflora*, *Lupinus bilineatus*, *Senecio angulifolius*, *Solanum lanceolatum*. *Adiantum andicola*, *Asclepias glaucescens*, *Asclepias otarioides*, *Begonia gracilis*, *Drymaria villosa*, *Lopezia racemosa*, *Muhlenbergia ciliata*, *Muhlenbergia diversiglumis*, *Pereilema crinum*, *Phaseolus coccineus*, *Piquería trinervia*, *Platanus australis*, *Rhynchelytrum repens*, *Salvia elegans*, *Shizachyrium repens*, *Sigesbeckia jorullensis*.

El relicto del bosque mesófilo de montaña se encuentra representado por: *Alnus jorullensis*, *Carpinus caroliniana*, *Clethra mexicana*, *Ilex tolucana*, *Fraxinus uhdei*, *Hedyosmus mexicanum*, *Bocconia arbórea*, *Oreopanax salvinii*, *Ternstroemia lineata* y *Prunus capuli* (Bello- González y Madrigal- Sánchez 1996).

Además existen numerosas plantas arbustivas y herbáceas de ornato como el aretillo (*Fuchsia arborescens*), bambú (*Bambusa* sp.), floripondio rojo (*Datura sanguínea*), floripondio blanco (*Datura candida*), higuera (*Ricinus communis*), tulipán (*Hibiscus rosa-sinesis*), nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) y tripa de pollo (*Commelina* sp.).



Se encuentra una pequeña superficie dedicada al cultivo y experimentación de algunas especies como el aguacate (*Persea americana*), durazno (*Prunus persica*), aunque también se encontraron otras especies como la ciruela (*Prunus domestica*), mango (*Mangifera indica*), galeana (*Spathodea campanulata*), guayabo (*Psidium guajava*), jacaranda (*Jacaranda mimosaeifolia*), laurel de la India (*Ficus retusa*) y nuez de macadamia (*Macadamia sp*) (Zavala-Álvarez 2006).

El arboreto es una zona de plantación, constituida por especies del género *Eucaliptus*, *Cupressus* y *Pinus*. Se encuentra a 2000 msnm y cuenta con una superficie de 6.5 ha (Gómez-Reyes 2005).

La huerta de aguacate y durazno al igual que el arboreto y otras plantaciones se establecieron durante la administración del INIFAP, se localizan en dos secciones del parque. La primera se encuentra junto a las instalaciones con una superficie de 4.5 ha y consta de aguacate, andrinos y durazno, la otra sección llamada la huertita se localiza aproximadamente a un kilómetro al oeste de las instalaciones con una superficie de 0.5 ha, la superficie total de ambas huertas es de 5 ha (Gómez-Reyes 2005).

En la reserva se describen 49 especies de pteridofitas pertenecientes a 26 géneros y 10 familias, entre los que se encuentran *Cheilanthes* con 7 especies, *Adiantum* con 6 especies y *Polypodium* con 5 especies. La mayoría de las especies son de tipo herbáceo, aunque se encontraron tres arborescentes, dos correspondientes al género *Cyathea* (*Cyathea bicrenata* y *C. myosurides*) y una más correspondiente a *Nephrolepis exaltata*, las cuales han sido introducidas en el área, al igual que otras angiospermas encontradas (Zavala-Álvarez 2006).



III. 3. 3 Hongos

Entre las especies de hongos ectomicorrízicos que se describen en el área de montaña se encuentran *Russula foetens*, *R. brevipes*, *R. cyanoxantha*, *R. emetica*, *Amanita virosa*, *A. vaginata*, *Laccaria laccata*, *L. bicolor*, *Leccinum aff. Rugocipes*, *Sullus granulatus*, *S. cothurnatus*, *S. tomentosus*, *Lactarius scrobiculatus*, *L. deliciosus*, *Scleroderma aerolatum* (Gómez-Reyes 2005).

III. 3. 4 Geología

La formación geomorfológica del área corresponde al Cenozoico superior, periodo en el que se originó la Faja Volcánica Transmexicana, dominado por materiales extrusivos que provienen de la erupción de volcanes, encontrándose que los últimos aportes fueron del volcán Parícutín entre 1943-1952 (Demant y Silva 1976).

Los materiales geológicos identificados en el área, están representados por cenizas volcánicas en distintos grados de alteración, con fragmentos de tamaño reducido que dan la impresión de arenas gruesas y finas y gruesas con material vítrico, roca basáltica en forma de derrames ocurridos en diferentes periodos, limos y arcillas en menor cantidad (Gómez-Tagle 1985).

III. 3. 5 Suelos

Los suelos en el área corresponden a dos unidades: Andosoles y Litosoles FAO (citado en Gómez-Tagle 1985). Los primeros son suelos profundos, bien drenados, ligeros, de color negro y pardo rojizo, ricos en minerales asimilables; la presencia de alofanos es característica de estos suelos.



El contenido de material orgánico es variable, pudiéndose definir la subunidad Andosol vítro, que presenta acidez moderada; se desarrolla sobre cenizas volcánicas, con textura de tipo arenoso, areno migajosa y migajón arenosa, con las fases superficiales, media y profunda. Este tipo de suelo tiene amplia distribución en toda el área de estudio (Gómez-Tagle 1985).

Los Litosoles son suelos someros, jóvenes, poco desarrollados, rocosos, limitados a cierta profundidad por roca basal continua, dura, coherente. Son de color gris a oscuro, varían de pobres a muy ricos en materia orgánica y la textura es de migajón arenosa y franca. Se encuentran en las zonas altas, con pendientes relativamente pronunciadas o bien, en áreas de corriente de lava reciente conocidas como malpaís. En el área de estudio también se encuentra la subunidad Litosol dístico, con el tipo gravoso discontinuo; este suelo tiene distribución reducida (Gómez-Tagle 1985).

III. 3. 6 Hidrología

La Reserva Natural se ubica en la región hidrológica No. 18 Balsas (RH18) dentro de la cuenca Tepalcatepec-Infiernillo, subregión Cupatitzio, el cual nace en el manantial Rodilla del Diablo en el área natural protegida del Parque nacional (INEGI 1986).

La sección montañosa, también forma parte de la subcuenca de escurrimiento del río Cupatitzio, la cual es una zona importante de descarga de acuíferos por su conformación física y geológica. Al interior del área existe un afloramiento superficial en forma de manantial que se mantiene durante todo el año, aunque disminuye durante la época de estiaje (Gómez-Tagle 1985).



III. 3. 7 Clima

De acuerdo con el sistema de clasificación de Koeppen, modificado por García (1988) y con la estación meteorológica ubicada dentro del área, se determinó que el clima es semicálido, subhúmedo, del tipo (A)C(w2)(w)b(i"')g,i, encontrándose entre los climas cálidos y templados por lo que se considera un clima de transición, siendo el más fresco de los cálidos y el más cálido de los templados, con temperatura media anual de 23.8 °C y la del mes más frío de 5.4 °C en Enero. La precipitación media anual es de 1600 mm y el porcentaje de lluvia invernal es del 5 % de la anual.

III. 3. 8 Problemática

La Reserva Natural del Parque Nacional Barranca del Cupatitzio a pesar de ser un área protegida, presenta perturbación de diferentes tipos como resultado directo o indirecto de algunas actividades humanas. Tales actividades son: la tala de árboles enfermos debido a la presencia de plagas que obligan a cortarlos para proteger a la vegetación circundante sana; el daño a la cubierta vegetal nativa debido al paso constante de la población que asiste a este lugar para practicar deportes al aire libre y para atravesar hacia diversos puntos de la ciudad; la extracción de ejemplares de plantas silvestres de interés comercial sobre todo en las áreas adyacentes a la mancha urbana; la contaminación de los arroyos que atraviesan la reserva debido al desagüe de tuberías de aguas negras; y la introducción de especies exóticas, lo que ocasiona la modificación del uso del suelo y la pérdida de las especies nativas. Además de la fragmentación del hábitat debido a la construcción de obras de infraestructura y asentamientos humanos. La perturbación de tipo natural se debe a incendios ocasionados por sequías y por la erupción del volcán Parícutín, entre otros (Fig. 7).



Figura 7. Algunos factores que han influido en la perturbación del hábitat en la Reserva. Fotos A. Beltrán (Tomadas en otoño de 2008).

Las partes de mayor altitud son las menos transitadas por su lejanía a la zona urbana lo que hace que el acceso a ellas sea más difícil y por esta razón son las menos perturbadas. En esta parte de la Reserva, la vegetación es más densa y se pueden observar gran variedad de especies de helechos formando parte de la vegetación secundaria, aunque también se observa en abundancia piedra volcánica (malpaís) (Figs. 8 y 9).



Figura 8. Aspecto de las zonas 2 (izquierda) y 3 (derecha) en la Reserva, consideradas de menor perturbación. Fotos A. Beltrán (Tomadas en otoño de 2008).

La profundidad del mantillo varía en diferentes sitios para una misma zona, encontrando que los lugares cercanos a arroyuelos o barrancas con abundante humedad tienen mantillo de más de 10 cm de profundidad. Los sitios a las orillas del camino en ocasiones presentan profundidad inferior a los 5 cm.



Figura 9. Algunas de las herbáceas presentes en las zonas 1, 2 y 3 de la Reserva.



Estos factores permitieron dividir el área de montaña en zonas con diferentes gradientes de perturbación, considerando a las zonas cercanas a la mancha urbana y que corresponden a las partes de menor altitud de la Reserva, como zonas perturbadas y numeradas como zonas 1 y 4. Las zonas de mayor altitud que se encuentran más alejadas de la mancha urbana y que son áreas de difícil acceso, se consideraron como zonas de poca perturbación y fueron numeradas como zonas 2 y 3 (Fig. 10).

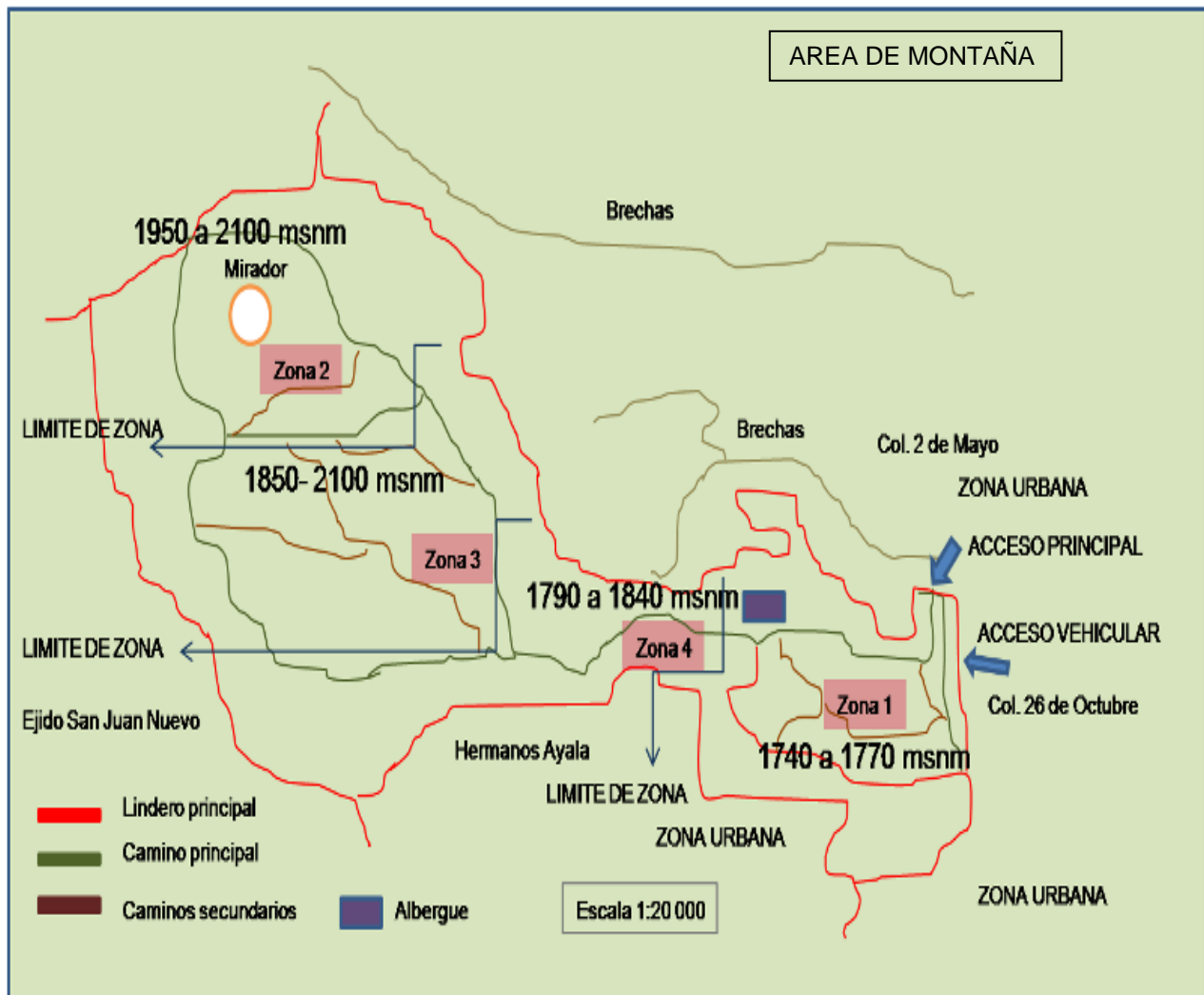


Figura 10. Ubicación de zonas de muestreo en la Reserva (mapa elaborado a partir de mapa de rutas del Parque Nacional de Uruapan).



Las zonas 1 y 4 son áreas colindantes con caminos principales dentro de la Reserva que sirven de tránsito a la población que visita el parque y a los habitantes del asentamiento humano. Además, son sitios cercanos al acceso principal de la Reserva y a la zona donde se practican deportes al aire libre (caminata y carrera principalmente) (Fig. 11).



Figura 11. Aspecto de las zonas 1 (a y b) y 4 (c y d) consideradas de mayor perturbación en la Reserva. Fotos A. Beltrán (Tomadas en otoño de 2008)



Las zonas 2 y 3 están cerca a un camino principal poco transitado debido a su lejanía y por lo tanto de difícil acceso, en donde la vegetación es más densa y muestra menor grado de disturbio (Fig. 8).

III. 4 ESPECIES DE ORQUÍDEAS A ESTUDIAR

Bletia (Ruiz & Pavón), es un género de orquídeas terrestres con alrededor de 50 especies neotropicales en su mayoría endémicas de México, que ha sido poco estudiado desde el punto de vista taxonómico (Sosa 1992). Este género ha sido difícil de clasificar debido a que es común que ocurra hibridación interespecífica, trayendo como consecuencia que las poblaciones de origen híbrido presenten patrones de variación que son difíciles de interpretar con base únicamente en material de herbario. También, varias poblaciones de la mayoría de las especies han cambiado su estrategia reproductiva de xenogamia (polinización cruzada) a autogamia (auto-polinización), dando como resultado cambios morfológicos en las estructuras florales utilizadas como caracteres diagnósticos para reconocer a las especies de este género (Sosa 1992).

Este género se encuentra bien representado en el estado de Michoacán como se muestra en los ejemplares de herbario del Instituto de Ecología ubicado en la ciudad de Pátzcuaro y ha sido descrito en 19 municipios entre los que se encuentran: Morelia, Coeneo, Pátzcuaro, Uruapan, Ziracuaretiro, Acuitzio, Zitácuaro, Zacapu y Erongarícuaro, principalmente en bosques de encino, bosques de pino y bosques de pino-encino.

Se cuenta con un aproximado de 13 especies determinadas, de las cuales algunas son consideradas de distribución abundante como *Bletia campanulata* y *B. purpurata*, encontrando algunas otras especies de distribución escasa como *B. amabilis*, *B. punctata*, *B. neglecta* y *B. reflexa* (Instituto de Ecología, Pátzcuaro 2008).



Algunas de estas especies, como *B. purpurata*, *B. campanulata* y *B. roezlii* son capaces de desarrollarse en zonas que presentan suelos perturbados y escasos, áreas reforestadas o en lugares con suelos erosionados. También se registran desarrollándose en zonas pedregosas o malpaís (Espejo *et al.* 2002, Hágater *et al.* 2005).

Su recolecta se puede realizar durante los meses de Junio a Noviembre principalmente, que corresponden a la época de lluvias ya que es entonces cuando se lleva a cabo la floración de estas especies. Las orquídeas de este género son perennes pero pierden sus partes aéreas durante la mayor parte del año por lo que es difícil localizarlas antes de la temporada de lluvia. El género *Bletia* está constituido por plantas herbáceas, de 20 a 60 cm de altura, con flores que pueden ser de diferentes tonalidades como blancas, amarillas, rosas, naranjas, moradas o rojas; se les encuentra a altitudes que van de los 1000 a 2400 msnm.

Entre las primeras descripciones ilustradas que se tienen del género, se encuentra la realizada por Bernal Díaz del Castillo quien describe a la especie *Bletia bf. jucunda* (denominada izacutli) en las publicaciones romanas (1628-1651). En el primer trabajo dedicado exclusivamente a las orquídeas mexicanas denominado *Novorum Vegetabilium Descriptions 2 (Orchidianum Opusculum)* de 1825 de Pablo de la Llave y Juan Lexarza se describe la flora de orquídeas de la parte central de Michoacán, principalmente de los alrededores de Morelia (entonces denominada Valladolid) y unas pocas de Paracho y Uruapan, aclarando su identidad con rasgos morfológicos examinados en plantas vivas y material de herbario (citado por Soto *et al.* 1995).



Entre las especies nuevas del centro de Michoacán que se describen en el “*Orchidianum opusculum*” se encuentran cinco especies de *Bletia*, dos de las cuales fueron transferidas al género *Laelia* (*Bletia grandiflora* y *B. autumnalis*). Las tres especies restantes, *B. punctata*, *B. coccinea* y *B. campanulata* pertenecen sin ninguna duda a *Bletia* (Dressler 1968).

Para el año del 2008 se pudieron registrar 3 especies de orquídeas pertenecientes a este género en la Reserva Natural Barranca del Cupatitzio: *Bletia purpurata*, *B. punctata* y *B. roezlii* (Salgado-Garciglia *com. pers*) (Fig. 12).



Figura 12. Especies del género *Bletia* encontradas en la Reserva: a) *B. purpurata*, b) *B. roezlii* y c) *B. punctata*.



III. 4. 1 Descripción taxonómica de las especies

Bletia purpurata (A. Rich et Gal)

Bletia purpurata Rich.& Gal in Ann Sci. Nat. sér. 3, 3: 23, 1845

SINONIMOS: *Crybe rosea*: (Lindl.), Nat, Syst. Bot. Ed. 2: 446, 1836;
Arethusa rosea (Lindl.) Benth., ex Hensl. In Godm. & Salvin. Biol. Am. 3: 304, 1884
Arethusa grandiflora S. Wts. in Proc. Am. Acad. Acad. 26: 154, 1991

“Planta terrestre de clima templado de las cumbres. Cormos alargados de 3 cm de largo y 2 cm de diámetro. Tallo de 8 cm de largo con dos a tres hojas. Hojas de 25 por 4.5 cm, color verde, con nervios longitudinales y de tamaño variables. Inflorescencia lateral de aproximadamente 25 cm de largo, de color púrpura, con dos a tres flores. Flores rojo violeta, cuando jóvenes externamente verde amarillento, en la base hasta blancas, raras veces se abren (cleistogamias). Sépalos de 35 mm de largo, blancos en la base, lo demás purpúreo, externamente verrugoso, especialmente en los ápices. Pétalos de 35 mm de largo, de colores iguales a las de los sépalos. Labelos de 4 por 3 cm, entero, con las orillas onduladas y un disco con cinco nervios o laminillas, de color púrpura, en el centro algo blanco. Columna de 30 mm de largo, recto, con un nectario pequeño y dos “orejas” en la mitad de la columna, dirigidas hacia adentro. Florecen en julio y agosto” (Fig. 13) (Rivera-Dueñas 2002).

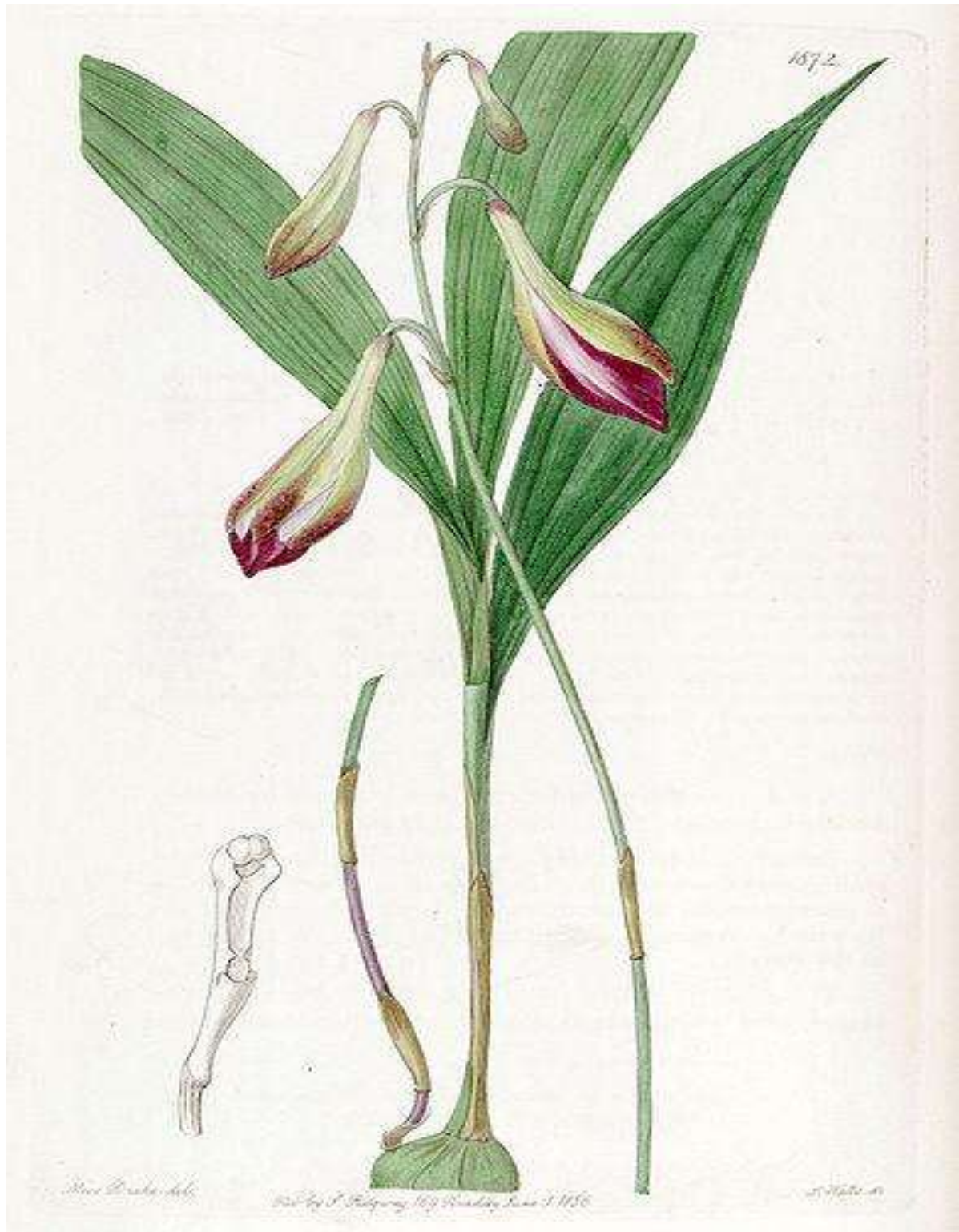


Figura 13. *Bletia purpurata* (tomada de Rivera-Dueñas 2002).

***B. punctata* Lex.**

Esta es quizá la especie más fácilmente reconocible del género. “Es endémica de México de la vertiente del Pacífico desde Jalisco hasta Oaxaca y del Altiplano Mexicano en Morelos, México, Puebla y Distrito Federal. Se caracteriza por sus flores erectas, abiertas, pequeñas, de color púrpura-verdoso, con los sépalos y pétalos erectos y agrupados a un lado de la flor, en forma de abanico, opuestos al labelo. Es una de las especies más vigorosas, llegando a desarrollar hasta 6 hojas e inflorescencias hasta de 2 m de alto. Algunas de estas características se mencionan en la descripción original e Lexarza. *Bletia secunda* Lindley sinónimo de *B. punctata*” (Sosa 1992) (Fig. 14).

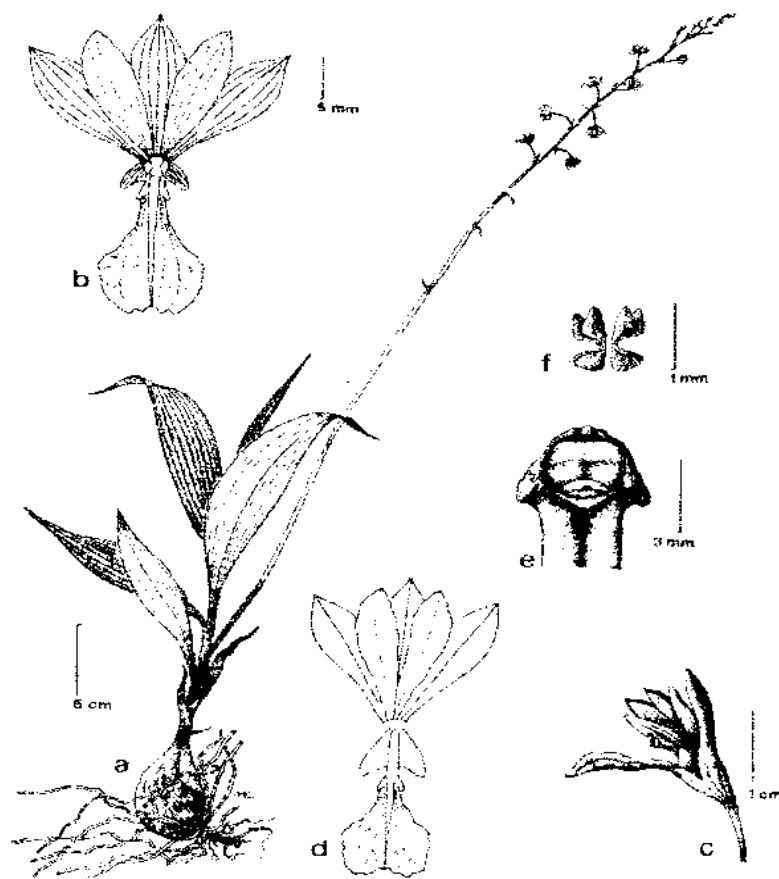
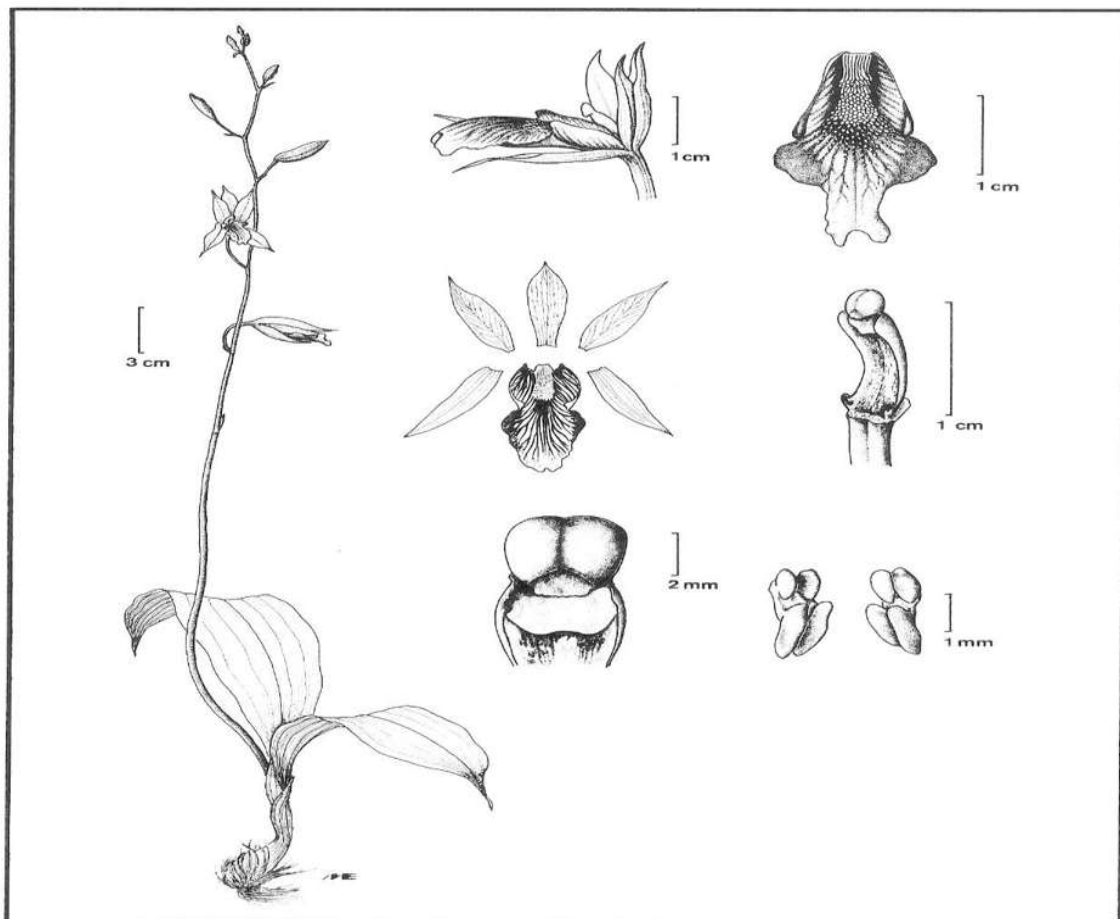


Figura 14. *Bletia punctata*. a, hábito; b, flor vista de frente; c, flor en vista lateral; d, partes florales extendidas; e, ápice de la columna; f, polinias (tomado de Sosa 1992).



Bletia roezlii Rchb linnaea 4: 7-1877.

“Hierbas terrestres, deciduas, 40-71 cm de alto; los cormos ovoides, erectos, agregados. Una o dos hojas por lo general presentes en la floración, ampliamente elípticas o lanceoladas, el haz de color verde pardo o verde oscuro, el envés de color púrpura o bronce-púrpura, inflorescencias racimosas con hasta 10 flores. Flores abiertas, sépalos amarillo verdosos o verdosos, a menudo con líneas rojizas en la superficie externa, pétalo verdoso, labelo con garganta amarillenta con venas rojizas o casi purpura. Polinario con 8 polinios desiguales, cápsula ascendente” (Hagsater 2002) (Fig. 15).



BLETIA ROEZLII Rchb.f.
ORCHIDS OF MEXICO PARTS 2-3

Plate 535
ICONES ORCHIDACEARUM 5-6, 2002

Figura 15. *Bletia roezlii*. hábito; flor vista de frente; flor en vista lateral; partes florales extendidas; ápice de la columna; polinias (tomado de Icones Orchidacearum 5-6 2002).



IV. HIPÓTESIS

Se espera que las orquídeas de las diferentes especies del género *Bletia*, presenten distintos grados o patrones de colonización micorrízica, así como posiblemente, distintos morfotipos de hongos asociados dado que se encuentran presentes en ambientes contrastantes dentro de la Reserva Natural Barranca del Cupatitzio.



V. OBJETIVOS

V.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio comparativo del patrón de colonización micorrízica y de los hongos asociados en tres especies adultas del género *Bletia* (*Bletia purpurata*, *B. punctata* y *B. roezlii*) en ambientes contrastantes dentro de la Reserva Natural Barranca del Cupatitzio.

V.1.1 Objetivos Particulares:

1. Realizar un estudio prospectivo para localizar poblaciones del género *Bletia*, en la Reserva Natural Barranca del Cupatitzio, de Uruapan, Michoacán.
2. Realizar la caracterización *in situ* de la colonización micorrízica en las raíces maduras de las tres especies en una zona conservada y una perturbada mediante la determinación de intensidad y extensión de la colonización en la época de floración (Junio a Noviembre).
3. Llevar a cabo el aislamiento de los hongos micorrízicos de las tres especies y su cultivo en medios axénicos para poderlos caracterizar morfológicamente.
4. Caracterizar y determinar los anamorfos mediante las principales estructuras morfológicas, en diferentes medios de cultivo y con diversas técnicas microscópicas.



VI. RESULTADOS

CAPÍTULO 1. ESTUDIO PROSPECTIVO DE LA DISTRIBUCIÓN Y ABUNDANCIA RELATIVA DE ORQUÍDEAS TERRESTRES DEL GÉNERO *Bletia* (ORCHIDACEAE) EN SITIOS CON DIFERENTES GRADOS DE PERTURBACIÓN EN LA RESERVA NATURAL BARRANCA DEL CUPATITZIO DEL EDO. DE MICHOACÁN.

RESUMEN

Se determinó la distribución y abundancia relativa de orquídeas terrestres del género *Bletia* en la Reserva Natural Barranca del Cupatitzio durante una sola época de floración (2008). Se delimitaron cuatro zonas en la Reserva en función de su grado de perturbación y calidad de sitio. Se hicieron recorridos de reconocimiento e identificación de especies del género en la época de floración y su ubicación y distribución se determinó mediante la toma de coordenadas con equipo GPS. La abundancia relativa se definió con una escala arbitraria de cuatro valores: abundante (>40 individuos), media (20-40 individuos), escasa (<20 individuos) y nula. Se localizaron tres especies, la de mayor abundancia fue *Bletia roezlii* con poblaciones de más de 40 ejemplares en 1000 m² en cada sitio en todas las zonas de la Reserva aunque se desarrolló mejor en lugares cercanos a caminos y/o sitios abiertos. *Bletia purpurata* tuvo una distribución y abundancia similar y su presencia fue mayor en la zona menos perturbada con caminos poco transitados y en los sitios de malpaís. *Bletia punctata* fue la especie de menor abundancia y distribución con poblaciones de 20 a menos individuos, siendo escasa en los sitios con mayor perturbación.



ABSTRACT

We determined the distribution and relative abundance of terrestrial orchids of the genus *Bletia* in the Cupatitzio Canyon Natural Reserve. There were several tours of recognition and identification of species in one flowering season (2008). Four different zones were identified defined by their perturbation degree and site quality. The localization of species, as well as their distribution was done with GPS equipment. The relative abundance was defined with an arbitrary scale of four values: abundant (> 40 plants), medium (20-40 plants), low (< 20 plants) and none. Three species were found, *B. roezlii* the most abundant and widely distributed with populations of more than 40 individuals in 1000 m² by area localized among the four areas, thrives best in areas near roads and / or open sites. *Bletia purpurata* had a similar abundance and distribution, frequently localized in roads with little traffic and low disturbance. *Bletia punctata* was the species of lowest distribution and abundance with smaller populations of 20 individuals at least, being low in sites with greater disturbance.

INTRODUCCIÓN

Las orquídeas terrestres en México están representadas por géneros como *Spiranthes*, *Bletia*, *Govenia*, *Habenaria* y *Malaxis* (Soto 1988). Entre éstos, uno de los géneros neotropicales más representativos es *Bletia* ya que su centro de diversificación ocurrió en este país con un aproximado de 50 especies conocidas, de las cuales se describen 13 para el estado de Michoacán distribuidas en 19 municipios (Hágsater *et al.* 2005, Sosa 2007, Instituto de Ecología, Pátzcuaro, 2008).



Sin embargo debido a la pérdida de sus hábitats naturales por cambios en el uso de suelo y otros factores como tala, contaminación, introducción de especies exóticas y recolecta de ejemplares silvestres, las poblaciones de las especies de este género como las del resto de las orquídeas se han visto disminuidas al paso del tiempo, por lo que es importante su estudio con fines de conservación. Algunas de estas especies como *Bletia campanulata* (Llave & Lex), son capaces de desarrollarse en zonas que presentan suelos escasos y perturbados, áreas reforestadas o en lugares con suelos erosionados. Otras como *B. reflexa* Lind. tienen una distribución muy escasa en el Estado (Instituto de Ecología-Pátzcuaro, 2008). Los registros sobre las especies encontradas en diversos ecosistemas se limitan a la descripción taxonómica y pocos son los estudios en el país que arrojen información sobre abundancia y distribución. Esto no permite verificar si las poblaciones han decrecido alarmantemente a lo largo del tiempo para poder llevar a cabo acciones de conservación o legislación. Además, resulta importante conocer la capacidad de adaptación de las diferentes especies a las transformaciones de los hábitats, con la finalidad de conservar aquellos en donde se presentan las orquídeas con menor capacidad de ocupar nichos perturbados y por lo tanto más fáciles de perder.

La Reserva Natural Barranca del Cupatitzio ubicada en el municipio de Uruapan en el Estado de Michoacán, a pesar de ser un área protegida sufre los efectos de su cercanía a la zona urbana de Uruapan. Las zonas colindantes a ella han sufrido la modificación de la cubierta vegetal por el paso constante de personas, la introducción de especies exóticas, cambios en el uso de suelo de bosque a huertas hortícolas de aguacate y durazno principalmente, la presencia de plagas que obliga a cortar árboles enfermos y que da lugar a zonas más abiertas y con mayor penetración de luz. En las áreas más lejanas a la localidad y que son de acceso restringido o más difícil, se sigue conservando su vegetación natural y presentan menor grado de perturbación (Fig. 16).

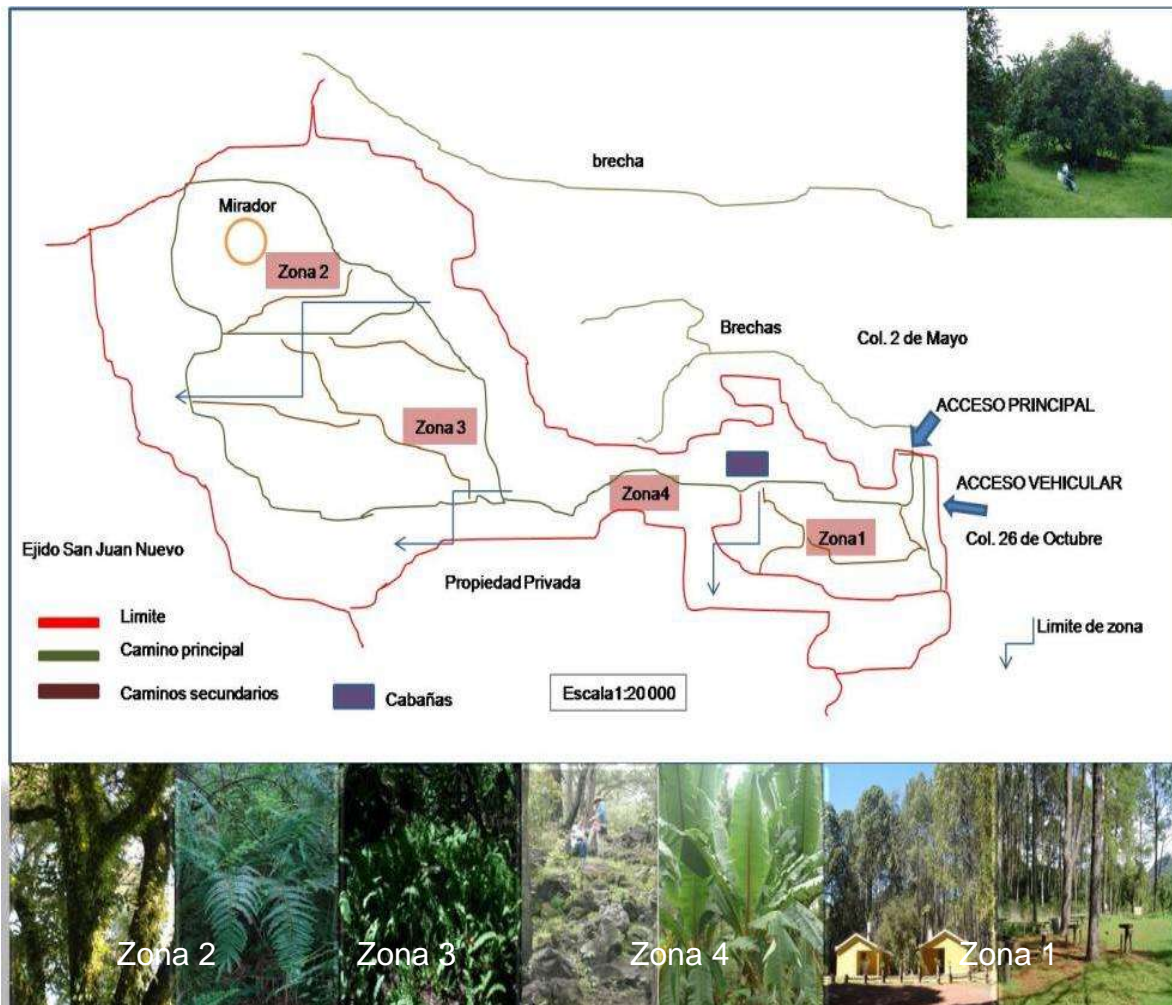


Figura 16. Ubicación de zonas de estudio y características de las mismas. (Elaborado a partir de mapas de ruta de la Reserva)

La identificación de sitios con diferentes características dentro de la Reserva permitió el estudio de la distribución y abundancia relativa de algunas de las especies del género *Bletia*, con la finalidad de determinar si presentaban cambios en estos parámetros que estuvieran relacionados a diferentes condiciones de calidad de sitio y perturbación. Esto contribuirá a generar una primera diagnosis que sirva de base para realizar posteriores estudios demográficos que permitan realizar la conservación de las especies y los hábitats más amenazados en esta reserva.



Se partió de la hipótesis de que las especies encontradas presentarían mayor distribución y abundancia relativa en sitios con menor perturbación pero se encontrarían también representadas en sitios perturbados en un mismo hábitat, lo que sería un reflejo de su capacidad de adaptación. Actualmente, son muy pocas las especies del género que están consideradas como amenazadas o en peligro de extinción según la Norma Oficial Mexicana (NOM-ECOL-059-2001). Sin embargo, aún cuando no estén oficialmente consideradas como amenazadas, algunas especies presentan poblaciones pequeñas y son escasas en el Estado (Instituto de Ecología, Patzcuaro, 2008).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se establecieron cuatro zonas con diferente grado de perturbación en la Reserva a partir de 6 recorridos de reconocimiento y delimitación mediante el marcaje con estacas de madera de 50 cm y toma de fotografías (cámara digital Sony DSC-W270 de 7.2 mega pixeles). Los recorridos se realizaron el 29 de Junio, 29 de Agosto, 9 de Septiembre, 10 y 24 de Octubre y 18 de Noviembre del año 2008. Para la delimitación de las zonas se consideraron características previamente descritas como tipo de vegetación principal y secundaria (Bello y Madrigal-Sánchez 1996, Gómez-Reyes 2005, Zavala-Álvarez 2006), suelo (Gómez-Tagle 1985), profundidad de mantillo, penetración de luz, altitud (equipo GPS marca GARMIN), presencia de especies exóticas, trazado de caminos y otras obras de infraestructura. Los límites entre las zonas se establecieron tomando en cuenta los caminos principales y secundarios que existen en la Reserva (Fig. 16). Las zonas denominadas 1 y 4 son áreas colindantes con caminos principales que sirven de tránsito a la población que visita la reserva y a los habitantes de la ciudad, además de ser sitios cercanos al acceso principal y a la zona urbana.



En estas áreas se encuentran las huertas y cabañas que sirven de albergue a turistas e investigadores. Las zonas marcadas como 2 y 3 se encuentran en la parte de mayor altitud, cercana al camino principal poco transitado por su lejanía y difícil acceso, en donde la vegetación es más densa y muestra menor grado de disturbio.

Se consultaron fichas de registro y ejemplares de herbario del género *Bletia* en el Instituto de Ecología de la ciudad de Pátzcuaro y de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, con la finalidad de determinar las especies registradas cercanas a la Reserva. Posteriormente se realizó el marcaje de ejemplares durante la época de floración (Julio a Noviembre del 2008) para llevar a cabo la determinación de las especies y seleccionar a las poblaciones que se recolectarían. Las zonas de colecta se delimitaron utilizando estacas de madera de 50 cm. Las poblaciones de orquídeas se marcaron utilizando placas de aluminio que contenían las especies y el número de ejemplar del cual se extrajeron las raíces. Estas placas se amarraron con hilo de nylon al pseudobulbo de la planta.

La determinación taxonómica de las especies se hizo en el Instituto de Ecología de la ciudad de Pátzcuaro, Michoacán por el Dr. Eduardo Zamudio. La ubicación se hizo mediante 6 recorridos de campo y con toma de fotografías en el marco del proyecto "Orquídeas del Parque Nacional Barranca del Cupatitzio" a cargo del Dr. Rafael Salgado Garciglia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Se recolectó un ejemplar de herbario por especie, mismos que quedaron bajo el resguardo de dicho Instituto. La ubicación de las tres especies se georeferenció utilizando equipo GPS (modelo eTrex Vista marca Garmin®, precisión 3 m) para posicionar las poblaciones en fotografías aéreas y/o imágenes satelitales SPOT ITRF92 georeferenciadas (INEGI, 1998) utilizando el programa Autocad 2007 donde se delimitaron los márgenes de la reserva y los principales rasgos topográficos.



La abundancia relativa de las poblaciones de orquídeas que se pudieron determinar taxonómicamente se determinó cualitativamente a partir de una escala arbitraria de cuatro valores realizada en un cuadrante de 20 x 50 m (1000 m²) por sitio, donde se consideraron abundantes a poblaciones de más de 40 ejemplares; medias a poblaciones de entre 20 y 40 ejemplares; escasas con poblaciones de menos de 20 ejemplares y nula cuando no se encontraron o no se pudieron determinar a los ejemplares.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La descripción de las zonas muestreadas dentro de la Reserva se presentan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Caracterización de las zonas estudiadas en la Reserva de acuerdo a la calidad de sitio y grado de perturbación.

ZONA	VEGETACIÓN	SUELO (FAO)	PROFUNDIDAD DE MANTILLO	ALTITUD (msnm)	PENETRACIÓN DE LUZ	PERTURBACIÓN	PRESENCIA DE MALPAÍS
1	Pino, pino-encino, huertas, vegetación exótica	Litosol y Andosol en igual proporción	De 1 hasta 15 cm en algunas zonas fuera de los caminos	1740 – 1770	Alta	Cambio de uso de suelo, urbanización cercana, introducción de especies exóticas, tránsito de personas y saqueo.	Si
2	Pino, pino-encino y arboretum	Litosol y Andosol	De 5 a 15 cm	1950 – 2050	Menor por vegetación arbórea más densa	Poco perturbada por su lejanía y difícil acceso.	Si
3	Pino-encino y Pino	Litosol	De 5 a 20 cm	1850 – 2100	Menor por vegetación arbórea más densa	Poco perturbada, conserva en su mayor parte la vegetación original	Si
4	Pino	Litosol	De 1 a 10 cm	1790 – 1840	Alta	Moderada por su cercanía a la zona urbana, suelos escasos en materia orgánica y abundante malpaís.	Si



De acuerdo con lo descrito por Gómez-Reyes (2005) se observaron cuatro unidades de vegetación: a) arboretum correspondiente a una zona de plantación con especies de los géneros *Eucaliptus*, *Cupresus* y *Pinus* localizada a 2000 msnm; b) huertas de aguacate (*Persea americana* L.) y durazno (*Prunus persica* L. Stokes) cercanas al acceso principal y a las instalaciones; c) bosque de pino (*Pinus lawsonii*, *P. douglasiana*, *P. michoacana* y *P. leiophylla*) que es la vegetación dominante en la reserva y d) bosque de pino-encino considerada como la vegetación original en toda la Reserva con dominancia de las especies de pino anteriormente descritas y *P. michoacana* var. *cornuta* y *Quercus obtusata*, *Q. castanea*, *Q. candicans*, *Q. magnoliifolia* y *Q. resinosa*.

Se encontraron para la época de floración mencionada únicamente tres especies en las cuatro zonas de la reserva: *B. purpurata*, *B. punctata* (Llave & Lex) y *B. roezlii* (Rchb. f. Linnaea) (Fig. 12). Se llevó a cabo el marcaje de 118 ejemplares que presentaron inflorescencias y que por lo tanto permitieron su determinación taxonómica. Las plantas que no florecieron durante los recorridos no fueron consideradas en la abundancia por lo que es posible que las poblaciones puedan estar subestimadas.

En cuanto a la distribución de las 3 especies se observó que *B. purpurata* y *B. roezlii* se encontraron en los cuatro sitios muestreados dentro de la Reserva. En el caso de *B. punctata* fue difícil de localizar o no se encontró en la mayoría de las zonas recorridas. Es posible que las poblaciones de esta especie hayan sido subestimadas dado que el carácter que permite distinguir las fenológicamente de *B. purpurata* es la flor dada la similitud de sus hojas.

En relación a la distribución de las especies para el año de recolecta 2008, la especie de mayor distribución en la reserva fue *B. roezlii* que se identificó en todas las zonas recorridas y se desarrolla bien tanto en zonas muy perturbadas como de escasa perturbación, en lugares cercanos a caminos o sitios abiertos (Fig. 17).



Espejo *et al.* (2002) mencionan la distribución de esta especie en bosques de pino-encino y en suelos pedregosos al igual que Hagsater *et al.* (2005) en bosques templados mexicanos.

En cuanto a *Bletia purpurata* también se encontró bien representada en los cuatro sitios de la reserva desarrollándose mejor en zonas pedregosas o de malpaís (Fig. 17). Esta especie parece adaptarse bien a lugares con escaso desarrollo de suelo y/o perturbación (Instituto de Ecología, Pátzcuaro 2008).

Como se indicó *Bletia punctata* fue difícil de localizar o no se encontró en la mayoría de las zonas recorridas y en la zona 2 aunque considerada de poca perturbación, no se localizaron individuos con inflorescencia (Fig. 17).

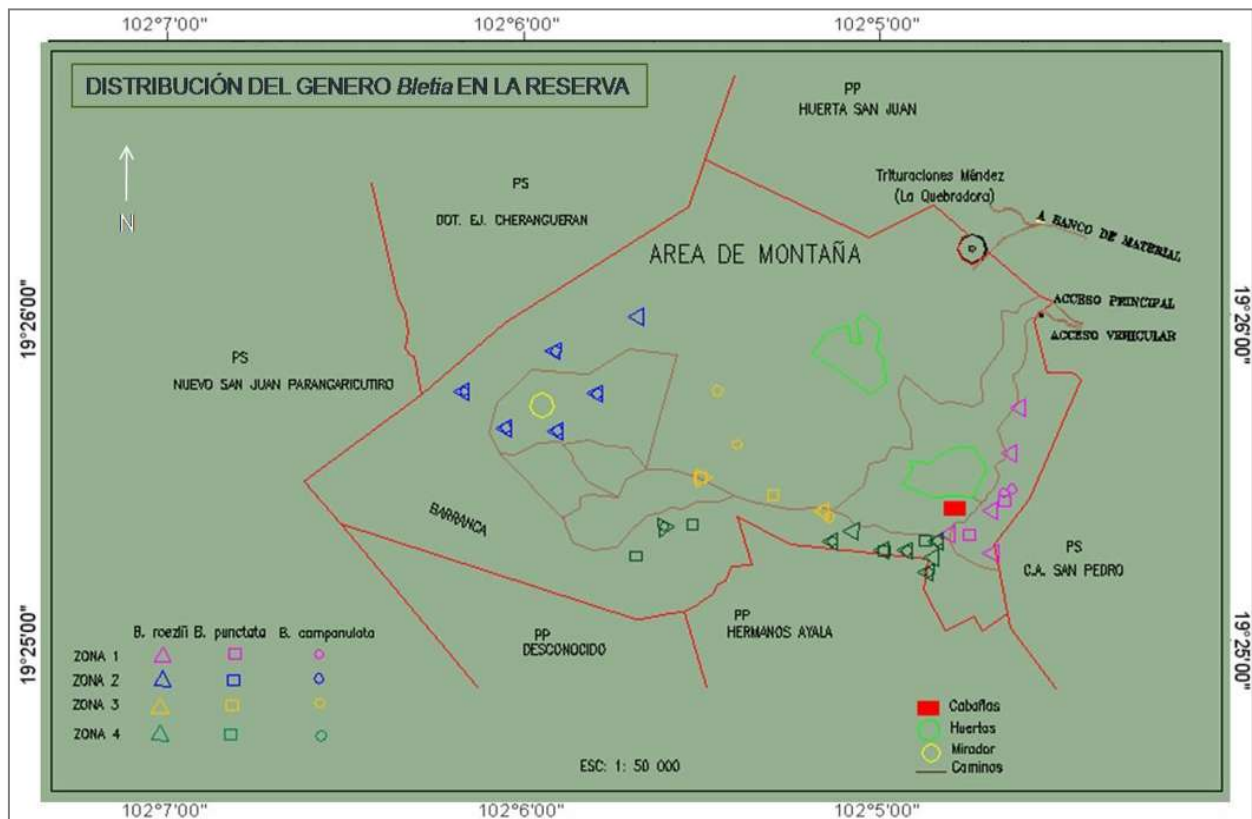


Figura 17. Mapa de distribución de las tres especies de *Bletia* en la Reserva Natural Barranca del Cupatitzio. Mapa generado a partir de imágenes satelitales SPOT E13B39B y E13B39C y cartas digitales con información predial 1:50 000. (Fuente INEGI)



En cuanto a la abundancia, *B. roezlii* además de ser la especie de mayor distribución fue también la más abundante de las tres, con poblaciones de más de 30 ejemplares por área en las cuatro zonas (Fig. 18).

Las otras orquídeas, *B. purpurata* y *B. punctata* presentaron una mayor abundancia en la zona 3 que fue la zona considerada menos perturbada ya que conserva en su mayor parte la vegetación original. Estas especies se encontraron distribuidas principalmente cerca del camino principal poco transitado por su lejanía a los accesos de la reserva y a la zona urbana. En estos sitios se encontraron manchones de más de 40 ejemplares de *B. purpurata* y de 20 a 40 ejemplares de *B. punctata*. Se ha descrito que *B. purpurata* se desarrolla bien en zonas pedregosas (malpaís) y también parece adaptarse bien a lugares con perturbación como se ha descrito anteriormente. Mientras que *B. punctata* aunque ha sido descrita creciendo en suelos someros, en la ciudad de México está considerada como extinta en este hábitat (Hágsater *et al.* 2005) y en otros hábitats aledaños también es difícil de encontrarla floreciendo anualmente (Ortega-Larrocea *com. pers.*) por lo que el estudio de sus poblaciones debe ser considerado a lo largo de un muestreo que abarque más tiempo (Fig. 18).

Aunque la abundancia relativa de *B. punctata* fue menor que para la especie anterior, también fue en la zona 3 en donde se encontraron las poblaciones más grandes. Aún con esto el número de poblaciones encontradas fue muy reducido en comparación con las otras dos especies (Fig. 18).

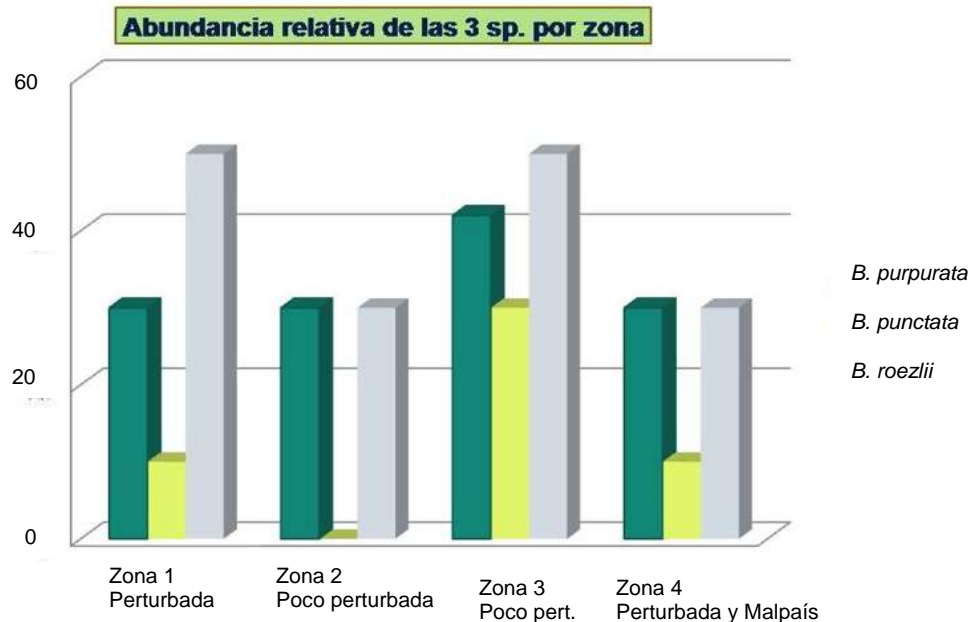


Figura 18. Abundancia relativa (abscisa) de las tres especies del género *Bletia* en las cuatro zonas de estudio en la Reserva Natural Barranca del Cupatitzio. Los valores representan No. de individuos contados en las poblaciones encontradas.

CONCLUSIONES

De las tres especies de *Bletia* encontradas en el año de muestreo (2008), *B. punctata* fue la que presentó menor distribución y abundancia. Es posible que esta especie tenga una menor capacidad de adaptación a la transformación de su hábitat ya que en los sitios que fueron señalados con algún grado de perturbación su presencia fue escasa o nula. Esto coincide además con que es la especie de menor distribución que se presenta en el Estado, descrita únicamente para dos municipios. *Bletia roezlii* se ha registrado en cuatro municipios y *B. purpurata* en ocho (Instituto de Ecología, Pátzcuaro 2008, Herbario Facultad de Biología, UMSNH, 2008).



Estudios prospectivos como el presente, son importantes porque arrojan información básica sobre la abundancia relativa que presentan algunas especies de orquídeas. Sin embargo, los estudios demográficos deben ser planeados con el muestreo de transectos y cuadrantes representativos de cada zona y a lo largo del tiempo para generar información útil en futuras prácticas de conservación y/o restauración.



LITERATURA CITADA

Bello-González M. A y X. Madrigal-Sánchez. 1996. Estudio florístico del campo experimental “Barranca del Cupatitzio”, Uruapan, Michoacán. INIFAP. Folleto científico No. 2 Uruapan, Mich. México. 47 pp.

Espejo S. A., J. García-Cruz, A. R. López, R. Jiménez y L. Sánchez. 2002. Orquídeas del Estado de Morelos. Herbario AMO, México D. F. 332 pp.

Gómez-Reyes V. 2005. Diversidad de hongos ectomicorrízicos y su relación con diferentes unidades ambientales en el Parque Nacional Barranca del Cupatitzio, Uruapan, Mich. Tesis de Maestría. Conservación y Manejo de Recursos Naturales. Facultad de Biología, UMSNH. 67 pp.

Gómez-Tagle R.A. 1985. Levantamiento de suelos del Campo Experimental Forestal Barranca del Cupatitzio y sus relaciones con la vegetación de coníferas. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 212 pp.

Hágsater E., M. A. Soto-Arenas, G. A. Salazar-Chávez, R. Jiménez-Machorro, M. A. López-Rosas y R. L. Dressler. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México D. F. 304 pp.

Instituto de Ecología, A.C. 2008. Centro Regional del Bajío. Av. Lázaro Cárdenas No. 253 A.P. 386 C.P. 61600 Pátzcuaro, Michoacán, México.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (INEGI). Carta topográfica 1:50 000 E13B39, Imágenes aéreas E13B29 y E13B39 esc. 1:40 000, 1996. Av. Lázaro Cárdenas No. 625 Col. Ventura Puente, Morelia, Mich. México.

NORMA Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001.



<http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/gacetas/227/especies.html>. (Accesada el 30 de Noviembre de 2008)

Ortega-Larrocea M. P., M. Rangel-Villafranco. 2007. Fungus-assisted reintroduction and long-term survival of two Mexican terrestrial orchids in the natural habitat. *Lankesteriana* 7: 317-321.

Sosa, V. 2007. Molecular and Morphological Phylogenetic Study of Subtribe Bletiinae (Epidendreae, Orchidaceae). *Systematic Botany* 32: 34-42.

Soto, M. A. 1988. Listado actualizado de las orquídeas de México. *Orquídea (Méx.)* 11: 233-277.

Zavala-Álvarez C. 2006. Pteridoflora del Parque Nacional Barranca del Cupatitzio, Uruapan, Michoacán, México. Tesis de Licenciatura. UMSNH. 87 pp.



CAPITULO 2. PATRONES DE COLONIZACIÓN MICORRÍZICOS EN ESPECIES DE *Bletia* EN UNA RESERVA NATURAL EN MICHOACÁN, MÉXICO.

RESUMEN

México es el centro de diversificación de la subtribu Bletinae y por tanto, una gran riqueza de especies de este género se encuentra en su territorio. A pesar de que el país cuenta con un gran conocimiento taxonómico de sus especies, poco se sabe acerca de las interacciones de las orquídeas mexicanas con sus hongos micorrízicos, importantes para estas plantas por su contribución en el aporte de nutrimentos. Con el objetivo de generar un primer estudio diagnóstico sobre el grado de micorrización natural que presentan distintas especies de orquídeas del género *Bletia* se realizó la caracterización *in situ* de la colonización micorrízica en raíces maduras de *Bletia roezlii*, *B. punctata* y *B.purpurata*. El estudio se desarrolló en un gradiente de perturbación en la Reserva Natural Barranca del Cupatitzio en Michoacán, México. Para esto se determinó la intensidad, extensión y fenología de la colonización micorrízica en la época de floración (Julio-Noviembre de 2008), la cual se presentó a lo largo de toda la raíz en *B. punctata* y *B. roezlii*, mientras que en *B. purpurata*, la intensidad y extensión de colonización fue más alta y con una mayor proporción de pelotones en proceso de digestión en los segmentos del extremo apical ($P \geq 0.01$) disminuyendo en la base junto al pseudobulbo. La intensidad de la colonización aumentó a finales del mes Noviembre que corresponde al final de la temporada de lluvias en *B. purpurata* y en *B. roezlii*, cuando las plantas comenzaban a perder las hojas. *B. roezlii* presentó una mayor colonización en las zonas más perturbadas. Es posible que esto pudiera explicar en parte que esta especie presentó una amplia distribución y abundancia en la reserva. Los estudios de los patrones de micorrización en estas especies relacionados a la calidad de sitio en un bosque y relacionados con su estado de conservación, pueden explicar en parte su persistencia en condiciones de perturbación y por tanto su grado de vulnerabilidad.



ABSTRACT

México is the diversification center of the subtribe Bletinae and therefore, a great richness of species of this genus is found in its territory. In spite of the fact that the country possesses a great taxonomic knowledge of its orchid flora, little is known about the interactions with their mycorrhizal fungi. The present work had as aim to generate a diagnosis about the in situ mycorrhization patterns in mature roots of three terrestrial orchids of the genus *Bletia*: *B. roezlii*, *B. punctata* and *B. purpurata*. The mycorrhiza characterization was performed over several roots collected in a gradient of disturbance and site quality in a *Pinus* forest at the Natural Reserve Barranca del Cupatitzio, at the Michoacan State. The mycorrhizal intensity measured in the cortex area of several transversal fragments as well as the mycorrhizal extension evaluated along the long of the entire root was recorded during the plant flowering season (July - November, 2008). The intensity and extension of the mycorrhiza colonization were more dependent of the species than over the differences in the habitat. The species *B. roezlii* present a deeper mycorrhizal colonization. A major proportion of mycorrhized cells were found for the three species in the segments near of the apical side, diminishing in the base close to the corm. The same was true for the degree of digestion of these structures, where more abundant intact pelotons and in degradation phase were found in the apical extreme. A high heterogeneity among the intensity and the extension of mycorrhization was recorded inside roots of the same species and also inside the same plant. As a result, significant differences in mycorrhizal colonization due to habitat transformation or site quality were avoided. Even when for some *Bletia* species, a broad distribution and abundance in this habitat is noticed, deeper studies on mycorrhizal colonization phenology and associated endophytes may partly explain their persistence in terms of disturbance and therefore their vulnerability to habitat transformation.



INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae tiene una amplia distribución en el mundo y una gran diversidad ya que representa el 10% de las plantas con flor (Dressler 1981). En la naturaleza, como sucede con la mayoría de las plantas, las orquídeas dependen de sus hongos endófitos en diferentes etapas de su ciclo de vida desde la germinación hasta el desarrollo de la planta adulta, viviendo en simbiosis al menos en las primeras etapas de desarrollo (Vij *et al.* 2002). Cuando las plantas son adultas, el grado de dependencia varía y aún en aquellas especies fotosintéticas en su totalidad, las raíces continúan estableciendo la micorriza y su micotrofia persiste y suplementa la fotosíntesis durante todo su ciclo de vida (Rasmussen y Whigham 2002, Ortega-Larrocea y González 2008). Tal es el caso de muchas orquídeas terrestres que incrementan su biomasa durante la época de follaje y presentan raíces poco ramificadas y gruesas con un área superficial que favorece poco la absorción de agua pero permite un córtex bien desarrollado donde puede hospedarse el hongo (Rasmussen 1995).

Vij *et al.* (1985) señalaron que la intensidad de la micorrización variaba en las especies y sus hábitats, de tal manera que las especies que habitan localidades ricas en humus se encuentran más micorrizadas que aquellas que crecen en suelos secos y escasos en materia orgánica. También se ha observado que hay mayor cantidad de células con pelotones no digeridos durante la época de inactividad de la planta (no crecimiento), mientras que en la etapa de crecimiento aumenta la cantidad de células con pelotones digeridos en orquídeas terrestres como *Bletilla* y *Sobralia* (Siddique y Raghuvanshi 1993). Rasmussen y Whigham (2002) observaron que en especies con floración en invierno, la fotosíntesis y la micotrofia se utilizan simultáneamente y que la colonización de la planta por el hongo prevalece durante el invierno en toda su longitud con muy pocos sitios con pelotones degradados cuando la raíz es joven y la planta presenta hojas.



La variabilidad en la dependencia micorrízica puede ser intra o interespecífica y contempla diferentes estrategias nutricionales y patrones de colonización y la mayor parte de los estudios están dados para orquídeas terrestres boreales o epífitas neotropicales. Es importante contar con información de especies de orquídeas terrestres de climas tropicales para comprender si la dependencia micorrízica es un factor que les impide su persistencia en sitios con perturbación y como consecuencia su distribución sea más restringida.

Sin embargo, poco se sabe sobre la distribución de las orquídeas neotropicales y su micotrofia. Por ejemplo, el centro de diversificación del género *Bletia* se encuentra en México con un número aproximado de 50 especies, la gran mayoría endémicas (Soto 1988). Algunas de las especies del género se desarrollan bien en sitios con diferente grado de perturbación o lugares con escaso desarrollo de suelo, así como en suelos pedregosos o malpaís (Espejo *et al.* 2002, Hágsater *et al.* 2005, Ortega-Larrocea y Rangel-Villafranco 2007), mientras que otras presentan escasa distribución o se encuentran al borde de la extinción (Hágsater *et al.* 2005).

El estudio comparativo de la relación micorrízica entre las orquídeas en un mismo hábitat y en diferentes especies de un mismo género, podría aportar información sobre si el grado de micorrización depende de las transformaciones del hábitat o es un patrón que presenta el género y es poco influenciado por la fenología de la planta o la transformación del hábitat. El propósito de este estudio fue describir los patrones de colonización micorrízica en raíces maduras de tres especies pertenecientes al género *Bletia*: *B. purpurata* (A. Rich et Gal), *B. punctata* (Llave & Lex) y *B. roezlii* (Rchb. f. Linnaea) en el centro-oeste de México. El estudio se hizo en sitios con diferente grado de perturbación de un bosque natural protegido de Pino durante la época de lluvias (Julio-Noviembre de 2008) que corresponde al periodo de crecimiento y floración de las orquídeas.



El estudio se realizó en la Reserva Natural Barranca del Cupatitzio (N 19° 25' y 19° 26' 19", W 102° 04' 06" y 102 07' 07") localizada en el municipio de Uruapan, Michoacán, México. La vegetación principal es bosque de pino, pino-encino y relictos de bosque mesófilo de montaña y algunas de las especies representativas son *Pinus douglasiana*, *P. michoacana* var. *cornuta*, *P. lawsonii*, *Quercus obtusata*, *Q. castanea*, *Q. resinosa*, *Alnus jorullensis*, *Carpinus caroliniana* y *Clethra mexicana* entre otros (Bello y Madrigal 1996, Zavala-Álvarez 2006). A pesar de ser un área protegida, la Reserva sufre los efectos de su cercanía a la zona urbana. El disturbio se da en las zonas colindantes a ella y consiste principalmente en la modificación de la cubierta vegetal por el paso constante de personas y por la introducción de especies exóticas; cambios en el uso de suelo de bosque a huertas hortícolas de aguacate y durazno principalmente; la presencia de plagas que obliga a cortar árboles enfermos y que da lugar a zonas más abiertas y con mayor penetración de luz. En las áreas más lejanas a la localidad, se sigue conservando su vegetación natural y están más conservadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se establecieron cuatro zonas con diferente grado de perturbación en la Reserva a partir de 6 recorridos de reconocimiento y delimitación y toma de fotografías digitales. Para la delimitación de las zonas se consideraron características previamente descritas como tipo de vegetación principal y secundaria (Bello y Madrigal-Sánchez 1996, Gómez-Reyes 2005, Zavala-Álvarez 2006), suelo y profundidad de mantillo (Gómez-Tagle 1985), penetración de luz, presencia de especies exóticas.



Las raíces fueron recolectadas en las 4 zonas para tener un muestreo representativo de los sitios y ver si existen distintos morfotipos micorrízicos asociados e intensidad de la colonización. El estudio se llevó a cabo durante el otoño que es la mejor época para la recolecta porque es cuando se puede reconocer al hospedero dado que es el periodo de crecimiento y floración de las plantas (estas plantas tienen hojas muy similares por lo que sin la flor, su determinación puede ser imprecisa). Además según lo descrito para otras especies que producen inflorescencias en otoño-invierno, esta época puede ser el mejor tiempo para el aislamiento de los hongos asociados dado que corresponde a la época en la que se observa una mayor extensión en la colonización (Rasmussen y Whigham 2002).

El muestreo consistió en la recolecta de un mínimo de 3 raíces de 4 plantas por especie y por zona de colecta: 4 sitios x 3 especies x 4 plantas x 3 raíces = 144 raíces. Las plantas muestreadas se seleccionaron considerando la presencia de inflorescencia y la facilidad para la extracción de la raíz. En total se analizaron 161 raíces (61 raíces de *B. roezlii*, 53 de *B.purpurata* y 47 de *B. punctata* para la cual no hubo plantas en una de las zonas). Se recolectaron raíces maduras con longitudes mayores a los 6 cm. Las raíces se recolectaron intactas de la base del pseudobulbo al ápice manteniendo la orientación. Se transportaron al laboratorio en frío dentro de papel aluminio rodeadas de sustrato para evitar su desecación. El material se procesó en el laboratorio en un periodo máximo de una semana después de la recolecta.

El material que no se procesó de inmediato fue preservado con alcohol-ácido acético-formaldehído (FAA) (90 mL de alcohol al 70 %, 5 mL de ácido acético glacial y 5 mL de formaldehído al 37 %) por 4 ó 5 días y se conservó en alcohol al 70 % (Mukerji *et al.* 2002).

La micorrización fue evaluada en cortes transversales de raíces tomando de referencia el ápice, parte media y parte basal.



Previo a la realización de los cortes, se midió la longitud de todas las raíces y se realizaron cortes transversales de 1 mm de espesor cada 8 a 10 mm a partir de la base. Los cortes se tiñeron con Fucsina ácida (0.01 % w: v en ácido láctico-glicerol-agua desmineralizada 14:1:1) y se montaron con PVLG o glicerol al 50 %. Cada sección se analizó para determinar la intensidad de la colonización por la proporción de espacios corticales ocupados por pelotones y se evaluaron con una escala cualitativa de 6 valores representados como 0, 12, 25, 50, 75 y 100 % del área cortical colonizada; la extensión de la colonización por el número de segmentos colonizados a lo largo de la raíz.

Se determinó además el estado de digestión de los pelotones y se clasificaron como intactos (con hifas sin digerir con su contenido citoplasmático completo), en proceso de digestión (con hifas parcialmente digeridas e hifas intactas) y digeridos (con hifas no distinguibles) según Rasmussen y Whigham (2002) como intactos, en proceso de degradación y digeridos (Fig. 19). Las observaciones se realizaron en microscopio a un aumento de 400 x.

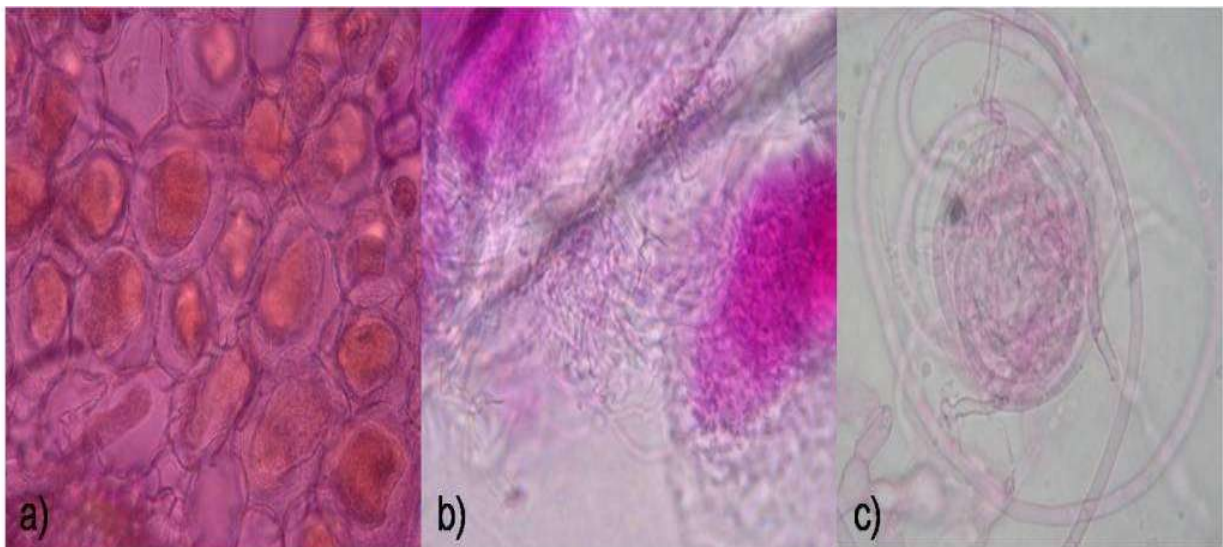


Figura 19. Pelotones en diferente estado de digestión. a) Digeridos (40x); b) en proceso de digestión (100x) y c) intactos (100x). Tinción con Fucsina ácida.



De algunas de las raíces, se midieron los diámetros en cada segmento analizado y grosor de velamen. Se calcularon valores promedio de la intensidad y extensión de los segmentos colonizados por raíz y por especie y los resultados se presentaron en porcentajes.

El análisis entre especies, sitios y recolectas, se realizó comparando los valores promedio de los parámetros cuantificados en donde para la intensidad y extensión, se compararon únicamente las raíces que presentaron colonización. Los resultados se compararon estadísticamente aplicando Anova de dos vías y cuando se encontró significancia se sometieron a prueba de Tukey. Para los análisis estadísticos se utilizó el programa JMP V. 6.

RESULTADOS

Las tres especies estudiadas mostraron colonización micorrízica a todo lo largo de la raíz y en todas las raíces de una misma planta encontrando regiones con más del 80 % de colonización o zonas con porcentajes bajos (< 12 %) o no colonizadas (Cuadro 2). La intensidad de la colonización varió considerablemente a lo largo de la raíz de una misma especie y entre las especies, como se observa para la mayoría de las especies terrestres y muchas epífitas (Hadley y Williamson 1972, Katiyar *et al.* 1986, Cruz-Blasí 2007). Esta densa colonización micorrízica se documentó para la época de lluvias que es también el periodo de crecimiento activo y de floración.



Cuadro 2. Promedio de intensidad (% \pm d.s.) de la colonización micorrízica por segmento (cm) y a lo largo de la raíz en las 3 especies de orquídeas terrestres en la Reserva Barranca del Cupatitzio. C= cormo, s= diferencia significativa, ns=no hay diferencia significativa.

Segmento de raíz (cm)	<i>Bletia purpurata</i>	<i>Bletia punctata</i>	<i>Bletia Roezlii</i>
Base		4.0 \pm 6.9 (n=7)	6.0 \pm 5.4
17	C	2.4 \pm 5.4 (n=7)	25.0 \pm 16.3
16		14.5 \pm 20.0	12.0 \pm 16.1
15	6.0 \pm 6.9 (n=5)	3.4 \pm 5.4 (n=11)	31.0 \pm 14.9 (n=12)
14	0.0 (n=5)	7.8 \pm 13.75 (n=13)	27.4 \pm 20.5 (n=15)
13	7.4 \pm 13.1 (n=11)	9.5 \pm 14.5 (n=16)	26.1 \pm 19.3 (n=23)
12	13.9 \pm 19.8 (n=14)	12.3 \pm 18.7 (n=21)	37.3 \pm 27.4 (n=29)
11	22.3 \pm 28.1 (n=17)	20.1 \pm 26.1 (n=22)	35.7 \pm 27.2 (n=23)
10	12.3 \pm 18.6 (n=17)	32.8 \pm 27.5 (n=24)	33.0 \pm 30.2 (n=42)
9	11.6 \pm 23.9 (n=21)	25.9 \pm 27.7 (n=29)	24.8 \pm 27.6 (n=53)
8	27.8 \pm 26.7 (n=35)	26.5 \pm 27.7 (n=35)	50.6 \pm 32.3 (n=58)
7	24.3 \pm 22.8 (n=41)	22.4 \pm 26.5 (n=39)	42.4 \pm 30.0 (n=59)
6	21.0 \pm 28.0 (n=46)	23.9 \pm 28.4 (n=41)	30.3 \pm 29.7 (n=59)
5	31.2 \pm 33.1 (n=46)	33.1 \pm 32.8 (n=42)	32.5 \pm 32.2 (n=59)
4	27.8 \pm 32.5 (n=46)	26.0 \pm 30.4 (n=42)	41.1 \pm 32.8 (n=59)
3	30.8 \pm 33.3 (n=46)	32.5 \pm 32.8 (n=42)	38.2 \pm 34.4 (n=59)
2	27.2 \pm 29.3 (n=46)	23.4 \pm 29.0 (n=42)	40.5 \pm 32.2 (n=59)
1	22.4 \pm 29.6 (n=46)	19.5 \pm 27.4 (n=42)	29.3 \pm 30.6 (n=59)
ápice			
Media de la colonización micorrízica del córtex (%)	25.6 \pm 8.6s (P= 0.04)	25.2 \pm 10s (P= 0.03)	34.3 \pm 10.6ns



La colonización total promedio por especie en ningún caso fue mayor al 35 % y fue *B. roezlii* la que presentó los porcentajes de colonización total promedio significativamente más altos ($P \leq 0.03$) (Fig. 20).

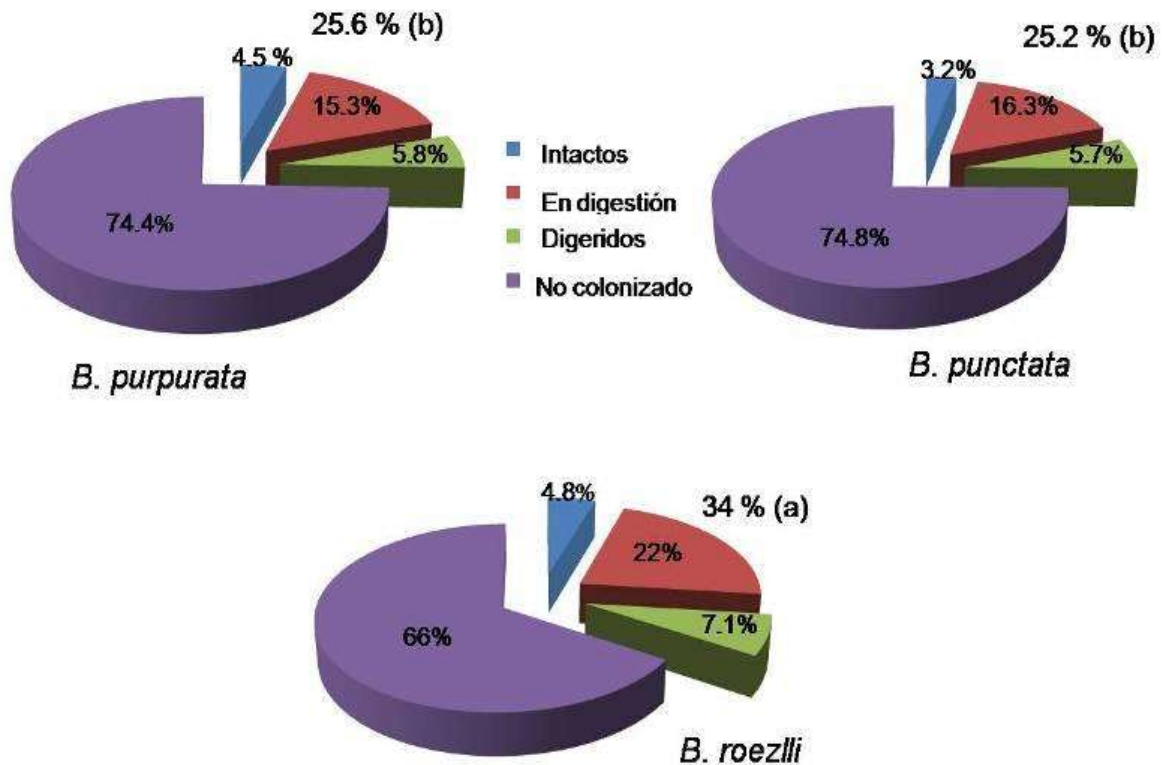


Figura 20. Porcentajes promedios totales de los estados de digestión de pelotones en tres orquídeas terrestres de la Reserva Barranca del Cupatitzio. Los colores indican el estadio y letras diferentes señalan diferencias significativas entre las especies (Tukey $P \leq 0.03$ %)

En estas raíces fue posible distinguir pelotones en diferente etapa de digestión siendo los segmentos que tenían pelotones en proceso de digestión los que presentaron los porcentajes más altos de colonización en el córtex. Este estado se encontró prácticamente en toda la longitud de las raíces, con un 15.3 % para *B. purpurata*, 16.3 para *B. punctata* y 22 % para *B. roezlii*.



En las zonas de córtex que tenían los pelotones intactos se presentaron los porcentajes más bajos (Figs. 21 y 22).

Solamente el 10.6 y el 13.2 % del total de raíces analizadas para *B. punctata* y *B. purpurata* respectivamente, no mostraron colonización, mientras que en *B. roezlii* únicamente el 3.2 % de las raíces no estaban colonizadas.

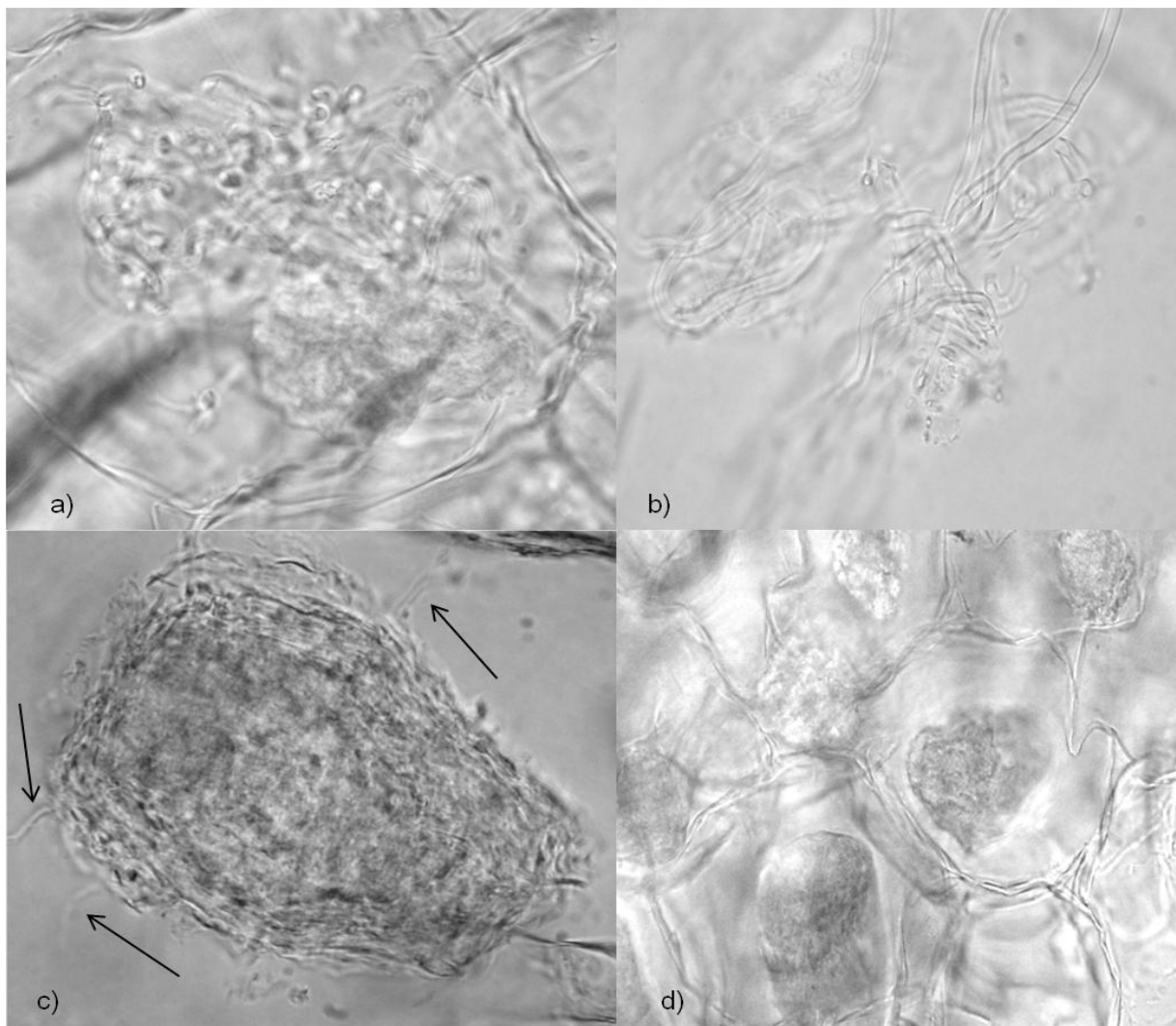


Figura 21. Pelotones intactos y en diferente estado de digestión. a) Pelotones intactos en *B. punctata* (100x); b) Pelotones intactos en *B. roezlii* (100x); c) en proceso de digestión (las flechas negras muestran hifas intactas y en el centro la masa compacta de hifas digeridas) en *B. purpurata* (100x) y d) pelotones digeridos en *B. roezlii* (40x).



Al comparar la intensidad y extensión de la colonización en las raíces por segmento se encontró que en *B. purpurata* y *B. punctata* los porcentajes más altos se concentraron en las regiones más cercanas al ápice disminuyendo en las zonas cercanas al cormo (Fig. 22). Los pelotones intactos estuvieron ausentes en los primeros centímetros de la base del cormo y en mayor proporción hacia el ápice en *B. punctata*. En la orquídea *B. roezlii* se observó una colonización uniforme a lo largo de todas las raíces (Fig. 22). Esto corrobora lo señalado por Cruz-Blasí (2007) para orquídeas mexicanas epífitas sobre los patrones de distribución de la colonización en la raíz en el sentido de que las zonas apicales presentaron células corticales densamente infectadas (a excepción de la zona meristemática) mientras que en las zonas cercanas a la parte basal la intensidad de la colonización disminuye, al menos para 2 especies en el presente estudio.

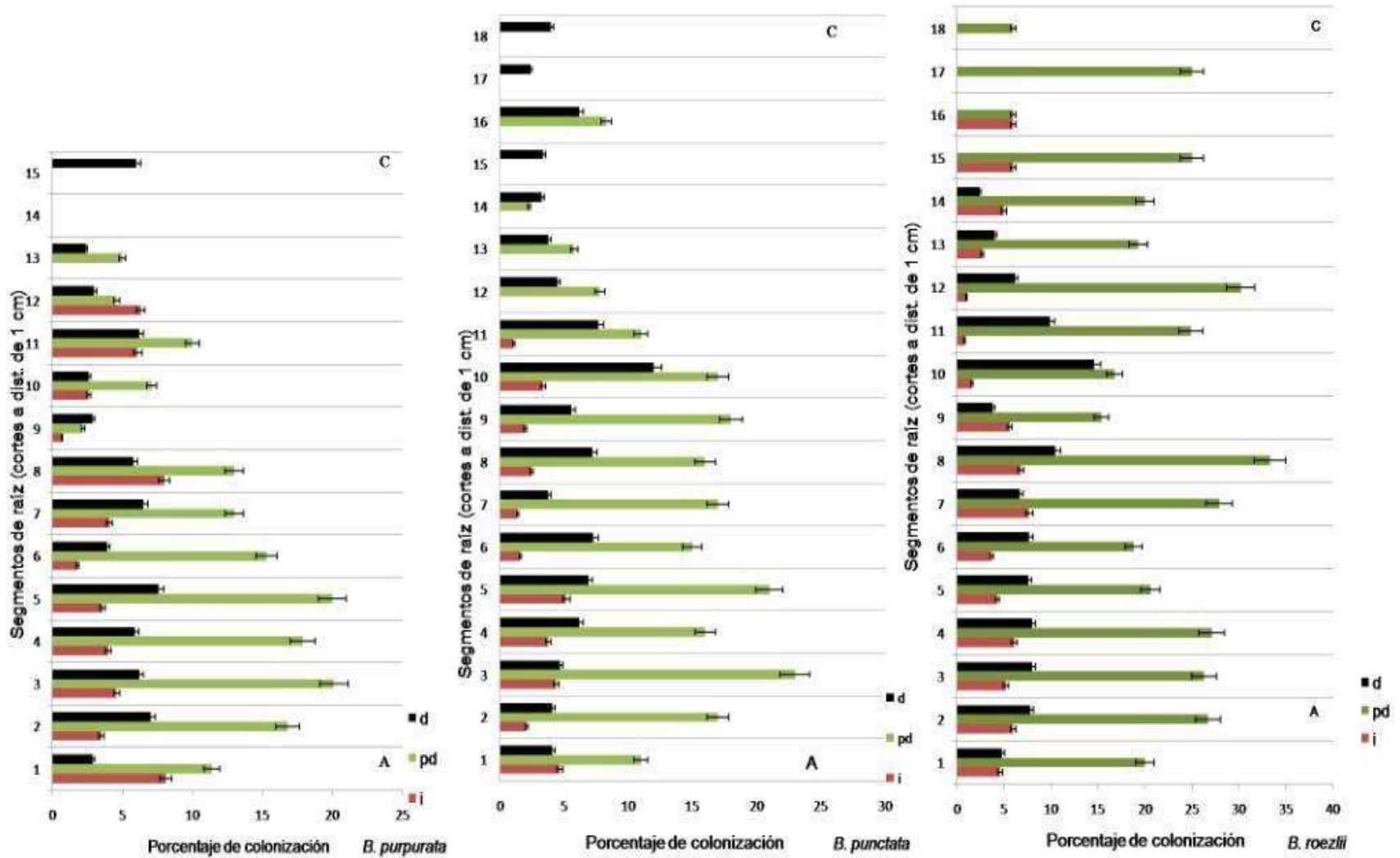


Figura 22. Extensión, intensidad y estado de digestión promedio de colonización micorrízica por especie. *B. purpurata* (intensidad de la colonización $P \leq 0.05$ % Anova), *B. punctata* (intensidad de la colonización $P \leq 0.04$ Anova), *B. roezlii* (no hubo significancia). d = pelotones digeridos, pd = en proceso de digestión, i = intactos, A = ápice, C = base cerca del cormo.



Con relación a los distintos sitios, la especie *B. roezlii* no presentó diferencias significativas en su colonización micorrízica atribuibles al grado de conservación de los sitios en la Reserva o a la calidad de sitio (Fig. 23). La especie *B.purpurata* presentó una mayor heterogeneidad observando la colonización micorrízica más alta en las zonas conservadas con buena calidad de sitio. *B. punctata* presentó una colonización significativamente más baja en el sitio de mayor perturbación ($P= 0.02$) y micorrización similar en sitios con suelos pedregosos (malpais) o zonas poco perturbadas (Fig. 23).

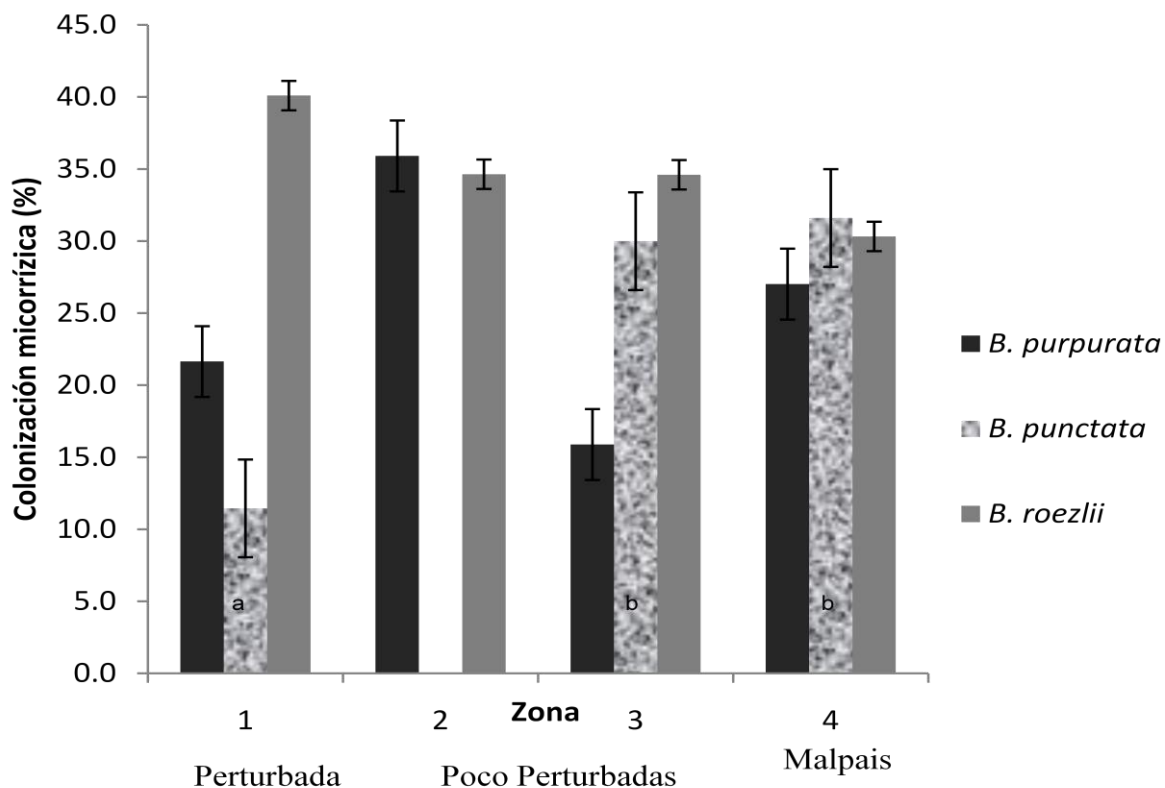


Figura 23. Comparación de porcentajes de colonización promedio en tres orquídeas terrestres por zona y especies. Letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios de colecta para *B. punctata* ($P \leq 0.02$ Tukey).



DISCUSIÓN

Las tres especies del género *Bletia* analizadas presentaron una micorrización extensiva a lo largo de todas sus raíces, siendo mucho más intensa y activa en las zonas de crecimiento. En estas últimas zonas, se encontró la mayor proporción de pelotones intactos y en vías de digestión y en las zonas basales o más senescentes, predominaron casi exclusivamente los pelotones ya digeridos.

Aún cuando hubo una gran heterogeneidad en cuanto a la intensidad de la micorrización en el córtex, la mayor parte de los segmentos analizados tuvieron más del 20 % de las células colonizadas activamente. Esto coincide con el crecimiento intenso de las plantas en la época de lluvias que es el periodo de floración, observando los máximos porcentajes cuando las plantas comenzaban a formar las flores y desarrollaban las cápsulas coincidiendo con la senescencia de las hojas. Siddique y Raghuvanshi (1993) señalaron que la colonización micorrízica tiene una marcada influencia en el crecimiento y desarrollo de especies micótrofas facultativas y esto puede explicar los patrones de colonización en las tres especies estudiadas.

Esto ha sido también observado para otras especies de orquídeas terrestres de hábitats con climas templados y ricos en materia orgánica (Hadley and Williamson 1972, Rasmussen 1995). Esto también se puede deber a que las raíces muestreadas eran maduras y como lo señalaron Rasmussen y Whigham (2002), la cantidad de pelotones digeridos se incrementa al aumentar la madurez de las raíces. Esto puede explicar la mayor proporción de los pelotones en proceso de digestión que se encontraron sobre todo en las zonas activas de crecimiento de las raíces.



Sin embargo, aunque en las tres especies la mayoría de las raíces se encontraron colonizadas, se presentaron grandes diferencias inclusive en una misma planta, siendo la heterogeneidad de la micorrización mucho mayor inter-radicalmente que intra-radicalmente, como se señala para la mayoría de las especies terrestres facultativas y epífitas (Hadley and Williamson 1972, Katiyar *et al.* 1986).

Cruz-Blasí (2007) describe en algunas orquídeas epífitas mexicanas, patrones de micorrización de igual modo en zonas apicales con células corticales densamente colonizadas. En las zonas cercanas a la parte basal, describe una disminución en la intensidad de la colonización y en algunos casos, se relaciona con el diámetro de la raíz o grosor del velamen. Los patrones de colonización para otras especies de Bletias en México en un malpaís xerófito descritos por Rangel-Villafranco y Ortega-Larrocea (2007), señalan una mayor intensidad y extensión de la colonización para *B. campanulata* y *B. urbana*. Ambas especies fueron estudiadas en la misma época fenológica, la floración que coincide con la época de lluvias en el México Central. Sin embargo, una gran diferencia en este estudio es la ausencia de velamen en las raíces, en contraste con el siempre presente en las bletias de los pinares de este estudio. Es posible que la presencia de velamen contribuya a una mayor heterogeneidad en la colonización intra e interriginal descrita aquí en comparación a las especies que se desarrollan en el matorral xerófito, en donde casi la totalidad de las raíces analizadas están micorrizadas en más de un 90 % (Ortega-Larrocea *com. pers.*).

El muestreo de las raíces fue robusto para detectar diferencias en los patrones de colonización atribuibles a los cambios en el hábitat de distribución en los bosques de Pino de Michoacán. Sin embargo, no se pudieron encontrar diferencias significativas contundentes intra o interespecíficas dadas por el disturbio del hábitat o por su calidad del sitio.



Los datos parecen indicar que las especies de *Bletia* en general presentan patrones de micorrización a lo largo de toda la extensión de las raíces y que éstos pueden variar en intensidad dependiendo de las especies. Algunas de las especies se encuentran con mayor abundancia en los distintos sitios y otras es mucho más difícil observarlas como *Bletia punctata*. Es posible que un posterior estudio donde se relacione la abundancia de las plantas, su condición micorrízica y los endófitos asociados, permita poner en evidencia si la transformación del hábitat tiene repercusiones en la distribución de estas orquídeas.

CONCLUSIONES

B. roezlii fue la especie que mayor porcentaje de colonización mostró y la que tuvo menor fluctuación en estos valores tanto en las diferentes fechas de colecta como en zonas con diferente grado perturbación, y dado que en la zona señalada como más deteriorada la intensidad en la colonización fue la más alta se puede decir que el éxito adaptativo de esta especie en sitios con gradiente de perturbación se puede explicar en parte por su capacidad de asociarse con los hongos micorrízicos.

Mientras que la disminución en las poblaciones naturales de *B. punctata* también puede explicarse en parte por la menor presencia del hongo en la raíz. Esta especie ha sido descrita creciendo en malpaís en la Ciudad de México y está considerada como extinta en este hábitat (Hágsater *et al.* 2005) y en otros hábitats aledaños también es difícil de encontrarla floreciendo anualmente (Ortega-Lerrocea *pers.commun.* 2009). En el estado de Michoacán sólo se reporta su presencia en dos municipios (Instituto de Ecología, Pátzcuaro 2008). Estudios como el presente son importantes ya que el conocimiento de la interrelación de las orquídeas con otros organismos, como los hongos micorrízicos pueden arrojar información valiosa para programas de reintroducción de estas plantas.



LITERATURA CITADA

Bello-González M.A. y X. Madrigal-Sánchez. 1996. Estudio florístico del campo experimental "Barranca del Cupatitzio", Uruapan, Michoacán. INIFAP. Folleto científico No. 2 Uruapan, Mich. México. 47 pp.

Cruz-Blasí J. 2007. Colonización micorrízica y diversidad de hongos micorrízicos de algunas especies de orquídeas epífitas tropicales en el sureste de Chiapas, México. Tesis de Maestría. Instituto de Postgraduados, Montecillos, Texcoco, México. 66 pp.

Dressler R.L. 1981. The orchids: natural history and classification. Cambridge; MA, USA. Harvard University Press.

Espejo S.A., A. R. García-Cruz, F. López, R. M. Jiménez y L. S. Sánchez. 2002. Orquídeas del Estado de Morelos. Herbario AMO, México D. F. 332 pp.

Gómez-Reyes V. 2005. Diversidad de hongos ectomicorrízicos y su relación con diferentes unidades ambientales en el Parque Nacional Barranca del Cupatitzio, Uruapan, Mich. Tesis de Maestría. Conservación y Manejo de Recursos Naturales. Facultad de Biología, UMSNH. 67 pp.

Gómez-Tagle R.A. 1985. Levantamiento de suelos del Campo Experimental Forestal Barranca del Cupatitzio y sus relaciones con la vegetación de coníferas. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 212 pp.

Hadley G. y B. Williamson. 1972. Features of mycorrhizal infection in Malayan orchids. *New Phytologist*, 71: 11-18.



Hágsater E., M. A. Soto-Arenas, G.A. Salazar-Chávez, R. Jiménez-Machorro, M.A. López-Rosas y R. L. Dressler. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México D. F. 304 pp.

Instituto de Ecología, A.C. 2008. Centro Regional del Bajío. Av. Lázaro Cárdenas No.253 A.P. 386 C.P. 61600 Pátzcuaro, Michoacán, México.

Katiyar R.S., G. D. Sharma y R. R. Mishra. 1986. Studies on mycorrhizal associations in terrestrial orchids. In: Biology, Conservation and Culture of Orchids. Ed.Vij, S.P. pp 63-70.

Mukerji K.G., C. Manoharachary y B. P. Chamola. 2002. Techniques in mycorrhizal studies. Kluwer Academia Publishers.Netherlands.521 pp.

Ortega-Larrocea M.P. y M. Rangel-Villafranco. 2007. Fungus-assisted reintroduction and long-term survival of two Mexican terrestrial orchids in the natural habitat. *Lankesteriana* 7: 317-321.

Ortega-Larrocea M.P. y D. González. 2008. Los hongos asociados a las orquídeas terrestres en la restauración. En: Heredia A.G. (ed.), Tópicos sobre diversidad, ecología y usos de los hongos microscópicos en Iberoamérica. Instituto de Ecología A.C. México, cap. 11, 218-227.

Rangel-Villafranco M. and M. P. Ortega-Larrocea. 2007. Efforts to conserve endangered terrestrial orchids *in situ* and *ex situ* at two natural reserves within Central Mexico. *Lankesteriana* 7:326-333.

Rasmussen H.N. 1995. Terrestrial Orchids from seed to mycotrophic plant. Cambridge University Press. Great Britain. 444 pp.



Rasmussen H.N. y D.F. Whigham. 2002. Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. *New Phytologist* 154 (3): 797-807.

Siddique S. y A. Raghuvanshi. 1993. Seasonal changes in *Vanda tasellata* mycorrhizae. *Journal of the Orchid Society of India*, 7: 83-85.

Soto M.A. 1988. Listado actualizado de las orquídeas de México. *Orquídea (Méx.)* 11:233-277.

Vij S.P. M. Sharma y S. Datta. 1985. Mycorrhizal endophytes of *Spiranthes lancea* (Sw) Baker (Orchidaceae). *Journal of Indian Botanical Society*, 64: 175-179.

Vij S.P., T. N. Lakhanpal y A. Gupta. 2002. Orchidoid Mycorrhiza and Techniques to investigate. In: Mukerji et. al. (eds.) 2002. *Techniques in Mycorrhizal Studies*, 385-434. Kluwer Academic Publishers.

Zavala-Álvarez C. 2006. Pteridoflora del Parque Nacional Barranca del Cupatitzio, Uruapan, Michoacán, México. Tesis de Licenciatura. UMSNH. 87 pp.



CAPITULO 3. AISLAMIENTO *IN VITRO* Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS MICORRÍZICOS DE ORQUÍDEAS TERRESTRES DEL GÉNERO *Bletia* EN UNA RESERVA NATURAL, CON FINES DE CONSERVACIÓN.

RESUMEN

En la actualidad muchas especies de orquídeas se encuentran en alguna categoría de riesgo contando con muy poco conocimiento sobre la interacción que guardan con otros organismos en etapas críticas de su ciclo de vida y que resultan indispensables para una conservación sostenible de estas plantas. En México poco se sabe sobre la simbiosis entre estas orquídeas y sus hongos micorrízicos probablemente involucrados, junto con otros factores, en su distribución geográfica y competencia ecológica. En este estudio se llevó a cabo el aislamiento, caracterización morfológica e identificación de hongos micorrízicos asociados a raíces de plantas adultas de 3 especies de orquídeas terrestres del género *Bletia*: *B. roezlii*, *B. punctata* y *B. purpurata* en gradientes de perturbación en la Reserva Natural Barranca del Cupatitzio con la finalidad de analizar la variabilidad fúngica presente entre especies de orquídeas relacionada con grado de disturbio.

Se realizaron aislados de pelotones individuales de 55 raíces (incluidas las 3 especies) que se agruparon en cuatro morfotipos diferentes. Estos morfotipos se caracterizaron por apariencia de la colonia, tasas de crecimiento y dimensión de estructuras. Los morfotipos uno y tres presentaron tasas de crecimiento muy lentas, mientras que en los morfotipos dos y cuatro fueron más rápidas. Los morfotipos tres y cuatro formaron micelio de apariencia algodonosa a manera de anillos y listones. Mientras que los morfotipos 2 y 4 crecieron sumergidos en el medio de cultivo.



El morfotipo dos es el que presenta al parecer mayor capacidad de adaptación y dispersión ya que se pudo aislar de las cuatro zonas estudiadas y de las tres especies de orquídeas sin importar el grado de disturbio. Las raíces de *B. roezlii* y *B. punctata* presentaron más de un morfotipo asociado a una misma raíz, no así y *B. purpurata* de la que se aisló un solo morfotipo por raíz.

Las dimensiones obtenidas para las estructuras analizadas y características morfológicas corresponden a las descritas para el género forma *Rhizoctonia* y todos los aislados son afines al género *Epulorhiza*.

Estos resultados mostraron que la capacidad de adaptación y dispersión de estas orquídeas puede estar relacionada en parte por la presencia de hongos micorrízicos en la raíz que les confieren un mayor éxito ecológico. Especies como *B. roezlii* que parecen ser menos selectivas hacia el hongo con el que se asocian presentaron una mayor distribución y tolerancia a la perturbación en la reserva. Este éxito también puede estar dado por la capacidad de adaptación y patrones de distribución de los hongos micorrízicos asociados.



ABSTRACT

In the present study were realized the isolation, morphological characterization and identification of mycorrhizal fungi associated with roots of adult plants of 3 species of terrestrial orchids of the genus *Bletia*: *B. roezlii*, *B. punctata* and *B. purpurata* in disturbance gradients in the Natural Reserve Barranca del Cupatitzio with the aim of analyzing the fungal variability present among species of orchid related with degree of disturbance.

The dimensions obtained for the structures analyzed and morphological characteristics correspond to those described for the genus-form *Rhizoctonia* and all isolates are related to genus *Epulorhiza*.

These results show that the adaptation ability and spread of these orchids may be due to the presence of mycorrhizal fungi in the roots that give them greater ecological success because species such as *B. roezlii* that appear to be less selective towards the associated fungus had a greater distribution and showed tolerance to disturbance in the reserve, and this same success can also be caused by the resilience and distribution patterns of the associated mycorrhizal fungi.

INTRODUCCIÓN

Las orquídeas son consideradas plantas evolutivamente avanzadas dentro del orden Liliales y comprende aproximadamente 1000 géneros y 35 000 especies (Batty *et al.* 2002, Hagsater *et al.* 2005). Sin embargo en la actualidad una gran cantidad de estas especies se encuentran en alguna categoría de riesgo como resultado directo o indirecto de actividades humanas entre las que se incluyen destrucción de hábitats y degradación, así como colecta de ejemplares silvestres (Batty *et al.* 2002, Hollick 2004).



Para llevar a cabo la reintroducción de estas orquídeas o iniciar programas de conservación que sean sostenibles se requiere preservar las condiciones necesarias para la sobrevivencia de estas plantas durante todo su ciclo de vida, lo que incluye a otras especies de organismos con los que se asocian durante algunas etapas críticas, como lo son los polinizadores durante la etapa de floración y hongos simbiotes durante la etapa de germinación (Zettler *et al.* 2003, Rasmussen y Rasmussen 2007).

También se ha observado que la distribución de estas plantas en diferentes hábitats es consecuencia de la distribución de estos hongos en suelo, aunque este fenómeno ha sido poco estudiado (Rasmussen 1995, Batty 2002, Ortega-Larrocea 2008). Por lo que se debe asumir que la modificación del uso de suelo, erosión o pérdida del mismo, trae como consecuencia una disminución en la biodiversidad de los microorganismos presentes, entre la que se encuentran los hongos micorrízicos y como consecuencia una disminución en la capacidad de dispersión sobre todo de aquellas orquídeas con especificidad mayor hacia esta asociación (Batty *et al.* 2002, Rangel-Villafranco y Ortega-Larrocea 2007). Si se busca preservar especies de estas plantas no se puede dejar fuera a su simbiote fúngico empleado durante la germinación y se debe de considerar también que la mayoría de éstas presentan algún grado de micotrofia durante la etapa adulta (Rasmussen y Rasmussen 2007). Conocer la diversidad fúngica involucrada en el desarrollo de orquídeas terrestres es importante para explicar su ecología y la función de estos hongos en la planta y en el suelo (Ortega-Larrocea 2008).

Existen algunas orquídeas que se asocian con una sola especie de hongo durante la etapa adulta y que presentan una distribución más restringida, mientras que otras se pueden asociar con un amplio rango de hongos (Hadley 1982, Sen *et al.* 1999, Batty 2002).



Resulta importante aislar e identificar a los hongos micorrízicos involucrados en las diferentes fases del ciclo de vida de estas plantas y conocer cuál es su contribución en el desarrollo y si la asociación es duradera, abundante o escasa (Shan *et al.* 2002, Rasmussen y Rasmussen 2007).

La mayoría de los hongos micorrízicos de orquídeas han sido asignados al género-forma *Rhizoctonia* (Sneh *et al.* 1991). Este género está integrado por una diversidad taxonómica de hongos que presentan algunas características similares y otras muy diferentes (Currah *et al.* 1987). Los métodos convencionales para identificar a este grupo de hongos se basan en la morfología de los aislados *in vitro*, que incluye color de la colonia, células monilioides, esclerocios y otras características del micelio (Currah *et al.* 1987, Sneh *et al.* 1991, Currah *et al.* 1997). De tal manera que se han establecido varios géneros anamorfos de hongos asociados exclusivamente a las orquídeas como *Epulorhiza*, *Ceratorhiza*, *Monillioopsis* y *Rhizoctonia* (Moore 1988, Sneh *et al.* 1991, Currah *et al.* 1997, Ortega-Larrocea y González 2008).

Debido a que estos hongos no forman estructuras de reproducción sexual, su clasificación puede basarse en características del esteroideo, pudiendo ser separados en morfoespecies o morfotipos que permiten identificar grupos a nivel de género en base sólo a características morfológicas con una precisión que ha sido corroborada mediante técnicas de identificación molecular (Guo *et al.* 2000, Shan *et al.* 2002, Lacap *et al.* 2003).



A nivel mundial se ha realizado un número sustancial de estudios sobre la diversidad de hongos micorrízicos de orquídeas en climas tropicales y regiones templadas con fines de conservación (Taylor *et al.* 1999, Frohlich *et al.* 2000, Batty *et al.* 2001). En México la investigación sobre este tipo de asociación es escasa y por lo tanto se conoce muy poco sobre aspectos ecológicos, fenológicos y de manejo con fines de conservación o reintroducción (Zettler 1997, Rangel-Villafranco y Ortega-Larrocea 2007), más aun, son muy pocas las especies de orquídeas de las que se conoce la identidad del socio fúngico.

En algunos estudios de orquídeas terrestres en los alrededores de la ciudad de México se menciona que algunos géneros parecen tener alta especificidad por su micobionte como *Bletia-Epulothiza*, *Dichromantus-Ceratorhiza*, *Habenaria-Epulothiza* y *Malaxis-Epulothiza* (Rangel-Villafranco y Ortega-Larrocea 2007). Se señala la importancia de investigar si el éxito adaptativo y la gran capacidad de dispersión que presentan algunas especies como *Dichromantus aurantiacus* parecen estar relacionados con la presencia del socio fúngico que contribuye a su sobrevivencia en la naturaleza. Especies como *Bletia urbana* consideradas en peligro podrían estar en riesgo debido a la disminución de las poblaciones naturales de su socio fúngico o a una menor infectividad (Ortega-Larrocea y Rangel-Villafranco 2007).

Un estudio encaminado a analizar si el mismo comportamiento se presenta en otras especies de orquídeas terrestres en un mismo hábitat podría contribuir a un mejor conocimiento de esta asociación y por lo tanto de propuestas más acertadas para programas de restauración y conservación.



La finalidad de este estudio fue llevar a cabo el aislamiento e identificación de los hongos micorrízicos de tres especies del género *Bletia*: *B. roezlii*, *B. purpurata* y *B. punctata* en ambientes contrastantes dentro de una Reserva Natural en el Estado de Michoacán. Esto se realizó mediante su caracterización morfológica para analizar grado de especificidad y determinar si el éxito adaptativo que presentan está relacionado con la presencia del socio fúngico.

B. roezlii y *B. purpurata* presentan amplia distribución en el estado encontrando registro para más de 5 municipios, mientras que *B. punctata* presenta una distribución más restringida siendo reportada solamente en dos municipios (Instituto de Ecología, Pátzcuaro 2008).

El estudio se realizó en la Reserva Natural Barranca del Cupatitzio (N 19° 25' y 19° 26' 19", W 102° 04' 06" y 102 07' 07") localizada en el municipio de Uruapan, Michoacán, México. La vegetación principal es bosque de pino, pino-encino y relictos de bosque mesófilo de montaña. Debido a su cercanía con la zona urbana de la ciudad de Uruapan se observan sitios con diferente grado de perturbación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio la Reserva se dividió en cuatro zonas con diferente grado de perturbación que fueron delimitadas por caminos principales y secundarios. Para la delimitación de las zonas se consideraron características previamente descritas como tipo de vegetación principal y secundaria (Bello y Madrigal-Sánchez 1996, Gómez-Reyes 2005, Zavala-Álvarez 2006), suelo y profundidad de mantillo (Gómez-Tagle 1985), penetración de luz, presencia de especies exóticas.



Los hongos micorrízicos asociados fueron aislados de algunas de las raíces recolectadas para el análisis de colonización en las tres especies. Se analizaron 1 o 2 raíces de 2 ó 3 plantas por especie y por sitio para obtener un total de 21 raíces de *B. purpurata*, 22 de *B. roezlii* y 13 de *B. punctata* (de la que fue difícil encontrar plantas con inflorescencia). En cada una de estas raíces se quitó el exceso de suelo con agua corriente y se hicieron cortes transversales a 10 mm aproximadamente en raíces largas (\geq a 12 cm), para raíces de menor tamaño ($<$ a 12 cm) los cortes se hicieron cada 6 a 8 mm. Los cortes se montaron en PVLG. Se separaron los segmentos que mostraban pelotones viables (indigestos) para su desinfestación (Rasmussen y Whigham 2002).

Antes de ser procesadas, las raíces se desinfestaron superficialmente utilizando la técnica propuesta por Ortega-Larrocea (2008) que consiste en: enjuagar con agua destilada estéril los segmentos colonizados en tubos Eppendorf®. Se lavaron con cloro comercial (~ 6%) al 10% (v: v) con 2 gotas de Tween 80 cada 500 mL durante 10 minutos en agitación constante. Se enjuagaron 3 tiempos con agua destilada estéril. Los segmentos se pasaron a una solución de antibióticos (eritromicina 0.03% y gentamicina 0.01% p: v) durante 10 min. y se enjuagaron 3 tiempos con agua destilada estéril. Todo el proceso se realiza en frío y bajo campana de flujo laminar.

Los explantes se sembraron en medios específicos descritos por Clements (1988) y Mitchell (1989). Cada segmento de raíz desinfestada se colocó en 1 mL de agua destilada estéril en una caja de Petri cortando el córtex con bisturí y aguja para dispersar los pelotones. Posteriormente se toman los pelotones con pipeta Pasteur estéril y se colocan en medio de aislamiento fúngico (MAF y MAF-A modificado). Las cajas se incubaron a 25-27°C en obscuridad hasta que se observan hifas recreciendo de cada pelotón (Fig. 24).



Pasado este tiempo se aislaron los hongos utilizando agar papa-dextrosa (PDA) con 50 mg/L de estreptomicina a pH 6.8 incubándose a la misma temperatura hasta obtener cultivos potencialmente micorrízicos verificados morfológicamente (Currah *et al.* 1987, Shan *et al.* 2002).

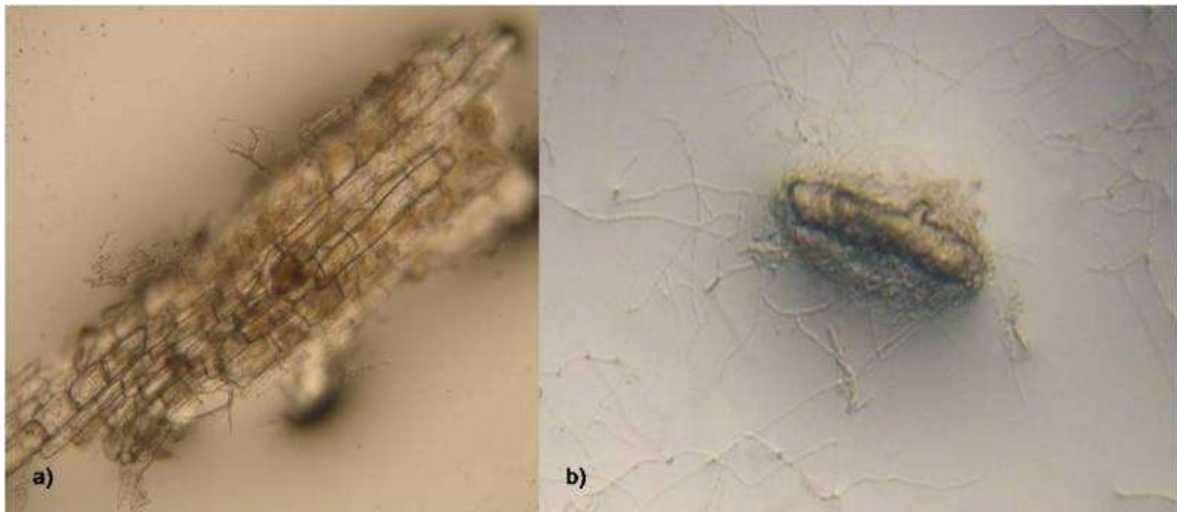


Figura 24. Extracción de pelotones individuales de raíces en tres especies de orquídeas. a) Sección de córtex con pelotones, b) pelotón individual con hifas en crecimiento para extracción y siembra en medio PDA. Fotos A. Beltrán.

Se calcularon porcentajes de aislamiento por raíz (no. de segmentos de los que se obtuvo algún aislado en relación al total de segmentos seleccionados para el aislamiento), aislamiento por sitio (no. de raíces de las que se obtuvo algún aislado en relación al total de raíces seleccionadas por sitio) y aislamiento por especie (no. de raíces de la que se obtuvo algún aislado en relación al total de raíces seleccionadas por especie).

Para la caracterización morfológica de los hongos anamorfos asociados se realizaron las siguientes pruebas:



Medios de cultivo para observar estructuras fúngicas:

Una vez que los hongos se hubieron desarrollado en el medio PDA se subcultivaron para observar la presencia de células monilioides y formación de esclerocios después de aprox. 8 semanas (aunque es muy variable ya que algunas nunca se desarrollan) (Shan *et al.* 2002).

Para observar el número de núcleos y morfología de las hifas se hicieron cortes de 1 mm³ de los aislados en PDA y se pusieron a crecer en agitación en medio Papa-Dextrosa Broth (PDB) por 15 a 20 días a una temperatura de 22 a 25 °C en presencia de luz.

Características de cultivos:

La caracterización de las colonias de los aislados se realizó a partir de los cultivos puros en crecimiento en medio PDA una vez que completaron su desarrollo en las cajas de Petri.

El color de la superficie se determinó con las cartas de color Munsell para suelo (2000) una vez que la colonia se desarrolló completamente llenando la caja de Petri. Se realizó una segunda comparación de las colonias maduras que fueron conservadas a 4 °C después de dos meses. Se analizaron otras características macroscópicas del cultivo como: brillo, textura, tasa de crecimiento, olor, modo de crecimiento, capacidad enzimática (Liparini *et al.* 2005); y características microscópicas que incluyeron color, ancho, septación y ángulos de ramificación del micelio y diámetro de las clamidosporas cuando presentes (Harvais y Hadley 1967) así como número de núcleos. Las medidas microscópicas se cuantificaron en un microscopio óptico a 400 magnificaciones.



Las pruebas de reacción de los aislados a la presencia de Polifenol oxidasas se realizaron mediante la preparación de medios de cultivo en cajas de Petri con agar 2%, extracto de malta 1.5 % y ácido tánico 0.5 % (Davidson *et al.* 1938, Zelmer 1994).

Las cajas fueron inoculadas con un fragmento de micelio de 1 mm³ y llevadas a incubación a 25 °C por periodos de 5 a 15 días, después de lo cual se observó la reacción de los aislados, considerando negativos aquellos que no mostraron cambio de coloración en el medio o crecimiento y positivos en caso contrario.

Las tasas de crecimiento se determinaron con la técnica de Currah *et al.* (1987), midiendo el incremento radial de la colonia en 4 direcciones cada 24 a 48 horas por periodos de 2 a 8 semanas. Las tasas de crecimiento fueron representadas en valores promedios en base a un mínimo de tres réplicas.

Análisis estadísticos: se realizaron comparaciones de dimensiones de células moniloides y características de las hifas de todos los aislados mediante pruebas Anova de dos vías y Tukey con el programa JMP V. 6.0.

La determinación del número de núcleos se hizo a partir de los cultivos en medio PDB los cuales se licuaron en 150 mL de agua destilada por 1 minuto, a partir de una alícuota de 1 mL vaciada en una membrana de diálisis montada en vacío (manifall). Las membranas se fijaron con 200 µL de solución de formaldehído al 2% por 20 min. Las hifas fueron teñidas con 200 µL de 4'-6'diamidino-2-fenilindol (DAPI) 5 µg/mL por un mínimo de 20 min en la oscuridad y desteñidas con agua destilada por 2 min. El material se montó en portaobjetos adicionando 100 µL de glicerina al 50 % y cubiertas con cubreobjetos para ser observadas en microscopio de epifluorescencia con el filtro de luz UV (200-400 nm) (Sneh *et al.* 1991).



Se hizo la determinación de los aislados con base en todas las características descritas anteriormente utilizando las claves citomorfológicas para *Rhizoctonia* (Sneh *et al.* 1991), claves dicotómicas para hongos micorrízicos asociados a orquídeas (Currah y Zelmer 1992) y claves para especies de *Epulorhiza* (Currah *et al.* 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron un total de 107 aislados de las tres especies extraídos a partir de 56 raíces, de los cuales 44 corresponden a *B. purpurata*, 46 a *B. roezlii* y 17 a *B. punctata*. Los resultados mostraron que *B. roezlii* fue la especie de la que se obtuvo el porcentaje más alto de aislamiento por número de raíces utilizadas con un 65.4 % y sin importar el grado de perturbación de los sitios de colecta más del 50 % de las raíces contenían segmentos con pelotones viables que pudieron ser aislados. *B. purpurata* y *B. punctata* presentaron porcentajes diferentes dependiendo del sitio del que se extrajeron las raíces, observando que los porcentajes más altos se obtuvieron en el sitio con abundante presencia de malpaís (zona 4) (Cuadro3).

El uso de dos medios diferentes para el aislamiento de los hongos (MAF y MAF-A) no pareció ser un factor que haya influido en un mayor éxito para el desarrollo de los pelotones aislados, si no que más bien este éxito pareció estar relacionado con la viabilidad de los pelotones al momento de extraerlos del córtex (Cuadro 3) al menos en el presente estudio. Rangel-Villafranco (2004) señala que el aislamiento de hongos micorrízicos a partir de explantes con pelotones viables (intactos o en proceso de digestión) de especies del género *Bletia* es más exitoso que en otros géneros tales como *Dichromantus* en el que el aislamiento es difícil aún cuando se tengan pelotones intactos. Por tal razón se recomienda que se realicen estudios que se enfoquen a analizar con mayor detalle los resultados observados.



Cuadro 3. Porcentaje de aislamiento de hongos micorrizicos por cantidad de raíces y número de explantes analizados y cantidad de morfotipos obtenidos.

ESPECIE	SITIO	TAMAÑO DE LA RAÍZ	MEDIO DE AISALMIENTO	CAJAS SEMBRADAS	Nº DE SEGMENTOS SELECCIONADOS	Nº DE SEGMENTOS DE LOS QUE SE OBTUVO AISLADOS	Nº. CAJAS CON AISLADOS	MORFO TIPO	PORCENTAJE DE AISLAMIENTO x RAÍZ	PORCENTAJE DE AISLAMIENTO x SITIO	PORCENTAJE DE AISLAMIENTO x ESPECIE	
<i>B. purpurata</i>	1	7.7 cm	MAF	5	5	0	0		0%	33.30%	47.80%	
		8.8 cm	MAF-A	0	ninguno	0	0		0%			
		15.6 cm	MAF	2	10	1	1	2				10%
			MAF-A	4								
		25 cm	MAF	2	4	3	9	2				75%
		19 cm	MAF	1	1	0	0					0%
			MAF-A	1								
		18.7 cm	MAF	4	5	0	0					0%
		10.9 cm	MAF-A	1	6	0	0					0%
			MAF	4								
	8.1 cm	MAF	2	3	2	6	2		66.60%			
	2	7.6 cm	MAF	4	6	0	0			0%		
		6.9 cm	MAF-A	2	3	0	0			0%		
			MAF	1	2	0	0			0%		
		6.8 cm	MAF-A	1	3	3	3	1		100%		
	3	7.3 cm	MAF	2	3	1	1	1		33%		
		5.5 cm	MAF	2	3	0	0			0%		
			MAF-A	1	1	0	0			0%		
		4.6 cm	MAF	2	3	0	1			0%		
	4	7.3 cm	MAF-A	1	1	0	0			0%		
4.1 cm		MAF	1	1	0	0			0%			
13 cm		MAF	2	3	1	1	2		33%			
6 cm		MAF-A	1	5	3	7	1 Y 2		60%			
4	18.8 cm	MAF	4	6	6	9	2		100%			
	13.5 cm	MAF-A	2	4	3	4	2		75%			
		MAF	2	5	1	3	2		20%			
	8.5 cm	MAF	5	5	3	7	1 Y 2		60%			
	13.9 cm	MAF	5	6	6	8	1, 2 Y 4		100%			
	10.3 cm	MAF-A	1	3	3	3	2		100%			
		MAF	3									
	11.5 cm	MAF-A	2	5	0	0			0%			
MAF-PROF.		b										
23.7 cm	MAF	7	11	1	1	4		9%				
9.8 cm	MAF-A	4	2	0	0			0%				
2	11.5 cm	MAF	7	10	0	0			0%			
	7 cm	MAF	3	4	0	0			0%			
		MAF-A	1	4	0	0			0%			
	6.7 cm	MAF	2	1	1	2	2		100%			
3	12.4 cm	MAF	3	4	3	5	1, 2 Y 3		75%			
	7.5 cm	MAF-A	1	4	1	1	1		25%			
	6.3 cm	MAF	2	3	0	0			0%			
	8.2 cm	MAF-A	1	2	2	2	2		100%			
3	8 cm	MAF	2	2	0	0			0%			
	10.8 cm	MAF	8	8	2	3	2		25%			
	9 cm	MAF	4	6	2	3	1 Y 2		33%			
	MAF-A	2										
4	11.6 cm	MAF	3	4	2	2	1		50%			
	7.8 cm	MAF-A	1	5	3	6	1		60%			
		MAF	3									
	5.9 cm	MAF-A	1	2	2	2	1		100%			
	10.8 cm	MAF	6	6	3	4	1 Y 2		50%			
	14.2 cm	MAF	7	11	3	4	2		27%			
	7.3 cm	MAF-A	4	6	1	2	1		16.60%			
	8.4 cm	MAF	2	ninguno	0	0			0%			
11.5 cm	MAF	1	10	0	0			0%				
<i>B. punctata</i>	1	17.7 cm	MAF	1	3	1	2	2		33.30%	60%	
		MAF-A	2									
		MAF	2									
		9.6 cm	MAF-A	2	5	1	1	3		20%		
		MAF PROF.	3									
	16.5 cm	MAF-A	1	1	2	2	3		100%			
	3	7.7 cm	MAF	2	3	0	0			0%		
		MAF-A	1									
		8 cm	MAF	4	5	0	0			0%		
		6.8 cm	MAF-A	1	4	0	0			0%		
MAF		4	4	0	0			0%				
4	5.8 cm	MAF	2	3	0	0			0%			
	22.3 cm	MAF-A	1	8	4	6	2 Y 4		60%			
	6 cm	MAF	8	3	1	2	3		33.30%			
	MAF-A	2										
12.3 cm	MAF	1	5	extraños	0			0%				
9 cm	MAF-A	1	4	3	4	1 Y 2		75%				
4.1 cm	MAF	1	1	0	0			0%				
total:				225		107						



A partir de características morfológicas como apariencia de las colonias, color y forma de crecimiento; de la medición y comparación mediante análisis estadísticos de sus tasas de crecimiento y las características morfométricas de las hifas y células moniloides cuando presentes, se obtuvieron cuatro morfotipos diferentes (Cuadro 4).

Cuadro 4. Características y morfometría de los aislados de *Epulorhiza* sp obtenidos a partir de raíces de tres especies de orquídeas. Letras diferentes indican diferencias significativas, s/d = no se tiene dato.

MORFOTIPO	COLOR COLONIA (CARTAS MUNSELL, 2000)	APARIENCIA DE LA COLONIA	ESCLEROCIOS		TASA PROMEDIO DIARIA DE CRECIMIENTO (mm) n = 91 (P<0.05)	CÉLULAS MONILOIDES (µm) n = 1074 (P ≤ 0.05)		No. DE CÉLULAS ENCADENA	HIFAS VEGETATIVAS (µm)				NÚMERO DE NÚCLEOS	REACCIÓN A PEROXIDASAS
	SUPERFICIE		COLOR (CARTAS MUNSELL, 2000)	APARIENCIA		LARGO µm	ANCHO µm		ANCHO	DIST. SEPTO PRINCIPAL	DIST. SEPTO RAMIFICACIÓN	ANGULO (grados)		
1	Amarillo pálido (8/2.5Y)	Plana serosa a afelpada, crecimiento irregular	Amarillo pálido a café claro (7/4.2.5 Y a 8/2.5Y)	Glabroso seroso	0.9 ± 0.6 b	10.7 ± 3.3 b	9.12 ± 2.3 b	3 a 5	3.46 ± 0.7	10.64 ± 5.3	2.63 ± 0.9	89.92 ± 12.2	2	NEGATIVA
2	Amarillo pálido (8/2.5Y)	Serosa	Amarillo pálido (8/2.5Y)	Glabroso seroso	2.5 ± 1.4 a	13.9 ± 2.2 a	11.65 ± 1.9 a	3 a 7	3.72 ± 0.8	12.6 ± 7.8	3.07 ± 1.1	90.2 ± 9	2	NEGATIVA
3	Amarillo pálido (8/2 a 8/3.5Y)	Afelpada plana a algodonosa con anillos	No fomo	No fomo	0.7 ± 0.5 b	5.28 ± 0.4 c	4.54 ± 0.3 c	5 a 10	3.13 ± 0.5	12.36 ± 5.8	3.03 ± 0.9	89.1 ± 5	2	NEGATIVA
4	Amarillo pálido (8/2 a 8/3.5Y)	Afelpada plana a algodonosa con anillos y listones	Amarillo pálido (7/4.2.5 Y a 8/2.5Y)	Glabroso seroso	2.2 ± 0.6 a	13 ± 2 a	8.4 ± 1.3 b	3 a 5	s/d	s/d	s/d	90	2	NEGATIVA



Todos los morfotipos aislados fueron afines al género-forma *Rhizoctonia* y por lo tanto a los géneros descritos para hongos micorrízicos orquídeoides. Entre las principales características que distinguen a los hongos agrupados en este género se mencionan la presencia de una ligera constricción en el punto de unión entre las hifa principal y la secundaria (Sneh *et al.* 1991), característica que se pudo observar en algunos de los aislados analizados (Fig. 25a y b), mientras que en otros el punto de ramificación se presentó en forma recta. Otras características que se describen para este grupo y que también se presentaron en los cuatro morfotipos aislados fueron la formación de un septo en la hifa secundaria, cerca del punto de ramificación y la formación de ángulos cercanos a los 90° entre la hifa principal y la secundaria (Duggar 1915, Sneh *et al.* 1991, Currah *et al.* 1997) (Fig. 25c, d y e).

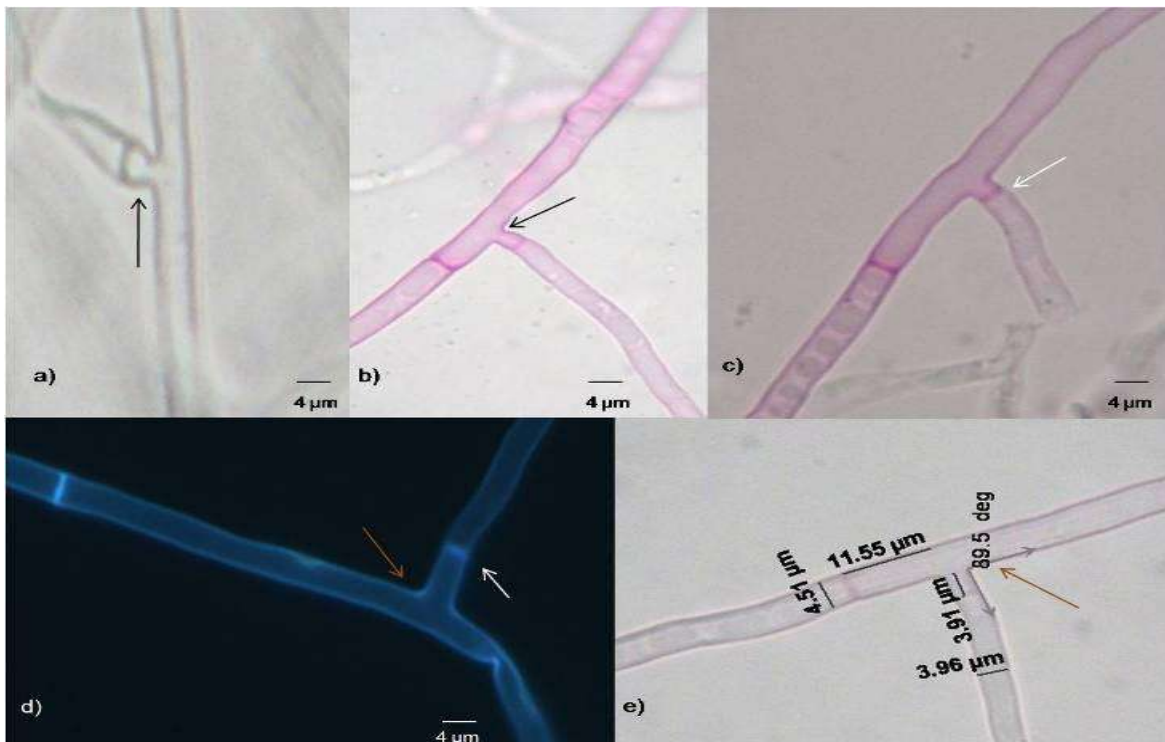


Figura 25. Características de las hifas en los aislados afines al género-forma *Rhizoctonia*. a) y b) Constricción en el punto de ramificación en morfotipo 2 (flechas negras), c), d) y e) septo cercano al punto de ramificación en la hifa secundaria (flechas blancas) y ángulos cercanos a 90° (flechas cafés), e) dimensiones de diferentes estructuras. b) y c) tinción con Fucsina ácida, d) con microscopio de epifluorescencia (longitud de onda 280 a 380 nm).



La presencia de hifas binucleadas, formación de células monilioides y esclerocios, la ausencia de de interconexiones permitieron corroborar también que los 4 morfotipos aislados corresponden a hongos micorrízicos orquideoides del género-forma *Rhizoctonia* (Currah *et al.* 1997) (Fig. 26).

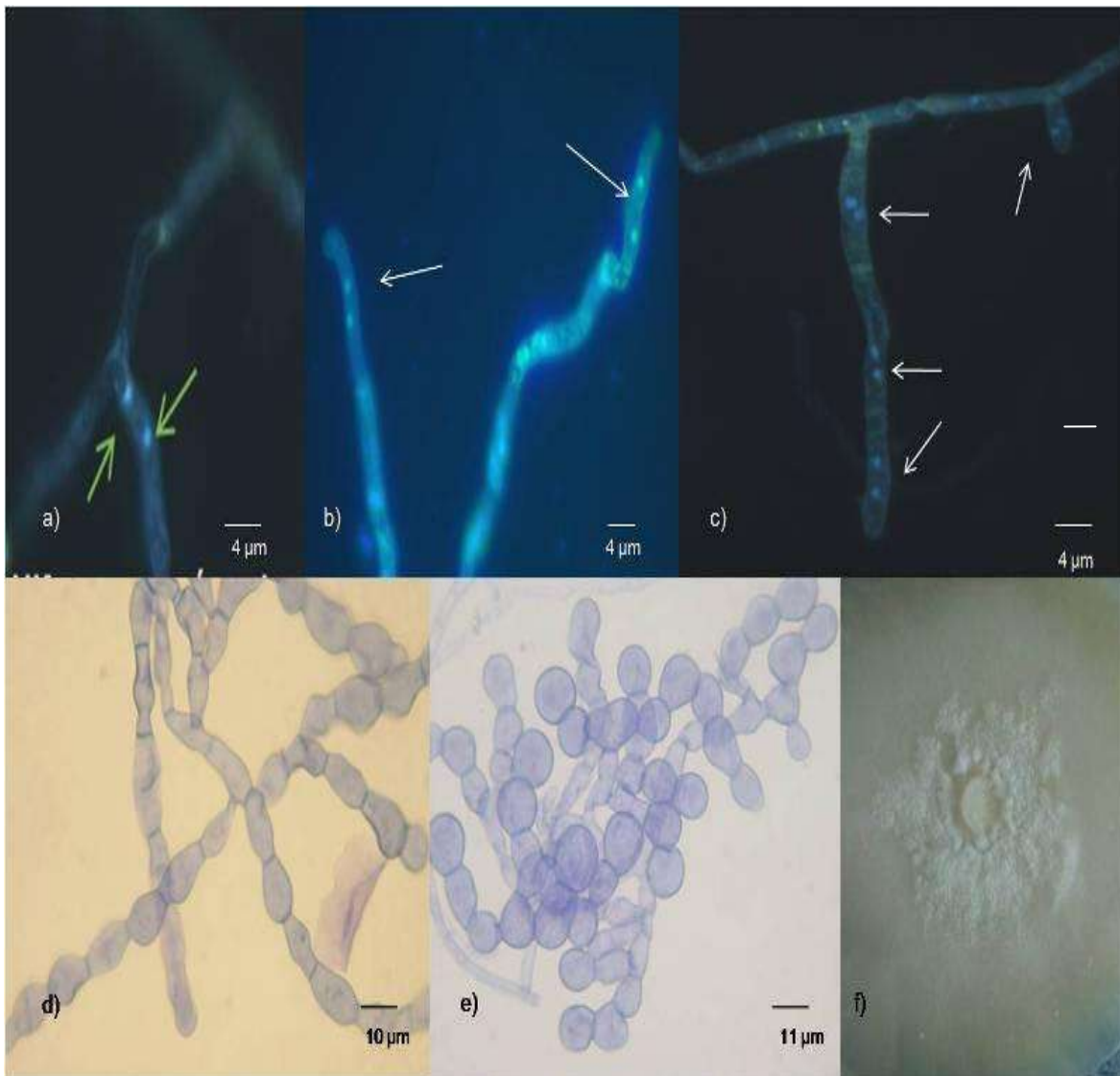


Figura 26. Características típicas de hongos micorrízicos orquideoides del género-forma *Rhizoctonia*. a) Hifas binucleadas (morfotipo 1), b) Hifas binucleadas (morfotipo 2), c) Hifas binucleadas (morfotipo 4), d) y e) Células monilioides (morfotipos 1 y 2) y f) Esclerocios (morfotipo 2). a, b y c con microscopio de epifluorescencia (longitud de onda de 280 a 380 nm), d y e tinción con azul de tripano (100x).



Diversos trabajos han comparado características morfológicas y moleculares confirmando la existencia de tres géneros anamorfos *Epulorhiza*, *Ceratorhiza* y *Moniliopsis* (Andersen 1996, Currah *et al.* 1997, Pereira *et al.* 2005). Los géneros *Ceratorhiza* y *Epulorhiza* incluidos en este grupo comparten algunas características en común sin embargo se les puede diferenciar por la presencia de aroma a cítricos en los aislados de *Epulorhiza* y mediante la prueba de reacción a las Polifenol oxidasas (Zelmer 1994). En general los aislados de *Ceratorhiza* son positivos y los de *Epulorhiza* son negativos (Currah *et al.* 1997).

Aún cuando los aislados mostraron algunas diferencias entre ellos, como tasas de crecimiento, dimensión de células monilioides y apariencia de la colonia, todos fueron afines al género anamorro *Epulorhiza* (Sneh *et al.* 1991, Currah *et al.* 1997) (antes denominado *Rhizoctonia repens*). Este género ha sido descrito para un amplio rango de orquídeas fotosintéticas (Pereira *et al.* 2003, Zettler *et al.* 2004, Suarez *et al.* 2006) y documentado también en orquídeas mexicanas (Rangel-Villafranco 2004, Ortega-Larrocea y Rangel Villafranco 2007, Cruz-Blasí 2007).

Las características consideradas fueron las siguientes:

Diámetro de las hifas principal y secundaria inferiores o cercanas a 4 μm .

La textura de crecimiento de la colonia, en general es serosa, con hifas sumergidas, de color amarillo claro y café muy ligero cuando la colonia es madura.

Las tasas de crecimiento de todos los morfotipos son inferiores a 4 mm.

Reacción negativa a las Polifenol oxidasas.



La caracterización de los 4 morfotipos se presenta a continuación:

El morfotipo 1 presenta crecimiento plano o sumergido aunque al resemejarse puede tomar apariencia algodonosa y su crecimiento es irregular. El morfotipo 2 se caracteriza y diferencia del morfotipo anterior por presentar colonias de crecimiento radial uniforme con apariencia cerosa y sumergidas en el medio, la coloración de la colonia y de los esclerocios es casi blanca y estos últimos se dispersan en toda la superficie de la colonia dándole apariencia en ocasiones granular. El morfotipo 3 se caracteriza porque las colonias en medio de cultivo crecen formando anillos y las hifas vegetativas crecen sobre el medio con apariencia algodonosa. El morfotipo 4, a diferencia del anterior, aunque también crece formando anillos, la apariencia de las hifas vegetativas es más algodonosa y forman listones (Fig. 27).

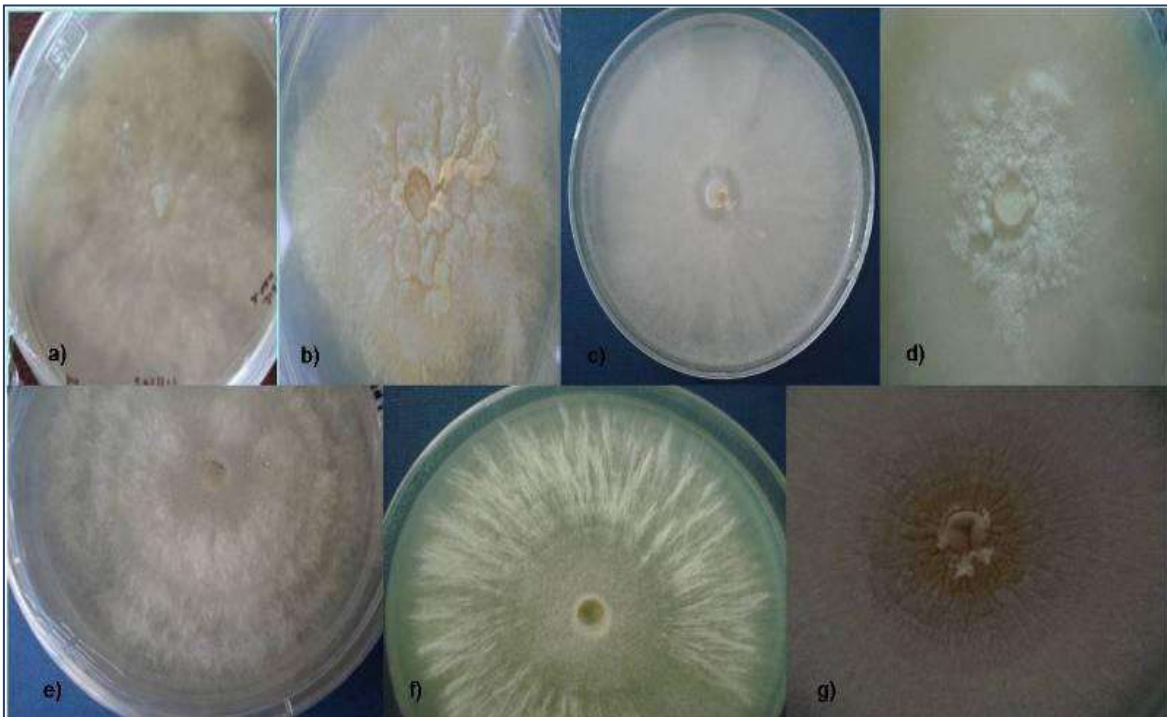


Figura 27. Forma de crecimiento de los cuatro morfotipos de *Epulorhiza* sp. en cultivo *in vitro*. Morfotipo 1 a) crecimiento irregular, b) esclerocios; morfotipo 2 c) crecimiento seroso, d) esclerocios; morfotipo 3 e) crecimiento con formación de anillos (no formo esclerocios); morfotipo 4 f) crecimiento con formación de anillos y listones, g) esclerocios.



Los morfotipos 2 y 4 parecen encajar bien en la descripción de *Epulorhiza repens*, mientras que el morfotipo 1 y 3 en algunos de los aislados presentaron hifas hialinas de paredes muy delgadas, con crecimiento atípico (no recto) y menor diámetro (Fig. 28).

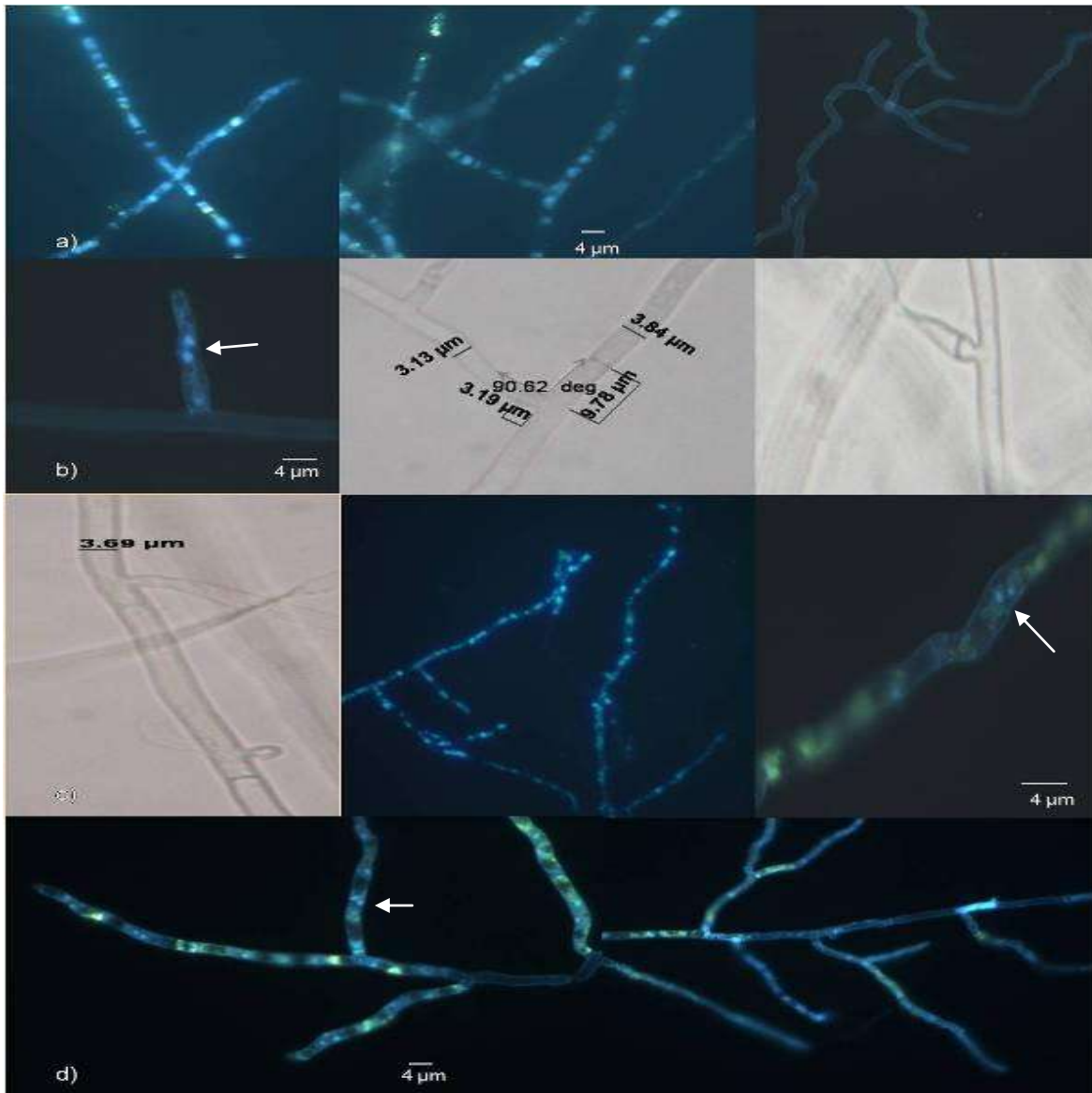


Figura 28. Morfometría de hifas en los 4 morfotipos aislados de *Epulorhiza* sp. a) Morfotipo 1, hifas con paredes muy delgadas (microscopio de epifluorescencia, 280-380 nm), b) Morfotipo 2 hifas con constricción en el punto de ramificación y binucleadas (Núcleos con microscopio de epifluorescencia 280- 380 nm, e hifas microscopio compuesto 100x) c) Morfotipo 3 con hifas de paredes muy delgadas y hialinas, d) Morfotipo 4 con hifas binucleadas (Microscopio de epifluorescencia 280-380 nm).



Los morfotipos 1 y 3 de *Epulorhiza* sp. presentaron crecimiento lento inferior a 1.5 mm por día, mientras que los morfotipos 2 y 4 tuvieron crecimiento más rápido de 2 a 3 mm por día. Los morfotipos 3 y 4 presentaron un crecimiento de la colonia a manera de anillos, y células monilioides de menor tamaño a lo reportado para *Epulorhiza* con formación de cadenas largas. Sin embargo, se clasificó como *Epulorhiza* por el diámetro de las hifas y las otras características antes descritas (Fig. 29). Esto permite corroborar que los caracteres morfométricos como color de la colonia y aspecto de la misma varía de un aislado a otro y con la resiembra y por lo tanto son menos constantes.

Sin embargo se sugiere la realización de pruebas moleculares que permitan diferenciar o agrupar los morfotipos encontrados y corroborar la identidad del género determinado como *Epulorhiza*.

La identificación de estos morfotipos coincide con lo mencionado por otros autores referente a que los hongos micorrízicos asociados a orquídeas terrestres pertenecientes al género *Bletia* que han sido aislados en otras regiones de México de plantas silvestres, únicamente pertenecen al género *Epulorhiza*. Por otro lado, *Ceratorhiza* se ha aislado de otros géneros como es el caso de la especie *Dichromantus auriantiacus*, lo que pudiera señalar cierta especificidad con el hongo asociado a nivel de género en estas orquídeas ya que se ha observado que la simbiosis se establece mejor con aislados provenientes del mismo género (Rangel-Villafranco 2004, Rangel-Villafranco y Ortega-Larrocea 2004, Ortega-Larrocea y Rangel-Villafranco 2007, Ortega-Larrocea y González 2008).

Estos mismos autores también mencionaron que especies como *B. urbana* son menos específicas que otras especies y que en condiciones de cultivo se asocian exitosamente con varios aislados de *Ceratorhiza*.

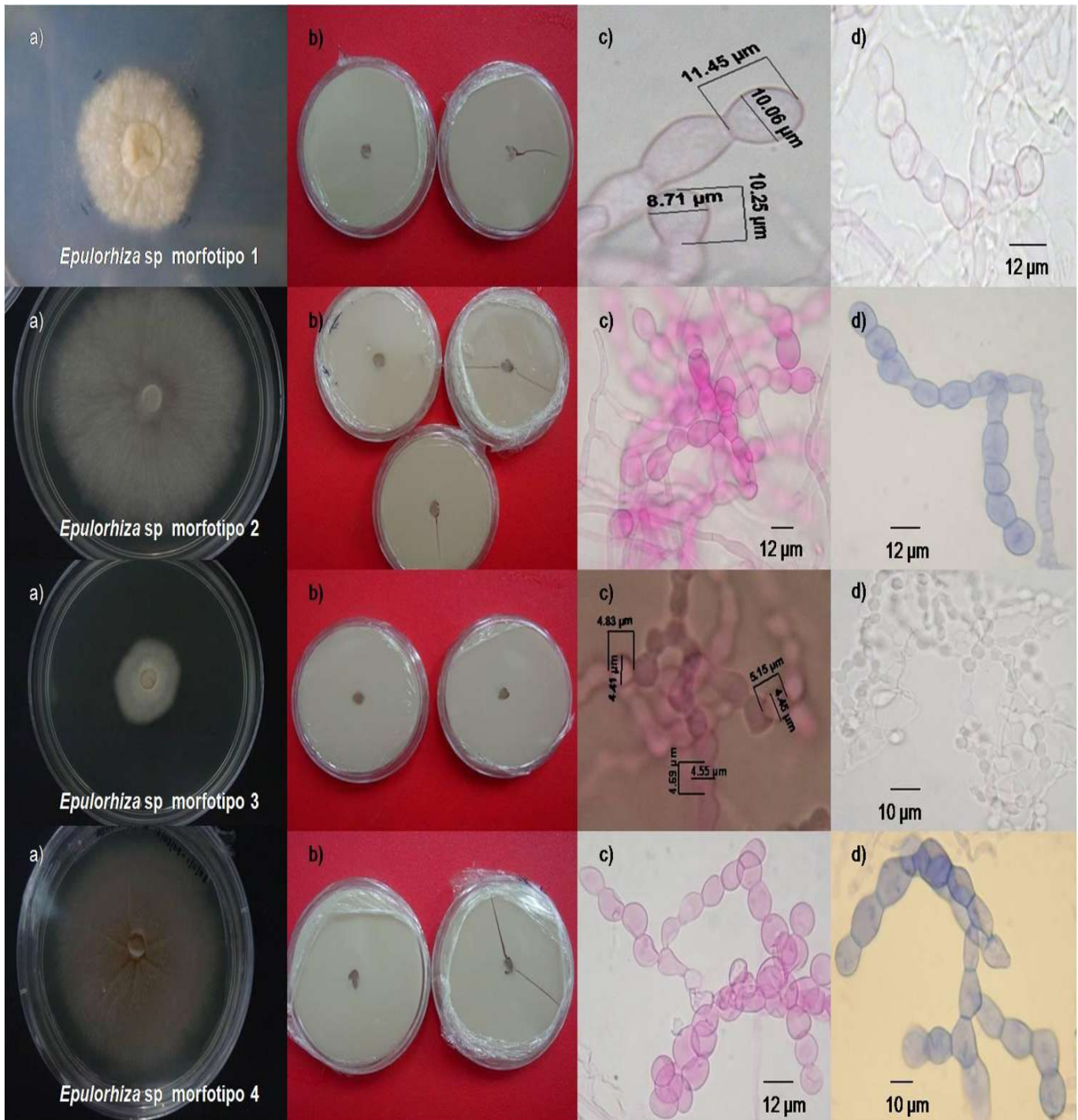


Figura 29. Caracterización morfométrica de los cuatro morfotipos de *Epulorhiza* sp aislados de tres especies de orquídeas terrestres. a) Comparación de tasas de crecimiento de los 4 morfotipos después de 12 días de su siembra en cajas de Petri, b) Reacción negativa a las Polifenol oxidasas en los 4 morfotipos en donde no hubo crecimiento ni cambio de coloración del medio, c) células moniloides y d) comparación del número de células moniloides por cadena. Tinción con Fucsina ácida y Azul de tripano.



Las diferencias más notorias a partir de las cuales se clasificó a los aislados en los cuatro morfotipos determinados como *Epulorhiza* sp después de haber sido separados en base a apariencia de la colonia fueron las tasas de crecimiento, dimensión de células monilioides e hifas.

Los morfotipos 2 y 4 presentaron tasas de crecimiento promedio significativamente más altas que los morfotipos 1 y 3 (Fig. 30), con valores de 2.5 y 2.2 mm/día contra 0.7 y 0.9 mm/día ($P \leq 0.01$).

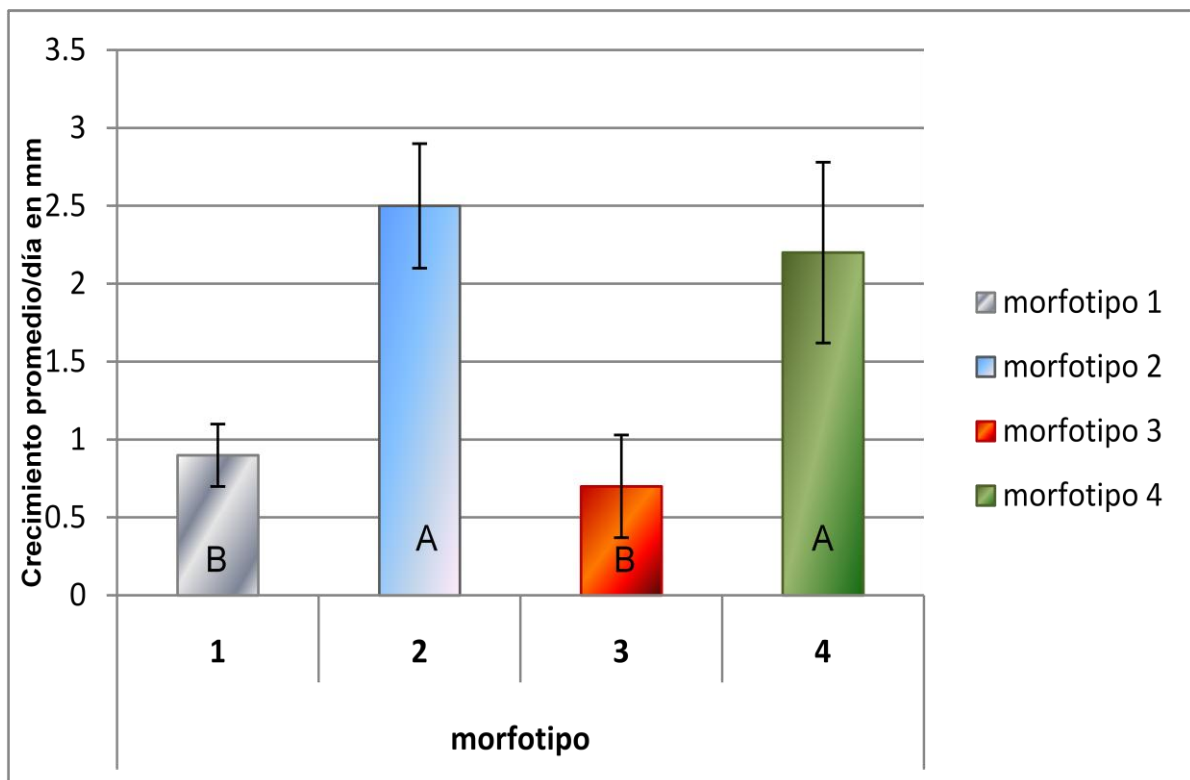


Figura 30. Tasas de crecimiento promedio por día y morfotipo. (Las barras indican valores promedios \pm intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas) (Tukey, $P \leq 0.01$).



Los morfotipos 2 y 4 alcanzaron su desarrollo máximo en el sistema en periodos de 15 a 20 días, mientras que los morfotipos 1 y 3 requirieron periodos de más de 40 días para completar su crecimiento en las cajas de Petri. Las tasas de crecimiento promedio diarias en cada uno de los morfotipos presentaron el mismo comportamiento en las tres especies analizadas.

Al analizar el crecimiento de los cuatro morfotipos por especie se observó que el morfotipo 2 presenta tasas de crecimiento altas y semejantes en los aislados de las cuatro especies, mientras que el morfotipo 3 aislado de *B. purpurata* presentó las tasas de crecimiento más bajas (Tukey, $P \leq 0.01$) (Fig. 31), lo que podría interpretarse como un reflejo de la capacidad de adaptación que posiblemente tiene el morfotipo 2 con respecto a los demás morfotipos en los que las tasas de crecimiento variaron entre especies sin ser significativamente muy diferentes. Cabe mencionar, además que del morfotipo 2 fue del que se obtuvo el mayor número de aislados, mientras que los morfotipos 3 y 4 fueron difíciles de aislar. Los morfotipos 1 y 2 se aislaron de las 4 zonas analizadas.

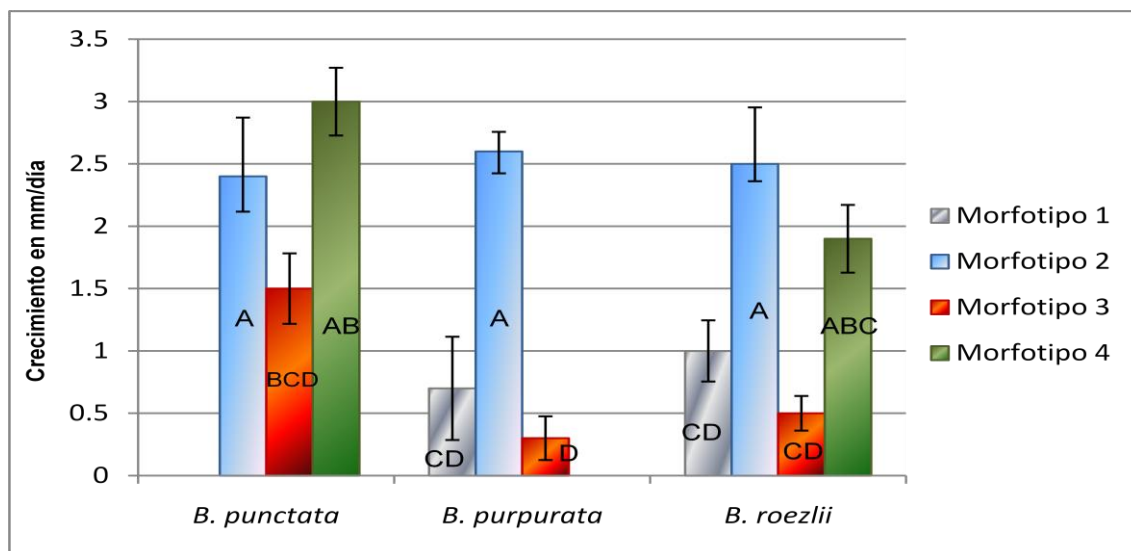


Figura 31. Crecimiento promedio de los 4 morfotipos de hongos por especie y prueba de significancia (Tukey, $P \leq 0.01$). (Las barras indican el promedio \pm el intervalo de confianza y letras diferentes indican diferencias significativas).



Al analizar la dimensión de células moniloides e hifas se encontró que las células moniloides de los morfotipos 2 y 4 son muy parecidas variando solamente en el ancho, motivo por el cual las del morfotipo cuatro son más ovaladas. Las células moniloides del morfotipo 1 presentan tamaños intermedios con respecto a los dos morfotipos anteriores, siendo el morfotipo 3 el que presenta las células moniloides de tamaños significativamente menores con respecto a los demás morfotipos (Fig. 32). Este tamaño se sale de los rangos que se describen para el género *Epulorhiza* por Currah *et al.* (1997).

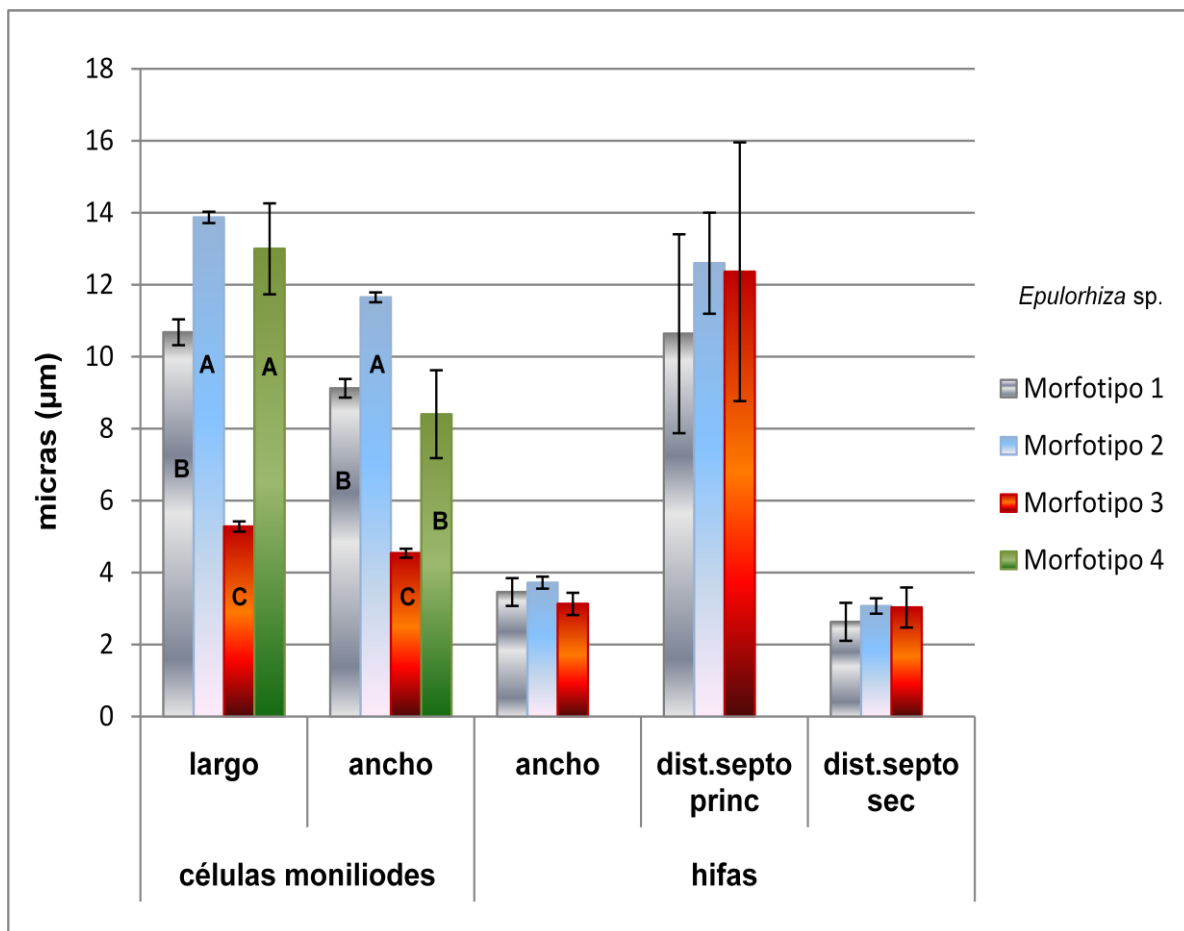


Figura 32. Características morfométricas de los cuatro morfotipos de *Epulorhiza*. Dimensión de estructuras por morfotipo. Las barras indican valores promedios \pm el intervalo de confianza y letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.01$, Tukey). Dist. Septo princ = distancia el punto de ramificación al primer septo encontrado en la hifa principal, dist. Septo sec = Distancia del punto de la ramificación al primer septo en la hifa secundaria.



Las dimensiones de las hifas fueron semejantes para todos los aislados y corresponden a los rangos que discriminan entre los géneros más comunes como *Ceratorhiza* que presenta dimensiones mayores.

Al hacer la comparación de los morfotipos aislados por especie y por zona, se encontró que *B. roezlii* presentó asociación con los cuatro morfotipos en la zona 1 considerada como de mayor perturbación mientras que de las otras dos especies de orquídeas analizadas únicamente se aisló el morfotipo 2 para *B. punctata* y los morfotipos 2 y 3 para *B. purpurata* (Cuadro 5). Es posible que el éxito en la asociación mostrado por *B. roezlii* pueda estar relacionado con su éxito adaptativo en la reserva y con la mayor colonización encontrada en las raíces en esta misma zona.

En el caso de *B. roezlii* y *B. punctata* se aislaron en ocasiones 2 ó más morfotipos de una misma raíz aunque siempre de diferente segmento lo que corrobora lo señalado por otros investigadores en el sentido de que algunas orquídeas pueden asociarse con más de un socio fúngico a la vez, incluso en una misma raíz (Rasmussen 1995). Esto les puede conferir cierta ventaja para la obtención de nutrimentos y una mayor sobrevivencia en sitios perturbados, tendencia que se observa en la mayor distribución y abundancia de *B. roezlii* en el área de estudio, ya que en las cuatro zonas se presenta asociada con más de un morfotipo en la misma raíz. Sin embargo a diferencia de lo señalado en trabajos previos en los que se aislaron diferentes morfotipos de una misma sección de raíz e incluso de un mismo pelotón (Kristiansen *et al* 2004, Suarez *et al.* 2006, Cruz-Blasí 2007) los morfotipos diferentes que fueron aislados en una misma raíz en las especies de orquídeas estudiadas provinieron de secciones diferentes.



En la zona 4 caracterizada por ser una zona pedregosa abundante en malpaís, las tres especies se encontraron asociadas al menos a dos de los morfotipos aislados y esto en parte podría explicar el éxito que muestran estas especies para desarrollarse en este tipo de hábitats o en sitios escasos en suelo como lo mencionan algunos autores (Espejo *et al.* 2002, Hágater *et al.* 2005).

Cuadro 5. Comparación de morfotipos aislados por especie y por zona de colecta.

SITIO	ESPECIE											
	<i>B. purpurata</i>				<i>B. punctata</i>				<i>B. roezlii</i>			
	MORFOTIPO											
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1		X				X	X		X	X		X
2		X			No se encontraron plantas				X	X	X	
3	X					X		X	X	X		
4	X	X			X	X	X		X	X		

El número de explantes que se procesaron para la extracción de los hongos micorrízicos fue de 105 para *B. roezlii*, 78 para *B. purpurata* y 60 para *B. punctata*. De este total se obtuvieron aislados de 35 explantes de *B. roezlii*, 24 de *B. pupurata* y 15 de *B. punctata*. Observando que de *B. roezlii* y *B. punctata* se aislaron los 4 morfotipos a pesar de que en esta última especie el número de explantes procesados fue mucho menor que para las otras dos especies y el número de aislados que se obtuvieron también fue mucho menor (17 contra más de 40 para la otras dos especies).



Lo que parece indicar que la cantidad de morfotipos obtenidos parece estar más relacionado con la presencia de más de un morfotipo en la misma raíz y del estado fisiológico de los pelotones que con la cantidad de explantes procesados, tal como lo señalan otros investigadores (Mitchell 1989). En el caso de *B. purpurata* únicamente se aislaron 2 de los morfotipos.

Esto nuevamente parece indicar que la capacidad de asociarse con más de un morfotipo de hongo en sitios con diferente grado de perturbación les confiere una mejor capacidad de adaptación a estas orquídeas (Rasmussen 1995, Taylor *et al.* 2003).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos corroboran lo señalado por otros investigadores para orquídeas terrestres mexicanas del género *Bletia* que indican cierta especificidad hacia su asociado fúngico al menos a nivel de género en la etapa adulta, asociándose con hongos del género anamorfo *Epulorhiza*. Y esta especificidad varía con la especie, existiendo algunas más selectivas hacia sus hongos asociados como en el caso de *B. punctata* y *B. purpurata* en el presente análisis.

B. roezlii se presentó asociada a los cuatro morfotipos aislados en la zona considerada de mayor perturbación (zona 1), por lo que es posible que el éxito adaptativo sea en parte un reflejo de su capacidad de asociarse con más de un morfotipo fúngico al ser menos específica hacia la asociación. En *B. roezlii* y *B. punctata* fue posible aislar más de dos morfotipos de hongos de una misma raíz, hecho que puede conferirles ventajas para la obtención de nutrimentos y mecanismos de dispersión, sobre todo en sitios perturbados según lo señalado en otros estudios.



La cantidad de morfotipos aislados por especie de orquídea parece estar más relacionada con la presencia de más de un morfotipo por raíz que por la cantidad de explantes procesados.

Los morfotipos fúngicos 2 y 4 presentan tasas de crecimiento significativamente más altas que los otros dos morfotipos. El morfotipo 2 se aisló de las 3 especies de orquídeas estudiadas y de los cuatro sitios muestreados sin importar el grado de perturbación, presentando tasas de crecimiento similares y fue el que mejor se repropagó bajo condiciones *in vitro*. Esto podría ser un reflejo de la mejor capacidad de adaptación de este hongo.



LITERATURA CITADA

Andersen T.F. 1996. A comparative taxonomic study of *Rhizoctonia sensulato* employing morphological, ultrastructural and molecular methods. Mycological Research 100: 117-1128.

Batty A.L, K.W. Dixon, y K. Sivasithamparam. 2000. Soil seed bank dynamics of terrestrial orchid. Lindleyana 15: 227-236.

Batty A.L.,K.W. Dixon, M.C. Brundrett y K. Sivasithamparam. 2002. Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in Mediterranean bushland. New Phytologist 152: 511-520.

Bello-González M. A y X. Madrigal-Sánchez. 1996. Estudio florístico del campo experimental “Barranca del Cupatitzio”, Uruapan, Michoacán. INIFAP. Folleto científico No. 2 Uruapan, Mich. México. 47 pp.

Cruz-Blasí J. 2007. Colonización micorrízica y diversidad de hongos micorrízicos de algunas especies de orquídeas epífitas tropicales en el sureste de Chiapas, México. Tesis de Maestría. Instituto de Postgraduados, Montecillos, Texcoco, México. 66 pp.

Currah R.S, L. Sigler y S. Hambleton. 1987. New records and new taxa of fungi from the mycorrhizae of terrestrial orchids of Alberta. Can J Bot 65: 2473-2482.

Currah R.S. y C. D. Zelmer. 1992. A key and notes for the genera of fungi with orchids and a new species in the genus *Epulorhiza*. Rep. Tottori Mycol. Inst. 30:43-59.



Currah R.S., C.D. Zelmer, S. Hambleton y K.A. Richardson. 1997. Fungi from orchid mycorrhizas. In: *Orchid Biology: Reviews and Perspectives VII*: 117-170. Arditty and Pridgeon (eds.). Kluwer Academic Publishers.

Davidson R.W., W. A. Cambell and D.J. Blaisedel. 1938. Differentiation of wood-decaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. *J. Agric. Res.* 57: 683-695.

Espejo S.A., A. R. García-Cruz, F. López, R.M. Jiménez y L. S. Sanchez. 2002. Orquídeas del Estado de Morelos. Herbario AMO, México D. F. 332 pp.

Frohlich J. y K.D. Hyde. 1999. Biodiversity of palm fungi in the tropics: are global fungal diversity estimates realistic? *Biodiversity and conservation* 8: 977-1004.

Gómez-Tagle R.A. 1985. Levantamiento de suelos del Campo Experimental Forestal Barranca del Cupatitzio y sus relaciones con la vegetación de coníferas. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 212 pp.

Gómez R.V. 2005. Diversidad de hongos ectomicorrízicos y su relación con diferentes unidades ambientales en el Parque Nacional Barranca del Cupatitzio, Uruapan, Mich. Tesis de Licenciatura. UMSNH. 67 pp.

Guo L.D., K.D. Hyde y E.C. Liew. 2000. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New Phytologist* 147: 617-630.

Hadley G. y Williamson. 1971. Analysis of the post infection growth stimulus in orchid mycorrhiza. *New Phytologist* 70: 445-455.



Hadley G. 1982. Orchid Mycorrhiza. In "Orchid Biology: Reviews and perspectives". Vol II (Ed. Arditty J.). Cornell University Press. New York. PP 84-118.

Hágsater E., M. A. Soto-Arenas, G. A. Salazar-Chávez, R. Jiménez-Machorro, M.A. López-Rosas y R. L. Dressler. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México D. F. 304 pp.

Harvais G. y G. Hadley. 1967. The relation between host and endophyte in orchid mycorrhiza. *New Phytologist* 66: 205-215.

Hollick P., T. Sanaratna, J. McComb, E. Bunn y K. Dixon. 2002. Response to paclobutrazol of symbiotic mycorrhizal fungi and dropper (tuber stalk) formation of host orchid seedling. *Plant Growth regulation* 36: 31-39.

Instituto de Ecología A.C. Centro Regional del Bajío. Av. Lázaro Cárdenas No. 253 A.P. 386 C.P. 61600 Pátzcuaro, Michoacán, México.

Kristiansen K.A., J.V. Freudenstein y H.N. Rasmussen. 2004. Molecular identification of mycorrhizal fungi in *Neuwiedia veratrifolia* (Orchidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 251-258.

Lacap D.C., K.D. Hyde y E.C. Liew. 2003. An evaluation of the fungal "morphotype" concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Diversity* 12: 53-66.

Liparini P.O, K. M. Megumi, B.A. Chaer y A. E. Fernandez. 2005. Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. *Can. J. Bot.* 83:54-65.



Mitchell R. 1989. Growing Hardy Orchids from seed at Kew. *The plants man* 3(2): 152-169.

Moore R.T.1987. The genera *Rhizoctonia-like fungi: Ascorhizoctonia, Cerathoriza* gen. Nov., *Eupulorhiza* gen. Nov., *Moniliopsis*, and *Rhizoctonia*. *Mycotaxon* 29:91-99.

Munsell 2000. Soil Color Charts. GretagMacbeth. 617 Life Britain Road, New Windsor, NY 12543.

Ortega-Larrocea M.P. y M. Rangel-Villafranco. 2007. Fungus assisted reintroduction and lon-term survival of two mexican terrestrial orchids in the natural habitat. *Lankesteriana* 7 (1-2): 317-321.

Ortega-Larrocea M.P. 2008. Propagación simbiótica de orquídeas terrestres con fines de restauración edafológica. pp. 85-96. En J. Álvarez-Sánchez. y Monroy-Ata. Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración. Facultad de Ciencias, UNAM. México. D.F.

Ortega-Larrocea M.P. y D. González. 2008. Los hongos asociados a las orquídeas terrestres en la restauración. En: Heredia A.G. (ed.), Tópicos sobre diversidad, ecología y usos de los hongos microscópicos en Iberoamerica. Instituto de ecología A.C. México, cap. 11, 218-227.

Pereira O-L., M.C. Kasuya, A.C. Borges y E.F. Araujo. 2005. Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. *Canadian Journal of Botany* 83: 54-65.



Pereira O.L.,C.L. Rollemberg, A.C. Borges, K. Matsuoka y M.C. Kasuya. 2003. *Epulorhiza epiphytica* sp. Nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. *Mycoscience* 44: 153-155.

Rangel-Villafranco M. 2004. Aislamiento de hongos micorrízicos de orquídeas terrestres de la reserva “El pedregal” de San Ángel, México, D.F. Tesis de Licenciatura. UNAM.

Rangel-Villafranco M. y M. P. Ortega-Larrocea. 2004. Propagación simbiótica de algunas orquídeas terrestres del Pedregal de San Ángel México, Distrito Federal. Resúmenes del IV Simposio Nacional y II Simposio Iberoamericano de la Simbiosis Micorrizica. Morelia, Michoacán, México. p 35.

Rangel-Villafranco M. y M.P. Ortega-Larrocea. 2007. Efforts to conserve endangered terrestrial orchids in situ and ex situ at two Natural Reserves within central Mexico. *Lankesteriana* 7 (1-2): 326 – 333.

Rasmussen H.N. 1995. *Terrestrial Orchids from seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press. Great Britain. 433 pp.

Rasmussen H.N y D.F. Whigham. 2002. Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. *New Phytologist* 154 (3): 797-807.

Rasmussen H.N. y F.N. Rasmussen. 2007. Trophic relationships in orchid mycorrhiza-diversity and implications for conservation. *Lankesteriana* 7(1-2): 334-341.



Sen R., A.M. Hyetala y C.D. Zelmer. 1999. Common anastomosis and internal transcriber spacer RFLP groupings in binucleate *Rhizoctonia* isolates representing root endophytes of *Pinus sylvestris*, sp. from orchid myorrhizas and a phytopathogenic anastomosis group. *New Phytologist* 144: 331-341.

Shan X.C., E.C. Liew, M.A. Weatherhead y I.J. Hodgkiss. 2002. Characterization and taxonomic placement of *Rhizoctonia*-like endophytes from orchid roots.

Sneh B., L. Burpee y A. Ogoshi. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. Minnesota, USA: American Phytopathological Society Press. Third printing. 135 pp.

Suarez J.P., M. Weib, A. Abele, S. Garnica, F. Oberwinkler y I. Kottke. 2006. Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in Andean cloud forest. *Mycological Research* 110: 1257-1270.

Taylor J.E., K.D. Hyde y E.B. Jones. 1999. Endophytic fungi associated with the temperate palm *Trachycarpus fortune* both within and outside of its natural geographic range. *New Phytologist* 142: 335-346.

Taylor D.L., T.D. Bruns, T.M. Szaro y S.A. Hodges. 2003. Divergence in mycorrhizal specialization within *Hexaletris spicata* (Orchidaceae), a nonphotosynthetic desert orchid. *American Journal of Botany* 90: 1168-1179.

Zavala-Álvarez C. 2006. Pteridoflora del Parque Nacional Barranca del Cupatitzio, Uruapan, Michoacán, México. Tesis de Maestría. UMSNH. 87 pp.

Zelmer C.D. 1994. Interactions between northern terrestrial orchids and fungi in nature. M. Sc. Thesis, University of Alberta.



Zettler L.W. y C.J. Hofer. 1997. Sensitivity of *Spiranthes odorata* seeds to light during in vitro symbiotic seed germination. *Lindleyana* 12 (1): 28-29.

Zettler L.W, J. Sharma y F. Rasmussen. 2003. Mycorrhizal diversity. In Dixon, K, Cribb P, Kell S, Barret R. eds. *Orchid Conservation*. Kota Kinabalu, Sabah Malaysia: Natural History Publications. 205-226.

Zettler L.W, J. Sharma y F. Rasmussen. 2004. Mycorrhizal diversity. In Dixon, K, Cribb P, Kell S, Barret R. eds. *Orchid Conservation*. Kota Kinabalu, Sabah Malaysia: Natural History Publications. 185-203.



VII. DISCUSIÓN GENERAL

En la actualidad existen diversos trabajos que indican que los patrones de colonización micorrízicos en las orquídeas son erráticos, variando considerablemente tanto en las raíces de una misma planta como en diferentes raíces provenientes de la misma especie (Vij et al. 2002, Rasmussen y Whigham 2002, Ortega-Larrocea y González 2008). Sin embargo, existe muy poco conocimiento sobre estos patrones de colonización cuando existe transformación de hábitats y de cómo la intensidad de la colonización puede influir en la persistencia de algunas especies de orquídeas. La información referente al grado en que esta transformación afecta la diversidad fúngica también es escasa. En el presente trabajo las tres especies de orquídeas estudiadas presentaron colonización a lo largo de toda la raíz de manera irregular y no fue superior al 35 % en promedio. En otras especies del género como *B. campanulata* y *B. urbana* analizadas en otros hábitats se reporta colonización muy cercana al 100% (Rangel-Villafranco y Ortega-Larrocea 2007) aunque las especies de *Bletia* en estos otros hábitats no desarrollan velamen, por lo que su presencia en las raíces de las especies analizadas puede ser un factor que explique la baja colonización encontrada.

Un hecho importante a considerar con los resultados obtenidos es que en algunas especies de orquídeas como *B. roezlii* la micotrofia no se ve afectada por la perturbación del hábitat dando como resultado una mejor adaptación a diferentes condiciones en el suelo ó bien una menor especificidad hacía su socio fúngico. En contraste *B. purpurata* y *B. punctata* vieron afectada su micotrofia como consecuencia de transformaciones de hábitats mostrando una menor dependendencia en sitios con mayor penetración de luz en los que la longitud de la raíz fue mayor y la colonización fue menor debido a que la adquisición de carbono se da a través de la fotosíntesis principalmente.



La intensidad mayor se encontró en los segmentos más cercanos al ápice predominando los pelotones intactos. Esto puede indicar que los hongos son encontrados en el suelo y conforme crece la raíz los va adquiriendo en lugar de una posible recolonización proveniente del bulbo. Estos resultados coinciden con lo documentado para otras orquídeas terrestres (Rasmussen 1995).

En las tres especies los pelotones en procesos de digestión presentaron los porcentajes más altos (18 %). Esto puede ser debido a que en la época de lluvias es la floración de la planta y formación de la semilla, pudiendo explotar con mayor intensidad su micotrofia para obtener nutrimentos a través del hongo. El estado de los pelotones ha sido relacionado con la fenología de la planta, edad o estacionalidad más que con el grado de disturbio (Látr *et al.* 2008). Se menciona que los pelotones digeridos son más frecuentes durante la etapa de crecimiento de la planta y en plantas adultas, así como en raíces maduras. Los pelotones en proceso de digestión son comunes en el periodo de floración (Siddique y Raghuvanshi 1993, Rasmussen y Whigham 2002) y los resultados obtenidos corroboran esta información.

De un total de 107 aislados obtenidos se pudieron segregar morfológicamente cuatro morfotipos diferentes. Las dimensiones obtenidas para las estructuras analizadas corresponden a las descritas por varios investigadores para el género forma *Rhizoctonia* (Moore 1987, Currah *et al.* 1997, Kristiansen *et al.* 2001). Todos los morfotipos pertenecieron al género anamorfo *Epulorhiza*, sin embargo el teleomorfo deberá ser determinado molecularmente para corroborar esta afirmación. El teleomorfo *Tullasnela* es un género que ha sido reportado comúnmente en orquídeas fotosintéticas y epífitas neotropicales (Zettler *et al.* 1997, Pereira *et al.* 2003, Suárez *et al.* 2006) y documentado para orquídeas terrestres y epífitas mexicanas (Rangel-Villafranco y Ortega Larrocea 2004, Cruz-Blasí 2007).



Trabajos previos en orquídeas terrestres en La Reserva del Pedregal de San Ángel en México D.F. (Rangel-Villafranco 2004) y en orquídeas epífitas en el sureste de México (Cruz-Blasí 2007) reportan el aislamiento de 15 sepas de 7 especies de orquídeas y 9 aislados de 4 morfotipos de hongos asociados a las raíces respectivamente, la mayoría afines al género *Epulorhiza*.

Los morfotipos 2 y 4 de este trabajo se aislaron de las tres especies y presentaron las tasas de crecimiento más rápidas bajo condiciones *in vitro*. El morfotipo dos encontrado en todos los sitios, pudiera tener una mayor distribución ecológica y pudiera presentar mayor capacidad de adaptación a las condiciones edáficas y de dispersión. Trabajos previos señalan que diferentes hongos responden de manera diferente en tiempo y espacio con cambios morfológicos y fisiológicos para adaptarse y responder a modificaciones en el medio ambiente ya sea a escala local o a más amplia escala (Boddy y Jones 2007). Y las estrategias incluyen patrones que pueden ser descritos cuantitativamente en términos de tasas de crecimiento radial, cobertura hifal y dimensiones de estructuras (Boddy y Donnelly 2007).

La especie más abundante y de mejor distribución en todas las zonas de la reserva fue *B. roezlii*. También fue la que presentó mayor colonización y de la que se obtuvo mayor número de aislados y morfotipos. En la zona con mayor grado de perturbación se asocia con todos los morfotipos aislados, encontrando más de un morfotipo asociado a una misma raíz. Trabajos previos han descrito que un mismo individuo de orquídea puede encontrarse asociado con varios morfotipos de un mismo género incluso en un mismo segmento de raíz (Suárez *et al.* 2006). En esta investigación los diferentes morfotipos se aislaron de diferentes segmentos en una misma raíz.



Sin embargo, la presencia de varios morfotipos puede indicar que *B. roezlii* es una especie de baja especificidad a sus endófitos y que por lo tanto, pudiera tener una distribución más amplia dado que puede proliferar en suelos distintos donde posiblemente se encuentra cualquiera de los morfotipos mencionados.

Otros trabajos han reportado una diversidad reducida en algunas orquídeas, encontrando a veces un solo morfotipo en un mismo individuo de la especie de planta (Pereira *et al.* 2005) como fue el caso de *B. purpurata* en esta investigación.

B. purpurata sólo se encontró asociada a dos morfotipos en la Reserva y de esta especie se aisló un solo morfotipo por raíz. Su distribución en el área de estudio fue más heterogénea, encontrándose mejor representada en lugares con mejor calidad de sitio.

B. punctata fue la especie que presentó menor abundancia y tuvo una distribución más restringida a sitios con presencia de malpaís en la Reserva o poco disturbio. Su colonización fue inferior al 15 % en la zona de mayor disturbio y de la que se extrajeron menor número de aislados, presentando raíces de mayor longitud en estos sitios. En las zonas que mostraron algún grado de perturbación, su presencia fue escasa o nula y en estos sitios se encontró asociada con un solo morfotipo de hongo presentando porcentajes de colonización bajos. Es posible que exista una mayor especificidad de esta especie por sus hongos y por lo tanto esto pudiera estar limitando su distribución y abundancia en la Reserva. Estudios previos de reconocimiento de la especie señalan la disminución de sus poblaciones en algunos hábitats y en el estado su distribución sólo ha sido reportada en dos municipios (Hagsater *et al.* 2005, Instituto de Ecología 2008).



Los resultados obtenidos en esta investigación indican que los hongos micorrízicos que se asocian con orquídeas terrestres del género *Bletia* pueden variar, así como los patrones de colonización de la raíz dependiendo de la especie, grado de perturbación y/o tipo de hábitat en el que se desarrollen. Existiendo sin embargo, tal como lo señalan trabajos previos cierta especificidad hacia el socio fúngico en este género de orquídeas.

El grado de especificidad fue diferente en las tres especies de orquídeas analizadas y esto puede ser un factor que influya en el mayor éxito adaptativo que presentan algunas de las especies dentro del género probablemente debido a la presencia de más de un morfotipo fúngico asociado a las raíces de una determinada especie.



VIII. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

La pérdida de hábitats naturales y la fragmentación de los mismos por actividades humanas son dos de las principales causas de la disminución de la biodiversidad a nivel local, regional y global. Se considera que en la actualidad el planeta está enfrentando una de las mayores extinciones en los últimos 65 millones de años (Galetto et al. 2007).

México incluye más biomasa que muchos otros países a nivel mundial, contando con tierras desérticas hasta bosques lluviosos y desde vegetación costera a asociaciones alpinas. Muchas de estas formaciones de plantas son buenos hábitats para las orquídeas, de manera que en el país se reportan más de mil doscientas especies. Sin embargo, el país presenta serios problemas sociales y medioambientales que ponen en riesgo esta biodiversidad observando que la superficie de los bosques, uno de los principales hábitats de estas plantas, se reducen cada año en 4.2% (Hagsater et al. 2005).

En México estas plantas son importantes desde el punto de vista social, cultural y económico. Y aunque su orquiflora es una de las mejor conocidas entre los países tropicales, se cuenta con pocos datos sobre el estado actual en el que se encuentran sus poblaciones naturales. Hasta el 2005 existían evidencias de que al menos dos especies ya se encontraban extintas y otras 22 estaban en riesgo (Hagsater 2005) y esta tendencia sigue aumentando actualmente, por lo que es importante que se realicen estudios demográficos de sus poblaciones.



En este trabajo se determinó la distribución y abundancia de tres especies del género *Bletia* en la Reserva durante una sola época de floración observando una distribución restringida y abundancia escasa para *B. punctata*, por lo que se recomienda que se lleven a cabo estudios demográficos detallados por transectos lineales y/o cuadrantes durante más de una época de floración para tener datos exactos de la situación de sus poblaciones naturales, así mismo se recomienda que este tipo de estudios no solamente se realicen para estas especies si no con mayor urgencia para aquellas que se encuentran más amenazadas.

Por otra parte, se ha visto que los cambios en la configuración del hábitat disponible pueden modificar las interacciones simbióticas entre las plantas y otros organismos. Reportándose que la especificidad de hábitat de las orquídeas parece ser consecuencia de la distribución de los hongos micorrízicos con los que se asocian, mecanismos de polinización y distribución de la semilla, entre otros factores (Batty *et al.* 2002) por lo que es importante conocer estas interacciones.

Este trabajo contribuyó al aislamiento e identificación morfológica de los hongos micorrízicos asociados a las raíces de las especies estudiadas, por primera vez para el estado de Michoacán, contando con cepas puras que quedarán bajo el resguardo del Lab. de Genética y Microbiología de la Facultad de Biología de esta Universidad. Sin embargo es importante que este tipo de estudios se realicen para las doscientas especies de orquídeas que se reportan en el estado y en diferentes etapas de su ciclo de vida desde la germinación, con la finalidad de determinar si el socio fúngico es el mismo o cambia durante su desarrollo para poder proponer programas de reintroducción o conservación que involucren hongos micorrízicos dado que son indispensables para la germinación de la semilla.



Se propone además llevar a cabo la identificación molecular de los aislados obtenidos en esta investigación con la finalidad de corroborar la identidad del género identificado y determinar en la medida de lo posible la o las especies obtenidas.

La confirmación de los postulados de Koch también es un paso importante a seguir por lo que se recomienda realizar pruebas de germinación simbiótica con las cepas obtenidas para confirmar su capacidad de asociación y además determinar la viabilidad de los aislados ya que está se va perdiendo con sucesivas resiembras.

Se ha documentado que las orquídeas terrestres son más difíciles de repropagar que las orquídeas epífitas sin la presencia del socio fúngico, por lo que también se propone que se lleven a cabo pruebas de germinación asimbiótica y simbiótica que permitan corroborar el grado de dependencia de este tipo de orquídeas hacia la asociación.

Se recomienda además realizar pruebas de porcentaje del aislamiento mediante el uso y comparación de diferentes medios de cultivo que más adelante permitan asegurar un mayor éxito en el aislamiento del simbiote dado que se ha reportado que de algunas especies de orquídeas es más difícil aislar el hongo, aún cuando se cuente con pelotones intactos.

Finalmente, en esta investigación se realizó la caracterización in situ de la colonización micorrízica en una sola época, por lo que se propone que se hagan estudios que consideren estacionalidad con la finalidad de conocer la fenología de la colonización, importante desde el punto de vista ecológico.



IX. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

Arditti J. 1992. Fundamentals of Orchid Biology. John Wiley and sons, USA. 691 pp.

Benzing D. H. 1982. Mycorrhizal infections of epiphytic orchids in Southern Florida. American Orchid Society Bulletin 51: 618 – 622.

Brundrett M. C. y L. K. Abbot. 1995. Mycorrhizal fungus propagules in the jarrah forest: II Spatial variability in inoculum levels. New Phytologist 131: 461 – 469.

Brundrett M. C. Diversity and classification of mycorrhizal associations. Biol. Rev. 79: 473 -495.

Burgess H. 1943. Problematik der Mycorrhiza. Naturwissenschaften 47/48: 558 – 567.

Burgess A. 1966. The defensive mechanism in orchid mycorrhiza. New Phyt. XXXVIII, 3: 273-283.

Cameron D.D, J. R. Leake and D. J. 2006. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. New Phytologist 171 (2): 405-416.

Dearnaley J.D.W. 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. Mycorrhizal (2007) 17:475-486

Demant A.R y L. Silva. 1976. El Eje Neovolcánico. In III Congreso Latinoamericano de Geología. México. D.F 22 pp.

Dressler R. L. 1968. Notes of *Bletia* (Orchidaceae). Brittonia 20: 182-190.

Fanfani A. 1990. Guía de orquídeas. Grijalbo, Barcelona. 88 pp.



Gaetto L., R. Aguilar, M. Musicante, J. Astegiano, A. Ferreras, M. Jausoro, C. Torres, L. Ashworth y C. Eynard. 2007. Fragmentación de hábitats, riqueza de polinizadores, polinización y reproducción de plantas nativas en el bosque Chaqueño de Córdoba, Argentina. Asociación Argentina de Ecología. *Ecología Austral* 17: 67 – 80.

García E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koeppen. Instituto de geografía UNAM. México. 220 pp.

Gebauer G. y M. Meyer. 2003. N-15 and C-13 natural abundance of autotrophic and carbon gain from fungal association. *New Phytologist* 160(1): 209-223.

Griesbach R.J.2002. Development of *Phalaenopsis* utility of indels within ribosomal DNA and B-tubulin sequences from fungi in the *Rhizoctonia solani* species complex. *Mol Phylogenet Evol.* 40:459-470.

Hagsater E. y AL. 2002. Icones Orchidacearum 5-6, 2002. Orchids of Mexico parts 2-3.

Hayman D. S. 1983. The physiology of vesicular arbuscular endomycorrhizal symbiosis. *Canadian Journal of Botany* 61: 944 -963.

<http://orquidea.biologia.com>. Accesado 05/Ago/09.

[http://turrusta.blogspot.com/2009/04/partes de una orquidea](http://turrusta.blogspot.com/2009/04/partes_de_una_orquidea). Accesado 12/Abril/2010.

<http://www.biología.edu.ar/fungi>. Accesado 02/octubre/2009

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (INEGI). Av. Lázaro Cárdenas No. 625 Col. Ventura Puente, Morelia, Mich. México. Cartas topográfica y de información predial E13B39, Carta hidrológica E13B39 esc. 1: 50 000 1986; carta del estado de Michoacán 1: 75 000. Imágenes satelitales SPOT ITRF92 2000 E13B39B y E13B39C esc. 1:40 000.



Jones D.L.2006. A complete guide to native orchids of Australia including the Island Territories. Reed New Holland, Sydney.

Kristiansen K.A, D. L. Taylor, R. Kjoller, H. N. Rasmussen y S. Rosendahl. 2001. Identification of mycorrhizal fungi from single pellets of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) using single-strand conformation polymorphism and mitochondrial ribosomal large subunit DNA sequences. *Molecular Ecology* 10: 2089-2093

Látr A., Čuříková, M., Baláž, Z., Jurčák, J. 2008. Mycorrhizas of *Cephalanthera longifolia* and *Dactylorhiza majalis*, two terrestrial orchids. *Ann. Bot. Fennici*:281-289.

Leake J.R .2005. The biology of myco-heterotrophic ("saprophytic") plants. *New Phytol* 127:171-216.

Lee S.S. 2002. A review of Orchid Mycorrhizae in Korea. *Plant Pathol. J.* 18(4): 169-178.

Márquez V.F y S. Escobar. 2000. Áreas Naturales Protegidas de México con decretos federales (1899-2000). Escobar (comp.). INE/ RDS / PNUD. México. 822 pp.

McKendrick S.L, J. R. Leake, D. L. Taylor y J. Read. 2000. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: ontogeny of *Corallorhiza trifida* and characterization of its mycorrhizal fungi. *New Phytol.* (2000) 145: 523-537.

McCormick M.K, D. F. Whigam y O'Neill. 2004. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytol.* 163: 425-438.

McCormick M.K, D. F. Whigam, D. Sloan, O Malleyk and B. Hodkinson. 2006. Orchid-fungus fidelity: a marriage meant to last? *Ecology* 87 (4): 903-911



Ortega-Larrocea M.P, E. Sandoval, C. Guzmán-Ramos y V. M. Chávez-Avilés. 2004. Cambios histológicos ocurridos durante la germinación simbiótica de una orquídea terrestre. Resúmenes del IV Simposio Nacional y II Simposio Iberoamericano de la Simbiosis Micorrizica. Morelia, Michoacán, México. p 34.

Otero J.T, J.D. Ackerman y P. Bayman.2002. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. American Journal of Botany 89(11): 1852-1858.

Peterson R.L, P. Bonfante, A. Faccio y Y. Uetake. 1996. Mycorrhizas: integrated development between roots and fungi. Mycologia 86: 311-326.

Peterson R.L y H.B. Massicote. 2004. Exploring structural definitions of mycorrhizas, with emphasis on nutrient – exchange interfaces. Can. J. Bot. 82: 1074-1088.

Rangel-Villafranco M. y M.P. Ortega-Larrocea. 2004. Propagación simbiótica de algunas orquídeas terrestres del Pedregal de San Ángel México, Distrito Federal. Resúmenes del IV Simposio Nacional y II Simposio Iberoamericano de la Simbiosis Micorrizica. Morelia, Michoacán, México. p 35.

Rasmussen H.N. 2002a. Recent developments in the study of orchid mycorrhizal. Plant and Soil (2002) 244 (1-2): 149-163

Rivera-Dueñas R. 2002. Guía ilustrada de 55 especies de orquídeas encontradas en la Reserva Biológica de Yuscarán, Honduras. Tesis de Licenciatura. Honduras. 96 pp.

Salazar G. 2008. Orquídeas. Diversidad Biológica e inventarios. UNAM. P 153 – 170.

Sivasithampam K. 1993. Ecology of root infecting pathogenic fungi in Mediterranean environments. Advances in Plant Pathology 10: 245 – 279.



Smith S.E, D. J. Read. 1997. Mycorrhizal symbiosis. 2dn. Academic Press, San Diego.

Sosa V. 1992. Neotipificación de tres especies del género *Bletia* (Orchidaceae). Acta Botánica Mexicana, Junio, No. 018. Instituto de Ecología A.C. Pátzcuaro, México. pp 1-9.

Soto M.A, G.A. Salazar y E. Hagsater. 1995. The Orchidaceae of México. A taxonomic synopsis. Informe final del proyecto P107 Orquídeas de México. Instituto Chinoin AC, Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología.

Van der Heijden M. G.A. y I. R. Sanders. 2003. Mycorrhizal Ecology. Ecological Studies, Vol. 157. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany. 456 pp.

Vij S.P. y M. Sharma. 1983. Mycorrhizal association in north Indian Orchidaceae: a morphological study. Bibliotheca Mycologica 91: 467-503.

Wells T. C. E. y J.H. Willems . 1991. Population ecology of terrestrial orchids. SPB Academic Publishing, The Hague, Netherlands. 189 p.



X. ANEXOS

Anexo 1. Características generales de las orquídeas y clasificación taxonómica de las especies estudiadas.

Las raíces de las orquídeas pueden ser simples o ramificadas con diámetros de 1 a 10mm dependiendo de la especie. Generalmente son circulares. Su organización anatómica consiste de un cilindro vascular rodeado por una endodermis que a su vez se encuentra protegida por el córtex; la porción más externa de la raíz es la exodermis que generalmente forma un tejido esponjoso de células muertas que es denominado velamen (Hagsater *et al.* 2005) (Fig. 33).



Figura 33. Características generales de la raíz en la familia Orchidaceae. a) Aspecto externo de las raíces, b) Aspecto interno de la raíz, en corte transversal (Tinción con Fucsina ácida, aumento 400x). Fotos A. Beltrán.



Las estructuras básicas de sus flores son similares a las liris o iris, pero muestran las siguientes características distintivas:

- a) Presentan simetría bilateral, por lo que es fácil imaginar una línea que divide a la flor en dos partes idénticas.
- b) Muestran al menos una fusión parcial entre los filamentos de los estambres y el estilo formando una sola estructura que incorpora los órganos sexuales masculinos y femeninos. Esta estructura es denominada columnela o ginostemo.
- c) Ha habido supresión de los estambres en uno de los lados de la flor, de tal manera que muchas orquídeas poseen sólo un estambre fértil.
- d) El pétalo opuesto al estambre o los estambres fértiles, es generalmente diferente a los otros dos que conforman la flor en color, forma y/o tamaño. El pétalo modificado es denominado labio o labelo y suele ser la parte más vistosa de la planta y funciona como atracción, guía o plataforma para los polinizadores.
- f) Con excepción de las orquídeas Apostasioideae y algunos miembros de Cyripedioideae y Vanilloideae en las que el polen puede presentarse a manera de granos individuales, el polen de las orquídeas generalmente forma agregados, en la mayoría de los casos a manera de tétradas que conforman una estructura más o menos sólida denominada polinia. El número de polinias por flor puede variar de 2 a 8 (raramente 12) (Hagsater *et al.* 2005) (Fig. 34).



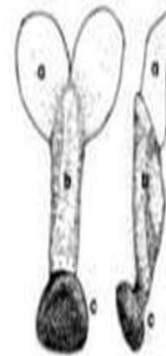
CÓMO RECONOCERLAS



Detalle de la Columna

A Antera
B Estigma
C Base de la columna

En *Bletia urbana*



Detalle del Polinario

a Polinios
b Estipite
c Viscidio

Polinario de Epidendrum

Figura 34. Características de la flor en la familia Orchidaceae. Tomado de <http://turrusta.blogspot.com/2009/04/partes-de-una-orquidea.html>



Clasificación Taxonómica:

Clasificación taxonómica de 3 especies de género *Bletia*

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Asparagales

Familia: Orchidaceae

Subfamilia: Epidendroideae

Tribu: Epidendreae

Subtribu: Bletiinae

Género: *Bletia*

Especie: *Bletia purpurata* (a)

***Bletia roezlii* (b)**

***Bletia punctata* (c)**



Figura 35. Clasificación taxonómica de tres especies del género *Bletia*.

Anexo 2. Tipos de micorrizas y características de la micorriza orquideoide

Las micorrizas son definidas como asociaciones simbióticas entre hongos y plantas en las que ambos integrantes se ven beneficiados (Smith y Read 1997). Existen siete categorías tradicionales de micorrizas en las plantas vasculares basadas en características estructurales identificadas con microscopio de transmisión electrónica, aunque actualmente se discute la reclasificación de estos tipos (Brundrett 2004). Estas categorías son: ectomicorrizas, ectendomicorrizas, micorriza arbutoide, micorriza monotropoide, micorriza ericoide, micorriza arbuscular y micorriza orquideoide (Fig. 36).

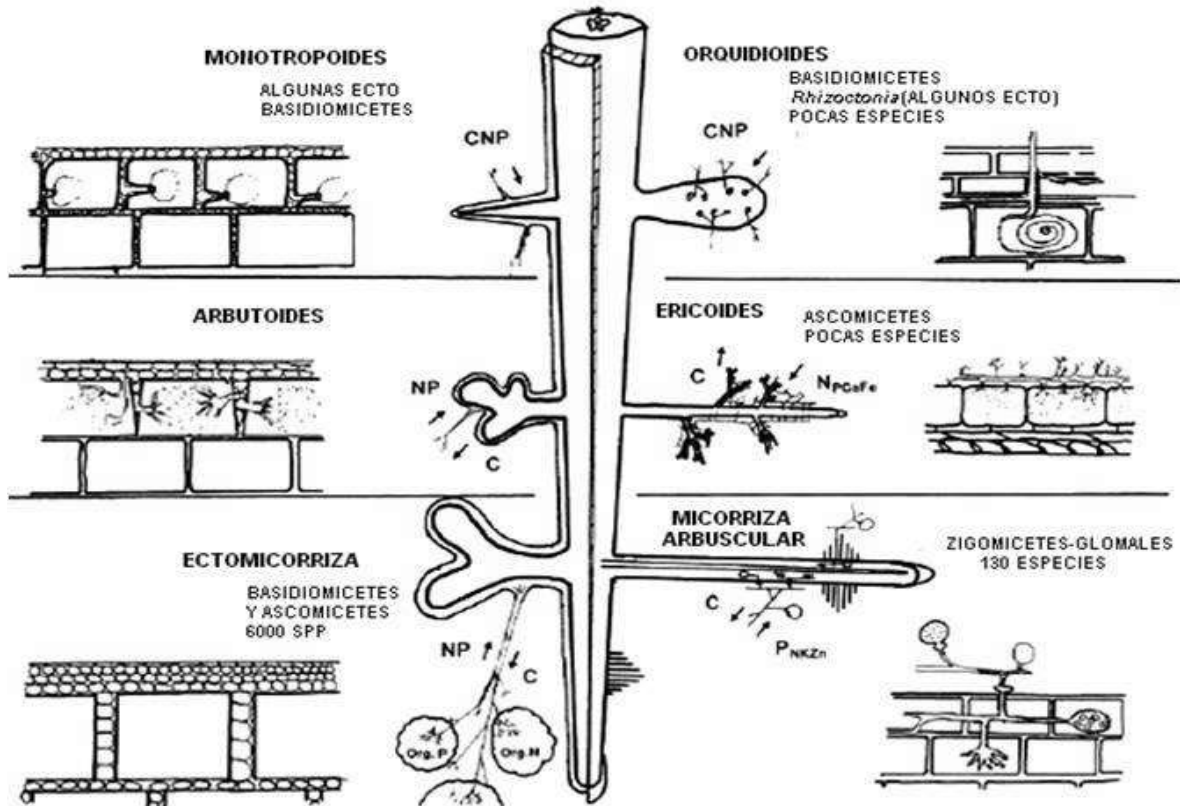


Figura 36. Categorías de micorrizas en plantas vasculares. (Tomada de Read 1999).

En la micorriza orquideoide el hongo asociado puede desarrollarse en protocormos y raíces en especies autotróficas, o en raíces de especies micoheterotróficas. Los procesos de colonización son similares en que las hifas penetran las células parenquimatosas de protocormos y/o raíces (Fig. 37a y b) formando enrollamientos hifales denominados pelotones (Fig. 37c). Estos ovillos se encuentran rodeados por una membrana derivada de la planta y por una matriz interfacial (Fig. 37d). Se asume que esta interface hongo-células de la planta es el sitio donde se lleva a cabo el intercambio de nutrientes en la mayoría de las micorrizas orquideoides. Los pelotones formados en este tipo de micorrizas son digeridos, permitiendo que exista recolonización de las células de la planta previamente colonizadas por las hifas fúngicas (Peterson y Massicotte 2004).

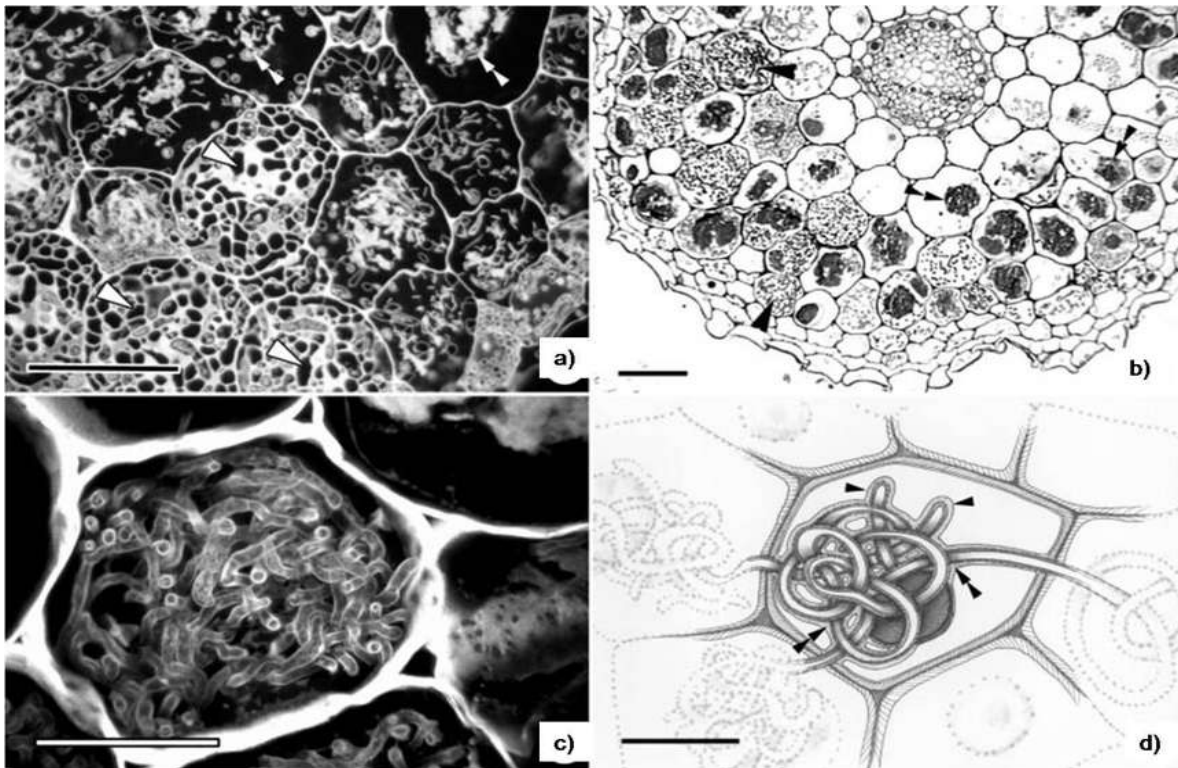


Figura 37. Interface en la micorriza orquideoide. a) Sección de *Goodyera repens* protocormo colonizado. Sección con pelotones intactos (flecha) y colapsados (doble flecha). Barra de escala 100 μm . b) Sección de raíz mostrando pelotones intactos (flechas) y colapsados (doble flecha). c) Pelotones en raíces de *Paphiopedilum* sp. Escala 50 μm . d) Diagrama e pelotones mostrando la interface entre el hongo y las células de la raíz, el hongo es separado por el citoplasma de la raíz por una membrana perifúngica (flechas) y material de la matriz interfacial (doble flecha). Escala 50 μm . (Tomada y modificada de Peterson y Massicotte 2004).



Anexo 3. Medios de cultivo y soluciones utilizadas

Medios de aislamiento fúngico (Clements 1988)

MAF (Para 1 L)

Ca(NO ₃) ₂ - 4H ₂ O	0.5 gr
KH ₂ PO ₄	0.2 gr
KCl	0.1 gr
MgSO ₄ - 7H ₂ O	0.1 gr
Extracto de levadura	0.1 gr
Agar	8 gr

Ajustar pH entre 5.5 y 6 antes de agregar el agar

(Rasmussen 1995)

MAF - A (Para 1 L)

NaNO ₃	0.3 gr
KH ₂ PO ₄	0.2 gr
MgSO ₄ - 7H ₂ O	0.1 gr
KCl	0.1 gr
Extracto levadura	0.1 gr
Azúcar	2.5 gr
Agar	8 gr

Ajustar pH a 6.8 antes de agregar el agar



Medio para reacción a Polifenol-oxidasas (para 500 mL)

Malta	Ac. Tánico
Malta 7.5 gr	Ac. tánico 2.5 gr
Agua 425 mL	Agua 75 mL
Agar bacteriológico 10gr	
Se calienta a disolver y autoclavar	Esterilizar con microfiltro (no autoclavar)

El ac. tánico se adiciona una vez que el medio sale de autoclave y está tibio

Solución de antibióticos (Eritromicina 0.03 % y Gentamicina 0.01 %)

Solución Stock

Eritromicina al 2% y Gentamicina al 1%: Diluir 0.2 gr de eritromicina y 0.1 gr de Gentamicina en 10 ml de agua. Agregar después a 1000 mL de medio para que quede a la concentración deseada.

Fucsina ácida 0.01%

Para 100 mL

Ácido láctico	87.5 mL
Glicerol	6.25 mL
Agua tridestilada	6.25 mL

Alcohol – Ácido acético – Formaldehido (FAA)

Para 100 mL

Alcohol 70%	90 mL
Acido láctico glacial	5 mL
Formaldehido 37%	5 mL



PLVG (Alcohol Polivinilico Lacto Glicerol)

Para preparar 100mL

Ácido láctico	50 mL
Agua destilada	45 mL
Glicerina	5 mL
Alcohol polivinilico	8.33 gr

Anexo 4. Resumen gráfico de técnicas utilizadas

1. Recolección de raíces



Figura 38. Proceso de recolección de raíces de orquídeas para análisis de colonización y aislamiento de hongos micorrízicos.



2. Desinfestación de raíces

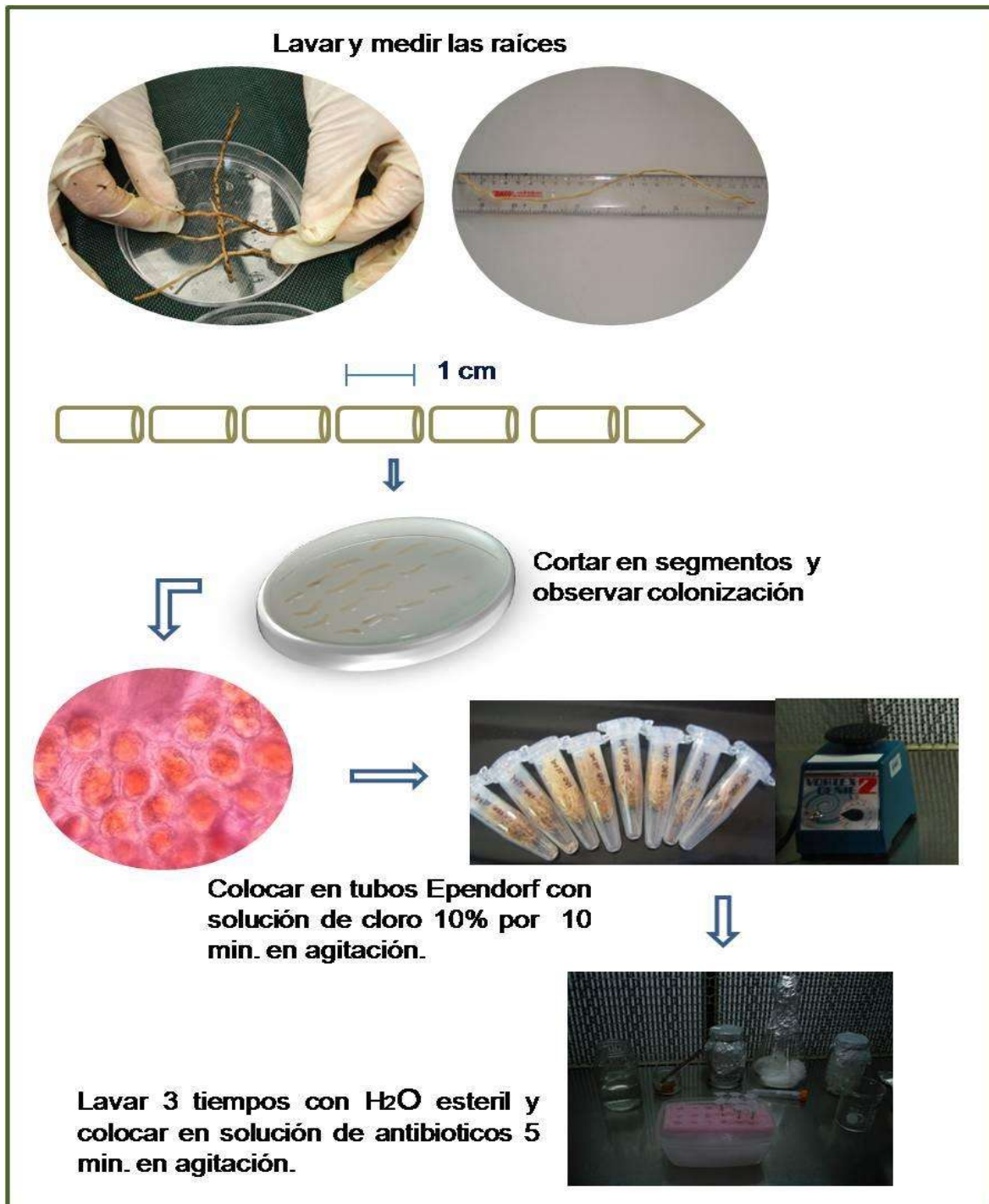


Figura 39. Técnica de desinfección de raíces para aislamiento de hongos micorrízicos orquideoides. Durante todo el proceso las raíces deben ser procesadas bajo campana de flujo laminar y a 4° C.



3. Caracterización de colonización micorrízica y aislamiento fúngico.

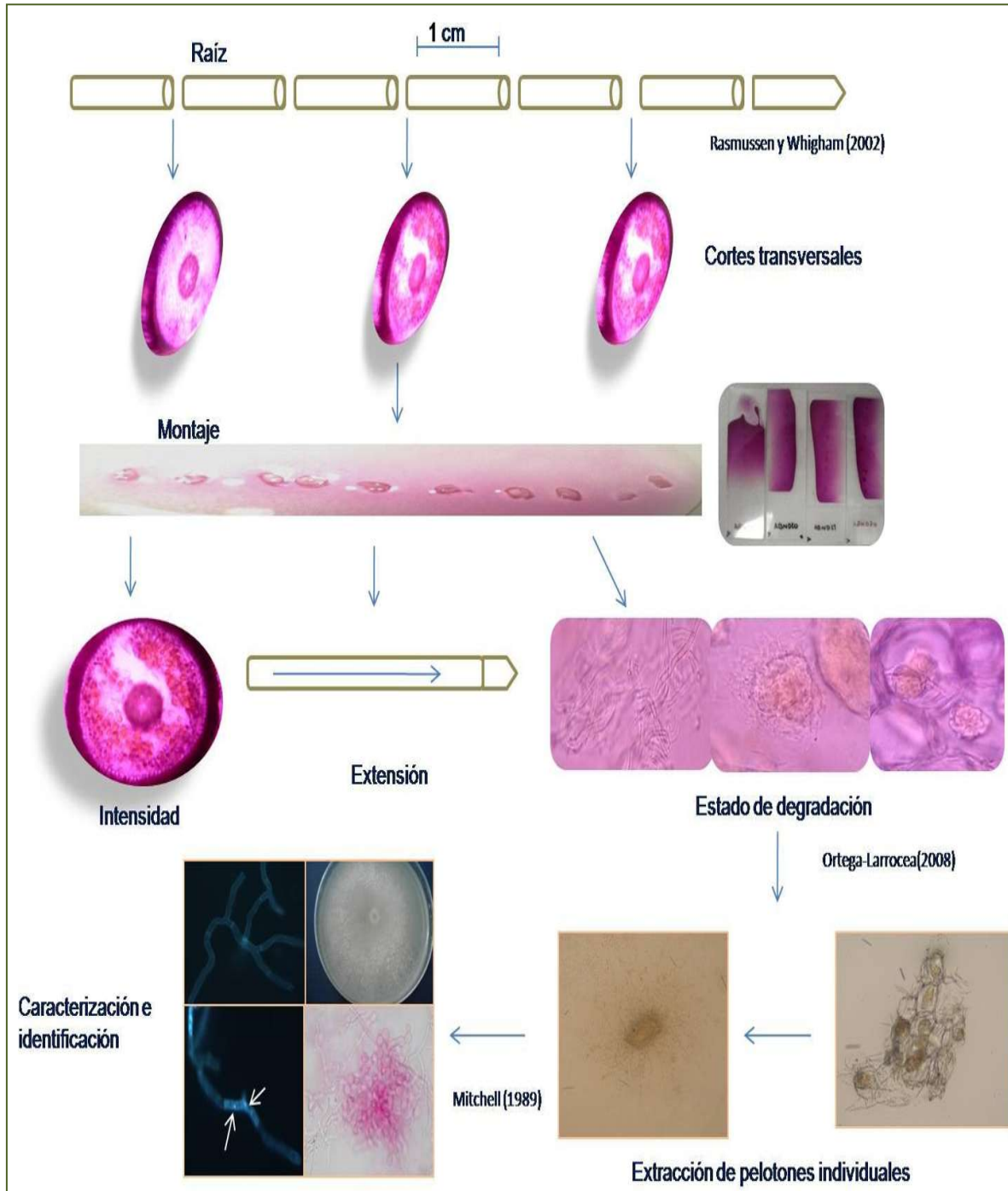


Figura 40. Técnica para caracterización de colonización micorrízica orquideoide y aislamiento de los hongos asociados.

4. Medición de crecimiento de las colonias de los aislados fúngicos



Figura 41. Proceso de medición de las tasas de crecimiento de las colonias de hongos micorrízicos extraídos de orquídeas.