



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

División de Estudios de Posgrado



FACULTAD DE BIOLOGÍA

Programa Interinstitucional De Maestría en Ciencias Biológicas

Área temática: Interacción Planta-Microorganismo-Insecto

**“Especificidad potencial de hongos micorrícicos en el
proceso de germinación y supervivencia *in vitro* de
orquídeas terrestres”**

T E S I S

Que Presenta:

Biól. Nubya Edith Montes Villa

Como requisito para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias Biológicas

Directora de tesis:

Dra. Yazmín Carreón Abud

Morelia, Michoacán, México, Agosto de 2016

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL **LABORATORIO DE GENÉTICA Y MICROBIOLOGÍA** DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA ASESORÍA DE LA **DRA. YAZMÍN CARREÓN ABUD** Y CO-ASESORÍA DE LA **M.C. MARÍA DE LOS ANGELES BELTRÁN NAMBO**, CON EL APOYO DE LA UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO Y EL FINANCIAMIENTO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT).



*Sorprendernos por algo es el primer paso de la
mente hacia el futuro”*

Louís Pasteur

Dedicado a mis padres y mis hermanos y familia, por el apoyo y las
armas que me brindan para lograr lo que me propongo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Gracias a dios por cada una de las bendiciones que ha puesto en mi vida y que han permitido realizar todo lo que siempre he deseado.

A mis padres Angelina Villa Recendiz y J. Octavio Montes Díaz, por la vida. Porque a lo largo de mi vida han caminado conmigo en cada uno de mis triunfos y tropiezos, por su apoyo y amor incondicional. Por su apoyo en cada una de mis desiciones y porque día con día siembran en mi la inquietud por seguir aprendiendo.

A mis hermanos Claudia Montes, Octavio Montes y Daniel Montes y a mi cuñado Ignacio Médina, quienes siempre con el mejor humor me motivan a seguir adelante y no claudicar. Por depositar en mi su confianza en todo momento.

A mi abuelo José Montes Álvares, que aunque ya no esta físicamente siempre inculcó en mi el amor por el estudio y las ganas de superación personal.

AGRADECIMIENTOS PROFECIONALES

A la Dra. Yazmín Carreón Abud, por aceptar asesorarme en este ciclo de mi vida, con conocimientos y materiales para la realización de este.

A la M.C. María de los Angeles Bletrán Nambo por todos los conocimientos brindados, por su apoyo incondicional, por la paciencia y confianza depositadas en mí.

A la mesa de sinodales: Dra. Írene Ávila Díaz, Dr. Rafael Salgado Garciglia, Dr. Victor Manuel Gómez Reyes, Dr. Javier Villegas Moreno y Dra. Yazmín Carreón Abud, por su tiempo para aportar elementos para que fuera un trabajo con mejor estructuración.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de este proyecto.

A todas las personas que participan en el laboratorio: Ángeles, Gloria, Aarón, Fátima, Griselda, Julieta, Román, Martín, Alejandro por hacer más amenas y alegres los días y tardes en el laboratorio.

A mis amistades en donde actualmente laboro, porque aún cuando me conocen poco, con su apoyo y palabras de moticavión me alentaron a continuar.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Generalidades de la familia Orchidaceae	3
2.2. Distribución y diversidad	4
2.3. Características de la familia Orchidaceae	4
2.3.1. Viabilidad de semillas de orquídeas	8
2.3.2. Proceso de germinación	10
2.3.2.1. Germinación asimbiótica	13
2.3.2.2. Germinación simbiótica	14
2.4. Asociación micorrícica	15
2.4.1. Clasificación de las Micorrizas	17
2.4.2. Micorriza Orquideoide	18
2.4.2.1. Mecanismos de colonización de los hongos micorrícicos orquideoideos (HMO)	19
2.4.2.2. Hongos micorrícicos orquideoideos	21
2.5. Especificidad orquídea-hongo	22
3. JUSTIFICACIÓN.....	25
4. HIPÓTESIS.....	26

5. OBJETIVOS	27
5.1. Objetivo general	27
5.2. Objetivos particulares	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
6.1. Colecta de material biológico	28
6.2. Procesamiento de muestras en laboratorio	28
6.3. Caracterización morfológica e identificación de hongos micorrícicos	30
6.4. Porcentaje de viabilidad de las semillas	31
6.5. Evaluación de la germinación de semillas de orquídeas	32
6.5.1. Evaluación del pocerntaje de germinación	34
6.5.2. Evaluación del índice de desarrollo	34
6.5.3. Evaluación del porcentaje de supervivencia	35
7. RESULTADOS	36
7.1. Aislamiento y caracterización morfológica de HMO	36
7.2. Viabilidad de las semillas	43
7.3. Evaluación de la germinación de semillas	45
7.3.1. Evaluación del porcentaje de germinación	45
7.3.2. Evaluación de índice de desarrollo	48
7.3.3. Evaluación del porcentaje de supervivencia	55
8. DISCUSIÓN.....	58
9. CONCLUSIONES	67
10. LITERATURA CITADA.....	68
11. ANEXOS	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Generalidades de una flor de orquídea.	6
Figura 2. Frutos y semilla de orquídeas.	7
Figura 3. Corte longitudinal de un protocormo del género <i>Bletia</i> .	12
Figura 4. Semilla y diferentes etapas de desarrollo y crecimiento de <i>Spiranthes cernua</i>	12
Figura 5. Esquema que resume los principales procesos de intercambio de nutrientes ectomicorrizas y endomicorrizas.	16
Figura 6. Tipos de micorrizas	18
Figura 7. a) Tolipofagia y b) Ptiófagia.	20
Figura 8. Extracción de pelotones individuales de raíces de orquídea.	29
Figura 9. Colonización.	36
Figura 10. Características de las hifas en los aislados afines al género-forma <i>Rhizoctonia</i>	37
Figura 11. Tasas de crecimiento (mm/día) de las morfoespecies de HMO.	41
Figura 12. Dimensiones de células monilioides de las distintas morfoespecies de HMO	42
Figura 13. Diámetro promedio de hifas de las morfoespecies de HMO.	43
Figura 14. Porcentaje de viabilidad de semillas de las distintas especies de orquídeas terrestres analizadas.	44
Figura 15. Viabilidad de semillas de especies de orquídeas terrestres en los métodos de tinción.	45
Figura 16. Pruebas de germinación simbiótica y asimbiótica.	47
Figura 17. Índice de desarrollo de <i>B. purpurata</i> a 30, 60 y 90 días de cultivo, en los diferentes tratamientos tanto asimbióticos, como simbióticos.	49
Figura 18. Desarrollo de <i>B. purpurata</i> .	50
Figura 19. Desarrollo de <i>H. flexuosa</i> .	51

Figura 20. Índice de desarrollo de <i>H. flexuosa</i> a 30, 60 y 90 días de cultivo, en los diferentes tratamientos tanto asimbióticos, como simbióticos	52
Figura 21. Cortes transversales de protocormos para análisis de colonización.	53
Figura 22. Etapas de desarrollo (ontogénicas de orquídeas).	54
Figura 23. Pruebas de supervivencia.	56
Figura 24. Proceso de recolección de raíces de orquídeas y desinfección de raíces para aislamiento de hongos.	92
Figura 25. Técnica de aislamiento, caracterización e identificación de los HMO.	93
Figura 26. Técnica de desinfección de semillas, y pruebas de germinación.	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferentes estadios de germinación y desarrollo de orquídeas propuesto por Zettler y McInnis (1993).....	34
Tabla 2. Identificación de los nueve hongos micorrícicos orquideoides. A la izquierda; la identificación morfológica y a la derecha la identificación molecular realizada por Beltrán (2016) (Datos en proceso).	60

RESUMEN

En México la familia Orchidaceae se encuentra taxonómicamente bien catalogada. Sin embargo, como sucede en otras partes del mundo, en nuestro país las poblaciones naturales de orquídeas han disminuido drásticamente sin que se cuente con datos precisos de su situación actual y de la interacción que guardan con otros organismos, como son sus hongos micorrícicos, los cuales son muy importantes para los procesos de germinación de la semilla, así como en distintas etapas de desarrollo de la planta. Por lo que, estudios como el presente son importantes ya que permiten determinar la especificidad ecológica (asociación planta-hongo en condiciones naturales), como potencial (asociación planta-hongo que se producen en condiciones de laboratorio), que pudieran tener las orquídeas terrestres hacia su socio fúngico y la eficiencia de la simbiosis en los procesos de desarrollo y supervivencia en cultivos *in vitro*, como propuesta de conservación eficiente de esta familia de plantas en sus hábitats naturales. El objetivo de este estudio fue caracterizar e identificar morfológicamente los hongos micorrícicos de orquídeas terrestres de los géneros *Govenia*, *Habenaria* y *Bletia*, y evaluar su especificidad potencial en la germinación y desarrollo de plántulas *in vitro*. Para abordar esto, se colectaron raíces de las plantas y se identificaron sus hongos micorrícicos a partir de las características macroscópicas y microscópicas que presentaron, las cuales se obtuvieron de cultivos puros. Además, se colectaron cápsulas de los mismos géneros para llevar a cabo las pruebas de viabilidad de semillas y la germinación de éstas en diferentes tratamientos. Se obtuvieron 9 morfoespecies a fines al género-forma *Rhizoctonia*, las cuales pertenecen únicamente a la especie *B. purpurata*, en las demás especies de orquídeas analizadas no se aislaron HMO. *B. purpurata* se relacionó principalmente con hongos del género teleomorfo *Tulasnella* (ocho morfoespecies) y uno a *Sebacina*. Sin embargo, se comprobó que la variación presentada en los caracteres evaluados no permite una caracterización clara para este grupo. Por otra parte, se evaluó la viabilidad de semillas de los diferentes géneros usando dos técnicas colorimétricas distintas (diacetato de fluoresceína y tetrazolio), concluyendo que el más efectivo para estimar la viabilidad es el de tetrazolio, debido los patrones de tinción del embrión que presentan, lo que permiten una mayor confiabilidad.

En la evaluación del proceso de germinación, los aislados de *B. purpurata* difirieron en eficiencia al promover la germinación, desarrollo y supervivencia de *B. purpurata* y *H. flexuosa*. La germinación de *B. purpurata* fue más eficiente En *B. purpurata* la especie *Tulasnella* sp1 fue el más eficiente en promover la germinación. En cuanto al índice de desarrollo, los más eficientes fueron *Tulasnella* sp1, *Tulasnella* sp3 y *Tulasnella* sp7. Por otra parte el mayor porcentaje de supervivencia se encontró en el tratamiento con *Tulasnella* sp1 y *Tulasnella* sp7, mientras que *Tulasnella* sp8 y *Sebacina* sp1 terminaron por parasitar y provocar la muerte de los estadios alcanzados al fin del experimento. Al analizar la interacción entre los aislados extraídos de *B. purpurata* en la germinación de semillas de *H. flexuosa*, se encontró que esta se vio favorecida por *Tulasnella* sp7, *Tulasnella* sp5, mientras que el índice de desarrollo mayor, se encontró en los medios asimbióticos KC, PHYTAMAX y en simbiosis con *Tulasnella* sp1. La supervivencia en esta especie fue más favorable en los medios asimbióticos KC, PHYTAMAX, y en simbiosis con *Tulasnella* sp1 y *Tulasnella* sp8 y menos desfavorable en simbiosis con *Tulasnella* sp2, *Tulasnella* sp5 y *Tulasnella* sp7. Según lo obtenido, existe especificidad orquídea-hongo, puesto que los aislados de *Bletia purpurata* fueron más eficientes en la promoción de la germinación, desarrollo y supervivencia de las plántulas, en comparación con *H. flexuosa*. Este estudio representa una contribución al conocimiento de la biología de la simbiosis para los géneros de orquídeas en estudio, así como para futuras investigaciones donde la reproducción por semilla es importante. De la misma manera, los métodos *in vitro* pueden emplearse como estrategias de conservación con el fin de promover la preservación de esta familia considerada amenazada.

Palabras clave: *Rhizoctonia*, *Tulasnella*, Simbiosis, *Sebacina*

ABSTRACT

In Mexico the Orchidaceae family is taxonomically well cataloged. However, like it happens in others parts of world, in our country the natural populations of orchids have been decreased drastically, and knowledge about their current situation and the interaction they share with other organisms, like their mycorrhiza fungi, is scarce. These fungi are very important for the germination process of the seed and during different stages of the plant development. Therefore, studies about these topics are important because they will allow to determine ecological specificity situation (plant-fungus association in natural conditions), as well as potential specificity (plant-fungus association that produced in laboratory conditions), that would allow to determine the specificity that terrestrial orchids might have towards their fungal partner and efficiency of the symbiosis in the development processes and survival in *in vitro* cultures, as an alternative in conservation programs of this plants family in their natural habitats. The aim of this study was the morphological characterization and identification of mycorrhiza fungi of terrestrial orchids include in genus *Bletia*, *Habenaria* y *Govenia*, and assess their potential specificity, *in vitro* germination and seedling development. To achieve this, plants roots were collected and their mycorrhiza fungi were isolate and identified from the macroscopic and microscopic characteristics. In addition, capsules of the same genera were collected to perform viability and germination seeds' tests. Nine morphospecies related to form-genus *Rhizoctonia* were obtained, they were extracted to *B. purpurata* species, and in *H. flexuosa* species isolates were not obtained. *B. purpurata* was mainly related to fungi of the teleomorph *Tulasnella* genus (eight morphospecies) and one to *Sebacina*. It was found that the variation present in the evaluated characteristics did not allow a clear characterization for this group. In the other hand, the viability of seeds of the different genera was evaluated using two different colorimetric techniques (fluorescein diacetate and tetrazolium), it concluded that the most effective technic to estimate viability is the tetrazolium.

In the evaluation of the germination process, isolates of *B. purpurata* differ in efficiency to promote the germination, growth and survival of *B. purpurata* and *H. flexuosa*. *Tulasnella* sp1 species was the most effective in promoting germination. With respect to development index, the most efficient samples were *Tulasnella* sp1, *Tulasnella* sp3 and *Tulasnella* sp7. The highest survival percentages were found in treatments with *Tulasnella* sp1 and *Tulasnella* sp7 while *Tulasnella* sp8 and *Sebacina* sp1 parasitized and eventually they caused plants' death at the end of the experiment. When the interaction between isolates extracted was analyzed on *H. flexuosa* seed germination, it was found that germination was favored by *Tulasnella* sp7 and *Tulasnella* sp5, while the greatest index development was found in KC and Phytamax asymbiotic media and in *Tulasnella* sp1 symbiotic media. The survival of this species was highest in KC and Phytamax asymbiotic media, and in *Tulasnella* sp1 and *Tulasnella* sp8 symbiotic media and lowest in *Tulasnella* sp2, *Tulasnella* sp5 and *Tulasnella* sp7 symbiotic media. The results obtained show that exist orchid-fungus specificity, since *B. purpurata* isolates were more efficient in promoting germination, development and survival of seedlings from this species compared with *H. flexuosa* seedlings.

This study represents a contribution for better knowledge on the biology of terrestrial orchids' symbiosis, and for future research where reproduction by seed could be important. Likewise, *in vitro* methods can be used as conservation strategies to promote the preservation of this family that is considered threatened.

1. INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae es uno de los grupos de plantas vasculares más grandes ya que comprende cerca del 10% de todas las especies de plantas con flores (Dressler 1981; Zotz, 2013). Los miembros de esta familia han obtenido diversas estrategias de vida que van desde epífitas a terrestres y de hojas siempre verdes hasta especies no fotosintéticas (Zettler *et al.*, 2004). De manera que, a nivel mundial se reportan alrededor de 25, 000 especies (Jones, 2006), y de las cuales al menos 1, 260 se encuentran distribuidas en diferentes estados de la República Mexicana (Soto *et al.*, 2007). Para el estado de Michoacán se menciona alrededor de 200 especies, algunas consideradas de distribución escasa o rara (Instituto de Ecología, Pátzcuaro, 2008).

En la mayoría de estas plantas se han encontrado hongos endofitos e intracelulares en uno o más de sus órganos tales como raíces y cormo en algún periodo de su ciclo de vida (Mukerji *et al.* 2002; Smith y Read 2008; Ávila *et al.*, 2013) y de los cuales no se conoce el papel que desempeñan en la planta. Algunos de estos hongos forman asociaciones simbióticas que son denominadas micorrizas orquideoideas y difieren de otros tipos de micorrizas por diversas características distintivas. Son consideradas una asociación benéfica para estas plantas, por lo que la comprensión de esta simbiosis micorrízica es de gran importancia, así como conocer la identidad y disponibilidad de los hongos simbiosiontes, ya que se considera un factor clave que ha influido en la función, distribución y diversidad de las orquídeas (Zettler *et al.*, 2004). Aún que esta familia se encuentra taxonómicamente bien catalogada, son pocos los estudios que se han realizado con la finalidad de conocer el tipo de interacciones que tienen estas plantas y el grado de especificidad tanto ecológica como potencial que pueden tener con estos hongos simbiosiontes.

La micorriza orquideoidea se caracteriza por la formación de pelotones, que son estructuras miceliares que ocupan el espacio intracelular en las células corticales causando el desplazamiento de los organelos (Breddy, 1991). Además, tienen otras características distintivas como células largas y ramificaciones en ángulo recto con respecto a la hifa principal; en ocasiones se estrecha ligeramente a nivel de la bifurcación y posee un septo cerca de ella. El hongo además puede producir ramilletes de células cortas y anchas,

denominadas células monilioides, y de las cuales se pueden desarrollar pequeños esclerocios (Mosquera *et al.*, 2010).

Los estudios de identificación morfológica y molecular de hongos asociados a orquídeas indican que existe un amplio rango de hongos que actúan como micobiontes (Warcup y Talbot, 1971; Currah *et al.*, 1988; Rasmussen, 1995; Taylor y Bruns, 1997, 1999; Kristiansen *et al.*, 2001), pero que presentan taxa comunes, y los cuales están incluidos dentro del grupo género-forma *Rhizoctonia*, que incluye en la fase asexual y sexual (anamorfo-teleomorfo) los géneros *Ceratrhiza-Ceratobasidium*, *Epulorhiza-Tulasnella*, *Sebacina-Monilliopsis* y *Rhizoctonia-Thanatephorus* (Warcup y Talbot 1967; Roberts, 1999; Mosquera *et al.*, 2010), con lo que se apoya que estas plantas presentan interacciones fúngicas específicas (Beltrán, 2010).

A nivel mundial las investigaciones realizadas indican una situación compleja ya que algunas orquídeas fotosintéticas, aun cuando muestran un amplio rango de asociación, tienen un único hongo micorrícico dominante (Dearnaley, 2007). También se ha encontrado que las orquídeas epífitas presentan una intensidad de colonización más baja y son más generalistas hacia la asociación que las orquídeas terrestres (Otero *et al.*, 2002), y que además en las orquídeas terrestres de climas templados la micorriza es fundamental durante el proceso de germinación de la semilla, desarrollo y/o establecimiento de la plántula en comparación con orquídeas epífitas tropicales (Smith y Read, 1997).

Algunos trabajos de orquídeas epífitas a nivel mundial indican estar asociados a distintos clados. En Puerto Rico, América Central-*Ceratobasidium* (Valadares *et al.*, 2012; Otero *et al.*, 2004; Mosquera *et al.*, 2013; Otero *et al.*, 2013), Brasil-*Tulasnella* y *Ceratobasidium*, (Pereira *et al.*, 2003, 2005) y en el Ecuador-*Tulasnella* y *Sebacina* (Suárez *et al.*, 2006), mientras que orquídeas terrestres de Puerto Rico y Colombia, muestran asociación principalmente con diferentes clados de *Tulasnella* (Valadares *et al.*, 2012; Otero *et al.*, 2004; Mosquera *et al.*, 2013; Otero *et al.*, 2013). Estudios de orquídeas terrestres realizados en alrededores de la ciudad de México reportan que algunos géneros parecen tener una alta especificidad por su micobionte como *Bletia-Tulasnella*, *Dichromantus-Ceratobasidium*, *Habenaria-Tulasnella* y *Malaxis-Tulasnella* (Rangel-Villafranco y Ortega-Larrocea, 2007; Beltrán, 2010). Sin embargo, aun que se menciona

que hay un gradiente de especificidad en géneros de orquídeas, aún siguiéndose pocos los estudios que se han realizado para confirmar esta situación.

Los proyectos de conservación a nivel mundial utilizan técnicas simbióticas para la propagación de orquídeas, utilizando bancos de semillas y cultivos de hongos. Las especies de orquídeas consideradas raras o amenazadas se han estado propagando simbióticamente con el propósito de conservación *ex situ* o reintroducción (Rasmussen, 2007). Sin embargo, para poder realizar este tipo de estudios se requiere de un amplio conocimiento de los aspectos biológicos de esta asociación, entre los que se encuentra la determinación de la especificidad que pudieran mostrar, tanto ecológica (papel de las interacciones o asociaciones planta-hongo que se producen en condiciones naturales), como especificidad potencial (asociaciones planta-hongo que se producen en condiciones de laboratorio) (Harley y Smith, 1983; Masuhara y Katsuya, 1994).

En México los estudios realizados sobre micorrizas en orquídeas aun que han abordado aspectos relacionados a la geminación, estos están encaminados únicamente a cuestiones de eficiencia y no de especificidad, por tal motivo el presente estudio es importante para conocer la especificidad potencial que pudieran tener las orquídeas terrestres hacia su socio fúngico y la eficiencia de la simbiosis en los procesos de desarrollo y supervivencia en cultivos *in vitro*, como propuesta de conservación eficiente de esta familia de plantas en sus hábitats naturales.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades de la familia Orchidaceae

La familia Orchidaceae pertenece a la clase de las monocotiledóneas, las cuales son principalmente plantas herbáceas (Rangel, 2006), es una de las familias de plantas con flor más grandes y diversas, ocupando el segundo lugar luego de la familia Asteraceae (Ordoñez, 2012). Se estima que está conformada por 20 000 a 30 000 especies distribuidas en 5 subfamilias; Apostasioideae, Vanilloideae, Orchidoideae y Epidendroideae (Hágsater *et al.*, 2005). Los miembros de este taxón crecen en una amplia gama de hábitats y tienen

una gran variedad de estrategias de vida que van de epífitas a terrestres, así como distintos aspectos nutricionales desde autótrofos a heterótrofos (Mc Cormick *et al.*, 2004).

2.2. Distribución y diversidad

Esta familia se distribuye por todo el mundo a excepción de los polos, por lo que se les considera verdaderas plantas cosmopolitas, alcanzando su máxima diversidad en las regiones de climas tropicales y subtropicales (Calderón, 2007), especialmente en los andes americanos (Dressler, 1981). No obstante, muchas especies se caracterizan por presentar distribuciones geográficas limitadas (Tremblay, 1997).

En México se reconocen actualmente más de 1,200 especies (Hágsater *et al.*, 2005). De ellas, aproximadamente, 200 están en alguna categoría de riesgo: amenazadas, o en peligro de extinción (SEMARNAT, 2010). Alrededor del 60% de los taxa se desarrollan en el bosque de niebla, ecosistema que ocupa solo 1% del territorio nacional (Menchaca *et al.*, 2012).

Los estados de la república mexicana que albergan una mayor diversidad de especies son Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Guerrero y Michoacán, aunque todos los estados cuentan por lo menos con una especie (Soto *et al.*, 2007).

Para el estado de Michoacán se mencionan alrededor de 200 especies, algunas consideradas de distribución escasa o rara (Soto *et al.*, 2007; Instituto de Ecología, Pátzcuaro 2008, citado en Beltrán, 2010).

La amplia distribución y diversidad de esta familia se asocia a una alta plasticidad adaptativa que le ha permitido colonizar una variedad de nichos, desde el medio terrestre, incluyendo formas litófitas hasta especies de vida aérea (epífitas) en las copas de los árboles (Chase *et al.*, 2003) y de hojas siempre verdes hasta especies no fotosintéticas (Zettler *et al.*, 2004).

2.3. Características de la familia Orchidaceae

Las plantas de esta familia poseen dos tipos de crecimiento, el monopodial, cuando el crecimiento vegetativo se da a partir de un meristemo apical que da lugar a un solo eje

principal; y el simpodial, cuando el crecimiento vegetativo se da por vástagos generados de manera consecutiva a partir de meristemas o yemas situadas en el vástago anterior formando un eje compuesto (Hágsater *et al.*, 2005).

Como característica única de la familia está la formación del protocormo, que es una estructura originada a partir de la diferenciación de las células del embrión que dará origen a la plántula. La fase de protocormo es heterotrófica y dependiente de la asociación con un hongo micorrízico que sustente la germinación y el posterior desarrollo de la plántula a través del suministro de nutrientes (Clements, 1988).

El tallo es muy variable en dimensiones y estructura, según el tipo de crecimiento pueden ser rizomas, cormos (terrestres) o pseudobulbos (epífitas). Esta estructura desempeña funciones de almacén de agua y sustancias de reserva (Hágsater *et al.*, 2005).

Las hojas son simples y enteras, perennes o deciduas, además pueden ser delgadas, carnosas, coráceas o rígidas (Hágsater *et al.*, 2005), con nerviación paralelinervia o conduplicadas (un solo nervio prominente por el envés y el resto de la lámina liso) (Reina y Otero, 2011). Estas estructuras efectúan las funciones típicas de la mayoría de las plantas, aunque también pueden estar modificadas para servir como almacén de agua (Hágsater *et al.*, 2005).

Las raíces son carnosas, simples o ramificadas, y en especies epífitas se presenta un tejido especializado llamado velamen, el cual facilita la absorción de humedad y puede realizar la fotosíntesis. De manera general, la función de las raíces es la de absorber agua y nutrientes, además de fijar la planta al hospedero en las especies epífitas (Hágsater *et al.*, 2005).

Las flores suelen estar agrupadas en racimos o panículas, aunque pueden ser solitarias. Las inflorescencias se originan principalmente en la base o el ápice del tallo o pseudobulbo. La flor presenta simetría bilateral y consta principalmente de las siguientes características, tres sépalos libres o connados, tres pétalos libres, de los cuales, el central está modificado (labelo) (Reina y Otero, 2011; Kull y Arditti, 2013) (Figura 1A); una columna, estructura resultante de la fusión entre los filamentos de los estambres y el estilo

(Figura 1B) (estructuras masculinas y femeninas) (Kull y Arditti, 2013); polinios, que son conglomerados de granos de polen; y el rostelo, estructura que separa los polinios de la superficie fértil del estigma, además de facilitar la dispersión de los mismos. Las flores son por lo general hermafroditas, aunque también existen unisexuales como en los géneros *Catasetum* y *Cynoches* (Hágsater *et al.*, 2005). Las orquídeas atraen a los polinizadores mediante gran variedad de estrategias, entre ellos el mimetismo, la fragancia, las ofertas de néctar, trampas, entre otros otros artefactos (Kull y Arditti, 2013).

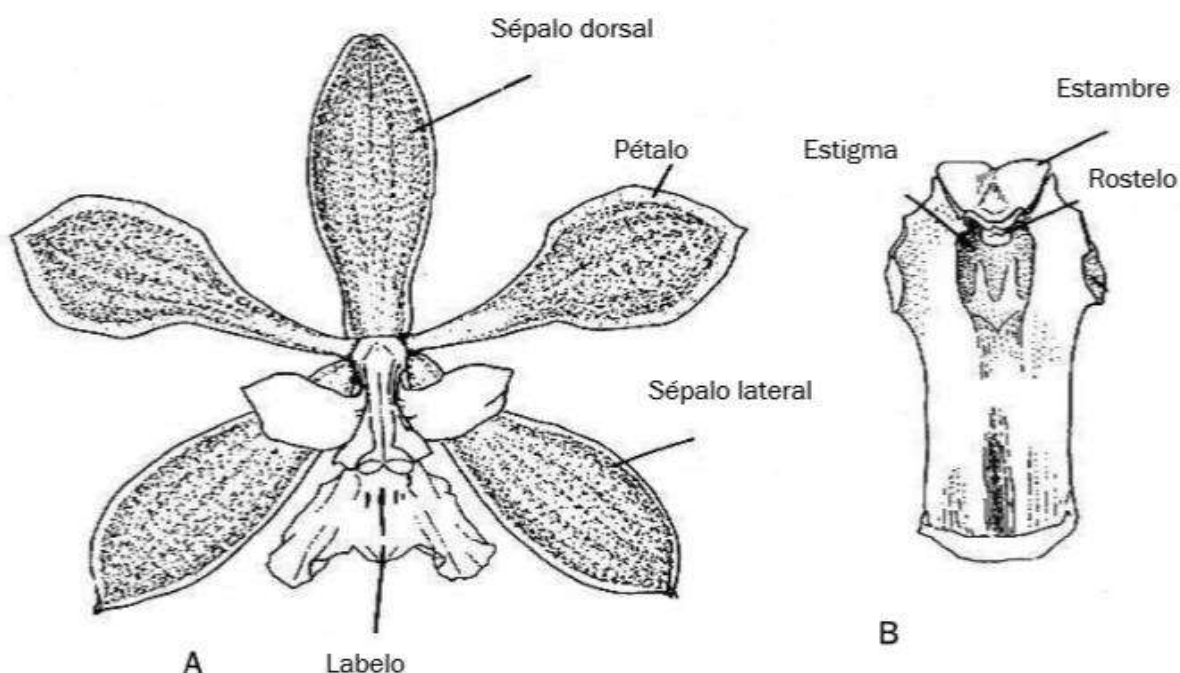


Figura 1. Generalidades de una flor de orquídea. A) Partes constituyentes de una flor de *Encyclia*, vista frontal y B) Vista ventral de la columna. Tomado de Dressler (1993).

Los frutos de las orquídeas son cápsulas con varias suturas longitudinales que al madurar permiten la liberación de las semillas (Arditti y Ghani, 2000; Hágsater *et al.*, 2005; Montaña, 2011) (Figura 2a). Pudiendo llegar a producir desde 1,300 a 4, 000, 000 semillas por cápsula (McKendrick, 2002, citado en Pazmiño, 2011).

Las orquídeas se caracterizan por poseer semillas minúsculas y numerosas, llamadas semillas polvo (Arditti y Healey, 1980; Kull y Arditti, 2013). Éstas pueden medir desde 0.4 – 1.25 mm de largo y 0.08 – 0.27 mm de ancho (Otero *et al.*, 2012). Debido al diminuto tamaño de las semillas, están escasamente diferenciadas por lo que contienen poca o

ninguna reserva para llevar a cabo la germinación, es decir, carece de endospermo (Arditti y Healey, 1980), de cotiledones y presentan un embrión muy pequeño (Arditti, 1992; Dressler, 1981) (Figura 2b).

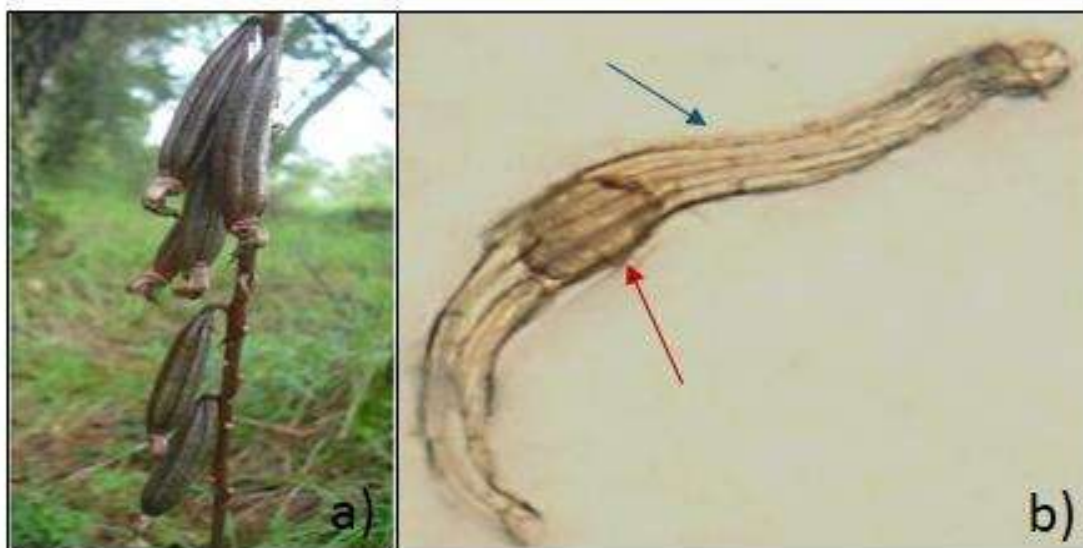


Figura 2. Frutos y semilla de orquídeas. a) Cápsulas de orquídeas del género *Govenia* y b) Semilla de orquídea de *Habenaria flexuosa* (flecha roja señala el embrión y flecha azul muestra la testa. Fotos tomadas por Montes (2015).

Aunado a esto, las semillas de las orquídeas contienen pocas cantidades de proteínas, lípidos, azúcares y granos de almidón (Smith y Read, 1997) y debido que, estas pocas reservas no son suficientes para iniciar los procesos de germinación por sí solas, un requerimiento fundamental para iniciar los procesos de germinación es la presencia de un simbionte (hongo micorrízico orquidídeo), debido a sus grandes limitantes (Otero *et al.*, 2012).

La sumatoria de estos factores hace que el número de semillas que germinan en condiciones naturales sea muy bajo en comparación con el número de semillas producido (Rasmussen, 1995).

La morfología general de las semillas de orquídeas varía desde filiforme, fusiforme y elipsoidal, y en algunos géneros se observan apéndices semejantes a alas o protuberancias, cuya función está relacionada con la dispersión (Pazmiño, 2011). Las medidas de las semillas de orquídeas terrestre van de 0.07 a 0.40 mm de ancho y de 0.11 a

1.97 mm de longitud, incluyendo la testa (Arditti y Healey, 1979, 1980; Healey *et al.*, 1980) y los de las especies epifitas tienden a ser aún más pequeñas (Stoutamire, 1983). Esto coloca a las semillas de orquídeas entre las más pequeñas conocidas en el reino vegetal.

La mayoría de las especies de orquídeas 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; Beltrán, 2010). Sin embargo, 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, 2002), en las que la colonización micorrízica tiene una marcada influencia en el crecimiento y desarrollo de estas plantas (Shagufta *et al.*, 1993).

2.3.1. Viabilidad de semillas de orquídeas

Actualmente, la forma más segura de corroborar la calidad de lotes de semillas proviene de la realización de ensayos de germinación (Benito *et al.*, 2004), en los que bajo condiciones ideales de luz, temperatura, humedad y sustrato se hacen emerger las plantas. Sin embargo en la mayoría de los casos se requiere de un tiempo excesivo para la observación de los resultados (Benito *et al.*, 2004). Cuando se evalúan las condiciones de germinación es importante tener en cuenta la viabilidad de las semillas en estudio, ya que permite obtener un estimado de la proporción de semillas que no germinará, como consecuencia de condiciones desfavorables causadas por la falta de viabilidad (Muñoz y Jiménez, 2008). Existen diferentes métodos colorimétricos para la determinación de la viabilidad de semilla. En específico, los métodos implementados para evaluar la viabilidad de semillas de orquídeas son el cloruro de trifetil tetrazolio (TTC) y el diacetato de fluoresceína (DFA) (Rasmussen, 1995), los cuales permiten la detección de vida o actividad metabólica (Widholm, 1972).

En orquídeas el método más utilizado para determinar dicha viabilidad es la prueba bioquímica de tetrazolio (Vujanovic *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2007; Lauzer *et al.*, 2007), el cual fue desarrollado por George Lakon para probar la viabilidad de semillas de cereales como el trigo, el maíz y cebada, y actualmente es aceptada por la International Seed Testing Association (ISTA) (Hartmann y Kester, 1983). Ésta se fundamenta en la reducción del cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio incoloro (Lakon, 1949). Las semillas viables son evaluadas en función de la coloración del embrión, siendo considerados viables los embriones de color naranja o rojo (Pritchard y Prendergast 1990; Mweetwa *et al.*, 2008). Algunas especies de orquídeas poseen semillas con latencia (Rasmussen, 1995), y requieren condiciones ambientales y de nutrientes específicos para germinar (Arditti *et al.*, 1982). Cuando hay latencia la coloración química de semillas de orquídeas, es una herramienta muy útil para monitorear la conservación de orquídeas y la posibilidad de su propagación *in vitro* (Pritchard y Prendergast, 1990). La determinación de la viabilidad también es importante para conocer el grado de conservación de las muestras, y más aun teniendo en cuenta el pequeño tamaño de las semillas y el desarrollo de un embrión inmaduro sin endospermo característico de las orquídeas (Arditti y Ernst, 1993). Estudios previos por Lallana y García (2010, 2012) han reportado el acondicionamiento de procedimientos de la prueba topográfica de tetrazolio para semillas de orquídeas empleando distintas dosis y tiempos de exposición a la sal 2,3,5 cloruro de trifeniltetrazolio (TTC). Por su parte, el procedimiento utilizando el método de tinción de diacetato de fluoresceína (DFA) ha sido utilizado con éxito durante muchos años como un colorante vital, en particular en los estudios de células de plantas cultivadas (Widholm, 1972) y granos de polen (Heslop-Harrison y Heslop-Harrison, 1970). Se basa en el hecho de que únicamente las células viables adquieren coloración con DFA y emiten fluorescencia cuando son iluminadas con luz ultravioleta (Widholm, 1972), el DFA entra libremente en las células en las que puede ser hidrolizado por enzimas esterases para dar fluorescencia en células vivas.

El uso de pruebas de este tipo puede evitar falsos negativos en la prueba de germinación de semillas de orquídeas. Cuando el medio de cultivo no es el óptimo (Pritchard, 1985), o el hongo micorrízico utilizado no es totalmente compatible con el de la orquídea examinada (Clements, 1982). De esta manera, la tinción de semillas de

orquídeas terrestres para determinar el porcentaje de semillas con embriones viables es un importante paso en la conservación de la orquídea y la propagación *in vitro* (Pritchard y Prendergast, 1990).

2.3.2. Proceso de germinación

La biología de la germinación de las semillas de orquídeas no es muy conocida debido al diminuto tamaño, lo que hace que sea difícil seguir el proceso desde el momento en que se liberan del fruto. Desde las primeras etapas de desarrollo de las plántulas de orquídeas terrestres son subterráneas, generalmente no se observan hasta algún tiempo después de la germinación. Esto deja toda una etapa en el ciclo de vida de las orquídeas prácticamente inexploradas (Rasmussen y Whigham, 1993).

Estas semillas contienen un embrión indiferenciado y puede estar constituido desde 8 a 734 células en orquídeas terrestres. El embrión no presenta cotiledones y no tiene reservas alimenticias (carece de endospermo); puede contener en sus células lípidos o proteínas que pueden ser suficientes para iniciar la germinación, pero que no están disponibles metabólicamente (Rasmussen, 1995; Arditti y Ghani, 2000), lo que las imposibilita para germinar por sí solas (McKendrick, 2000). Sin embargo, algunas especies de orquídeas de los géneros *Dactylorhiza* y *Orchis* pueden llegar a metabolizar estas reservas para germinar (Rasmussen, 1995; Arditti y Ghani, 2000). La mayoría de las semillas de orquídeas dependen de la energía y nutrientes que les proporcionan hongos micorrícicos para germinar y desarrollarse (Rasmussen, 1995; Smith y Read, 1997); es decir, pasan por una fase micoheterótrofa antes de llegar a ser autótrofas. Otro beneficio que proporciona el hongo en algunas especies de orquídeas es la interrupción de la latencia (Brundrett *et al.*, 2003; Peterson *et al.*, 2004).

El desarrollo de las orquídeas durante la germinación no ocurre como en el resto de las demás angiospermas (radícula-tallo-hoja) (Zettler y McInnis, 1993), sin embargo, dicho proceso es similar entre ellas (Arditti, 1992; Sheehan, 1996; Damon *et al.*, 2004), y se puede definir como los estadios secuenciales de desarrollo del embrión hasta la formación de una planta completa. La germinación de las orquídeas marca la transición del estado de embrión latente a una forma metabólicamente activa, en donde se producen

eventos como el aumento de la tasa de respiración, la síntesis de enzimas y ácidos nucleicos, la división celular e hidratación de proteínas (Pritchard, 1993). Estos eventos dependen de factores abióticos como la luz, el agua y la temperatura.

El proceso de germinación se inicia con la imbibición (movimiento del agua al interior del embrión), produciendo un aumento de volumen que rompe la testa (Smith, 1973; Arditti, 1992; Barba *et al.*, 2002). A partir de este evento, comienza la división celular, formando una estructura indiferenciada de células de forma cónica llamada protocormo (McKendrick, 2000). Durante el desarrollo del protocormo simbiótico se observa su polarización (región del meristemo apical y parte basal) en donde se observan los pelotones distribuidos en la parte basal (Clements, 1988; Arditti, 1992; Rasmussen, 1995; Peterson *et al.*, 2004) (Figura 3). Manteniendo las condiciones normales, el protocormo continuará su crecimiento por varias semanas, meses o incluso años dependiendo de la especie hasta que alcance la edad apropiada para producir raíces y hojas. En el caso de orquídeas terrestres, es de vital importancia que la relación orquídea-hongo se conserve durante los estados tempranos del ciclo de vida de la planta ya que el protocormo enterrado no puede fabricar alimento por sí mismo. Por otro lado, los protocormos de las orquídeas epífitas son comúnmente verdes, lo que les posibilita producir parte de su alimento. Sin embargo, la relación orquídea-hongo no ha sido en su totalidad investigada (McKendrick, 2000). Una vez que se encuentra en estado de protocormo, se forma en la región apical una protuberancia con el primordio foliar, seguido de la formación de rizoides en la parte inferior del protocormo. A partir del primordio foliar se desarrollan las hojas y en la parte basal del protocormo se forman las raíces, obteniendo una planta completa (Smith, 1973; Barba *et al.*, 2002).

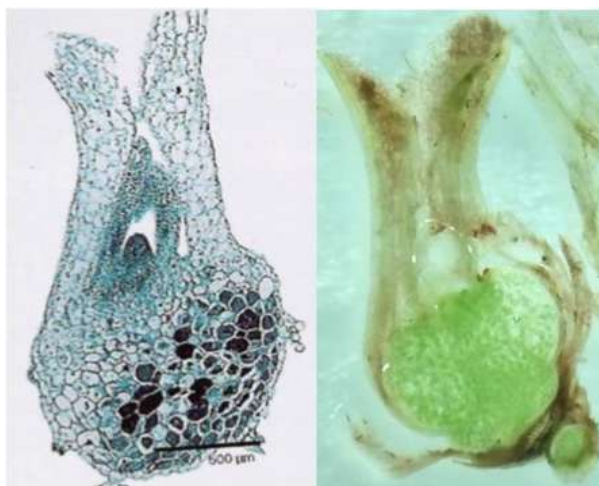


Figura 3. Corte longitudinal de un protocormo del género *Bletia*. Parte inferior colonizada por hongos micorrícicos (zona oscura) (microscopía de luz) a la izquierda, Tomada de Ortega-Larrocea. A la derecha corte longitudinal de una plántula de orquídea de *Bletia purpurata* (estadio 5), parte inferior colonizada, Fotografía de Montes (2016).

Zettler y McInnis (1993), proponen las siguientes etapas de desarrollo, en las cuales se basó el presente proyecto: Etapa 0, semillas antes de germinar; Etapa 1, imbibición y ruptura de testa; Etapa 2, protocormo con presencia de rizoides; Etapa 3, protocormo con primordio foliar; Etapa 4, aparición de primera hoja verdadera; Etapa 5, alargamiento de la hoja y aparición de raíz; Etapa 6, plántula (Figura 4).

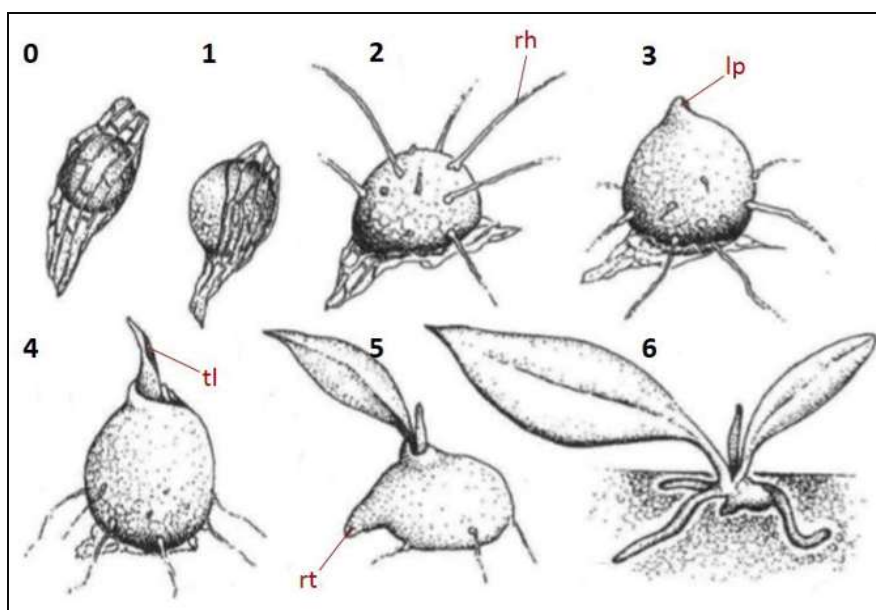


Figura 4. Semilla y diferentes etapas de desarrollo y crecimiento de *Spiranthes cernua*: rh, rizoides; lp, primordio foliar; tl, hoja verdadera; rt, raíz. Tomado de Zettler y McInnis (1993).

Debido a la delicada naturaleza de las semillas de orquídeas y las condiciones específicas que se requieren para la germinación, se ha hecho uso de métodos *in vitro*, tanto asimbióticos, como simbióticos (Johansen y Rasmussen, 1992; Ramsay y Dixon, 2003).

2.3.2.1. Germinación asimbiótica

El cultivo asimbiótico comenzó, cuando Knudson (1922) demostró que las semillas de una especie de orquídeas tropicales podrían ser germinadas con éxito en un medio de cultivo con nutrientes minerales y carbohidratos. Este medio podría sustituir a la relación obligada con hongos endófitos (De Pauw, 1993). Las posteriores modificaciones de este método todavía se utilizan hoy en día para la propagación de muchas especies de orquídeas tropicales, mismas que tienden a crecer fácilmente. El medio usado para la germinación asimbiótica es más complejo que para la germinación simbiótica, ya que todos los nutrientes orgánicos e inorgánicos y los azúcares deben estar disponibles para la orquídea en una forma apropiada puesto que ya no existe la intermediación del hongo (Muñoz, 2011). La propagación *in vitro* de especies tropicales utilizando la germinación de semillas y el cultivo de meristemos de forma asimbiótica es ahora una práctica generalizada y una industria a gran escala, ya que ha demostrado ser una herramienta adecuada para la producción de plántulas de varias especies de orquídeas con fines comerciales y de conservación. Sin embargo, las orquídeas terrestres de regiones templadas han demostrado ser mucho más difíciles de cultivar con este protocolo (Hadley, 1982; De Pauw, 1993).

En México se han realizado pocos estudios con la finalidad de implementar la propagación masiva y conservación de orquídeas mexicanas. Existen antecedentes como el de Ávila y Salgado (2006), en donde establecieron cultivos *in vitro* exitosos, como medios de micropropagación y conservación de especies epífitas, predominantemente del Estado de Michoacán como *Cattleya aurantiaca*, *Encyclia adenocaula*, *Epidendrum radicans*, *Euchile citrina*, *Laelia albida*, *Laelia autumnalis*, *Laelia speciosa*, *Oncidium cavendishianum* y *Oncidium tigrinum*, mediante métodos de propagación sexual, a través de semillas, como asexual con el cultivo de segmentos vegetativos (explantes), logrando la formación de callos, la regeneración de estructuras tipo protocormos y el desarrollo

plántulas, utilizando el medio nutritivo MS con reguladores del crecimiento (auxinas, citocininas y ácido giberélico).

2.3.2.2. Germinación simbiótica

La relación simbiótica de las orquídeas es fundamental en las primeras etapas del ciclo de vida de la planta, por lo que en cultivo *in vitro* es necesaria la inoculación del hongo micorrízico para su germinación. El aislamiento, identificación y cultivo de hongos simbióticos eficaces, obtenidos a partir de raíces de plantas silvestres adultas, que promuevan la germinación de semillas y/o crecimiento de las plantas de las especies de orquídeas amenazadas es esencial y puede ser determinante para el éxito de los programas de conservación (Arditti, 1992; Rasmussen, 1995; Stewart y Kane, 2006). Este método ha sido usado para la propagación de orquídeas terrestres en zonas templadas. Tiene la ventaja de usar un medio simple y como resultado las semillas germinan más rápido, las plantas micorrizadas suelen ser más fuertes y robustas en un tiempo más corto (Hadley y Williamson, 1971; Arditti *et al.*, 1990; Peterson *et al.*, 1998; Ramsay y Dixon, 2003), además, la presencia de los hongos micorrízicos reduce el estrés que puede producirse por falta de nutrientes, agua, cambios del suelo, del pH, metales tóxicos (Otero y Bayman 2009), y generan resistencia a infecciones causadas por patógenos, por lo que son de gran utilidad ya que potencian el crecimiento de la planta pero también la supervivencia de ésta, en comparación a sus contrapartes cultivadas asimbióticamente (Otero y Bayman, 2009). Por ello son considerados de extrema utilidad como inoculantes durante las diferentes fases de micropropagación (Fernández, 2010).

En un estudio realizado por Chávez *et al.*, (2015), observaron que los tratamientos donde se implementó la metodología simbiótica tuvieron menor porcentaje de contaminación por microorganismos que los tratamientos de tipo asimbiótico. Por lo tanto, se considera que el uso de los hongos micorrízicos constituye una herramienta biológica eficaz para el mantenimiento, conservación y preservación de orquídeas, especialmente de poblaciones afectadas (Otero y Bayman, 2009).

Sin embargo, la desventaja es que se necesita seleccionar el tipo de hongo micorrízico adecuado para que se origine la simbiosis y prevenir parasitismo y la

consecuente muerte de las semillas (Muñoz, 2011). En contra parte, algunos autores como Rasmussen y Whigham (1998) sugieren que la germinación puede ser estimulada por una variedad de hongos con poca relación en cultivo *in vitro*, en comparación con la compatibilidad real de éstos con la planta en la naturaleza.

2.4. Asociación micorrízica

El término “micorriza”, (del griego *mycos*: hongo *rrihos*: raíz) que en latino significa raíz fungosa (Harley y Smith, 1983; Wang y Qiu, 2006) fue propuesto por Frank (1885) para describir la asociación simbiótica que se establece entre las raíces de la mayoría de las plantas y diferentes grupos de hongos presentes en el sustrato (Koide y Mosse, 2004; Smith y Read, 2010).

La micorriza es es una asociación biológica que favorece a las plantas en su nutrición mineral, balance hídrico y desarrollo (Smith y Read, 1997). Entre sus principales funciones se encuentran:

a) Mejoran la absorción de macro y micronutrientes como: fósforo, nitrógeno, calcio y potasio del suelo, a través de las redes de hifas externas por transportadores como H⁺-ATPasa, localizados en la hifa extra radical (Bonfante y Genre, 2010) (Figura 5). Estos compuestos son convertidos a cadenas cortas para ser traslocados a través de vacuolas móviles del hongo, se transfieren al apoplasto interfacial por flujo, siendo tomadas por la planta por transportadores de membrana, de tal manera que genera un aumento del crecimiento, sanidad y resistencia al estrés (Guzman y Farías, 2005) (Figura 5). El hongo obtiene de la planta compuestos orgánicos, un hábitat protegido y la capacidad de perpetuarse en el tiempo y en contraposición, las plantas a través de la micorriza favorece en particular la absorción de compuestos como H₂PO₄⁻, NH₄⁺, Zn, Cu, entre otros, debido a la elongación del micelio externo más allá de la zona de agotamiento de nutrientes alrededor de la raíz.

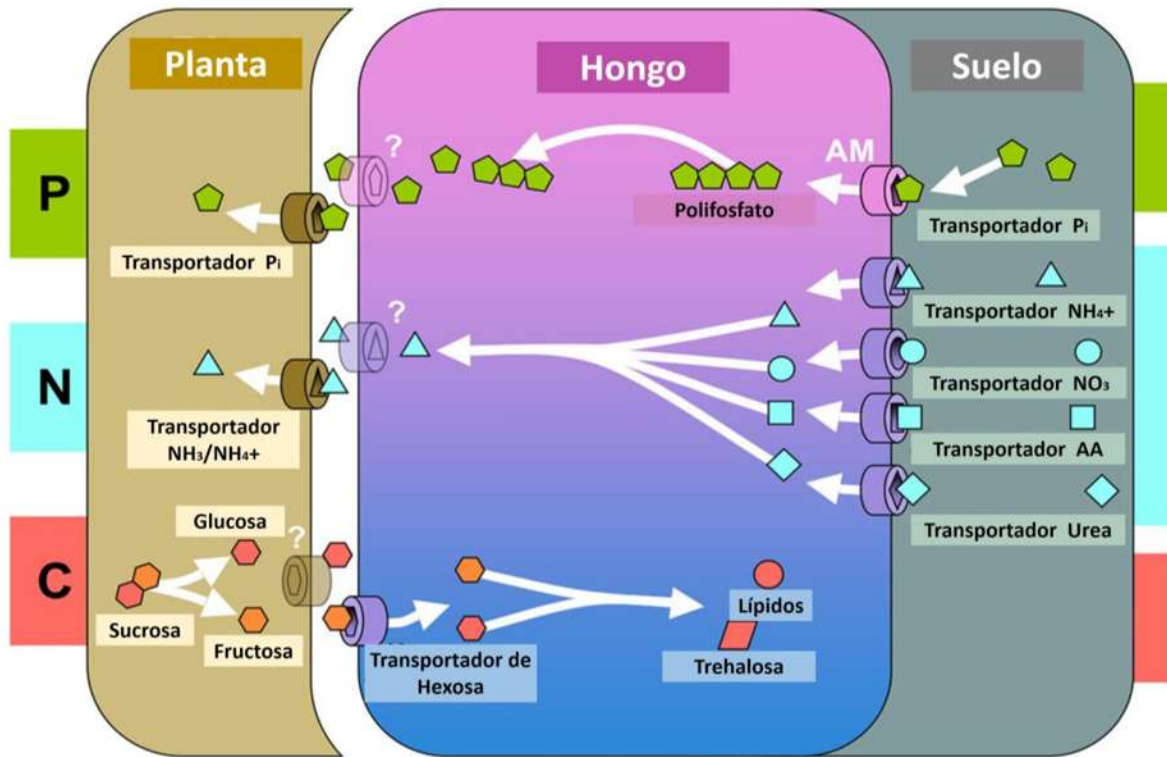


Figura 5. Esquema que resume los principales procesos de intercambio de nutrientes ectomicorrizas y endomicorrizas. Traslocación de fósforo (P), nitrógeno (N) y carbono (C) en la interfase suelo-hongo y hongo-plantas. P inorgánico y formas minerales u orgánicas de N, tales como NH_4^+ , NO_3^- y aminoácidos (AA), son absorbidos por transportadores especializados situados en la membrana fúngica en el micelio extraradical. Tomada de Bonfante y Genre (2010).

b) Las hifas son capaces de penetrar partes del suelo inaccesibles para las raíces, aumentando la absorción de agua que mejora la resistencia en cuanto al estrés hídrico (Aguilar y González, 2011).

c) Producción de diversas hormonas, como auxinas y citocininas que afectan positivamente el desarrollo de las orquídeas, movilización de nutrientes e iniciación del crecimiento apical radicular (Carrasco, 2010).

d) Incremento de la resistencia frente a hongos patógenos del suelo por su efecto antagonico. Una raíz micorrizada es difícil que sea colonizada por un hongo patógeno (Aguilar y González, 2011). Existen diferentes mecanismos mediante los cuales las micorizas pueden actuar en protección contra enfermedades como: Barrera física, impidiendo que en el lugar ocupado se instale cualquier agente perjudicial; producción de compuestos fungistáticos y antibióticos, en caso de que logre instalarse (Carrasco, 2010).

e) Mejora la estructura del suelo, gracias a la generación de exudados producidos por los hongos micorrícicos, evitando la pérdida de la morfología del sustrato (Aguilar y González, 2011).

El desarrollo de la asociación micorrícica regula el microambiente alrededor de las raíces y contribuye a prevenir el desarrollo de las infecciones en las plantas, pero a pesar de los beneficios generados en algunas especies vegetales, en otras pueden causar daño considerable al actuar como patógenos agresivos (Carrillo, 2003). Debido a esto existen mecanismos de defensa como la regulación molecular de la simbiosis que involucran un número de etapas claramente definidas y exactas, en la cuales, probablemente ocurran alteraciones en la expresión genética de la planta o el hongo, durante el proceso de colonización y funcionamiento del hongo micorrícico, que evita el funcionamiento como patógeno (Guzmán y Farías, 2005). Además de la formación de compuestos fenólicos y ciertas proteínas protectoras (quitinasas y peroxidasas) producidas por la planta, que pueden tener un efecto antimicrobiano significativo (Carrillo, 2003).

2.4.1. Clasificación de las Micorrizas

Las micorrizas se clasifican en base a la localización de las hifas con respecto a las células, las características morfológicas que presentan, a la planta a la que se asocian y a las especies de hongos involucradas (Smith y Read, 1997; Finlay, 2008), de esta manera se pueden distinguir tres grupos fundamentales: endomicorrizas; las hifas no forman manto (Figura 6a), y el hongo crece dentro de las células corticales de la raíz y forman estructuras características (Figura 6c), ectomicorrizas, las cuales forman un manto alrededor de las raíces sin penetrar las células (Figura 6b y 6c), y las ectendomicorrizas, las cuales se encuentran intermedias entre las primeras dos (Currah, 1991) (Figura 4c).

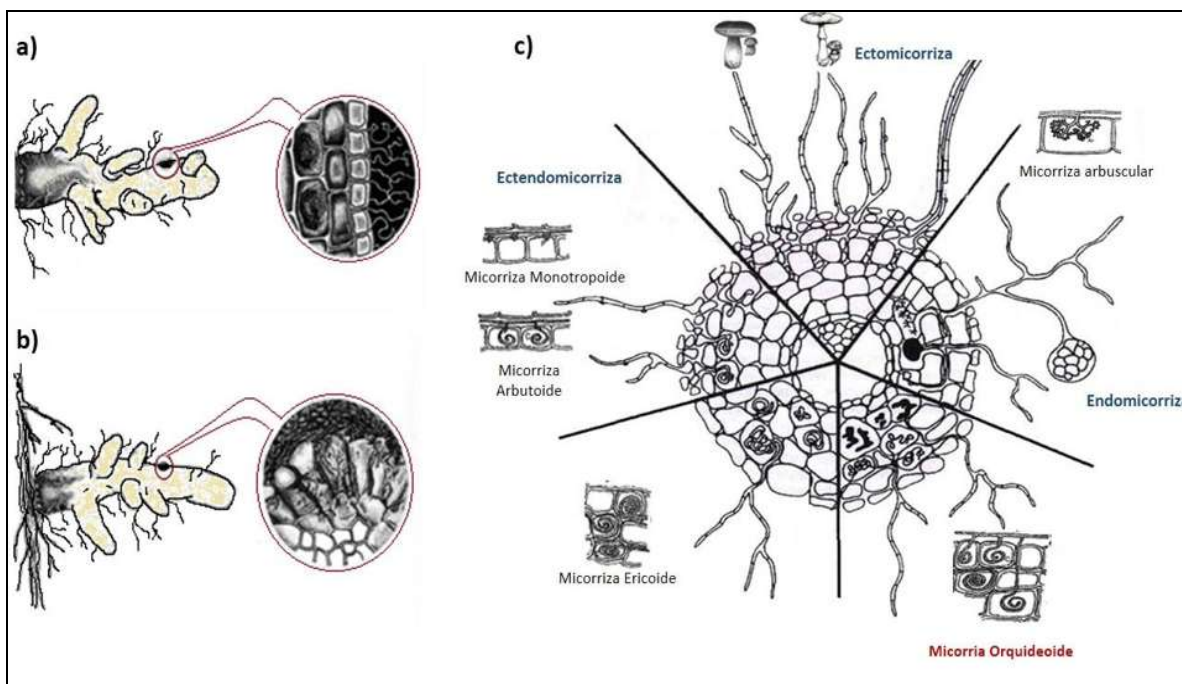


Figura 6. Tipos de micorrizas: a) Micorrizas sin manto fúngico, b) Micorrizas con manto fúngico (tomado y modificado de Camargo-Ricalde, 2009) y c) Distintos tipos de micorrizas (Tomado y modificado de Barea, 2009; modificado de Agarwal y Sah, 2009).

2.4.2. Micorriza Orquideoide

La familia Orchidaceae, al igual que el 80-90% de las plantas superiores forma asociaciones simbióticas de tipo micorrizas, debido a que todas las orquídeas son mico-heterotróficas en alguna fase de su ciclo biológico (Brundrett, 2008). Este tipo de micorriza pertenece al grupo de las endomicorrizas (González *et al.*, 2005) y se caracteriza porque el micobionte forma aglomeraciones de hifas denominadas “pelotones” en el tejido cortical de los protocormos, raíces y rizomas (Rasmussen, 1995; Brundrett *et al.*, 1996), los cuales liberan los nutrientes cuando degeneran (Brundrett *et al.*, 1996). Esta asociación es un requerimiento fundamental, por lo menos en los primeros estadios de la planta para el establecimiento en diferentes sustratos (Otero *et al.*, 2012). En las semillas, es determinante para iniciar los procesos de germinación (Arditti, 1992; Dressler, 1981).

Las investigaciones sugieren que esta simbiosis es una relación de parasitismo, donde la planta utiliza al hongo para tomando sus minerales, pero donde el hongo no recibe nada a cambio (Hadley, 1970). Por lo que esta asociación entre un hongo micorrícico y las raíces de una orquídea hay que entenderlas como simbiosis en sentido amplio y no como un mutualismo propiamente dicho, pues la nutrición carbonada de la planta (además de la

mineral) se produce desde el hongo hacia la planta (Brundrett, 2006; Finlay, 2008). Estos hongos pueden metabolizar un amplio rango de fuentes de carbono y producen enzimas hidrolíticas, incluyendo, protopectinasa y endopoligalacturonasa, celulasa y otras hidrolasas que rompen las macromoléculas, lo que posibilita el crecimiento del hongo como saprófito en suelos con desechos orgánicos o como parásito en diferentes especies vegetales (Salomes & Barroso, 1983; Smith y Read, 1997; Rasmussen, 2002). Sin embargo, los mecanismos de ésta, hacia el hongo siguen siendo una interrogante (Smith y Read, 2008).

2.4.2.1. Mecanismos de colonización de los hongos micorrícicos orquideoides (HMO)

Las raíces de las orquídeas son estructuras con ciertas características que ayudan en los procesos de simbiosis micorrícica (Arditti, 1992), ya que pueden albergar estos hongos durante una o más etapas del crecimiento de la planta (Beltrán, 2010). 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).

El hongo micorrícico es capaz de existir en el suelo, ya sea como esclerocios o como micelio activo, la penetración hifal ocurre comúnmente cuando la hifa entra en contacto con un tricoma epidérmico de las células de las raíces o rizomas dependiendo de la especie de orquídea (Rasmussen y Whigham 2002). El sitio y extensión de la penetración del hongo varía con la especie. Después de la penetración, la hifa comienza a formar tabiques y a ramificarse. El tipo de tejido más comúnmente colonizado es el tejido de la corteza de la raíz, donde el hongo entra en las células, formando agregaciones de hifas o pelotones. Una vez dentro de la célula, el hongo se separa del citoplasma y por la membrana celular se produce la transferencia de nutrientes (Rasmussen, 1995). La liberación del contenido citoplasmático se puede dar en dos formas diferentes denominadas tiofagia y tolipofagia (Burgeff, 1959) (Figura 7). La diferencia radica en que en la tiofagia (Figura 7b), la lisis de las estructuras del hongo es total y en la tolipofagia (Figura 7a) se dan ciclos de lisis, seguidos por otros de nueva formación de pelotones en el mismo estrato celular, observándose capas celulares hospederas y regiones de digestión (Reyes, 1973; Mukerji *et al.*, 2002).

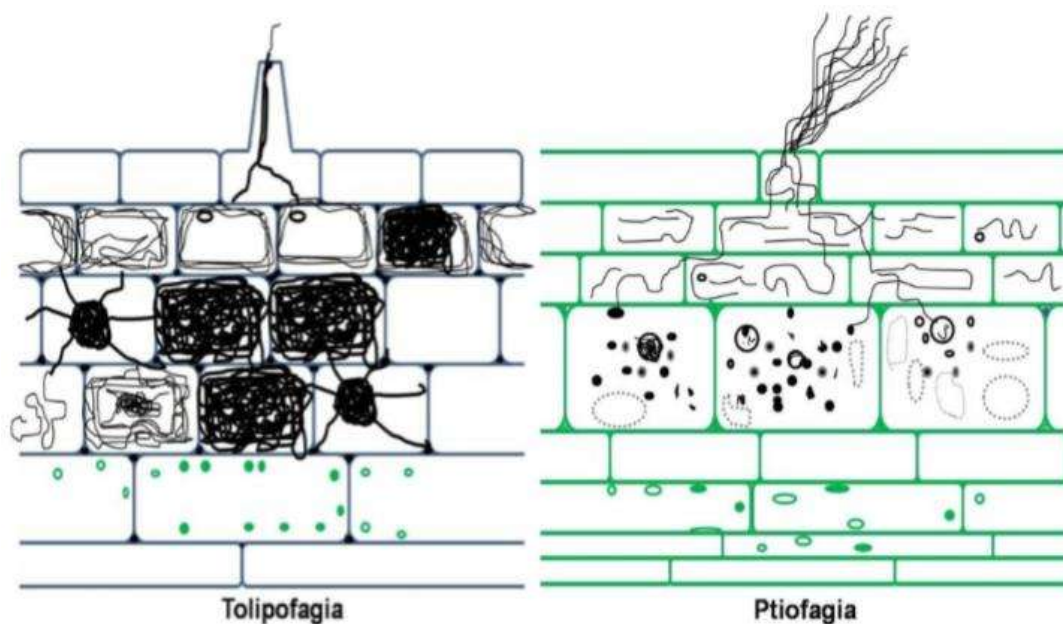


Figura 7. a) Tolipofagia y b) Ptiófagia. Modificado de Arditti (1992) por Beltrán (2010).

La primera colonización también puede ocurrir en los rizoides o en las células del protodermo (los rizoides son extensiones de una célula protodérmica generalmente formados en la parte basal del protocormo), después del hinchamiento de las células embrionarias y el rompimiento de la testa de la semilla. La infección inicial puede ser un paso importante para el reconocimiento entre un hospedero y un hongo (Rasmussen, 1995). Dentro del embrión, el hongo micorrízico forma los pelotones, y cuando están bien desarrollados, éstos pueden ocupar casi todo el volumen celular, lo que confiere una extensa superficie de contacto entre los simbios (Peterson *et al.*, 2004). La mayoría de las células son colonizadas, excepto las del meristemo apical.

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 (Arditti, 1992; Vij *et al.*, 2002; Beltrán, 2010).

2.4.2.2. Hongos micorrícicos orquidioides

La mayoría de los hongos formadores de micorrizas de orquídeas pertenecen a la clase Basidiomycota, los cuales han sido asignados a un grupo polifilético artificial conocido como género-forma o complejo *Rhizoctonia* (Sneh *et al.*, 1991; Rasmussen, 1995). Es decir, concentra una diversidad taxonómica de hongos que presentan algunas características similares y otras muy diferentes (Currah *et al.*, 1987).

Este grupo incluye en su estado anamorfo (estado asexual) los géneros *Ceratorhiza*, *Epulorhiza*, *Moniliopsis* y *Rhizoctonia* (Moore 1987), y en su estado teleomorfo (estado sexual) los géneros *Ceratobasidium*, *Tulasnella*, *Sebacina* y *Thanatephorus*, respectivamente (Warcup y Talbot 1967; Roberts, 1999).

El complejo *Rhizoctonia* es un grupo de hongos filamentosos que no producen esporas sexuales y se distinguen por algunas características vegetativas morfológicas generales, tales como la formación de micelio de coloración parda, morfología de las hifas y la constricción en los puntos de ramificación de las hifas formando ángulos rectos (90°) (González, 2008).

Además de estas características, que siempre están presentes, hay otras que se encuentran en un gran número de individuos, pero pueden estar ausentes en otros. Algunas de ellas son; formación de cadenas de hifas hinchadas, conocidas como células monilioides y esclerocios en medio de cultivo (Sneh, 1991; González, 2008), la alta tasa de crecimiento y un aparato septal dolíporo complejo (González, 2008).

El número de núcleos presentes en las células somáticas de hifas jóvenes y el grosor de las hifas guía son otra característica que es de utilidad para la diferenciación en distintas especies (Sneh, 1991; Andersen, 1996). No obstante, se conoce que este carácter también puede variar entre especies de un mismo género o incluso entre aislamientos de una misma especie (Andersen, 1996).

Se pueden observar hifas multi-nucleadas en especies del complejo *Rhizoctonia* patógenas de plantas, como es *Rhizoctonia solani* (teleomorfos: *Thanatephorus*,

Ceratobasidiales). Células bi-nucleadas se encuentran en hongos correspondientes a los géneros *Ceratobasidium* y *Tulasnella* (Otero *et al.*, 2002).

La identificación de especies dentro del grupo se hace difícil, ya que tiene pocos caracteres morfológicos y los rasgos fisiológicos y patogénicos varían de un individuo a otro (González, 2008). Aunado esto, la mayoría de los estudios se efectúan en cultivos *in vitro*, en los cuales las estructuras reproductivas sexuales no suelen observarse (Cedoño, 2008). El análisis de la fase sexual constituye una valiosa herramienta para esclarecer y correlacionar la taxonomía de este grupo, pero son muy pocas las ocasiones en que se ha logrado la inducción del estado perfecto bajo condiciones de laboratorio (González, 2002).

2.5. Especificidad orquídea-hongo

Algunas orquídeas epífitas de climas tropicales no forman micorriza cuando adultas, mientras que muchas orquídeas terrestres muestran una mayor dependencia hacia estos (Smith y Read, 1997).

Muchas de las características únicas que las distinguen están asociadas con el hongo que las coloniza (Otero *et al.*, 2002, 2004). Según Bayman y Otero (2006), las relaciones micorrícicas pueden ser formadas por selección natural, afectar la distribución de las orquídeas e inclusive determinar la diversificación de éstas. Sin embargo, este proceso ha sido poco estudiado.

Algunos autores afirman que existen orquídeas generalistas (Curtis, 1939; Hadley, 1970; Musuhara *et al.*, 1993), mientras que otros argumentan que son específicas (Clements, 1998; Mckendrick *et al.*, 2002). Sin embargo, la especificidad entre orquídeas y hongos micorrícicos ha sido objeto de controversia durante mucho tiempo (Masuhara y Katsuya, 1994).

Una especie de orquídea es considerada específica cuando interactúa de forma estrecha con un grupo de hongos filogenéticamente emparentados; por el contrario, se le considera generalista cuando sus hongos micorrícicos incluyen una gran variedad de orígenes filogenéticos (Otero *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2003; Otero *et al.*, 2004; Otero y Bayman, 2009).

En orquídeas existe un gradiente de niveles de especificidad y las diferentes especies varían dentro de estos niveles (Otero *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2003; Otero *et al.*, 2004; Otero y Bayman, 2009). En este caso es importante diferenciar entre especificidad ecológica (*in situ*) y especificidad potencial (*in vitro*) (Masuhara y Katsuya, 1994; Rasmussen, 2002). El término “especificidad potencial” aplicado a las orquídeas terrestres, se refiere al papel de las interacciones o asociaciones planta-hongo que se producen en condiciones de laboratorio (Harley y Smith, 1983; Masuhara y Katsuya, 1994).

La determinación del nivel de especificidad micorrícica es un factor que debe ser tenido en cuenta para la conservación de orquídeas mediante la germinación simbiótica de las semillas (Otero *et al.*, 2013). Actualmente, la especificidad del hongo en orquídeas ha sido estudiada utilizando dos métodos: el primero consiste en una descripción morfológica y/o aislamiento del hongo de plantas adultas desarrolladas en estado silvestre, mientras que el segundo método incluye 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 (Beltrán, 2010).

A nivel mundial se han realizado algunos estudios sobre la diversidad y especificidad de hongos micorrícicos de orquídeas de climas tropicales y de regiones templadas con fines de conservación (Taylor *et al.*, 1999; Batty *et al.*, 2002). Algunos trabajos reportan para orquídeas epífitas de Puerto Rico, América Central y Brasil, estar asociadas con diferentes clados de *Ceratobasidium*, como *C. cornigerum*, mientras que orquídeas terrestres de Puerto Rico y Colombia, muestran asociación principalmente con diferentes clados de *Tulasnella* como *T. ephyfitica* y *T. calospora* (Valadares *et al.*, 2012; Otero *et al.*, 2004; Mosquera *et al.*, 2013; Otero *et al.*, 2013). Sin embargo, aún son muy pocas las especies de orquídeas de las que se conoce la identidad del socio fúngico (Beltrán, 2010). Específicamente, en México la investigación sobre este tipo de asociación es escasa y por lo tanto es poco lo que se conoce sobre aspectos ecológicos y de manejo con fines de conservación o reintroducción (Rangel-Villafranco y Ortega-Larrocea, 2007).

Estudios de orquídeas terrestres realizados en alrededores de la ciudad de México reportan que algunos géneros parecen tener una alta especificidad por su micobionte como *Bletia-Tulasnella calospora*, *Dichromantus-Ceratobasidium*, *Habenaria-Tulasnella* y *Malaxis-Tulasnella* (Rangel-Villafranco y Ortega-Larrocea, 2007).

Resulta importante aislar e identificar a los hongos micorrícicos 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, 2007). Además, el estudio comparativo de la relación micorrícica entre las orquídeas de diferentes especies de un mismo género, o diferentes géneros, podrían aportar información sobre si existe especificidad en la asociación, lo cual podría generar propuestas acertadas para programas de conservación y restauración.

Por su parte, recientemente se han realizado trabajos de investigación que puedan ayudar a conocer la especificidad potencial, mediante pruebas de germinación simbiótica. Encontrando que la especificidad del hongo micorrícico en orquídeas puede ser variable (Otero *et al.*, 2002; 2004; 2007). Arditti *et al.* (1990) especularon que las orquídeas terrestres de climas templados deben ser especialistas en sus relaciones con hongos micorrícicos, ya que son difíciles de germinar en medios nutritivos en condiciones asépticas, mientras que las orquídeas epífitas tropicales deben ser generalistas en sus relaciones con los hongos micorrícicos debido a que sus semillas se germinan con facilidad en cultivo *in vitro*.

En estudios realizados por Zettler *et al.* (1999) y Zettlet *et al.* (2007), encontraron que algunas especies de orquídeas epífitas como en el caso de *Epidendrum nocturnum* Jacq., pueden germinar con un hongo aislado de otra especie de orquídea, lo que demuestra que la especificidad que muestran las orquídeas bajo condiciones *in vitro* (especificidad potencial) para la germinación, varía entre especies de orquídeas (Otero *et al.*, 2002, 2004) y generalmente es menor a la especificidad mostrada en campo (especificidad ecológica) (Swarts *et al.*, 2010). Sin embargo, existe la necesidad de realizar más estudios para esclarecer este paradigma, especialmente en orquídeas terrestres, en donde los estudios de estos aspectos son pocos.

3. JUSTIFICACIÓN

La conservación y el uso sustentable de las orquídeas es un tema de suma importancia en la actualidad. En los últimos años los métodos de cultivo *in vitro* están siendo utilizados con éxito para la conservación y propagación de distintas especies de orquídeas, especialmente aquellas que se encuentran en peligro de extinción y de importancia económica.

En México son muy pocos los estudios realizados que permitan conocer a los hongos asociados con las orquídeas epífitas y terrestres y el nivel de especificidad mostrada en condiciones *in vitro* (especificidad potencial) como una forma de inferir la especificidad ecológica que estas plantas pudieran tener en sus hábitats naturales, además de que tan viable, compatible y efectiva puede ser esta asociación micorrícica para la germinación, el desarrollo y supervivencia de las distintas especies de esta familia en condiciones *in vitro*, lo que resulta importante en el caso de orquídeas terrestres, las cuales no se han podido propagar con los medios de cultivo convencionales. Por lo que el presente estudio contribuye al conocimiento de la identidad de los hongos micorrícicos asociados a orquídeas terrestres, así como a la especificidad potencial orquídea-hongo, como alternativa en programas de propagación de estas plantas con fines de reintroducción y conservación en sus hábitats naturales.

4. HIPÓTESIS

La especificidad potencial de la asociación micorrícica para el proceso de germinación, desarrollo y supervivencia *in vitro* es baja en las especies de orquídeas *Bletia Habenaria* y *Govenia*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Caracterizar e identificar morfológicamente los hongos micorrícicos de orquídeas terrestres de los géneros *Bletia*, *Habenaria* y *Govenia*, y evaluar su especificidad potencial en la germinación y desarrollo de plántulas *in vitro*.

5.2. Objetivos particulares

- 1) Caracterizar e identificar morfológicamente los hongos micorrícicos a partir de caracteres anamorfos de tres géneros de orquídeas terrestres.
- 2) Evaluar la viabilidad de la semilla mediante dos pruebas colorimétricas y determinar cuál método es más eficiente.
- 3) Evaluar la especificidad potencial de los hongos micorrícicos en la germinación de las especies de orquídeas analizadas, desarrollo y supervivencia de plántulas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Colecta de material biológico

Raíces y cápsulas de orquídeas:

El muestreo se realizó en las localidades de Santa Fe de la Laguna, municipio de Quiroga y San Andrés Córú, municipio de Ziracuaretiro, Michoacán. Consistió en la colecta de 5 plantas por género y por sitio de colecta: 2 sitios x 3 géneros x 5 plantas x 3 raíces = 90 raíces (Anexo 3). Éstas correspondieron a orquídeas terrestres de los géneros *Bletia*, *Habenaria* y *Govenia*.

Las raíces se recolectaron de la base del pseudobulbo al ápice manteniendo la orientación y se transportaron al laboratorio en frío dentro de papel aluminio rodeadas de sustrato para evitar su desecación (Anexo 3).

Las raíces se procesaron en el laboratorio en un periodo máximo de una semana después de la colecta.

En un segundo muestreo en campo, se colectaron cápsulas de los tres géneros, en los mismos sitios, y estas se dejaron madurar para su procesamiento en el laboratorio.

6.2. Procesamiento de muestras en laboratorio

Colonización de raíces

En cada una de las raíces se eliminó el exceso de suelo con agua corriente y se midió la longitud de cada una de estas. Posteriormente se realizaron cortes transversales de 1mm de espesor cada 8 a 10 mm aproximadamente, tomando como referencia el ápice, parte media y parte basal. Los cortes se tiñeron siguiendo la metodología de colonización de Rasmussen y Whigham (2002), la cual consistió en teñir los segmentos con Fucsina ácida (0.01% w: v en ácido láctico-glicerol-agua desmineralizada 14:1:1) y se montaron en alcohol polivinílico (PVLG) o glicerol al 50% y se observaron a microscopio óptico, a 10x y 40x, para determinar la presencia de pelotones (Anexo 3).

Aislamiento y cultivo de hogos

Antes de ser procesados los fragmentos de raíz colonizados, se desinfectaron superficialmente utilizando la técnica propuesta modificada por Ortega-Larrocea (2008) que consistió en: enjuagar con agua destilada estéril los segmentos colonizados en tubos

Eppendorf®. Se lavaron con cloro comercial (~ 6%) al 10% (v: v) durante 10 minutos en agitación constante. Se enjuagaron 3 tiempos con agua destilada estéril, hasta no percibir el olor a cloro. Los segmentos se pasaron a una solución de antibióticos (eritromicina 0.03% y gentamicina 0.01% p: v) durante 10 min, y se enjuagaron con agua destilada estéril. Todo el proceso se realizó en frío y bajo campana de flujo laminar (Anexo 3).

Se seleccionaron aquellos fragmentos de raíz que contenían pelotones, los cuales fueron aislados posteriormente en medios de cultivo según la técnica sugerida por Clements y Mitchell (1989). Cada segmento de raíz desinfectada se colocó en 1mL de agua destilada estéril en una caja Petri cortando el córtex con bisturí y aguja para dispersar los pelotones (Figura 8a). Posteriormente se tomaron los pelotones individuales con una pipeta Pasteur estéril y se colocaron en medio de aislamiento fúngico (MAF) (Figura 8b). Las cajas se incubaron a una temperatura de 27°C en oscuridad hasta que se observaron las hifas creciendo en cada pelotón (Anexo 3).

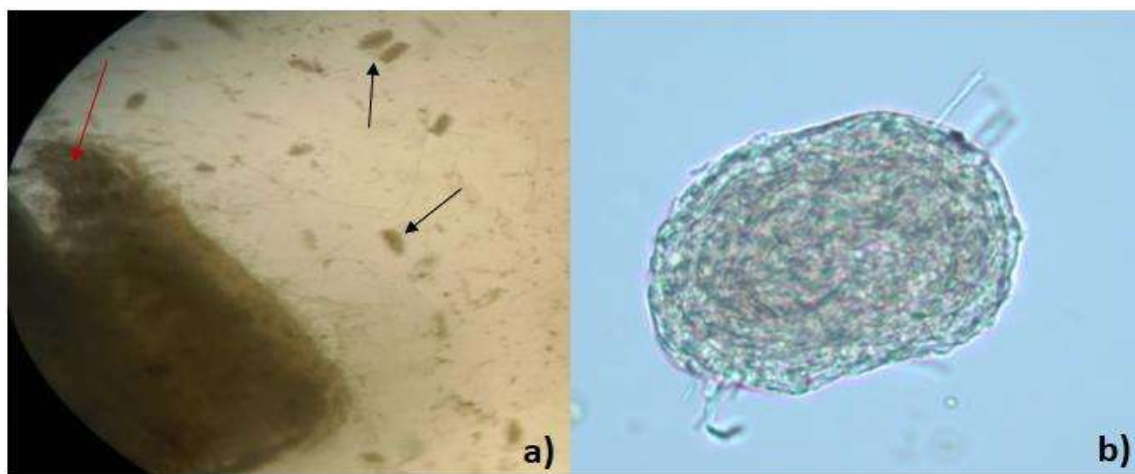


Figura 8. Extracción de pelotones individuales de raíces de orquídea. a) Flecha roja indica disección de raíz y negras los pelotones sueltos, b) pelotón individual.

Una vez que se desarrollaron las hifas, dichos hongos se transfirieron a medio Agar Papa Dextrosa (PDA), incubándose a la temperatura antes mencionada, hasta obtener los cultivos micorrícicos puros en donde se realizó la caracterización morfológica (Currah *et al.*, 1987; Shan *et al.*, 2002) (Anexo 3).

6.3. Caracterización morfológica e identificación de hongos micorrícicos

La caracterización morfológica de los hongos micorrícicos asociados se realizó mediante las siguientes pruebas:

Macroscópica:

- Apariencia de la colonia: Una vez que los hongos se desarrollaron en medio PDA, se sub-cultivaron para observar características como el color de la superficie y fondo, el cual fue determinado con las cartas de color Munsell para suelo (2000). Además se analizaron otras características macroscópicas del cultivo como: brillo, textura, olor, forma del crecimiento (Beltrán, 2010) y formación de esclerocio (Shan *et al.*, 2002)
- Tasas de crecimiento: Se determinaron con la técnica de Currah *et al.*, (1997), midiendo el incremento radial de la colonia en 4 direcciones cada 24h, hasta que éste cubrió completamente la caja Petri.
- Pruebas de reacción a la Polifenol oxidasa de los aislados: se realizaron en medios de cultivo en caja Petri con agar 2%, extracto de malta 1.5% y ácido tánico 0.5% (Zelmer, 1994).

Las cajas fueron inoculadas con un fragmento de micelio de 1 mm³ y fueron incubadas a una temperatura de 25°C en un tiempo aproximado de 15 días, después del cual se observó la reacción de los aislados, considerando como negativos aquellos que no mostraron crecimiento o cambio de coloración en el medio y positiva en caso de que presentaran alguna de las características antes mencionadas.

Microscópica:

Se realizaron cortes de los aislados en PDA de aprox. 1mm³ y se pusieron a crecer en medio Papa-Dextrosa Broth (PDB), alrededor de 15 a 20 días en agitación a 25°C en presencia de luz. Posteriormente se licuaron en 150mL de agua destilada por 1 minuto, a partir de una alícuota de 1mL vaciada en membrana de diálisis montada en vacío (Beltrán, 2010). Enseguida se colocó un fragmento de micelio en portaobjetos y se tiñó con azul tripano, y se realizó la observación de las características del micelio en microscopio con objetivo 40x y 100x:

- Presencia y dimensiones de células monilioides y (Shan *et al.*, 2002)
- Observación del número de núcleos y morfología de las hifas (Liparini *et al.*, 2005).

Se determinaron los anamorfos con las claves citomorfológicas para *Rhizoctonia* (Sneh *et al.*, 1991), claves dicotómicas para hongos micorrícicos asociados a orquídeas (Currah y Zelmer, 1992) y claves para especies de *Epulorhiza* (*Tulasnella*) (Currah *et al.*, 1997), según las características obtenidas en las distintas pruebas (Anexo 4).

6.4. Porcentaje de viabilidad de las semillas

Técnica de tetrazolio (TTC)

Se tomó una porción de semillas de cada una de las cápsulas colectadas y se colocaron en tubos Ependorf®, posteriormente se les adicionó agua destilada y se dejaron un lapso 24 h. Una vez transcurrido el tiempo, se retiró el agua y se les colocó tetrazolio al 1% p/v. (ISTA Handbook on Tetrazolium Testing en Código: IT-LAB-10-v03), con el cual permanecieron en oscuridad durante un tiempo de 24 hrs. Posteriormente, las semillas se colocaron en una laminilla con ayuda de una micropipeta, y se observó la ocurrencia de la reacción en el microscopio con el objetivo 4X. En reacción positiva los embriones se tiñeron de rojo intenso, debido a la reducción del tetrazolio por la actividad respiratoria de las células, mientras que los embriones no viables permanecieron de color café (no se tiñeron (Rasmussen, 1995).

Se contó el número de embriones tanto viables como no viables presentes en cada observación del porta objetos (15 observaciones) y se calculó el porcentaje de viabilidad de las semillas en cada observación, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%V = \frac{(SV * 100)}{SNV}$$

En donde:

%V: porcentaje de viabilidad, SV: semillas viables y SNV: semillas no viables.

Posteriormente, se promediaron los datos, para obtener el porcentaje de viabilidad en cada una de las especies de semillas de orquídeas.

Técnica de Diacetato de Fluoresceína (DFA)

Se tomó una porción de semillas correspondientes a cada una de las cápsulas y se colocaron en laminillas, se adicionó una gota pequeña de agua para hidrolizarlas, al cabo de diez minutos se les adicionó dos gotas de diacetato de fluoresceína (DFA) al 0.1% (peso/volumen) en acetona absoluta, procurando cubrir todas las semillas y se dejó actuar durante diez minutos, antes de que la fluoresceína fallase. Las muestras se llevaron a observación al microscopio de fluorescencia (luz ultravioleta). Se realizaron observaciones a lo largo de todo el cubreobjetos, realizando transeptos, para abarcar toda la muestra (Rasmussen, 1995).

6.5. Evaluación de la germinación de semillas de orquídeas

Medios de cultivo

Se utilizaron tres medios nutritivos para llevar a cabo la germinación asimbiótica; el medio básico de avena (MBA), el cual sirvió como tratamiento control, el medio KC (Knudson, 1946) y el medio Phytamax (P6668, Sigma Aldrich, 1992).

Para la germinación simbiótica se utilizó únicamente el medio básico de avena más la inoculación del hongo micorrícico orquideoide.

Desinfestación y siembra de semillas

Se seleccionaron las cápsulas que presentaron mayor porcentaje de viabilidad de acuerdo con la técnica de tetrazolio al 1%, utilizando una cápsula de cada género de orquídea (*Bletia*, *Habenaria* y *Govenia*).

Se colocaron aproximadamente 100 semillas en sobres de papel filtro con medidas de 4x4cm, se realizaron dobleces para evitar que las semillas se perdieran una vez que se esterilizaran. Posteriormente se engraparon procurando que las semillas quedaran retiradas de la grapa y se rotularon según el género de orquídea perteneciente.

Las semillas se sumergieron en solución de hipoclorito de sodio al 10% en agitación constante, durante diez minutos. Enseguida se retiró el hipoclorito en la campana de flujo laminar y se realizaron alrededor de cuatro enjuagues con agua destilada estéril (modificado de Rangel, 2006) (Anexo 4).

Tratamientos asimbióticos

En condiciones asimbióticas se sembraron las semillas en Medio básico de avena (MBA) (modificado de Mitchell, 1989), KC (Knudson, 1946) y Phytamax. Los sobres de papel filtro que contenían las semillas previamente esterilizadas se abrieron bajo campana de flujo laminar, con pinzas estériles y esparcieron en los distintos medios de cultivo. Cada tratamiento se sembró por quintuplicado (cinco réplicas).

Tratamientos simbióticos

Los diferentes hongos obtenidos en la fase de aislamiento fueron transferidos a cajas de Petri en medio de cultivo PDA, para obtener cultivos jóvenes, los cuales fueron inoculados una vez sembradas las semillas.

Para la germinación simbiótica las semillas se sembraron en medio MBA. Una vez sembradas las semillas, se inoculó un cubo de agar que contenía el HMO (para cada uno de los hongos) de aproximadamente 0.5cc. Además se adicionó el tratamiento control, en el cual, únicamente se sembraron semillas en medio MBA, sin la inoculación del hongo. Tanto la siembra como las replicas fueron las mismas anteriormente descritas (Anexo 4).

Todos los tratamientos se incubaron con un fotoperiodo de 16/8h luz/oscuridad hasta observar su germinación (ruptura de testa y formación de protocormo), para evaluar la eficiencia en la germinación, desarrollo y supervivencia en cada uno de los tratamientos clasificándolos y cuantificándolos de acuerdo con el estadio de germinación propuesto por Zettler y McInnis (1993).

Los cambios ontogénicos del embrión de *Bletia*, *Habenaria* y *Govenia* durante el proceso de la germinación fueron registrados y contabilizados en una lupa estereoscópica con objetivo 2X, realizando tres observaciones al azar en cada una de las réplicas por

tratamiento cada 30 días después de la siembra (durante 90 días), para establecer la ontogenia del embrión durante su germinación. Así, cada semilla o plántula observada se le asignó una puntuación (0-6) en la escala de germinación (Tabla 1).

Tabla 1. Diferentes estadios de germinación y desarrollo de orquídeas propuesto por Zettler y McInnis (1993).

Estadios	Descripción
0	Semilla sin germinar
1	Hinchazón de embrión y ruptura de testa
2	Protocormo con presencia de rizoides
3	Protocormo con primordio foliar
4	Aparición de primera hoja
5	Emergencia de la raíz
6	Plántula

6.5.1. Evaluación del porcentaje de germinación

El porcentaje de germinación de las semillas fue estimada mediante la siguiente fórmula:

$$\%G = \frac{(N1+N2+N3+N4+N5+N6)}{(NV+N0+N1+N2+N3+N4+N5+N6)} * 100$$

Donde:

%G es el porcentaje de germinación, NV representa las semillas no viables, N0 es el número de semillas en la etapa cero, N1 es el número de semillas en la primera etapa (ruptura de testa), y así sucesivamente.

6.5.2. Evaluación del índice de desarrollo

El índice de desarrollo es un indicador que refleja el estadio ontogénico de los embriones durante el proceso de germinación de las semillas y se calcula mediante la siguiente fórmula establecida por Otero *et al.* (2004):

$$ID = \frac{(N1 + N2 * 2 + N3 * 3 + N4 * 4 + N5 * 5 + N6 * 6)}{(N0 + N2 + N3 + N4 + N5 + N6)}$$

Donde:

ID es el índice de desarrollo, N0 es el número de semillas en la etapa cero, N1 es el número de semillas en la primera etapa (ruptura de testa), y así sucesivamente. El ID puede variar desde cero (cuando no hay semillas germinadas) a seis (cuando todas las semillas alcanzaron la etapa de plántula).

6.5.3. Evaluación del porcentaje de supervivencia

El porcentaje de supervivencia fue estimado sumando el número de estadios (1-6) censados, entre la suma de semillas no viables (sin embrión), en estadios 0, o parasitadas por el hongo y aquellas en estadio 0-6, todo esto multiplicado por cien.

Diseño estadístico

A los datos obtenidos de las tasas de crecimiento, dimensión de células monilioides y diámetro de hifas presentes en cada una de las morfoespecies, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA).

Se utilizó el mismo análisis para el porcentaje de viabilidad de semillas, así como el porcentaje de germinación y supervivencia al concluir el tiempo establecido en cada uno de los tratamientos. Sin embargo, debido a que los valores de germinación y supervivencia fueron estimados en porcentaje, el conjunto de datos se normalizó con una transformación logaritmo natural (Ln). El análisis se realizó utilizando el programa estadístico computarizado JMP 8.0, para determinar si existían diferencias significativas entre los datos obtenidos en las distintas pruebas.

Por su parte, el ID es un valor estandarizado, es un valor asignado para cada índice de desarrollo, multiplicado por un factor se representa sin hacer algún tipo de transformación o análisis estadístico en dicho programa.

7. RESULTADOS

7.1. Aislamiento y caracterización morfológica de HMO

Se obtuvieron un total de 122 aislamientos, de los cuales, 96 presentaron esporas, u otras características no afines a las descritas por Currah y Zelmer, (1992) para hongos micorrícicos orquídeoides (HMO) y 26 presentaron características de hongos micorrícicos, los cuales fueron extraídos de la orquídea terrestre de *Bletia purpurata*. A pesar de que todas las raíces de orquídeas analizadas en el presente estudio se encontraron colonizadas (Figura 9), *Habenaria sp* mostró un porcentaje de colonización significativamente mayor que el resto de las especies de orquídeas (figura 9a). No obstante, *Habenaria sp.*, *H. flexuosa*, *Govenia lagenophora*, *G. superba* y *G. greenwoodii* no se lograron aislar hongos micorrícicos a pesar de haber mostrado colonización (Figura 9b, c, d, e, f).

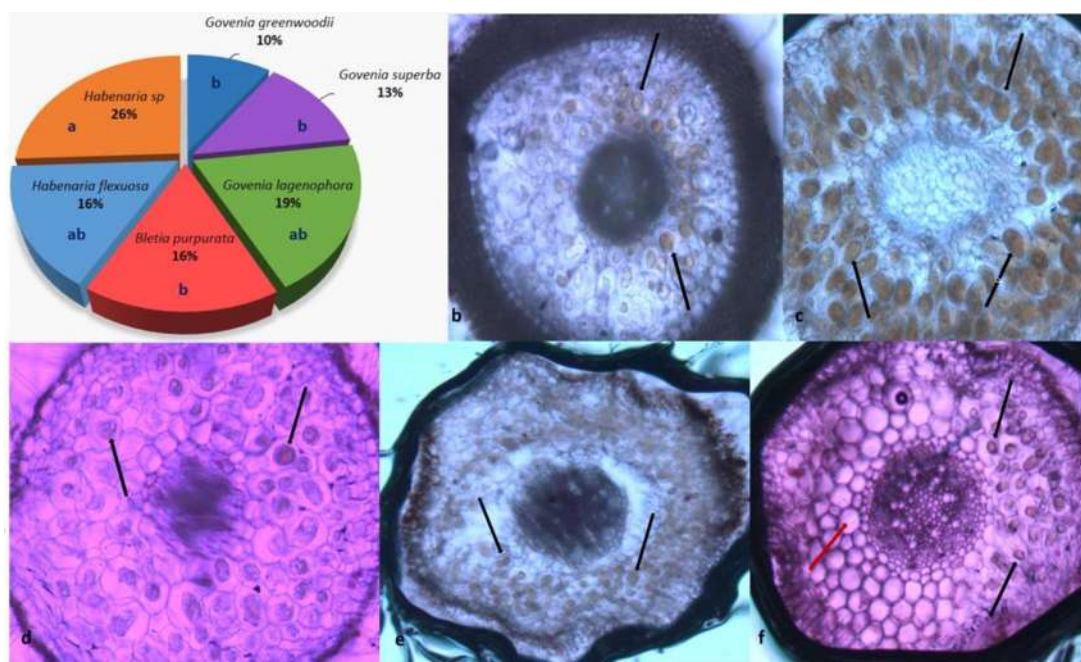


Figura 9. Colonización. a. Porcentaje de colonización de raíces en las diferentes orquídeas. Letras distintas indican diferencia significativa (Tukey, $P \leq 0.0044$); b. Corte transversal de raíz *B. purpurata*; c. *H. flexuosa*; d. *G. greenwoodii*; e. *G. superba*; f. *G. lagenophora*. Flechas negras indican pelotones en células corticales y flecha roja indica célula cortical libre de colonización.

A partir de las características morfológicas como la apariencia de las colonias, color, forma de crecimiento, así como análisis estadísticos de las mediciones y comparaciones de del crecimiento y características de las hifas (ancho μm) y células monilioides (ancho μm y largo μm) cuando se encontraron presentes, se obtuvieron 9 morfoespecies diferentes. Las cuales fueron afines al género forma *Rhizoctonia* y por tanto a los géneros descritos para hongos micorrícicos orquideoides. Las principales características que distinguieron a estos hongos son, la morfología de las hifas, generalmente presentaron una constricción en el punto de ramificación entre la hifa principal y la secundaria (Sneh *et al.*, 1991) (Figura 10a). Formación del septo cerca al punto de ramificación de la hifa secundaria (Figura 10a) y la formación de ángulos cercanos a los 90° entre la hifa principal y la secundaria (Figura 10b) (Sneh *et al.*, 1991; Currah *et al.*, 1997).

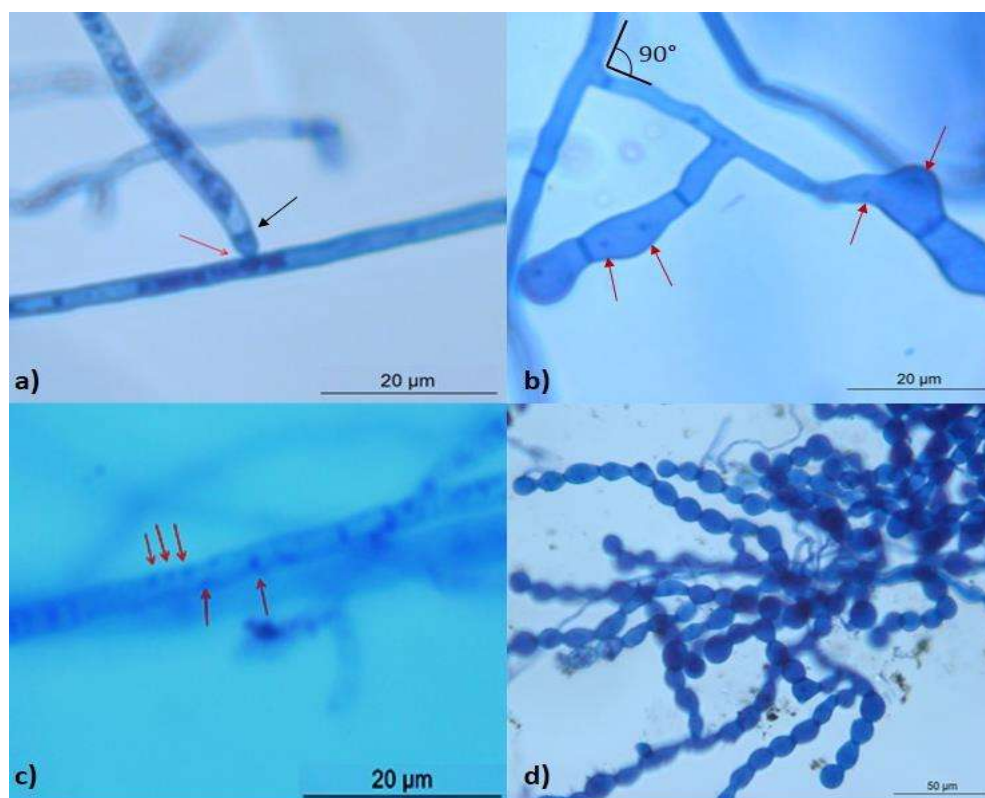


Figura 10. Características de las hifas en los aislados afines al género-forma *Rhizoctonia*; a) constricción en el punto de ramificación (flecha roja), septo cerca al punto de ramificación de la hifa secundaria (*Tulasnella* sp2); b) ángulo cercano a los 90° entre hifa principal y secundaria, hifas binucleadas (flechas rojas) (*Tulasnella* sp2); c) hifas multinucleadas (*Sebacina* sp1) y d) Células monilioides (*Tulasnella* sp1). Fotografías tomadas por Montes (2015), con microscopio Leyca con objetivo 40X (a, b y c) y 20X (d).

La presencia de hifas binucleadas (Figura 10b) y/o multinucleadas (Figura 10c) y la formación de células monilioides se encontraron en la mayoría de las morfoespecies (Figura 10d).

Las características morfológicas de todos los aislados se presentan en el Anexo 2.

Las características que se consideraron para agrupar dentro del género *Tulasnella* fueron las siguientes:

7. Textura de la colonia, en general serosas, con hifas sumergidas, de color amarillo claro.
8. Diámetro de hifa principal y secundaria inferior a 4 μm .
9. Las tasas de crecimiento de todos los morfotipos son inferiores a 4 mm.
10. Reacción negativa a las polifenol oxidasa.
11. Hifas binucleadas

Así mismo se encontró una morfoespecie afín al género *Sebacina*. Una característica distintiva del género anamorfo *Sebacina* en contraste con el género *Tulasnella* es que pueden presentar ya sea hifas binucleadas o multinucleadas (más de dos núcleos entre cada septo de la hifa) (Sneh *et al.*, 1991; Currah *et al.*, 1997).

La caracterización de las diez morfoespecies se presenta a continuación:

***Tulasnella* sp1.** Presenta crecimiento sumergido, regular o uniforme, de apariencia serosa y sin brillo, al resemblarse nuevamente toma la misma apariencia. Forma esclerocio blanquecino, de consistencia serosa en forma de manchones irregulares. Las tasas de crecimiento son estadísticamente significativas más lentas (3mm/día, Tukey, $P \leq 0.0001$) (Figura 11) en comparación con el resto de las morfoespecies, excepto con *Tulasnella* sp9. Las hifas binucleadas, con diámetro de 3 μm (Figura 13) y las dimensiones de células monilioides largas, en forma de barril, oscilando entre los 15 μm (largo) a 11 μm (ancho) (Figura 12), coincidiendo con las medidas establecidas por Currah *et al.* (1997).

***Tulasnella* sp2 y *Tulasnella* sp4.** Presentan crecimiento superficial a sumergido, regular o uniforme, de apariencia serosa y sin brillo, no desarrolla esclerocio, y al resemblarse desarrolla pequeños mechones de hifas de apariencia algodonosa o en forma de

pelos rígidos. Sin desarrollo de esclerocio. Las tasas de crecimiento son lentas (1-1.3mm/día), sin embargo, las tasas de crecimiento de *Tulasnella* sp2 son estadísticamente mayores que las de *Tulasnella* sp4 (Figura 11). Hifas binucleadas, de diámetro de hifas estadísticamente iguales entre ellas (2.7µm) (Figura 13), al igual que las dimensiones de células monilioides que van de los 13-14µm (largo) a 9µm (ancho) y en forma de barril (Figura 12).

Por, lo cual, se clasificaron ambas con la especie *Tulasnella calospora*, según Currah *et al.*, (1997).

***Tulasnella* sp3 y *Tulasnella* sp8.** La morfoespecie *Tulasnella* sp3 se caracteriza por presentar crecimiento sumergido, irregular, de apariencia farinosa a serosa, brillante, con tendencia a formar anillos, cuando es subcultivado puede perder la apariencia brillante y la formación de anillos. Por su parte, *Tulasnella* sp8 presenta crecimiento sumergido seroso sin brillo, regular y uniforme, ambas sin formación de esclerocio. Las tasas de crecimiento de *Tulasnella* sp3 son muy lentas estadísticamente hablando (0.04mm/día, Tukey, $P \leq 0.0001$), en comparación de *Tulasnella* sp8, la cual presenta tasas de crecimiento estadísticamente mayores al resto de las morfoespecies (1.7mm/día, Tukey, $P \leq 0.0001$) (Figura 11) sin embargo, pese a esta diferencia, ambas morfoespecies tienden a mostrar una gran similitud en cuanto a otras características. Presentan hifas binucleadas, que oscilan entre 1.4 a 1.6µm de diámetro, dichas morfoespecies presentan un diámetro de hifas estadísticamente iguales entre sí, y diferencia significativa respecto al resto de las morfoespecies (Tukey, $P \leq 0.0001$) (Figuras 13), desarrollan células monilioides globosas a semi globosas, similares entre estas y estadísticamente menores (Tukey, $P \leq 0.0001$) respecto al resto de las morfoespecies de (4-6µm largo y 4µm ancho) (Figura 12).

El diámetro de células monilioides de *Tulasnella* sp3 y *Tulasnella* sp8 se encuentran por debajo de las medidas establecidas por las claves de identificación para HMO propuestas por Currah *et al.* (1997), para este género de HMO, pero también para otros género de HMO.

***Tulasnella* sp5.** Presenta crecimiento superficial a sumergido, irregular, de apariencia serosa y ligeramente brillante, con formación de esclerocio color blanquecino y

de apariencia afelpada. Al resemejarse tiende a formar anillos. Sus tasas de crecimiento de aproximadamente 1mm/día. Presenta hifas binucleadas, con un diámetro aprox., de 2.9µm. Presenta tasas de crecimiento cercanas a 1mm/día, las hifas son binucleadas, con diámetro cercanos a los 3µm. Presenta células moniloides en forma de barril, con medidas cercanas a los 12µm de largo y 6µm de ancho.

***Tulasnella* sp6.** Presenta crecimiento superficial a sumergido, regular, de apariencia farinosa a serosa y sin brillo, al resemejarse nuevamente toma la misma apariencia. Forma esclerocio blanquecino, de consistencia farinosa o serosa. Sus tasas de crecimiento de aprox. 1.1mm/día, las hifas binucleadas que oscilan a los 2.5µm de diámetro. Desarrollan células moniloides en forma de barril (12µm largo y 8µm ancho).

***Tulasnella* sp7.** El crecimiento irregular de superficial a sumergido, de apariencia serosa y brillante. Al resemejarse forma esclerocio que va del blanquecino a ligeramente amarillento y de apariencia serosa. Las tasa promedio de crecimiento es lenta, 0.55mm/día, hifas binucleadas de 2.2µm y no desarrolla células moniloides.

***Sebacina* sp1.** Presenta crecimiento sumergido, regular, de apariencia farinosa a serosa sin brillo, desarrolla esclerocio blanquecino y de apariencia afelpada. Al resemejarse tiende a desarrollar pequeños manchones de hifas, de aspecto algodonoso. Las tasas de crecimiento son de 1.1mm/día con diámetro de 3.2µm y no desarrolla células moniloides. La principal característica de esta morfoespecie, es que las hifas son multinucleadas, a diferencia del género *Tulasnella* que se caracteriza por presentar únicamente hifas binucleadas, por lo cual se clasifico dentro de este género.

El crecimiento del total de las morfoespecies se encontró por debajo de los 2mm/día. Se realizó un análisis estadístico, en donde se obtuvo diferencia significativa entre algunas de las morfoespecies, respecto al crecimiento (mm/día) ($P \leq 0.0001$, Tukey). De tal manera que *Tulasnella* sp8, presentó un crecimiento mayor estadísticamente significativo ($P \leq 0.0001$, Tukey) (aprox. 1.6 mm/día), mientras que *Tulasnella* sp1 presentó la menor tasa de crecimiento (aprox. 0.3 mm/día) ($P \leq 0.0001$, Tukey). Sin embargo, todas las morfoespecies se encontraron por debajo de los 2 mm/día (Figura 11),

tal como menciona Otero *et al.* (2004, 2005), reportando que las tasas de crecimiento de HMO generalmente son bajas (<4 mm/día).

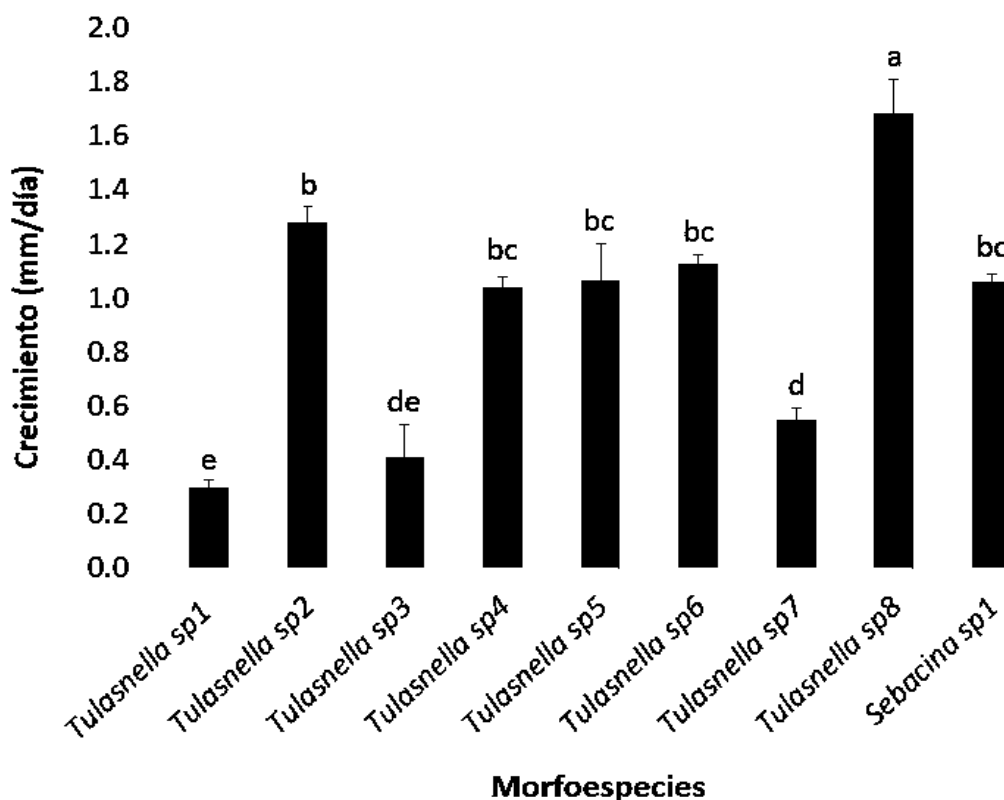


Figura 11. Tasas de crecimiento (mm/día) de las morfoespecies de HMO. Letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey, $P \leq 0.0001$).

Al analizar la dimensión de las células monilioides se pudo observar que las que pertenecen a *Tulasnella* sp1 son significativamente más grandes ($P \leq 0.0001$, Tukey), seguidas por *Tulasnella* sp2, *Tulasnella* sp4, y *Tulasnella* sp6 en comparación a las morfoespecies *Tulasnella* sp3 y *Tulasnella* sp8 que presentaron dimensiones estadísticamente más pequeñas ($P \leq 0.0001$, Tukey) (Figura 12), incluso por debajo de los estándares establecidos en las claves de identificación para *Tulasnella* por Currah *et al.* (1997). Por su parte, *Tulasnella* sp7 y *Sebacina* sp1 no formaron dichas estructuras (Figura 12).

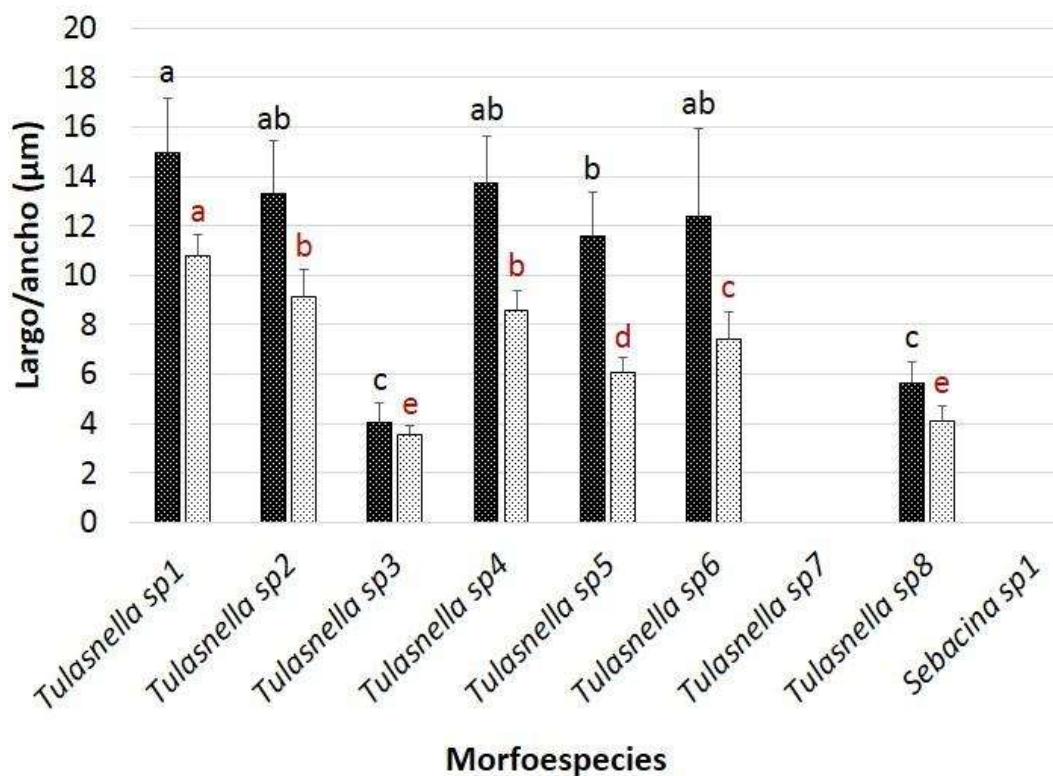


Figura 12. Dimensiones de células monilioides de las distintas morfoespecies de HMO; largo (µm): barras negras y ancho (µm): barras claras (µm). Letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey, $P \leq 0.0001$).

Las dimensiones de las hifas fueron semejantes para la mayoría de los aislados y corresponden a los rangos que discriminan entre los géneros más comunes como *Ceratorhiza* que presenta dimensiones mayores (Currah *et al.*, 1997). Sin embargo, *Tulasnella* sp3 y *Tulasnella* sp8, seguida de *Tulasnella* sp7 fueron los aislados que presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.0001$, Tukey), presentando las dimensiones de hifas mas pequeñas (Figura 13).

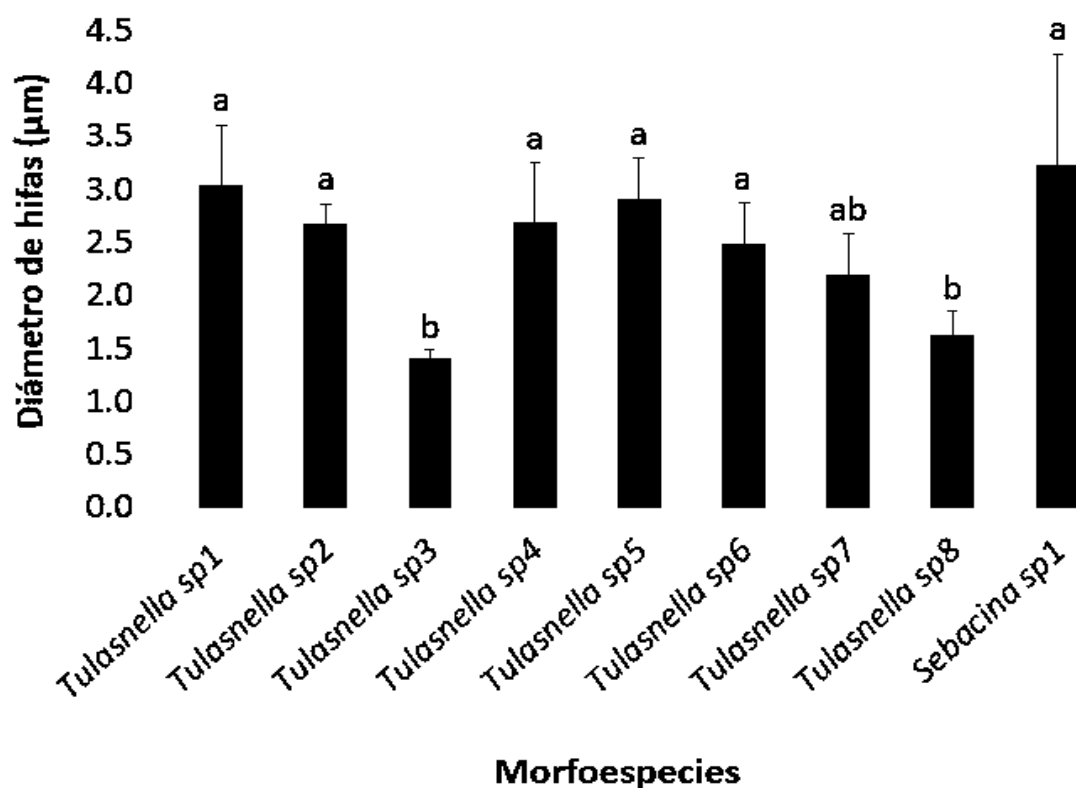


Figura 13. Diámetro promedio de hifas de las morfoespecies de HMO. Letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey, $P \leq 0.0001$).

7.2. Viabilidad de las semillas

Se evaluó la viabilidad de semillas de *G. lagenophora*, *G. superba*, *B. purpurata* y *H. flexuosa*, mediante dos técnicas de tinción, excepto de *G. greenwoodii* (solo se realizó prueba de tetrazolio).

Al comparar las dos técnicas colorimétricas para evaluar la viabilidad de semillas de las distintas especies, la mayoría de los lotes de semillas no presentaron diferencias significativas entre los métodos, sin embargo, al menos la especie *Bletia purpurata* presentó diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.0004$), ya que el mayor porcentaje de viabilidad fue en aquellas teñidas con tetrazolio (>60%), respecto a la técnica con diacetato de fluoresceína (Tukey, $P \leq 0.0004$) (Figura 14).

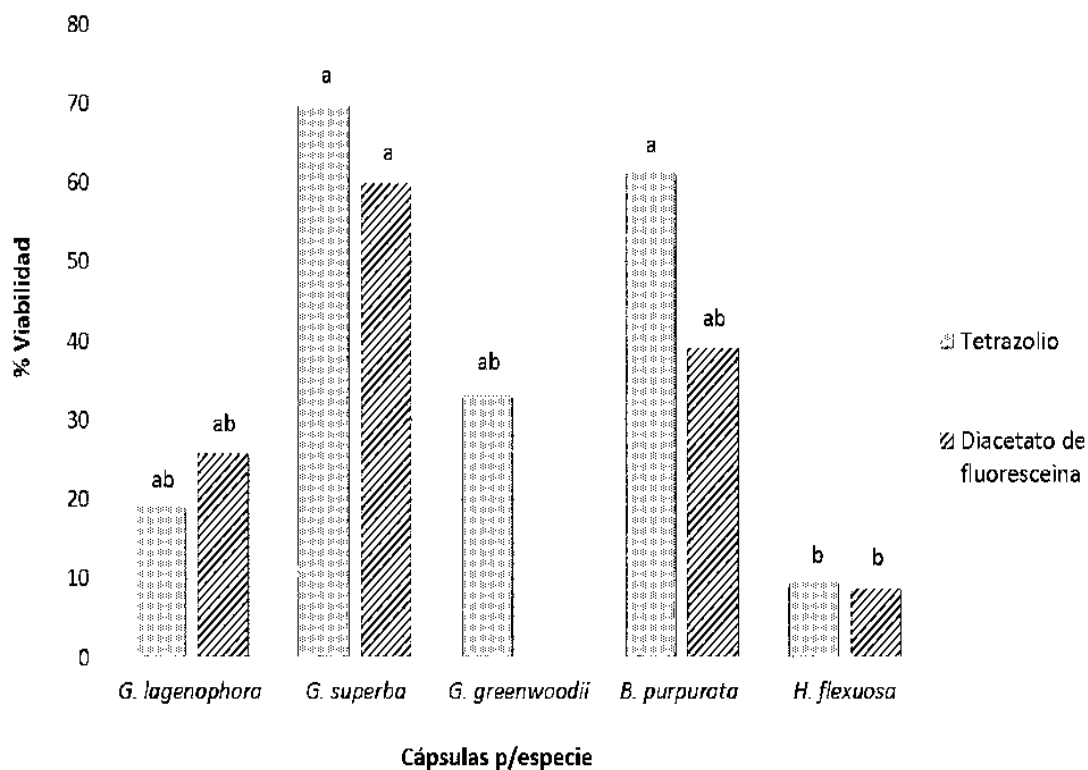


Figura 14. Porcentaje de viabilidad de semillas de las distintas especies de orquídeas terrestres analizadas. Letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey, $P \leq 0.0004$).

De esta manera, al tomar en cuenta los valores de viabilidad bajo la técnica de tetrazolio, las semillas de *G. superba* como las de *B. purpurata* fueron las que mostraron mayor porcentaje de viabilidad (>60%), seguidas por *G. greenwoodii* (33%), *G. lagenophora* (19%) y *H. flexuosa* (10%) (Figura 14).

Una vez realizada la comparación entre técnicas, se concluyó, que aunque no hubo demasiada variación entre ambas, la más efectiva es la técnica de tetrazolio (TTC), ya que la tinción con diacetato de fluoresceína (DFA) da falsos positivos al teñir otros tejidos de la semilla, además de teñir el embrión (Figura 15).

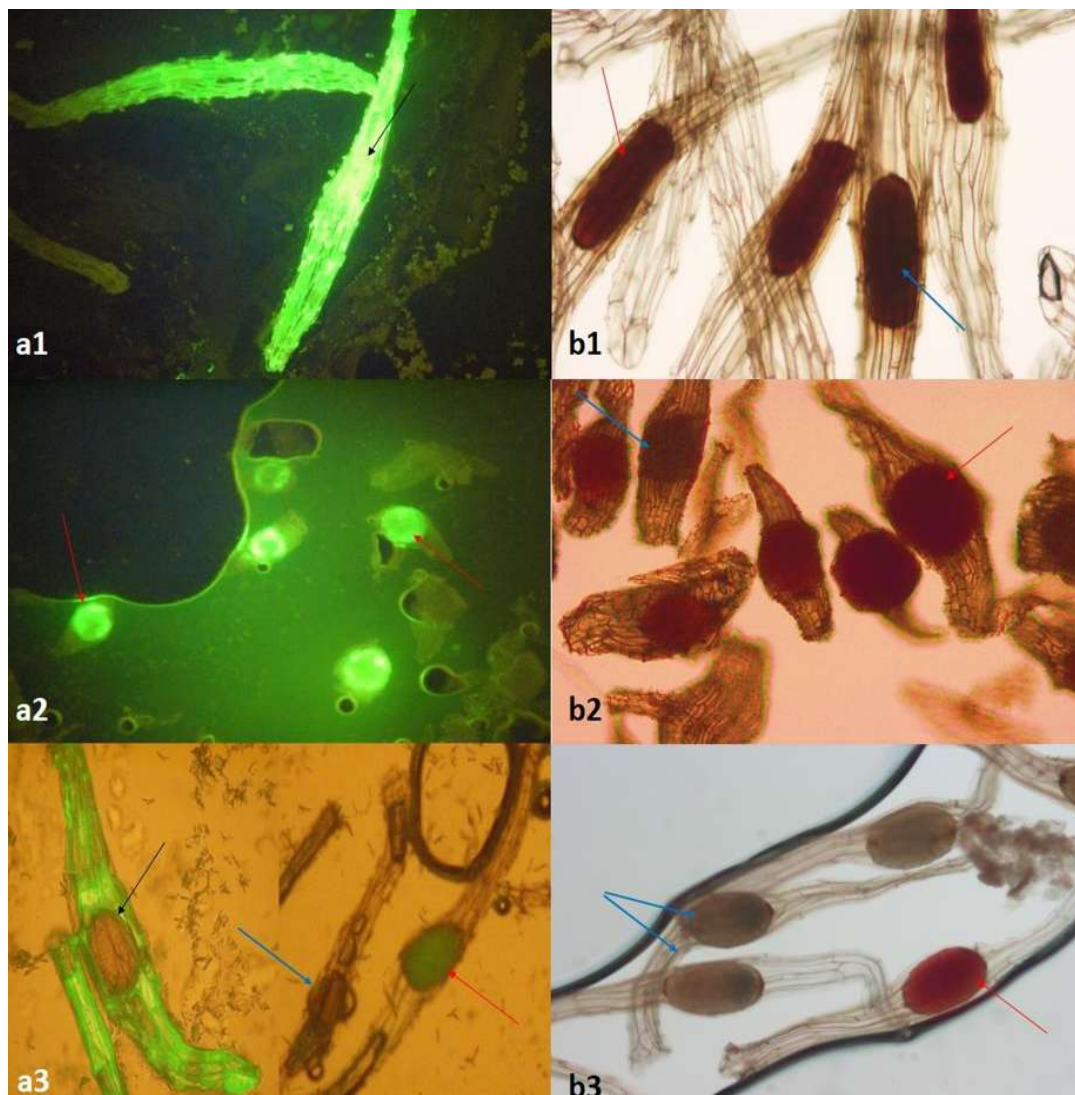


Figura 15. Viabilidad de semillas de especies de orquídeas terrestres en los métodos de tinción. a1) *Govenia lagenophora* DFA, b1) *Govenia lagenophora* TTC; a2) *Bletia purpurata* DFA, b2) *Bletia purpurata* TTC; a3) *Habenaria flexuosa* DFA y b3) *Habenaria flexuosa* TTC. Flechas roja indica semilla viable, flecha azul semilla inviable y flecha negra indica falso positivo ó negativo.

7.3. Evaluación de la germinación de semillas

7.3.1. Evaluación del porcentaje de germinación

Las semillas de la especie *B. purpurata* mostraron el mayor porcentaje de germinación (100%) al ser inoculadas con *Tulasnella* sp1, seguido de los tratamientos inoculados con *Tulasnella* sp2, *Tulasnella* sp4, *Tulasnella* sp6, *Tulasnella* sp7 y *Tulasnella* sp8 (aprox. 80-90%). Todos éstos, mostraron diferencia significativa (Tukey, P

≤ 0.0001) respecto a los tratamientos simbióticos inoculados con *Tulasnella* sp3, *Tulasnella* sp5, *Sebacina* sp1, y los tratamientos asimbióticos que presentaron los porcentajes más bajos de germinación (menor al 50%) (Figura 16a).

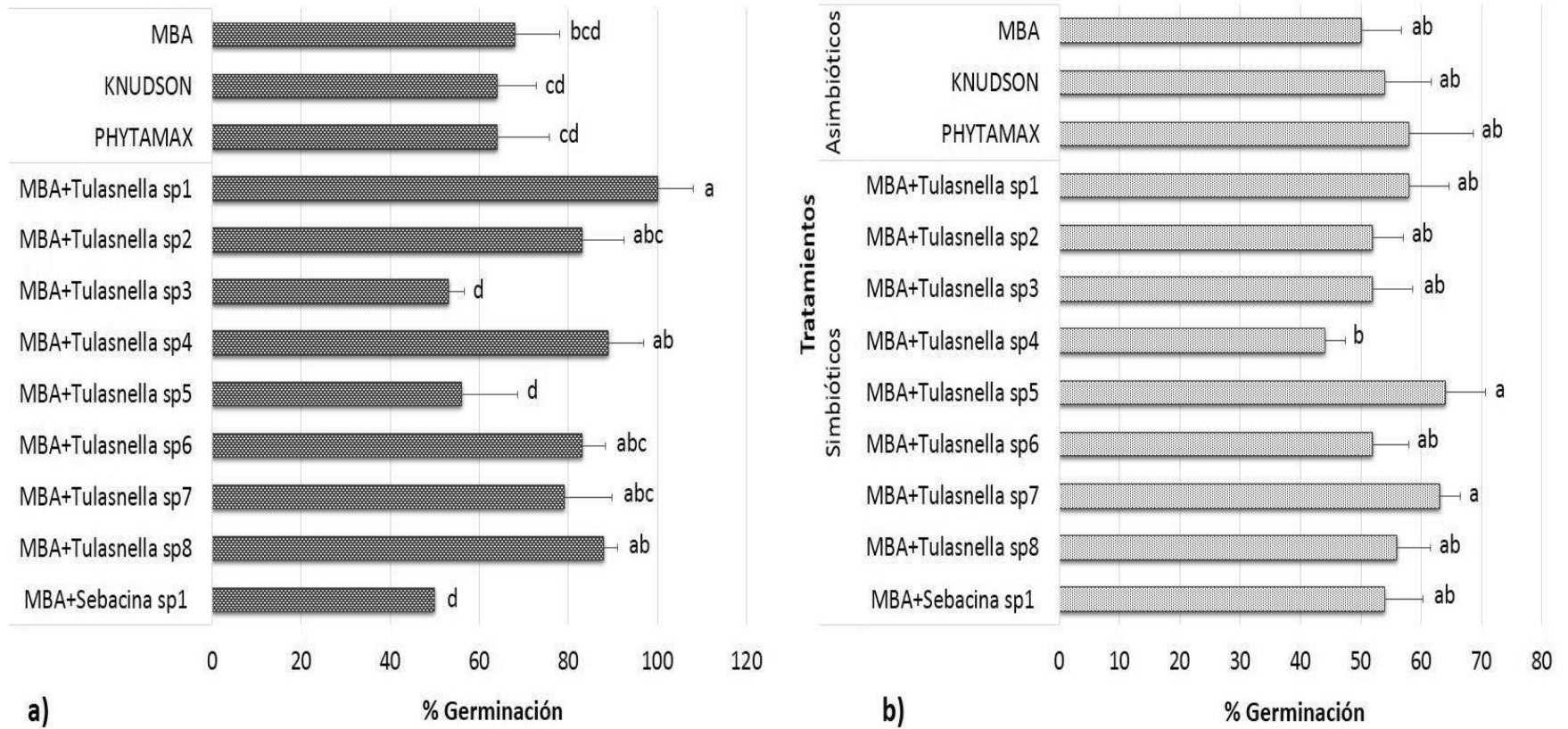


Figura 16. Pruebas de germinación simbiótica y asimbiótica. a) Muestra la germinación de semillas de *B. purpurata*, en donde las letras distintas muestran diferencias.

A diferencia de lo anterior, las semillas de la especie *H. flexuosa*, mostraron el mayor porcentaje de germinación (64%) al ser inoculada con *Tulasnella* sp5 y *Tulasnella* sp7 (63%), seguidas de los demás tratamientos simbióticos y asimbióticos ya que mostraron una germinación entre el 50 y 55%, sin embargo, el tratamiento que mostró menor porcentaje de germinación fue el inoculado con *Tulasnella* sp4 (Figura 16b).

7.3.2. Evaluación de índice de desarrollo

En cuanto al desarrollo de *B. purpurata* a los treinta días, el mayor índice se logró en aquellos tratamientos simbióticos inoculados con los hongos *Tulasnella* sp2 y *Tulasnella* sp4 y, llegando mayoritariamente al estadio dos y tres (protocormo), sin embargo a los sesenta días, los tratamientos que mostraron mayor índice de desarrollo fueron aquellos inoculados con los hongos *Tulasnella* sp1, *Tulasnella* sp3, y *Tulasnella* sp7 alcanzando estadios cuatro, cinco y seis. A los noventa días, en dichos tratamientos ya había alcanzado el estadio seis (plántula) (Figura 17 y 18).

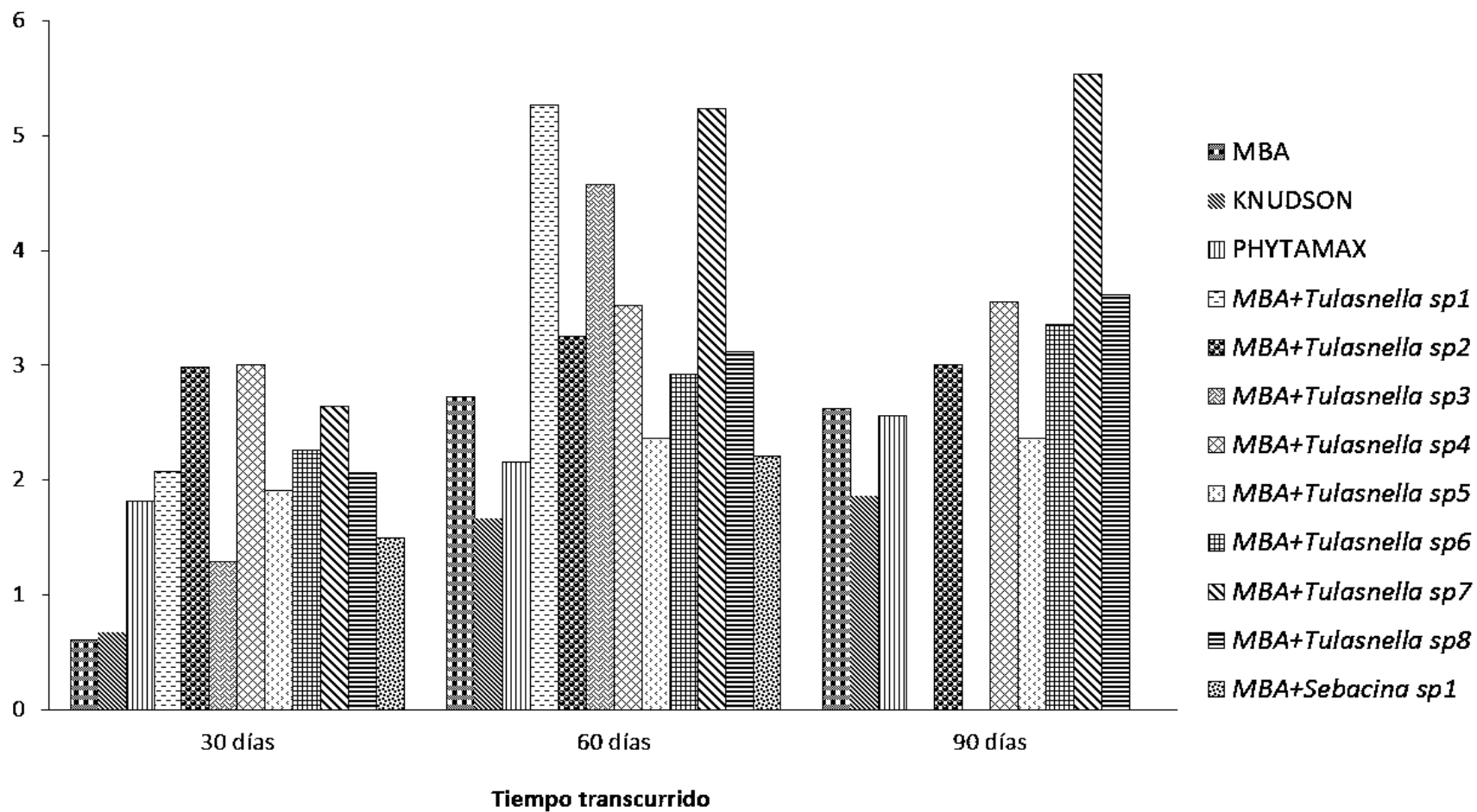


Figura 17. Índice de desarrollo de *B. purpurata* a 30, 60 y 90 días de cultivo, en los diferentes tratamientos tanto asimbióticos, como simbióticos. En donde; 0-semilla sin germinar, 1-rompimiento de testa, 2-aparición de rizoides, 3-aparición del primordio foliar, 4-aparición de verdadera, 5-desarrollo de primera raíz y 6-Plántula.

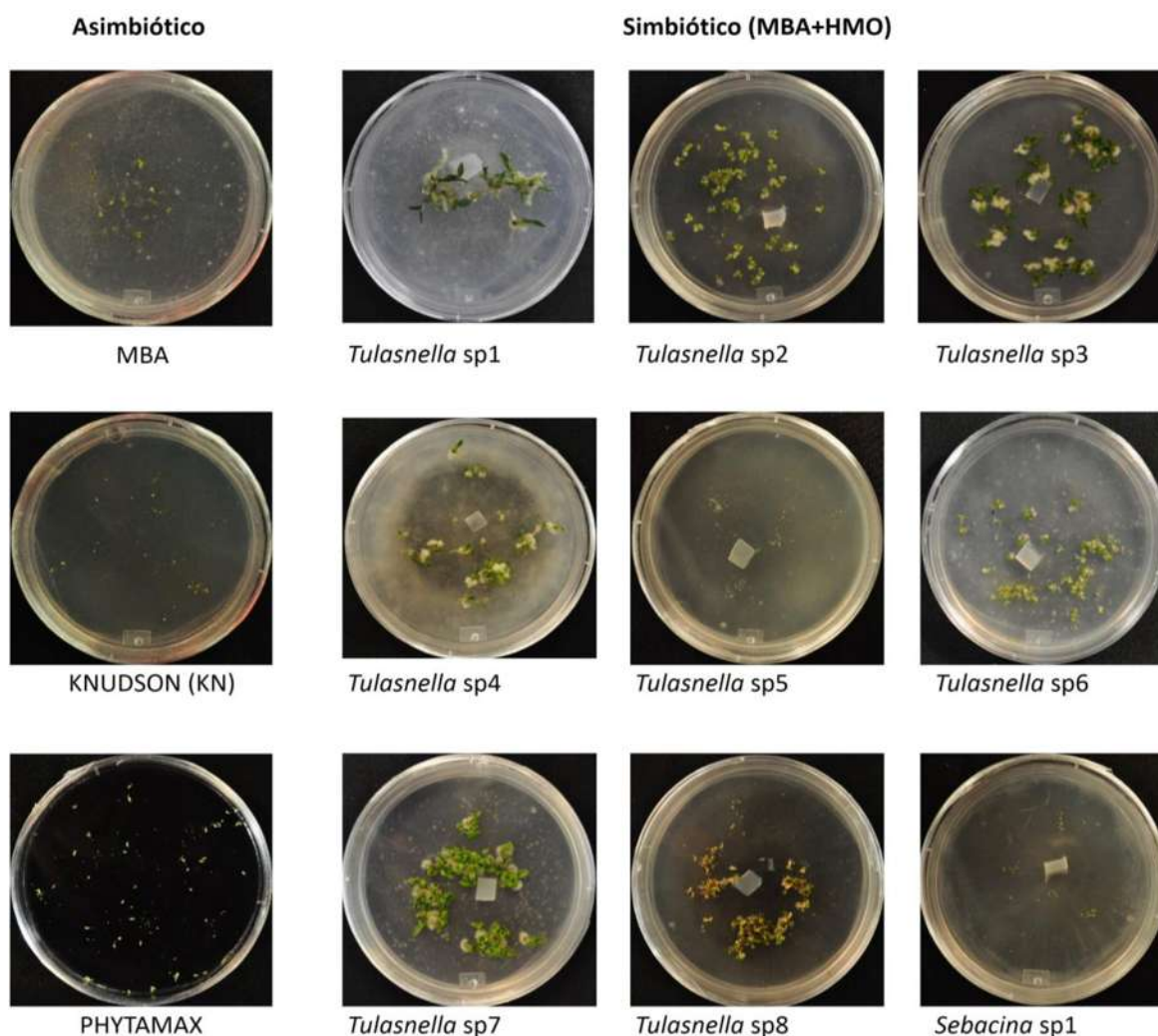


Figura 18. Desarrollo de *Bletia purpurata*. A la izquierda tratamientos asimbióticos (90 días); a la derecha tratamientos simbióticos. *Tulasnella* sp1 y sp3 (60 días), *Tulasnella* sp2, sp4, sp5, sp6, sp7, sp8 y *Sebacina* sp1 (90 días).

Por otra parte, la inoculación del hongo *Sebacina* sp1 mostró una interacción patogénica, puesto que transcurridos los noventa días éste acabó por parasitar a todos los estadios alcanzados (semilla germinada-formación de rizoides) (Figura 17 y 18). No obstante el índice de desarrollo de *B. purpurata* en la mayoría de los casos fue progresivamente mayor al de los tratamientos asimbióticos (Figura 17).

Respecto a *H. flexuosa*, el desarrollo se vió favorecido a los treinta días por el medio asimbiótico Phytamax. A los sesenta días el mayor índice se encontró nuevamente en el medio asimbiótico Phytamax, seguido del simbiótico inoculado con *Tulasnella* sp1.

A los noventa días se muestra que el mayor índice de desarrollo se presentó en el medio asimbiótico Knudson, seguido de Phytamax y en la simbiosis con *Tulasnella* sp1. (Figura 19 y 20).

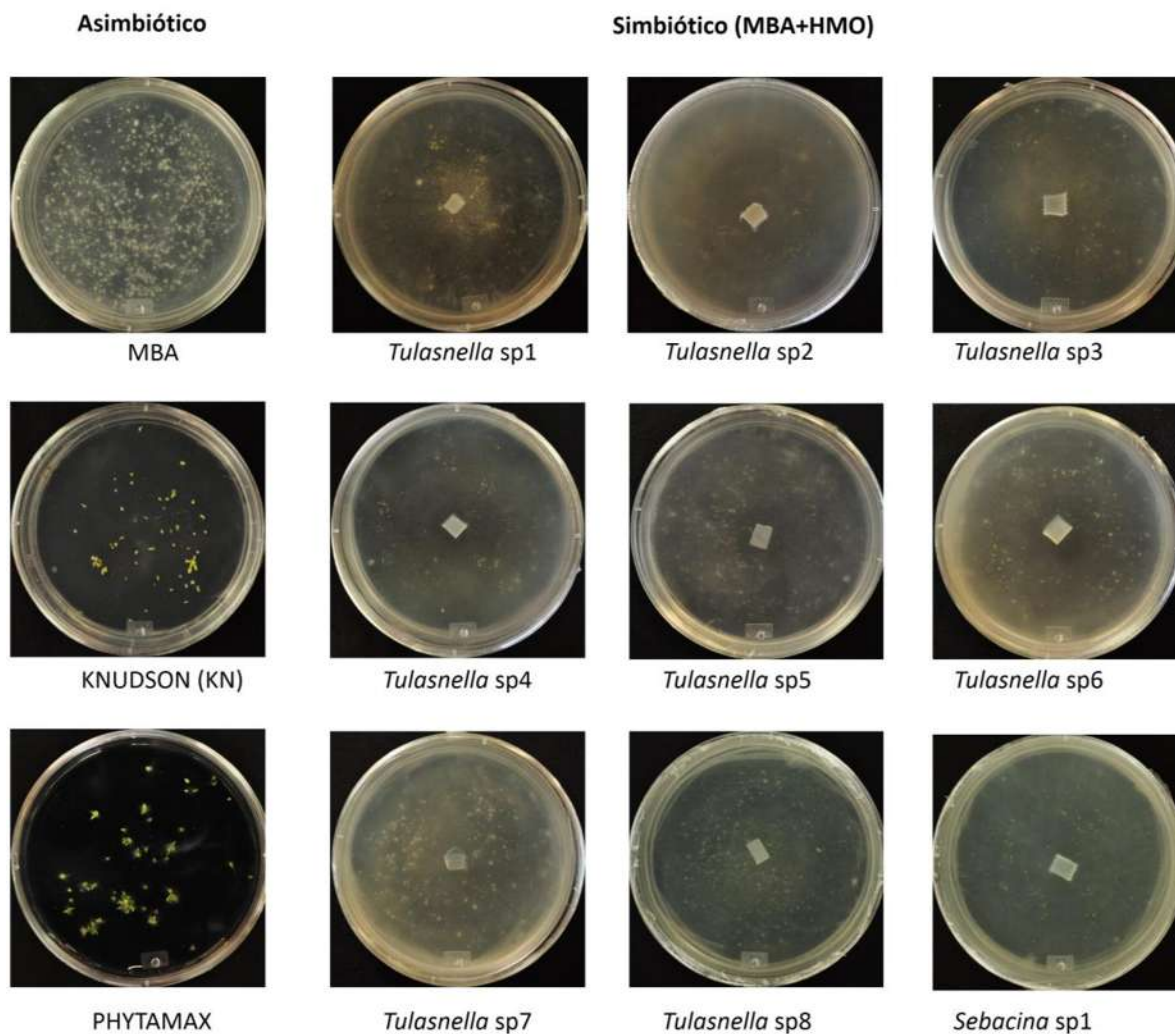


Figura 19. Desarrollo de *H. flexuosa*. A la izquierda tratamientos asimbióticos; a la derecha tratamientos simbióticos (90 días de siembra).

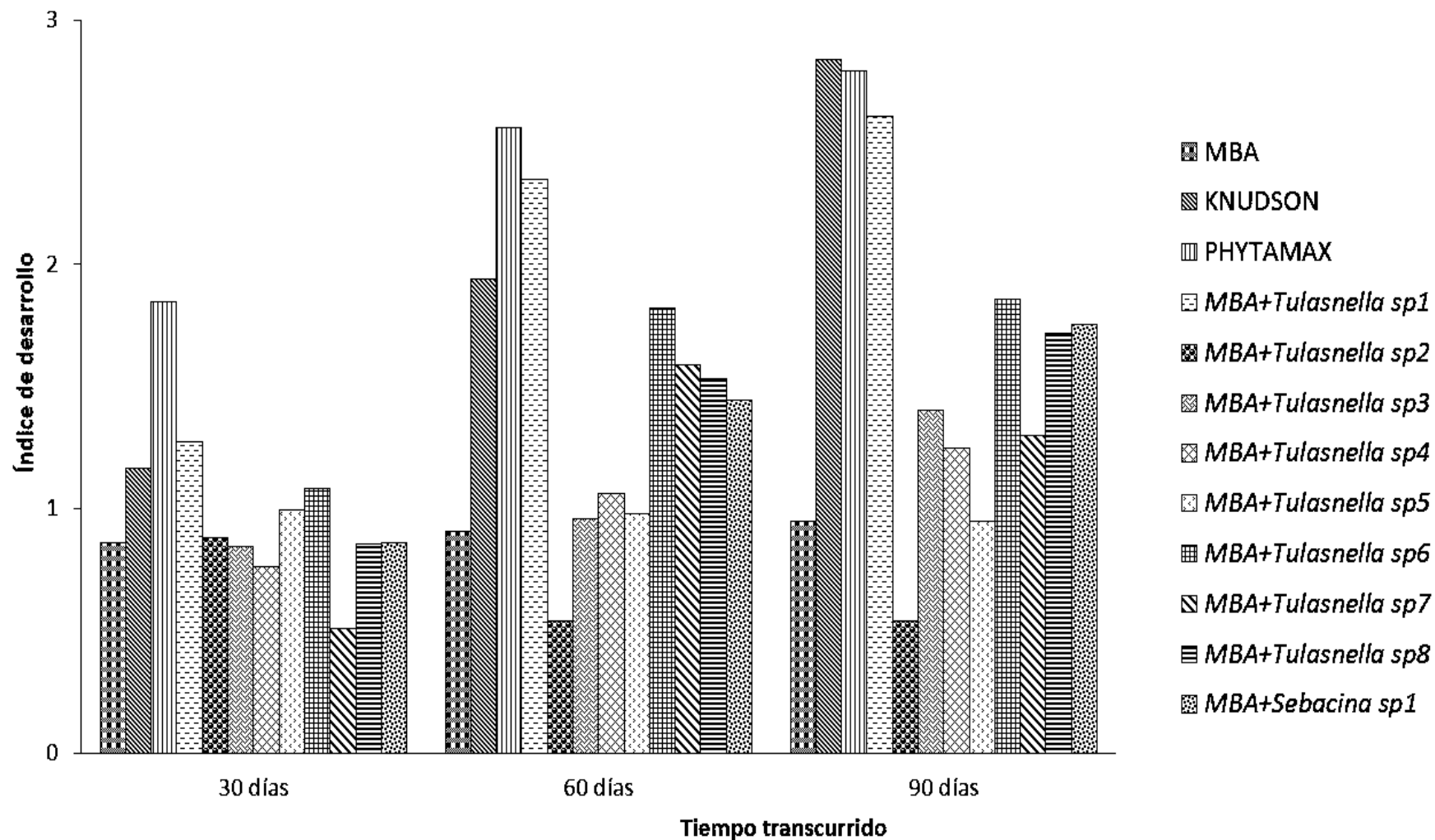


Figura 20. Índice de desarrollo de *H. flexuosa* a 30, 60 y 90 días de cultivo, en los diferentes tratamientos tanto asimbióticos, como simbióticos. En donde; 0-semilla sin germinar, 1-rompimiento de testa, 2-aparición de rizoides, 3-aparición del primordio foliar.

En todos los tratamientos (a excepción del género *Govenia*), los embriones se hincharon y rompieron la testa dentro de los 20 a 25 días después de la siembra. A los 60 días, se tomaron algunos protocormos cuidadosamente y se realizaron cortes de estos, los cuales, revelaron pelotones compactos típicos en los tratamientos inoculados con el HMO (Figura 21), sin embargo, las células corticales de aquellos protocormos que se encontraban en medios asimbióticos se encontraron intactos y libres de pelotones.

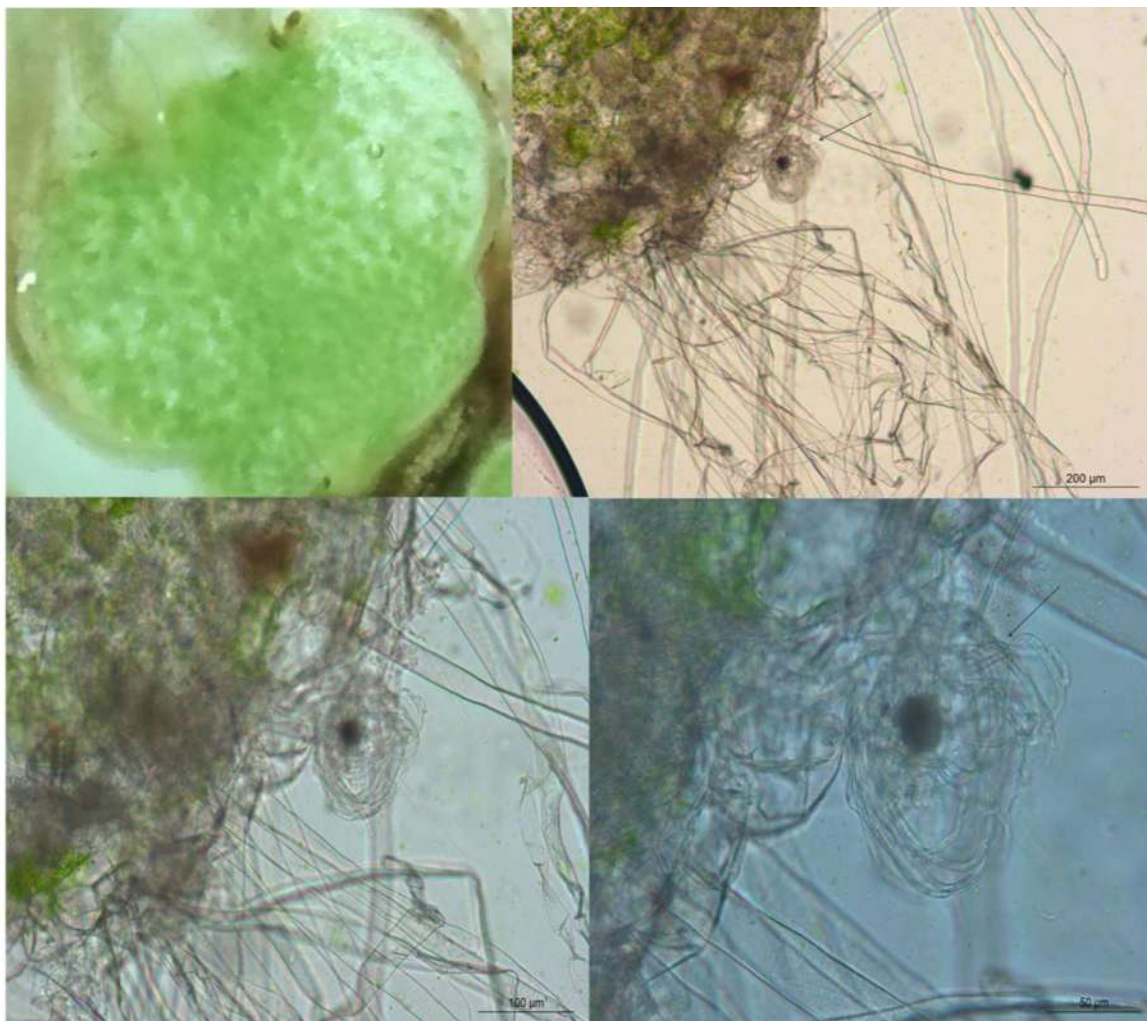


Figura 21. Cortes transversales de protocormos para análisis de colonización.

Durante el proceso de germinación de los diferentes géneros, se establecieron los seis estadios de desarrollo propuestos por Zettler y McInnis (1993) (Figura 22a) como resultado del crecimiento, diferenciación y desarrollo del embrión, formando así el protocormo y posteriormente las estructuras foliares y raíces de *B. purpurata* (Figura 22b) y *H. flexuosa* (Figura 22c).

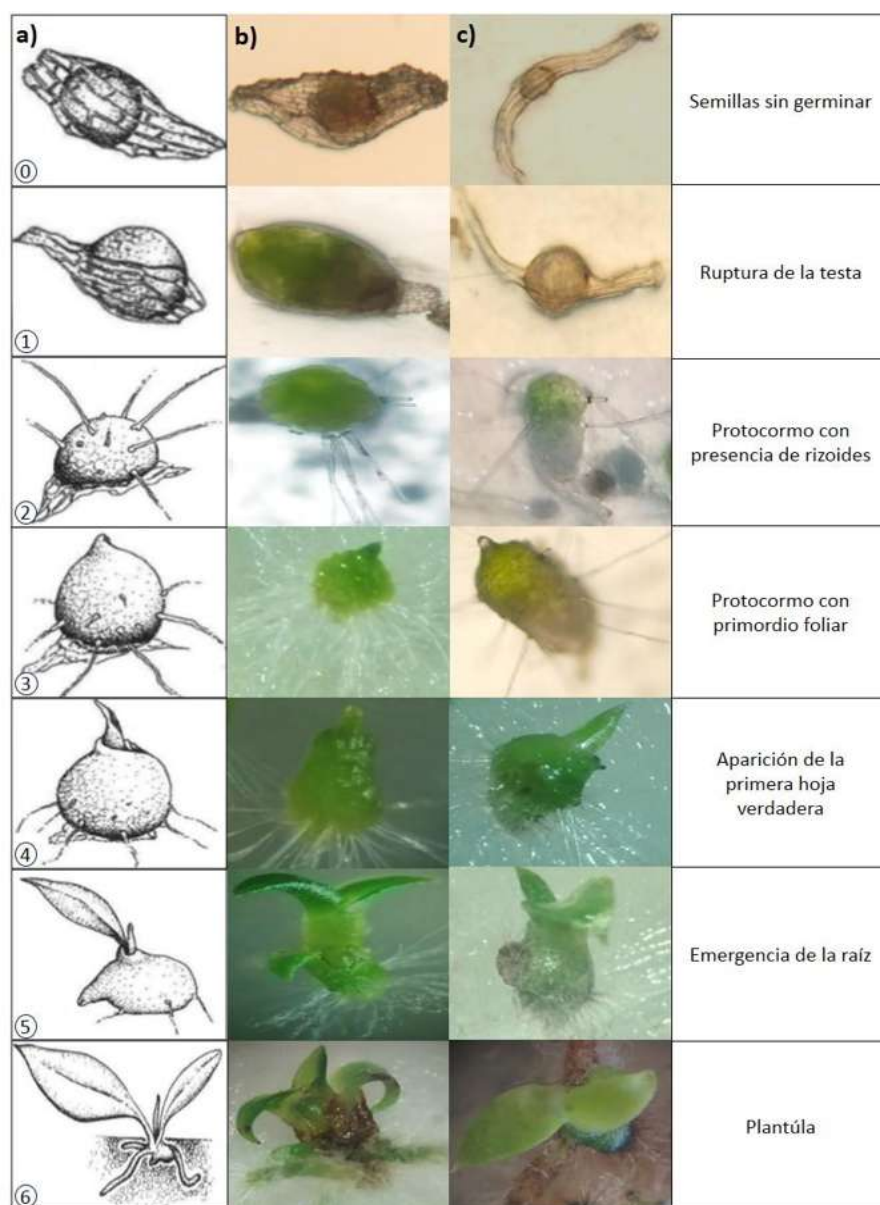


Figura 22. Etapas de desarrollo (ontogénicas de orquídeas). a) Estadios propuestos por Zettler y McInnis (1993); b) etapas de desarrollo de *B. purpurata* y c) etapas de desarrollo de *H. flexuosa*.

No obstante, el índice de desarrollo mostrado de los tratamientos de *H. flexuosa* (Figura 20), contrastan con los mostrados en *B. purpurata* (Figura 17), puesto que estos se encuentran muy por debajo (igual o menor al estadio tres) (Figura 20).

7.3.3. Evaluación del porcentaje de supervivencia

Transcurridos los noventa días, se observó que la supervivencia de los diferentes estadios ontogénicos fue variable en los distintos tratamientos (Figura 23).

Por su parte, los tratamientos que presentaron el mayor porcentaje de supervivencia de *B. purpurata*, con una diferencia significativa (Tukey, $P \leq 0.05$) fueron los simbióticos inoculados con *Tulasnella* sp1 y *Tulasnella* sp7. Mientras que los tratamientos simbióticos con *Tulasnella* sp8 y *Sebacina* sp1 terminaron por parasitar en su totalidad a los diferentes estadios ontogénicos encontrados a los noventa días (Figura 23a).

En cuanto a *H. flexuosa* el mayor porcentaje de supervivencia (70-80%) fue mostrado en los tratamientos asimbiótico Phytamax y Knudson, y en simbiosis con *Tulasnella* sp1, los cuales mostraron diferencia significativa (Tukey, $P \leq 0.0001$), respecto a los demás tratamientos. Mientras que los tratamientos estadísticamente más desfavorables en la supervivencia (15-30%) fueron aquellos en simbiosis con *Tulasnella* sp2, *Tulasnella* sp5 y *Tulasnella* sp7 (Figura 23b).

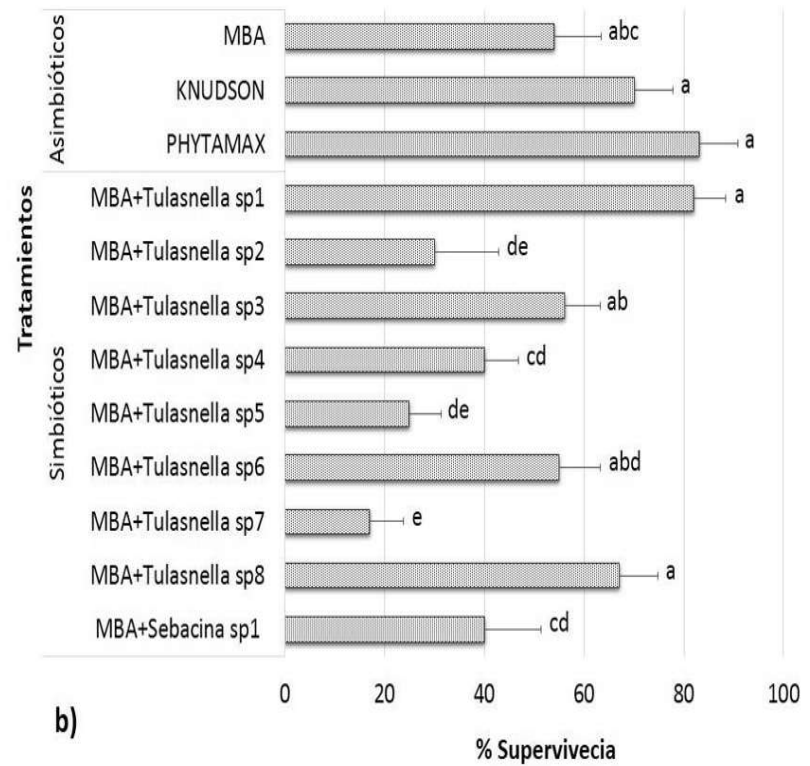
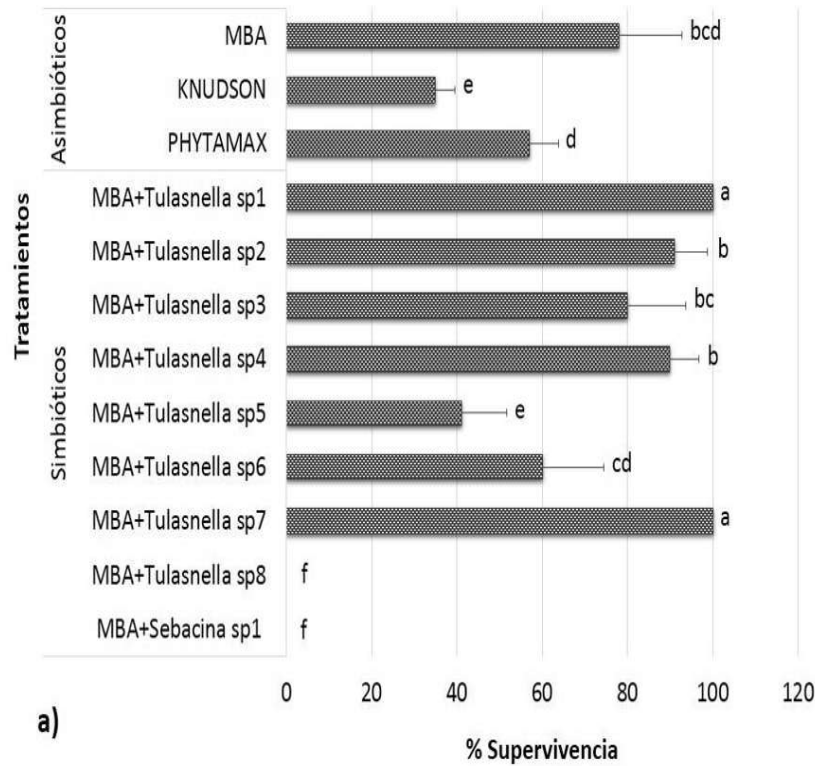


Figura 23. Pruebas de supervivencia. a) Muestra la supervivencia de los diferentes estadios ontogénicos de *B. purpurata*, en donde las letras distintas muestran diferencia significativa Letras distintas muestran diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.0000$) y b) supervivencia de *H. flexuosa*, en los diferentes tratamientos. Letras distintas muestran diferencias significativas Letras distintas muestran diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.0001$).

En cuanto a la germinación y desarrollo en semilla del género *Govenia*, no se logró inducir la especificidad potencial en los tratamientos simbióticos, ni la germinación y desarrollo en aquellos asimbióticos, a pesar de que las tres especies (*G.lagenophora*, *G. superba* y *G. greenwoodii*) presentaron un porcentaje estadísticamente mayor (Tukey, $P \leq 0.0001$) al de *H. flexuosa*.

8. DISCUSIÓN

Los hongos micorrícicos forman junto con sus hospederos relaciones simbióticas complejas, y en la actualidad existe un gran número de interrogantes acerca del funcionamiento de esta simbiosis. Las micorrizas en orquídeas es uno de los temas principales en la investigación sobre la biología de estas plantas, ya que juega un papel crucial para la germinación y la supervivencia de estas, además de ser una herramienta en la conservación de especies amenazadas (Yuan *et al.*, 2009; Arditti, 1992; Batty, 2002).

En el presente estudio se obtuvieron 122 aislamientos, de los cuales, 96 presentaron otras características que difieren de los HMO. Únicamente 26 presentaron características de hongos micorrícicos orquídeoides, por lo que el bajo aislamiento de HMO a partir de tejidos, puede llevar simultáneamente a aislar hongos no simbióticos, ya que algunos estudios han demostrado que la aparición de hongos endófitos en las raíces es más abundante que aquellos hongos que forman micorriza (Warcup y Talbot 1967; Suárez *et al.* 2006; Yuan *et al.*, 2009).

Los 26 aislamientos de HMO pertenecen únicamente a orquídeas de la especie *B. purpurata*, lo que muestra el bajo éxito de crecimiento que pueden mostrar los HMO al aislarse en cultivo *in vitro*. Un factor que puede impedir el crecimiento de los HMO, a pesar de estar presentes en los tejidos corticales de la raíz, es el suministro de aditivos, que no estimulan el crecimiento de estos, ya que al parecer, tienen necesidades nutricionales desconocidas, que hasta el momento no se han tenido en cuenta (Bayman *et al.*, 2011, Vidal, 2015). Además, el uso de medios generales como el PDA, podría atenuar la diversidad presente debido a la dificultad que presentan ciertos hongos al crecer en esta fuente de carbono (Bayman *et al.*, 1997).

Dichos aislamientos se pudieron segregar mediante caracteres morfológicos en 9 morfoespecies, en el presente estudio. La mayoría de 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).

Ocho morfoespecies corresponden al género teleomorfo *Tulasnella* (anamorfo *Epulorhiza*), siendo este un género ampliamente reportado en estudios donde se han

aislado hongos micorrícicos en orquídeas terrestres en Puerto Rico y Colombia realizados por Otero *et al.* (2004, 2013), Valadares *et al.* (2012) y Mosquera *et al.* (2013), y documentado para orquídeas terrestres epífitas mexicanas (Rangel-Villafranco y Ortega-Larrocea, 2005; Rangel, 2006; Cruz-Blasí, 2007; Beltrán, 2010; Vidal, 2015).

En un estudio realizado por Beltrán (2010), en donde llevo a cabo aislamientos y caracterización morfológica de HMO terrestres *Bletia purpurata*, *B. roezlii* y *B. punctata* en una reserva natural del estado Michoacán, encontró que éste género de orquídeas se encuentra asociado a hongos *Tulasnella* sp. De igual manera, concuerda con resultados obtenidos en un estudio realizado por Rangel (2006), en el que al aislar HMO de especies del género *Bletia*, en la reserva ecológica del Pedregal de San Ángel, encontró que dicha especie, en etapa adulta se relaciona con hongos micorrícicos pertenecientes a la familia Tulasnellaceae, en particular *B. campanulata* y *B. urbana* con *Tulasnella calospora* (Ortega-Larrocea *et al.*, *sometido*, citado en Rangel, 2006). Estas plantas son de la familia Bletinae de más reciente evolución comparada con las especies de la subfamilia Apostasioidea y Cypripedioideae donde han sido aislados comúnmente (Kristiansen *et al.*, 2004; Shefferson *et al.*, 2005). Sin embargo, no se puede generalizar que todas las orquídeas terrestres son específicas al género *Tulasnella*, puesto que en el mismo estudio realizado por Rangel (2006), las orquídeas terrestres del género *Dichromanthus aurantiacus* se relacionan con hongos micorrícicos pertenecientes a la familia Ceratobasidiaceae, manteniendo una relación simbiótica que es posiblemente persistente durante todo su ciclo de vida, dado que aislados obtenidos de raíces de plantas adultas y de protocormos pertenecen a la misma familia. Esta especie pertenece a la subfamilia Orchidoideae (Dressler, 1993).

Además de su papel como hongo micorrícico, *Tulasnella* es generalmente descrito como un género de hongo saprófito de amplio rango ecológico (Alexopoulos *et al.*, 1996), lo que puede explicar la mayor cantidad de aislados en este estudio.

Así mismo, Beltrán (2010) reportó que los morfotipos 1 y 3 de *Tulasnella* sp presentaron células moniloides de menor tamaño a las reportadas para este género, o cualquier otro género de HMO en las claves de identificación de HMO propuestas por Currah *et al.* (1997), tal como ocurre con *Tulasnella* sp3, *Tulasnella* sp8 en el presente

trabajo. Sin embargo, se clasificaron como *Tulasnella* por las otras características antes descritas.

Por lo tanto, realizar pruebas moleculares que permitan diferenciar o agrupar las morfoespecies encontradas y corroborar la identidad del género determinado como *Tulasnella* es de gran importancia, por lo que, se realizó la identificación molecular de dichos aislados por Beltrán, (2016) (datos en proceso), la cual se comparó con la identificación morfológica en la siguiente tabla:

Tabla 2. Identificación de los nueve hongos micorrícicos orquideoides. A la izquierda; la identificación morfológica y a la derecha la identificación molecular realizada por Beltrán (2016) (Datos en proceso).

Identificación morfológica	Identificación molecular
<i>Tulasnella</i> sp1	<i>Trichocladium</i> (Ascomiceto)
<i>Tulasnella</i> sp2 (<i>Tulasnella calospora</i>)	<i>Tulasnella calospora</i>
<i>Tulasnella</i> sp3	No identificado
<i>Tulasnella</i> sp4 (<i>Tulasnella calospora</i>)	<i>Tulasnella calospora</i>
<i>Tulasnella</i> sp5	Ascomiceto (orden Pleosporales)
<i>Tulasnella</i> sp6	Ascomiceto (orden Hypocreales)
<i>Tulasnella</i> sp7	<i>Trichocladium</i> (Ascomiceto)
<i>Tulasnella</i> sp8	<i>Sebacina vermifera</i>
<i>Sebacina</i> sp1	Ascomiceto (orden Pleosporales)

Tanto la identificación morfológica, como la molecular no coinciden totalmente (Tabla 2). De acuerdo con la identificación molecular realizada por Beltrán (2016) (datos en proceso), se encontró similitud en cuanto a la identificación morfológica solamente en dos hongos; *Tulasnella* sp2 y *Tulasnella* sp4 – ambas *Tulasnella calospora* en la identificación morfológica y molecular. No obstante, respecto al resto de los hongos micorrícicos no se encontró similitud en la identificación morfológica, ya que varios de estos aislados encontraron similitud con hongos Ascomicetos como *Trichocladium*, o a fines a los órdenes Pleosporales e Hypocreales, a excepción de *Tulasnella* sp8 – *Sebacina vermifera*. Por tanto, lo anterior no nos permitiría inferir que las orquídeas del género *Bletia* son específicas a los hongos del género *Tulasnella*.

En estudios previos de aislamientos de hongos micorrícicos en orquídeas fotosintéticas se han reportado generalmente Basidiomicetes, sin embargo, como endófitos de raíz en orquídeas epífitas, se han reportado hongos Ascomicetes de los órdenes Pleosporales e Hypocreales, tal como menciona Herrera *et al.* (2010), pero no como HMO.

De tal manera que el criterio taxonómico continúa siendo válido como una primera herramienta de aproximación a los géneros, sin embargo, no siempre es suficientemente exacto como sistema de identificación de hongos del género forma *Rhizoctonia*, mucho menos de las relaciones que guardan entre sí. Sin embargo, la filogenia molecular ha permitido corroborar que estos criterios usados, permiten discernir entre diferentes géneros de este complejo.

Sin embargo el género *Sebacina* no se ha reportado como hongo micorrícico de esta especie o género de orquídeas.

El pequeño tamaño de las semillas de orquídeas es otro factor limitante cuando se quiere llevar a cabo programas de conservación de esta familia. Por lo que, estudios sobre germinación y fisiología *in vitro* requieren conocer con certeza los patrones de viabilidad en semillas de orquídeas, sin embargo, aún existe dificultad para distinguir las semillas viables de las no viables (Alomia, 2014).

En el presente estudio, los métodos colorimétricos empleados no mostraron diferencia significativa entre ellos, a excepción de la especie *Bletia purpurata*, ya que el mayor porcentaje de viabilidad fue en aquellas teñidas con tetrazolio, respecto a la técnica con diacetato de fluoresceína.

Sin embargo, se concluyó, que aunque no hubo demasiada variación entre ambas técnicas, la más efectiva fue la de tetrazolio (TTC), ya que la tinción con diacetato de fluoresceína (DFA) da falsos positivos al teñir otros tejidos de la semilla, además de teñir el embrión, lo que pudiera deberse a las características de la testa. La cual está formada por un tejido muerto, compuesto de hasta 96% de aire; de forma que cada semilla de orquídea puede ser considerada como un auténtico globo, esto es lo que pudiera estar

impidiendo la penetración del DFA y por consiguiente, que la técnica funcione de manera correcta. Por su parte, si la prueba de tinción se realiza en semillas intactas, la testa repelente al agua impide la absorción uniforme de la tinción, y el color de esta también puede interferir con la interpretación de la prueba (Eiberg, 1970).

Tradicionalmente el método más utilizado es la prueba topográfica por tetrazolio. En ella se utiliza una solución incolora de la sal cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio como un indicador de varios procesos de reducción que ocurren en las células vivas (Baskin y Baskin, 2004; Alomia, 2014). En semillas de orquídeas, este método resulta útil, pues la mayoría de especies de esta familia tienen las testas hialinas, tal es el caso de las especies estudiadas, lo que permite una clara observación del embrión cuando la reacción con la sal resulta positiva (Alomia, 2014).

Los pocos estudios sobre germinación de semillas de orquídeas se han realizado sin conocer con certeza el porcentaje de viabilidad de las semillas (Porrás-Alfaro y Bayman, 2007; Alomía y Otero, 2013). Esta situación es crítica a la hora de establecer si la falta de germinación es debida a un tratamiento específico, o a la falta de viabilidad de las semillas al momento de iniciar el experimento, generando ruido en el diseño experimental (Alomia, 2014). Así, el presente estudio reporta como método efectivo el de tetrazolio, para la evaluación del porcentaje de viabilidad en semillas de los géneros *Govenia*, *Habenaria* y *Bletia*, que puede ser aplicado con facilidad en estudios de germinación y fisiología.

Las orquídeas varían en sus preferencias por los hongos micorrícicos (Otero *et al.*, 2004; Otero *et al.*, 2007) y esto determina el grado de especificidad hospedero-huésped. Las orquídeas terrestres se han considerado como un grupo más dependiente en cuanto a su asociación con su micobionte, porque son difíciles de germinar sin su presencia (Arditti *et al.*, 1981). Se tiene documentado que para algunas orquídeas, la especificidad de la asociación tiene niveles que varían entre especies (Otero *et al.*, 2002) y etapas de la vida de las orquídeas habiendo en ocasiones, sucesión de hongos a lo largo de la vida de la orquídea (Luigi y Riess, 2001; McCormick *et al.*, 2004).

En este estudio, fue posible evidenciar que nueve aislados difirieron significativamente en su capacidad para inducir la germinación de las semillas de *B.*

purpurata y *H. flexuosa*. La variación entre la inducción de la germinación y el desarrollo de las plántulas se ha demostrado previamente en orquídeas terrestres (Hadley, 1970; Clements, 1987, 1988; Smreciu y Currah, 1989; Masuhara *et al.*, 1993), de la misma manera que se demostró en el presente trabajo.

En relación a la especificidad potencial de la asociación hospedero-huésped, la especie con mayor éxito de germinación fue *B. purpurata*, empleando el aislado de *Tulasnella* sp1 de la misma especie de orquídea. Por su parte, *H. flexuosa* presentó el mayor porcentaje de germinación al implementar el aislado *Tulasnella* sp5 y *Tulasnella* sp7 procedente de *B. purpurata*. Estos resultados concuerdan con estudios previos, en los cuales se ha encontrado semillas que pueden germinar con hongos aislados de otras plantas de orquídeas (Warcup, 1981; McCormick *et al.*, 2004; Otero *et al.*, 2004; Porras-Alfaro y Bayman, 2007).

Al comparar las dos especies de orquídeas podemos observar, que si bien algunos hongos promueven la germinación de semillas de *H. flexuosa*, aun cuando no fueron extraídos de plantas adultas de la misma especie, el porcentaje es menor, respecto al porcentaje de germinación de *B. purpurata*, especie de la cual se extrajeron los hongos micorrícicos probados. Sin embargo, no se puede inferir únicamente que los aislados no son igual de eficientes en ambas especies de orquídeas, ya que esto puede estar influenciado en gran medida por el porcentaje de viabilidad que allí presentaron los lotes de semillas.

Sin embargo, los resultados obtenidos, muestran claramente que no existe correlación directa entre el porcentaje de viabilidad y de germinación, puesto que la especie *B. purpurata* mostró una viabilidad del 61% y una germinación variante, del 50 al 100% según el tratamiento, mientras que la especie *H. flexuosa* presentó un 10% de viabilidad y un porcentaje de germinación del 45 al 65% según el tratamiento. Nuestros resultados, por tanto concuerdan con estudios de germinación realizados con otras orquídeas, en donde muestran que no hay una correlación directa entre los porcentajes de viabilidad y de germinación. De tal manera que, Fracchia *et al.* (2013) reportaron porcentajes de germinación simbiótica de 70% en semillas de la orquídea terrestre *Aa aachalensis* Schltr. que presentaron un porcentaje de viabilidad del 43%. Por otro lado,

Dutra (2008) en un estudio de germinación asimbiótica de semillas de *Cyrtopodium punctatum* (L.) Lindl., reportó porcentajes de viabilidad del más del 70%, pero porcentajes de germinación de menos del 5%.

A su vez, la viabilidad de las especies *G. lagenophora* (19%), *G. superba* (70%) y *G. greenwoodii* (33%), tampoco parece estar relacionada con los porcentajes de germinación, puesto que éstas no germinaron en hasta 90-120 días después de la siembra tanto en los medios asimbióticos como simbóticos. En un estudio realizado por Alomia, (2014) reporta un porcentaje de viabilidad del 49% para la especie *Vanilla odorata*, pero una ausencia de germinación, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Esto se justifica más por los requerimientos de esta especie para germinar, así como la falta del hongo apropiado para establecer la relación micorrícica y/o nutrientes en el medio que posibiliten la germinación para una especie en particular (Alomia, 2014).

La germinación de semillas de orquídeas es difícil de estudiar en campo por el pequeño tamaño de las semillas (Rasmussen y Whighman, 2002). Por tal motivo, los experimentos de germinación pueden ayudar a demostrar que los hongos aislados de plantas adultas son potencialmente micorrícicos. Sin embargo, el hecho de que algunos aislados no promuevan germinación no descarta su papel como hongo micorrícico, sino que abre nuevas inquietudes acerca de la sucesión de especies que puede existir a lo largo de la vida de la planta. Así es posible que hongos encontrados en la fase adulta, no sean los mismos que inicialmente se requieran para colonizar las semillas y/o desintegrar la testa lignificada que permita luego a otros organismos promover la transferencia de nutrientes que se espera ocurra en este tipo de asociación (Alomia, 2014).

Al finalizar el experimento, la especie *B. purpurata*, mostró mayor desarrollo en los tratamientos simbióticos con *Tulasnella* sp1, *Tulasnella* sp3, y *Tulasnella* sp7 alcanzando estadios cinco y seis. Para *H. flexuosa*, el mayor índice de desarrollo se presentó en los medios asimbióticos Knudson y Phytamax, seguidos por el medio simbiótico con *Tulasnella* sp1, en donde la mayoría se encontraban en estadios tres. Sin embargo, los aislados *Tulasnella* sp2, *Tulasnella* sp5 y *Tulasnella* sp7, provocaron que el desarrollo de *Habenaria flexuosa* se viera afectada, y comenzaran a parasitar los estadios

alcanzados hasta ese momento. Por lo que esta última, según los resultados, es capaz de adquirir los nutrientes del medio sin ayuda del socio fúngico para poder desarrollarse.

Lo cual corrobora que existe cierta especificidad potencial, ya que la simbiosis orquídea-hongo se ve mayormente favorecida siempre y cuando los hongos extraídos de cierta planta adulta sean utilizados en germinación simbiótica de semillas de la misma especie.

Para ambas especies de orquídeas, los tratamientos simbióticos dieron lugar a un mayor y mejor desarrollo morfológico, observándose en todos la formación de rizoides. En los tratamientos asimbióticos (especialmente en Phytamax) de *B. purpurata*, no se observó el desarrollo de rizoides y los protocormos simbióticos. Lo cual concuerda con el estudio de Rangel (2006), en donde orquídeas del género *Dichromanthus* dieron lugar a un mayor y mejor desarrollo morfológico en los tratamientos simbióticos.

En cuanto al tratamiento asimbiótico Phytamax de *B. purpurata*, se observó que el desarrollo fue deteniendo después de alcanzar el estadio 3 y los protocormos se comenzaron a oxidar, fenómeno observado en el estudio realizado por Rangel (2006), en donde observo que el desarrollo de *Dichromanthus aurantiacus*, no continuó después de alcanzar el estadio 3 y los protocormos se comenzaron a oxidar, de igual manera sucedió en otros estudios con *Spiranthes magnicamporum* y *S. odorata*, (Anderson, 1991). La oxidación puede ser resultado de la producción de exudados fenólicos por parte del protocormo o como resultado de un efecto tóxico de los elementos del medio. Esto no ocurre en los tratamientos simbióticos por lo que tal vez, el socio fúngico esté previniendo este fenómeno quizá con la síntesis de hormonas que impidan la oxidación y que favorezcan el desarrollo de los protocormos (Anderson, 1991; Arditti, 1992; Rasmussen, 1995; Gangaprasad *et al.*, 1999).

Por su parte, la inoculación del hongo *Sebacina* sp1 mostró una interacción patogénica en la especie *B. purpurata*, ya que transcurridos los noventa días, éste acabo por parasitar todos los estadios alcanzados (E1, E2 y E3). Por otro lado, los diferentes estadios de desarrollo de *H. flexuosa* en los tratamientos simbióticos, alcanzados al cabo de noventa días comenzaron a morir, lo cual concuerda con el estudio realizado por

Rangel (2006), en el que, al estudiar el desarrollo simbiótico de *Bletia campanulata*, el porcentaje de protocormos y plántulas desarrolladas se fue reduciendo considerablemente en simbiosis con el hongo micorrícico. Esto, pudiera deberse a que no existió un equilibrio en el crecimiento del hongo con las condiciones del medio, tal como se menciona en estudios anteriores (Rasmussen, 1995; Zettler, 1997; Zettler y Hofer, 1998; Otero *et al.*, 2003; Rangel, 2004), ya que el aislado creció más, invadiendo semillas sin germinar, semillas germinadas y protocormos. Este fenómeno ha sido descrito por varios autores, los cuales mencionan que el balance entre orquídeas-hongos micorrícicos es muy delicado y en algunos casos las semillas o plántulas son digeridas por el hongo (Warcup y Talbot, 1967; Smerciu y Currah, 1989; Sneh *et al.*, 1991). Posiblemente el aislado utilizado no sea adecuado para mantener la relación durante el desarrollo de las plántulas ya que fue obtenido de las raíces de una planta adulta de la misma especie y anteriormente no fue probado. Por otro lado, el crecimiento acelerado del aislado podría haber sido propiciado por condiciones microambientales como la disponibilidad de la fuente de carbono en el medio (Oddie *et al.*, 1994; Stewart, 2004). Por otra parte, es posible que la habilidad saprobias del hongo se acelere después de varios subcultivos *in vitro*, en comparación cuando los hongos son recientemente extraídos de la planta y están en condiciones de degradar sustratos más complejos como los que hay en el suelo (Rangel, 2006).

9. CONCLUSIONES

- Estudios que permitan conocer los hongos micorrícicos que se asocian a orquídeas terrestres son de fundamental importancia, si se requiere realizar programas de conservación y reintroducción de orquídeas.
- Se concluyó que, específicamente la especie *Bletia purpurata* se asocia principalmente con HMO que pertenecen al género *Tulasnella*.
- Sin embargo, los caracteres morfológicos no siempre son confiables para identificar los HMO. Por lo que se requiere además de la caracterización e identificación morfológica, la identificación molecular, para tener mejores resultados.
- Es difícil llegar a estimar la viabilidad de las semillas de estas plantas, por las características que presentan, sin embargo, en el presente estudio se estableció que la técnica colorimétrica de tetrazolio es la más confiable.
- Según los resultados obtenidos, existe especificidad orquídea-hongo, puesto que los aislados de *Bletia purpurata* fueron más eficientes en la promoción de la germinación, desarrollo y supervivencia de las plántulas, en comparación con *Habenaria flexuosa*.
- No todos los aislados de HMO extraídos de raíces de orquídeas terrestres adultas promueven una especificidad potencial benéfica en cultivo *in vitro*, aún cuando provengan de la misma especie, por lo que es recomendable probar estos a lo largo del ciclo de vida de la planta. Si bien algunos pueden promover la germinación de semillas, otros pueden promover el desarrollo de la misma o su supervivencia.
- De tal manera que *Habenaria flexuosa* logró mayor porcentaje de germinación en los medios simbióticos *Tulasnella* sp5 y *Tulasnella* sp7, pero un mayor desarrollo al término del experimento en los medios asimbióticos Phytamax y Knudson.

10. LITERATURA CITADA

- Agarwal P.** y Sah P. 2009. Ecological importance of ectomycorrhizae in world forest ecosystems. *Nature and Science*, 7: 107-110.
- Aguilar, J.,** & González, D. 2011. Las micorrizas, nuestras aliadas ocultas. *La fertilidad de la tierra*. (17): 9-13.
- Alexopoulos C. J.** y Blackwell M. 1996. *Introductory Mycology*. New York: John Wiley & Sons. 869 p.
- Alomia, J.** & Otero, J. T. Germinación simbiótica de semillas de *Vanilla calyculata* Schltr. (Orchidaceae). 2013. En: MEMORIAS VII Congreso Colombiano de Botánica. VII Congreso Colombiano de Botánica. V.1. 602p. 6-10 agosto de 2012; Ibagué, Colombia.
- Alomía, A.Y.A.** 2014. Hongos micorrízicos en *Vanilla* spp. (Orchidaceae) y su potencial para la germinación de semillas. Tesis en Maestría en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia. 76pp.
- Andersen, T. F.** 1996. A comparative taxonomic study of *Rhizoctonia* sensu lato employing morphological, ultrastructural and molecular methods. *Mycological Research*. 100(9): 1117-1128.
- Anderson, A. B.** 1991. Symbiotic and asymbiotic germination and growth of *Spiranthes magnicamporum* (Orchidaceae). *Lindleyana* 6, 183-186.
- Arditti, J.,** Michaud, J.D. & Healey, P.L. 1979. Morphometry of orchid seeds. I. *Paphiopedilum* and native California and Related species of *Cypripedium*. *American Journal of Botany*. 66: 1128-37.
- Arditti, J.,** Michaud, J. D. & Healey, P. L. 1980. Morphometry of orchid seeds. II. Native California and related species of *Calypso*, *Cephalanthera*, *Corallorhiza*, and *Epipactis*. *American Journal of Botany*. 67: 347-60.
- Arditti, J.,** Michaud, J. D., & Oliva, A. P. 1981. Seed germination of North American orchids. I. native California and related species of *Calypso*, *Epipactis*, *Goodyera*, *Piperia*, and *Platanthera*. *Botanical Gazette*, 442-453.
- Arditti, J;** Clements, Ma; Fast, G; Hadley, G; Nishimura, G; Ernest R. 1982. Orchid seed germination and seedling culture - a manual. In: Arditti J, ed. *Orchid biology-reviews and perspectives II*. Ithaca: Cornell University Press, Cap.7, p. 243-370.

- Arditti, J.**, Ernst R, Yam TW, Glabe C. 1990. The contributions of orchid mycorrhizal fungi to seed germination: a speculative review. *Lindleyana*. 5: 249–255.
- Arditti, J.** 1992. Fundamentals of Orchids Biology. Jhon Wile & Sons. Inc. USA. 420-452pp.
- Arditti, J.** y Ernst, R (ed). 1993. Micropropagation of Orchids. New York: John Wiley & Son, New York.
- Arditti, J.** & A.K.A Ghani. 2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. Tansley Review No. 110. *New Phytologist*. 145: 267-421.
- Ávila, D. I.** y Salgado, R.G. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. Revista Biológicas. Facultad de Biología, UMSNH. 8:138-149.
- Ávila, D. I.**, Garibay, O. R., Magaña, L. Elia and Oyama, K., 2013. Molecular evidence reveals fungi associated within the epiphytic orchid *Laelia speciosa* (HBK) SCHLTR. *Botanical Sciences* 91(4): 523-529.
- Barba, A. A.**, Luna, R.S., y Romero, A. J. 2002. Orquideología Básica. Biotemas U.I.B.V FES-Zaragoza, UNAM, México: 18.
- Baskin, J. M.** y C. C. Baskin. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.* 14: 1-16.
- 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: 511-521.
- Bayman, P.**, Lebron, L. L., Tremblay, R. L. y Lodge, D. J. 1997. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchideaceae). *New Phytologist*. 135: 143-149.
- Bayman, P.** & Otero J. T. 2006. Microbial endophytes of orchid roots: diversity and effects on plants. En: Schulz B., Boyle C, y Sieber T. (eds.). Microbial root endophytes. Soil Biology 9, Berlín, Springer-Verlag, Berlín Heidelberg. 153-178p.
- Bayman, P.**, Mosquera-Espinosa, A.T., Porras-Alfaro, A. 2011. Mycorrhizal relationships of vanilla and prospects for biocontrol of root rots. En: D. HavkinFrenkeland F. Belanger (eds.). Handbook of vanilla science and technology. Blackwell Publishing, Reino Unido. 266-280p.

- Beltrán, N. M. A.** 2010. 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. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Biología. UMSNH. Morelia, Michoacán, México. 126pp.
- Benito, M. L. F.,** Sierra, N. H., Jiménez, I., & Rubira, J. P. 2004. Aplicación de métodos colorimétricos para la determinación de la viabilidad en semillas de *Pinus pinea*: Test de Tetrazolio e Índigo Carmín. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales*, (17): 23-28.
- Bonfante, P.,** y A. Genre. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature communications*. 1: 48, DOI: 10 1038.
- Breddy, N.** 1991. Orchid Mycorrhiza and symbiotic raising techniques. *American Orchid Society Bulletin* 60: 556-569.
- Brundrett, M. C.,** N. Bougher, Dell, .B, Grove, T., and Malajczuk, N. 1996. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. *Austrian Centre for International Agricultural Research Monograph* 32m, Canberra. p. 374.
- Brundrett, M. C.,** Scade A., Baty, A.L, Dixon, K W., Sivasithamparam, K. 2003. Development of in situ and ex situ seed baiting techniques to detect mycorrhizal fungi from terrestrial orchid habitats. *Mycol. Res.* 107(10): 1210-1220.
- Brundrett, M. C.** 2006. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol. Rev.* 79: 473 -495.
- Brundrett, M. C.** 2008. Mycorrhizal Associations: The Web Resource. Date accessed. <mycorrhizas.info>.
- Burgeff, H.** 1959. Mycorrhiza of orchids. Withner, C. L. *The orchids*, 361-95pp.
- Calderón, S. E.** 2007. Libro rojo de plantas de Colombia. Volumen 6: Orquídeas, primera parte. Instituto Humboldt, Colombia.
- Camargo-Ricalde, S. L.** 2009. Micorrizas. COSMOS, Enciclopedia de las Ciencias y la Tecnología en México. Tomo Ciencias Biológicas. CONACYT, UAM y ICyTDF. México. 110-113 pp.
- Carrasco, V.** 2010. Aspectos Ecofisiológicos de la raíz de *Pinus Pseudostrobus* y *P. patula* Y y Especies ectomicorrícicas comestibles de *Hebeloma spp.* Y *Laccaria spp.* Tesis

de Maestría en Ciencias. Texcoco, México: Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas.

- Carrillo, L.** 2003. Microbiología Agrícola: Apéndice/ Guía de trabajos prácticos. www.unsa.edu.ar.
- Chase, M.,** J. Freudenstein, K. Cameron & R. Barrett. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. Pp. 69-89 in: Dixon, K., S. Kell, R. Barrett y P. Cribb (eds.). Orchid conservation. Natural History Publications. Kota Kinabalu.
- Chávez, H. K.,** A.T. Mosquera y J.T Otero. 2015. Propagación in vitro de semillas de la orquídea *Comparettia falcata* Poepp. & Endl. (Orchidaceae) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas. *Acta agronómica*. 64(2): 125-133.
- Clements, M. A.** 1982. Australian native orchids (epiphytic and terrestrial). Seed germination and culture, methods. *Orchid Biology: Reviews and Perspectives (USA)*.
- Clements, M. A.** 1987. Orchid-fungus-host associations of epiphytic orchids. In K. Saito and R. Tanaka [eds.], Proceedings of the 12th World Orchid Conference. 12th World Orchid Conference, Tokyo, Japan. 80–83pp.
- Clements, M. A.** 1988. Orchid mycorrhizal associations. *Lindleyana* 3: 73-86.
- Cruz-Blasi, J.** 2007. Colonización micorrízica y diversidad de hongos micorrízicos de algunas especies de orquídeas epifitas tropicales en el Sureste de Chiapas. Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 66pp.
- 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., S. Hambleton, y A. Smreciu.** 1988. Mycorrhizae and mycorrhizal fungi of *Calypso bulbosa*. *American Journal of Botany* 75: 739–752.
- Currah, R. S.** 1991. Taxonomic and developmental aspects of the fungal endophytes of terrestrial orchid mycorrhizae. *Lindleyana*. 6: 211-213.
- Currah, R. S. & Zelmer, C. D.** 1992. A key and notes for the genera of fungi mycorrhizal with orchids and a new species in the genus *Epulorhiza*. Reports of the Tottori Mycological Institute. 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.
- Curtis, J. T.** 1939. The relation of specificity of orchid mycorrhizal fungi to the problem of symbiosis. *Am. J. Bot.* 26:390-399. García C.J., y V. Sosa. 1998. Orchidaceae I: Clave de Subfamilias y Tribus. Flora de Veracruz. Fascículo: 106. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Ver & University of California, Riverside, CA México, D.F., 7 p.
- Damon, A.**, Aguilar, G.E. Rivra, L., y Nikolaeva, V. 2004. Germinación in vitro de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región Soconusco, Chiapas, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 10(2): 813-820.
- Dearnaley, J. D. W.** 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhizal*. 17(6): 475-486.
- De Pauw, M. A.** 1993. *In vitro* germination of *cyripedium* species. Tesis de Maestría de Ciencias de las Plantas. Facultad de estudios de graduados, Universidad de Manitoba. 110pp.
- Dressler, R. L.** 1981. *The Orchids: Natural History and Classification*. Harvard University Press. Cambridge, Estados Unidos. 332p.
- Dressler, R. L.** 1993. Filogenia y clasificación de la familia de las orquídeas. Prensa de la Universidad de Cambridge.
- Dutra, D.** 2008. Reproductive biology and asymbiotic seed germination of *Cyrtopodium punctatum*, an endangered Florida orchid. Tesis Master of Science University of Florida. 78p.
- Fernández, K.** 2010. Micorrización in vitro e in vivo de plántulas de papa (*Solanum tuberosum* var. Alfa). *Cultivos tropicales*. 31: (21), 21.
- Finlay, R. D.** 2008. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany*. 59(5): 1115-1126.
- Fracchia, S.**; Silvani, V.; Flachsland, E.; Terada, G. & Sede, S. 2013. Symbiotic seed germination and protocorm development of *Aa achalensis* Schltr., a terrestrial orchid endemic from Argentina. *Mycorrhiza*. 24:35-43.

- Gangaprasad, A. N,** Decruse W. S, Seeni S. Menon S. 1999. Micropropagation and restoration of the endangered malabar daffodil orchid *Ipsea malabarica*. *Lindleyana* 14(1): 38-46.
- González, C.,** Monroy, A; García, E; Orozco, M. 2005. Influencia de hongos micorrizógenos arbusculares (hma) en el desarrollo de plántulas de *Opuntia streptacantha* Lem. Sometidas a sequía en condiciones de invernadero, *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 8(1): 5-10.
- González, H. D.** 2002. Estado Actual de la Taxonomía de *Rhizoctonia solarti* Kühn.
- González, G. M.** 2008. Reseña de “aspectos de sistemática y biología del complejo *Rhizoctonia*”. *Fitosanidad*. 12(3): 147-159.
- Guzman, S., & Farías, J.** 2005. Biología y regulación molecular de la micorriza arbuscular. *Red de revistas científicas de América Latina y el Caribe*. 9(2): 17-31.
- Hadley, G.** 1970. Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. *New Phytologist*. 69:1015-1023.
- Hadley, G. & Williamson, B.** 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, II. (J. Arditti, ed.). Comstock publishing Associates, Ithaca, New york. 83-118 pp.
- Hágsater, E. M. A.** Soto A; G. A. Salazar C; R. Jiménez M; M. A. López R; R. L. Dressler. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México, 304 pp.
- Hartmann, H. T. & Kester, D. E.** 1983. Plant propagation. Principles and practices. 4th edn. Englewood Cliffs. New Jersey: Prentice-Hall.
- Harley, J. L., y S. E. Smith.** 1983. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press Inc., London, UK.
- Healey, P. L.,** Michaud, J. D & Arditti, J. 1980. Morphometry of orchid seeds. III. Native California and related species of *Goodyera*, *Piperia*, *Platanthera*, *Spiranthes*. *American Journal of Botany*. 67: 508-18.
- Herrera, P.,** J.P. Suárez & I. Kottke. 2010. Orchids keep the ascomycetes outside: a highly diverse group of ascomycetes colonizing the velamen of epiphytic orchids from a tropical mountain rainforest in Southern Ecuador. *Mycology*. 1(4):262-268.

- Heslop-Harrison, J., & Heslop-Harrison, Y.** 1970. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain technology*. 45(3): 115-120.
- Jones, D.** 2006. A complete guide to native orchids of Australia including the island Territories. Reed New Holland, Sydney.
- Johnson, T., Stewart, L., Dutra, D., Kane, M., y Larry Richardson.** 2007. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae)-preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 90:313-323.
- Mc Cormick, M. K., Whigham D. F, O'Neill, J.** 2004. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist*. 163: 425-438.
- Mckendrick, S.** 2000. Ceiba Foundation for Tropical Conservation. Consultado 08 Mar 2010. Disponible en [http://www.ceiba.org/documents/CFTCpropman\(SP\).pdf](http://www.ceiba.org/documents/CFTCpropman(SP).pdf).
- Moore R. T.** 1987. The genera of *Rhizoctonia*-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen. nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Moliniopsis*, and *Rhizoctonia*. *Mycotaxon*. 29: 91-99.
- Kristiansen, K. A., D. L. Taylor, R. Kjoller, H. N. Rasmussen, y S. Rosendahl.** 2001. Identification of mycorrhizal fungi from single pelotons of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) using single-strand conformation polymorphism and mitochondrial ribosomal large subunit DNA sequences. *Molecular Ecology* 10: 2089–2093.
- Knudson, L.** 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Bot. Gaz.* 73:1-25.
- Knudson, C.** 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*. 15: 214-217.
- Koide, T. R., y B. Mosse.** 2004. A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza*. 14(3): 145-163.
- Kull, T. y J. Arditti.** 2013. Orchid Biology VIII: Reviews and Perspectives. Springer Ed. Illustrated. *Science & Business Media, B.V.* 584pp.
- Lakon, G.** 1949. The topografical Tetrazolium Method for Determining the Germination capacity of Seeds. *Plant Physiol*. 24, 389-394.
- Lallana, V. H; García, L. F.** 2012. Protocolo para determinar viabilidad mediante el test de tetrazolio en semillas de orquídeas. 3er. Congreso de Orquideología, Conservación y Bromeliaceas. Resúmenes de trabajos y Ponencias p. 77-78. Montecarlos, Misiones 18, 19, 20, 21 de julio de 2012.

- Lallana, V. H;** García, L. F. 2010. Puesta a punto de la prueba de tetrazolio en semillas de orquídeas. 75° Reunión de Comunicaciones Científicas de la Asoc. Cienc. Nat. Del Litoral. Santa Fe, 23/06/10. Resúmenes, p. 8.
- Lauzer, D.;** Renaut, S.; Arnaud.; y Barabé, D. 2007. In vitro asymbiotic germination, protocorm development, and plantlet acclimatization of *Aplectrum hyemale* (Muhl. ex Willd.) Torr. (Orchidaceae). J. Torrey. Bot. Soc. 134(3):344-348.
- Luigi P. P.,** Riess S. 2001. Endophytes of *Serapias parviflora* Parl and *Spiranthes spiralis* (L.) Cheval. (Orchidaceae): description of endophytes of *S. parviflora* and *in vitro* symbiosis development in *S. parviflora* and *Spiranthes spiralis*. *Lankesteriana*. 2: 23-30.
- Loddiges, G.** 2015. *Govenia superna*. *Botanical Cabinet* (Loddiges). 18: 1831-1832. Disponible en: <https://orchid.unibas.ch/index.php/en/bibliorchidea?action=detail&idbib=97776>
- Masuhara. G.;** Katsuya, K.; y Yamaguchi, K. 1993. Potential for symbiosis of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* with seeds of *Spiranthes sinensis* var. *amoena* *in vitro*. *Mycol. Res.* 97(6):746 – 752
- Masuhara, G.** y Katsuya, K. 1994. *In situ* and *in vitro* specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames, var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). *New Phytologist*. 127(4): 711 - 718.
- McCormick M.** K, Whigham D. F, O'Neill J. O. 2004. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytol.* 163: 425-438.
- McKendrick, S. L.;** Leake, J. R.; Taylor, D. L; y Read, D. J. 2002. Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. *New Phytologist*. 154(1): 233 - 247.
- Menchaca, G.,** R. A. Lozano, R. M. A. y Sánchez, M. L. 2012. Ensayo, Estrategias para el aprovechamiento sustentable de las orquídeas de México. *Rec. Mex. Cienc. For.* 3(13): 9-16.
- Mitchell, R. B.** 1989. La creciente orquídeas resistentes a partir de semillas de Kew. *Plantsman*, 11 (3): 152-169.
- Montaño, M.** 2011. Evaluación del efecto de hongos micorrízicos en el proceso de aclimatación de la orquídea *Oncidium sphacelatum* producida *in vitro* en la UTHH.

Memoria de tesis de Técnico. Universidad Tecnológica de la Huasteca Hidalguense. Huejutla, Hidalgo. 36pp.

Mosquera, E. A. T., Bayman, P., & Otero, J. T. 2010. *Ceratobasidium* como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia. *Acta Agronómica*, 59(3): 316-326.

Mosquera, E. A. T., P. Bayman, G. A. Prado, A. Gómez-Carabali and J.T. Otero. 2013. Pathogenicity of orchid mycorrhizal fungi (*Ceratobasidium* sp) on rice and biocontrol of *Rhizoctonia solani* sheath blight. *Myocologia*. 105: 141-151.

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

Muñoz, B. M. I. 2011. Evaluación de medios de cultivo para la germinación “in vitro” de las orquídeas *Cyrtorchilum macranthum* y *Epidendrum jameisoni* Rchb.F. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ingeniería Agronómica, Universidad Técnica de Ambato. Ambato, Ecuador. 77pp.

Muñoz, M. y Jiménez, V. 2008. Capsule development, in vitro germination and plantlet acclimatization in *Phragmipedium humboldtii*, *P. longipolium* and *P. pearcei*. *Lankesteriana*. 8(2):23-31.

Mweetwa, A. M.; G. E. Welbaum, D.; y Tay. 2008. Effects of development, temperatura, and calcium hypochlorite treatment on in vitro germinability of *Phalaenopsis* seeds. *Sci Hortic*. 117: 257-262.

Oddie, R. L. A, Dixon K. W, McComb J. A. 1994. Influence of substrate on asymbiotic and symbiotic *in vitro* germination and seedling growth of two Australian terrestrial orchids. *Lindleyana* 9(3): 183-189.

Ortega-Larrocea, M. P., E. Sandoval, C. Ramos Y V. M. Chávez-Avila. 2005. Histological development of *Bletia urbana*: an endangered terrestrial orchid from México. *Selbyana*. 26: 309.

Ortega-Larrocea, M. P, González D, Chávez V. M, Martínez, A. Symbiotic micropropagation, reintroduction, and long-term monitoring of *Bletia urbana* Dressler (Orchidaceae), an endangered terrestrial orchid from Mexico. Enviado a *Biol. Conservation*, mayo 2006.

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.

- Ordoñez, C. N. F.** 2012. Efecto de hongos endófitos de orquídeas del grupo *Rhizoctonia* y otros endófitos cultivables sobre el desarrollo de plantas de *Vanilla planifolia* JACKS. Tesis de Maestría en Bosques y conservación ambiental. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. 64pp.
- Otero, J. T.; Ackerman, J. D.; y Bayman, P.** 2002. Diversity and host specificity of mycorrhizal fungi from tropical orchids. *Am. J. Bot.* 89:1852-1858.
- Otero J. T, Bayman P, Ackerman J D.** 2003. Variación germinación simbiótica entre semillas de *Tolumnia variegata* y entre hongos micorrízicos. *Lankesteriana* 7: 0.
- Otero, J. T., Ackerman, J. & Bayman, P.** 2004. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology*. 13: 2393-2404.
- Otero, J. T., Bayman, P. & Ackerman, J. D.** 2005. Variation in mycorrhizal performance in the epiphytic orchid *Tolumnia variegata* *in vitro*: The potential for natural selection. *Evolution Ecology*. 19: 29–43.
- Otero, J. T.; Flanagan, N; Herre, E. A.; Ackerman, J.; y Bayman, P.** 2007. Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid, *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *Am. J. Bot.* 94:1944-1950.
- Otero, J. T. y Bayman, P.** 2009. Symbiotic vs. asymbiotic seed germination in epiphytic orchids. *Acta Agronómica*. 58(4): 270 - 276.
- Otero, J. T.; Thrall, P. H.; Clements, M.; Burdon, J. J. & Miller, J. T.** 2011. Codiversification of orchids (Pterostylidinae) and their associated mycorrhizal fungi. *Australian Journal of Botany*. 59: 480-497.
- Otero, J. T., Díaz, C. M. y Ordoñez, N. F.** 2012. La vainilla y los hongos formadores e micorrizas. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. *ORQUIDEOLOGÍA* XXIX (1): 56-69.
- Otero, J. T.; Mosquera-Espinosa, A. T.; y Flanagan, N. S.** 2013. Tropical orchid mycorrhizae: potential applications in orchid conservation, commercialization, and beyond. En: Fourth Scientific Conference on Andean Orchids. *Lankesteriana*. 13(1-2): 57 - 63.
- Pazmiño, C. R. E.** 2011. Caracterización morfológica de semillas y del proceso germinativo de seis especies de orquídeas amenazadas en la provincia de Loja para conservación en el banco de germoplasma de la UTPL. Tesis de Ingeniería en bioquímica. Facultad de Ciencia e Ingeniería en alimentos, Universidad Técnica de Ambato. Ecuador. 216pp.

- Peterson, R. L.**, Uetale, Y. & Zelmer, C. 1998. Fungal symbioses with orchid protocorms. *Symbiosis*. 25: 29-55.
- Peterson, R. L.**; Massicotte, H. B. & Melville, L. H. 2004. Mycorrhizas: anatomy and cell biology. Saint Paul: NRC Research Press. 173pp.
- Pereira, O. L**; Rollemberg, C. D; Borges, A; Matsuoka, K; y Kasuya, M. C. 2003. *Epulorhiza epiphytica* sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. *Mycoscience* 44: 153 - 155.
- Pereira, O. L**; Kasuya, M. C. M.; Rollemberg, C. D.; y Chaer, G. M. 2005. Isolation and identification of *Rhizoctonia*-like mycorrhizal fungi associated with three species of neotropical epiphytic orchids in Brazil. *Rev. Bras. Ciencia do Solo* 29:191 - 197.
- Porrás-Alfaro, A.** & Bayman, P. 2007. Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *Mycol.* 99(4): 510-525.
- Pritchard, H. W.** 1985. Determination of orchid seeds viability using fluorescein diacetate. *Plant, Cell & Environment*. 8(9): 727-730.
- Pritchard, H. W**; Prendergast, F. G. 1990. Viability testing in terrestrial orchid seed. *Acta Universitatis Wratislaviensis*, 1055:11-16.
- Pritchard, H. W.** 1993. Orchid seed storage: historical perspective, current status, and future prospects for long-term conservation. *Selbyana*. 14: 89-104.
- Rangel, V. M.** 2004. Aislamiento de hongos micorrízicos de las orquídeas terrestres de la reserva ecológica “El pedregal de San Ángel”, Mexico D.F. Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. 113 p.
- Rangel, V. M.** 2006. Germinación simbiótica y reintroducción de orquídeas terrestres en la reserva ecológica del Pedregal de San Ángel, México, D. F. Tesis de maestría, Instituto de Geología, UNAM. México, D. F. 115pp.
- Ramsay, M. M.**, & Dixon, K. W. 2003. Propagation science, recovery and translocation of terrestrial orchids. In Dixon, KW, Kell, SP, Barrett, RL, & Cribb, PJ (editors) *Orchids conservation*. Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu, Sabah. 259-288pp.
- Rasmussen, H. N.** & D. F. Whigham. 1993. Seeds Ecology of Dust Seeds in Situ: A New Study Technique and Its Application in Terrestrial Orchids. *Botanical Society of America*. 80(12): 1374-1378.

- Rasmussen, H. N.** 1995. Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plants. Cambridge: Cambridge University Press, 460 p.
- Rasmussen H. N.** y D.F. Whigham. 1998. The underground phase: a special challenge in studies of terrestrial orchid populations. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 126: 49-64.
- Rasmussen, H. N.** 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil*. 244: 149-163.
- 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.
- Reina, R. G. A.** & Otero, J. T. 2011. Guía ilustrada de las orquídeas del Valle geográfico del río Cauca y Piedemonte andino bajo. Asociación Vallecaucana de Orquideología. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Santiago de Cali. 95p.
- Reyes. T. C.** 1973. El fenómeno de la micorriza. *Orquídea* (México). 3(9): 281-291.
- Roberts, P.** 1999. Rhizoctonia-Forming Fungi: a Taxonomic Guide. Royal Botanical Garden, Kew, London.
- Rivas, M.,** Warner, J., & Bermúdez, M. (1998). Presencia de micorrizas en orquídeas de un jardín botánico neotropical. *Revista de biología tropical*. 46, 211-216.
- Salomes, P. M.** & J. Barroso. 1983. Localization of polyphenoloxidases during the establishment of *Ophrys lutea* endomycorrhizas. *New Phytologist*. 95: 219-222.
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).** 2010. Norma Oficial mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres- Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. 30 de diciembre de 2010. México D.F. México. 1-78pp.
- Shagufta, S.,** Arun, R., Siddique, S., & Raghuvanshi, A. 1993. Seasonal changes in *Vanda tessellata* mycorrhizae. *Journal of the Orchid Society of India*. 7: 83-85.
- 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.

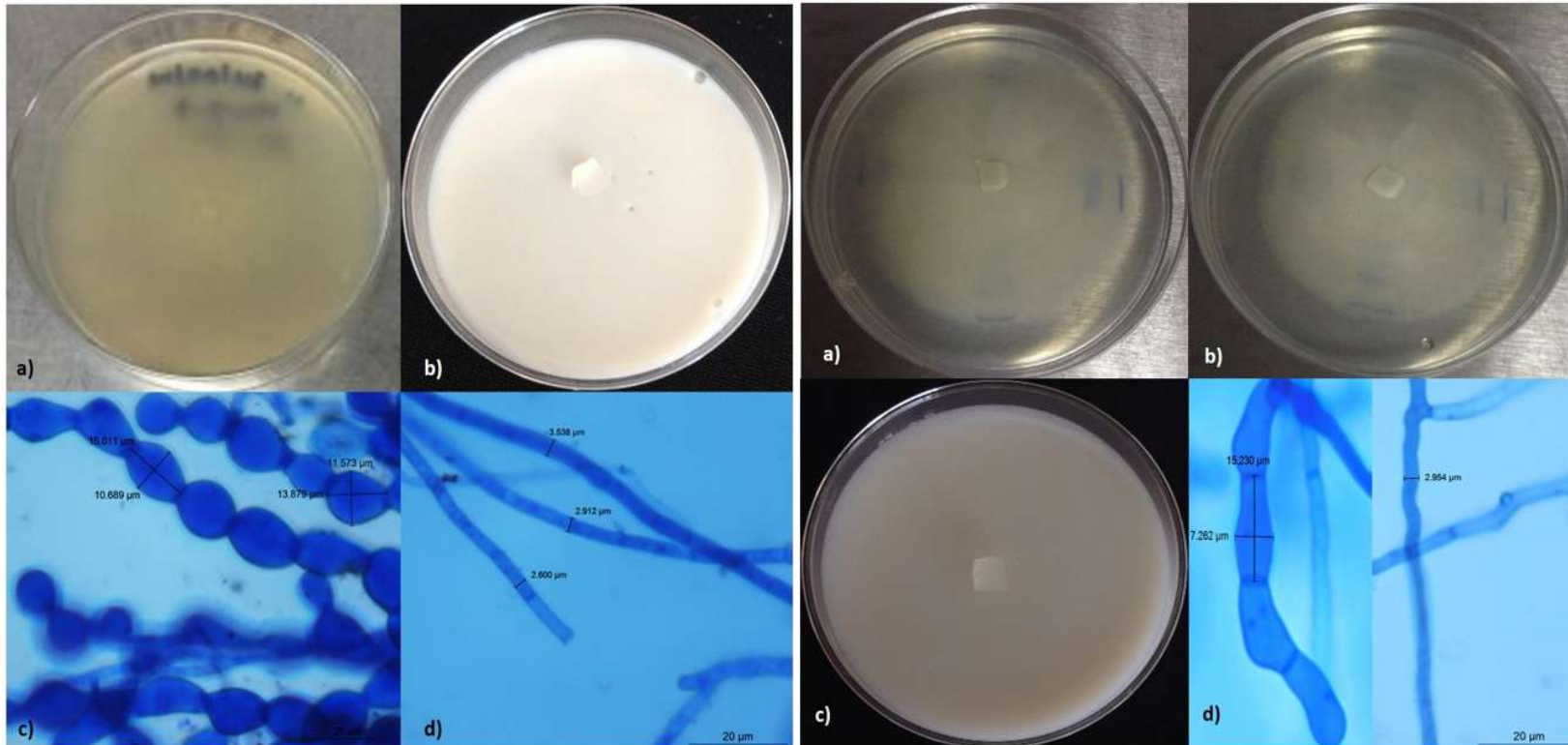
- Sheehan, T. J.** 1996. In: Introduction to floriculture. AGT. USA. 119-146pp.
- Smreciu, E. A,** Currah R S. 1989. Symbiotic germination of seeds de terrestrial orchids of North America and Europe. *Lindleyana* 4 (1): 6-15.
- Smith, S. E.** 1973. Uptake of glucose, trehalose and manitol by leaf slices of the orchid *Bletilla hyacinthine*. *New Phytologist*. 72: 957-964.
- Sheehan, T. J.** 1996. In: Introduction to floriculture. AGT. USA. 119-146pp.
- Smith, S. E. & D. J. Read.** 1997. Mycorrhizal Symbiosis. 2° edition. Elsevier. Ed. Academic Press. 347-357pp.
- Smith, S. & Read, D. J.** 2008. Mycorrhizal Symbiosis. 3er Ed. Academic Press. Cambridge. ISBN 9780123705266. 800 pp.
- Smith, S. E. & D. J. Read.** 2010. Mycorrhizal Symbiosis. 3° edition. Elsevier. ISBN: 978-0-12-370526-6. Ed. Academic Press. 800pp.
- Smreciu, E. A,** y Currah, R. S. 1989. La germinación simbiótica de semillas de orquídeas terrestres de América del Norte y Europa. *Lindleyana*. 4 (1): 6-15.
- Sneh, B.,** L. Burpee & A. Ogoshi. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. Minnesota, USA: American Phytopathological Society Press. Third printing. 135pp.
- Soto, A. R. S. Gómez y E. Hágsater.** 2007. Risk of extinction and patterns of diversity loss in Mexican orchids. *Lankesteriana*. 7(1-2): 114-121.
- Stewart, S. L.** 2004. Symbiotic techniques in orchid seed germination. Enviromental Horticulture Department, University of Florida, Florida USA. 30 p.
- Stewart, S. L. y Kane, M. E.** 2006. Symbiotic seed germination and in vitro seed ling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell Tiss Org*. 86:147–158.
- Stoutamire, W. P.** 1983. Early growth in North American terrestrial seedlings. In North American Terrestrial Orchids. Symposium II. Proceedings and lectures. Ed. E. H. Plaxton. Ann Arbor. USA: *Michigan Orchid Society*. 14-24pp.
- Suárez, J. P.,** Michael, W., Abele, A., Garnica, S., Oberwinklerb, F., y Kottke, I. 2006. Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycol. Res*. 110: 1257 – 1270.

- Swarts, N. D.,** Sinclair, E. A., Francis, A., & Dixon, K. W. 2010. Ecological specialization in mycorrhizal symbiosis leads to rarity in an endangered orchid. *Molecular Ecology*. 19(15): 3226-3242.
- Taylor, L. D.,** y T. D. Bruns. 1997. Independent, specialized invasión of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 94: 4510–4515.
- Taylor, L. D.,** y T. D. Bruns. 1999. Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the “cheating” orchids *Corallorhiza maculata* and *C. mertensiana*. *Molecular Ecology* 8: 1719–1732.
- 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.,** Bruns, T. D.; Szaro, T. M.; y Hodges, S. A. 2003. Divergence in mycorrhizal specialization within *Hexalectris spicata* (Orchidaceae), a nonphotosynthetic desert orchid. *Am. J. Bot.* 90(8): 1168 - 1179.
- Tremblay, R. L.** 1997. Distribution and dispersion patterns of individuals in nine species of *Lepanthes* (Orchidaceae). *Biotropica*. 29: 38-45.
- Valadares, R. B. S.,** M.C Pereira, J. T. Otero and E. J. B. N Cardoso. 2012. Orchid mycorrhiza diversity in *Coppensia doniana*, a widespread Oncidiinae from campos de Jordao-SP Brazil. *Biotropica*. 44: 114-122.
- Vidal, A. A. I.** 2015. Comparación de la recalcitrancia de hongos micorrízicos de orquídeas epífitas y terrestres durante su aislamiento. Tesis de Licenciatura, Facultad de Biología, UMSNH. Morelia, Michoacán, México. 99pp.
- 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*. Kluwer Academic Publishers. 385-434pp.
- Vujanovic, V.,** Arnaud, M.; Barabe, D.; y Thibeault, G. 2000. Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. *Ann. Bot.* 86:79-86.
- Wang, B. &** Qiu, Y. L. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*. 16(5): 299-363.
- Warcup, J. H. &** Talbot, P. H. B. 1967. Perfect states of *Rhizoctonias* associated with orchids. *New Phytologistl.* 66: 631-641.

- Warcup, J. H.**, y Talbot, P. H. B. 1971. Perfect states of *Rhizoctonia* associated with orchids III. *New Phytologist* 70: 35–40.
- Warcup, J. H.** 1981. The mycorrhizal relationship of Australian orchids. *New Phytologist*. 87: 371-381.
- Widholm, J. M.** 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain technology*. 47(4): 189-194.
- Yuan, Z. L.**; Chen, Y. C.; y Yang, Y. 2009. Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting an epiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*): estimation and characterization. *World J. Microb. Biot.* 25:295 - 303.
- Zettler, L. W.** y McInnis T. M. 1993. Symbiotic seed germination and development of *Spiranthes cernua* and *Goodyera pubescens* (Orchidaceae: Spiranthoideae). *Lindleyana*. 8(3): 155-162.
- Zettler, L. W.**, Hofer C. J. 1998. Propagation of the little club-spur orchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications. *Environmental and Experimental Botany*. 39: 189-195.
- Zettler, L. W.**, J. C. Burkhead, y J. A. Marshall. 1999. Use of a mycorrhizal fungus from *Epidendrum conopseum* to germinate seed of *Encyclia tampensis* *in vitro*. *Lindleyana*. 14: 102–105.
- Zettler, L.W.**; Sharma, J. & Rasmussen, F. 2004. Mycorrhizal diversity. In: Dixon, K, Cribb, P, Kell, S, Barrett, R, eds. *Orchid Conservation*. Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia: Natural History Publications. 185-203.
- Zettler, L. W.**; Poulter, S. B.; McDonald, K. I.; y Stewart, S. L. 2007. Conservation-driven propagation of an epiphytic orchid (*Epidendrum nocturnum*) with a mycorrhizal fungus. *HortScience*. 42(1): 135-139.
- Zotz, G.** 2013. The systematic distribution of vascular epiphytes – a critical update. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 171(3): 453-481.

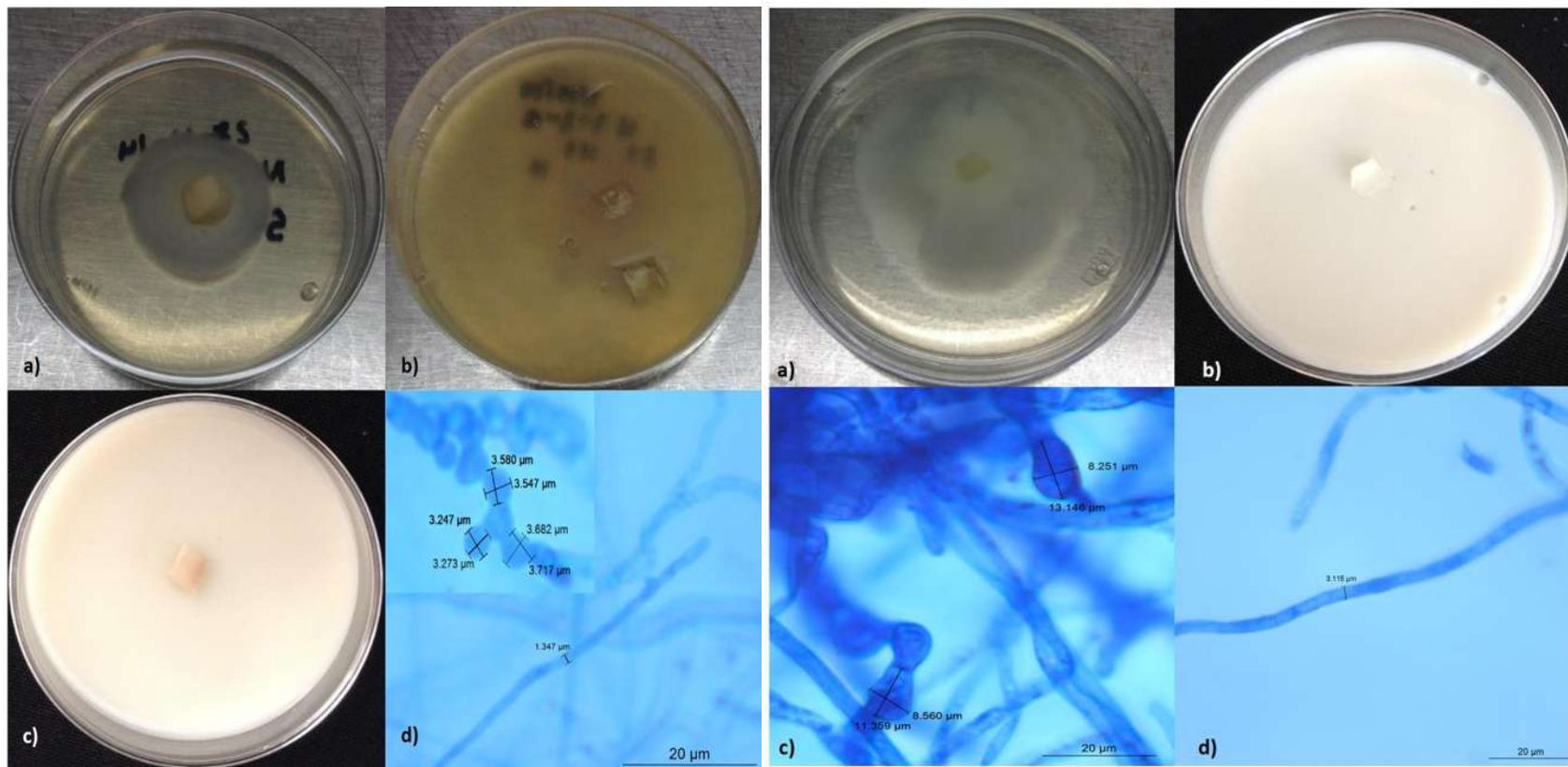
11. ANEXOS

Anexo 1. Principales características de las morfoespecies de HMO aislados



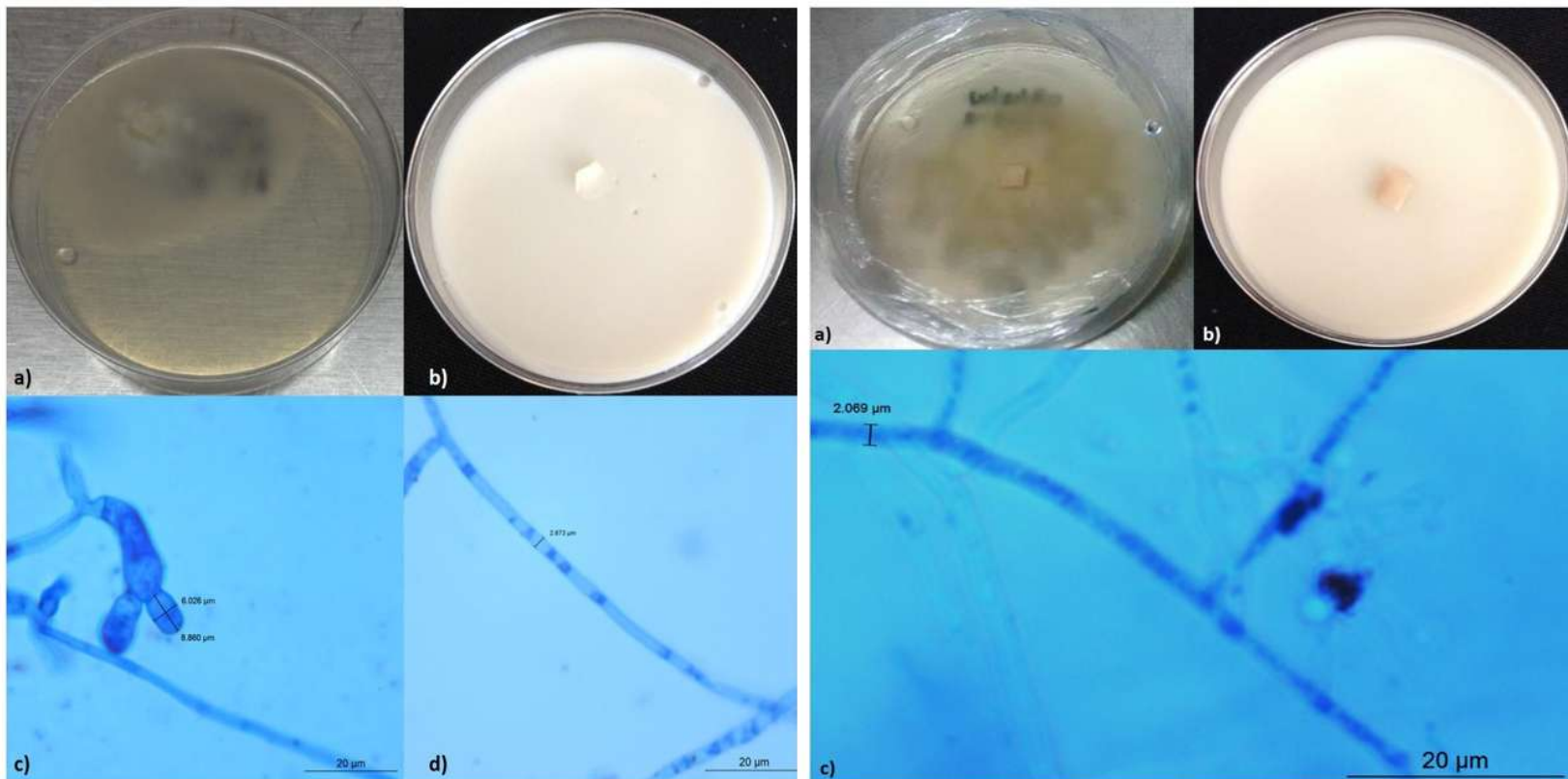
Tulasnella sp1. a) Aislado en medio PDA, b) reacción negativa a peroxidasa, c) medición de células monilioides y d) medición de hifas.

Tulasnella sp2 y sp4. a) *T. sp2*, b) *T. sp4*, c) reacción negativa a peroxidasa, c) medición de células monilioides e de hifas.



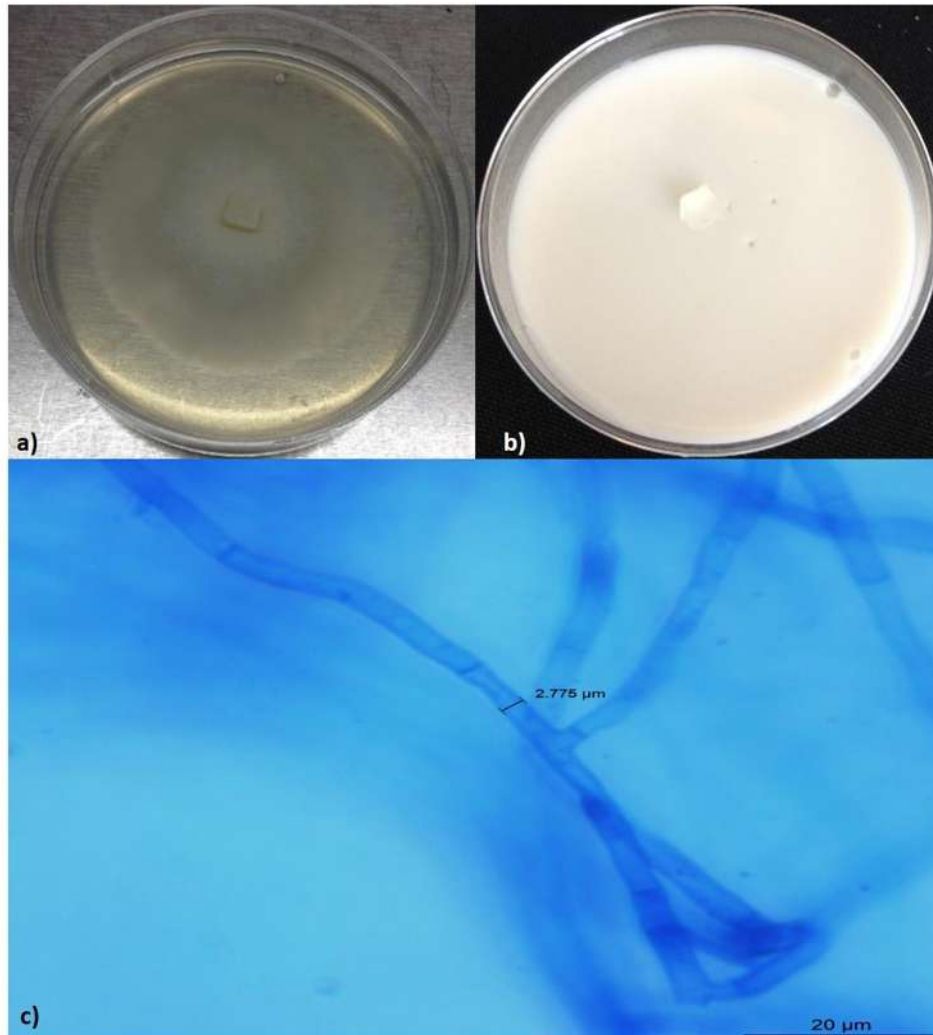
Tulasnella sp3 y sp8. a) *T. sp3*, b) *T. sp8*, c) reacción negativa a peroxidasa, c) medición de células monilioides e de hifas.

Tulasnella sp5 a) Aislado en medio PDA b) reacción negativa a peroxidasa, c) medición de células monilioides y d) medición de de hifas.



Tulasnella sp7. a) Aislado en medio PDA, b) reacción negativa a peroxidasa, c) medición de hifas.

Tulasnella sp6. a) Aislado en medio PDA, b) reacción negativa a peroxidasa, c) medición de células moniloides y d) medición de hifas



Sebacina sp1. a) Aislado en medio PDA, b) reacción negativa a peroxidasa, c) medición de hifas.

Anexo 2. Medios de cultivo utilizados en la metodología

Fucsina ácida 0.01

Para preparar 1L	
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
Ácido láctico glacial	5 mL
Formaldehido 37%	5 mL

PVLG (Alcohol Polivinílico Lacto Glicerol)

Para preparar 100 mL	
Ácido láctico	50 mL
Agua destilada	45 mL
Glicerina	5 mL
Alcohol polivinílico	8.33 gr

Medio de Aislamiento Fúngico (Clements, 1988)

MAF (para preparar 1L)	
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 a 5.5 - 6 antes de agregar el agar	

Medio para reacción a la Polifenol-Oxidasa

Para preparar 500 mL	
Malta	Ac. Tánico
Malta 7.5 gr	Ac. Tánico 2.5 gr
Agua 425 mL	Agua 75 mL
Agar bacteriológico 10 gr	
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.	

Solución de Tetrazolium

Para preparar 1L
Preparado en buffer de fosfato:

KH₂PO₄

KH₂PO₄ 3.63 gr

Agua 400 mL

Na₂HPO₄

Na₂HPO₄ 7.13 gr

Agua 600 mL

Cuando estén completamente disueltas las soluciones se mezclan, posteriormente añadir y disolver el Tetrazolium al 1% (peso/volumen):

Tetrazolium

10 gr

Almacenar en botella de vidrio ámbar a 4°C sin luz (no más de tres meses), si se torna color rosado, desechar.

Solución de Diacetato de Fluoresceína

DFA (para preparar 1L)

DFA al 0.1% (peso/volumen)

Disolver en acetona absoluta

La reacción tiene lugar en aproximadamente 10 minutos siguientes, antes de que la fluoresceína falle.

Medio Básico de Avena

MBA (para preparar 1L)	
Avena en polvo	3.5 gr
Extracto de levadura	0.1 gr
Agar bacteriológico	8 gr
Ajustar pH a 5.5 antes de agregar el agar	

Medio Knudson

Kn (para preparar 1L)	
Ca(NO ₃) ₂ - 4H ₂ O	1 gr
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 gr
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.25 gr
MnSO ₄ 4H ₂ O	0.0075
KH ₂ PO ₄	0.25 gr
FeSO ₄	0.0278 gr
EDTA sódico (Na ₂ EDTA)	0.0373 gr
Ajustar pH a 5.5 – 5.7 antes de agregar el agar	
Sacarosa	30 gr
Agar bacteriológico	8 gr

Medio Phytamax

para preparar 1L

Nitrato de amonio	825.0 mg
Ac. Bórico	3.10 mg
Cloruro de calcio anhidro	166.0 mg
Cloruro de cobalto hexahidratado	0.0125 mg
Sulfato cúprico pentahidratado	0.0125 mg
Desodio EDTA hidratado	37.240 mg
Sulfato ferroso heptahidratado	27.850 mg
Sulfato magnesio anhídrido	90.350 mg
Sulfato manganoso	8.450 mg
Yoduro de potasio	0.4150 mg
Nitrato de potasio	950.0 mg
Fosfato de potasio monobásico	85.0 mg
Molibdeno de potasio monobásico	0.1250 mg
Sulfato de zinc heptahidratado	5.30 mg
Carbón activado	2000.0 mg
MES (libre de ácido)	1000.0 mg
Myo-inositol	100.0 mg
Ácido nicotínico (libre de ácido)	1.0 mg
Peptona tipo I	2000.0 mg
Piridoxina	1.0 mg
Sacarosa	20000.0 mg
Tiamina	10.0 mg
Agar bacteriológica	8 gr

Ajustar pH a 5.5 – 5.7 antes de agregar el agar

Resumen gráfico de las metodologías utilizadas

Anexo 3. Aislamiento y caracterización de HMO

1. Recolecta de raíces



a) Escarbar con las manos para no dañar el sistema radical.



b) Cortar la raíz desde la base.



c) Se marca la orientación ápice-base de la raíz y se cubren con suelo rizosférico y se almacenan a 4°C hasta ser procesadas.

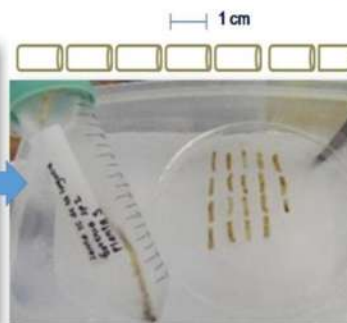
2. Desinfestación de raíces



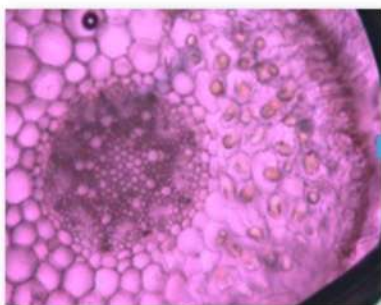
d) Enjuague de raíces



e) Medición de raíces



f) Cortar la raíz en segmentos
Rasmussen y Whigham (2002)



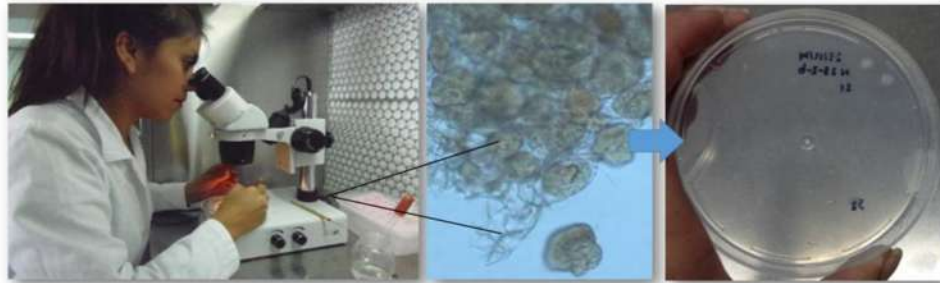
g) Observación de la colonización.
Montaje de cortes transversales de 1mm en Fucsina ácida.
Ortega-Larrocea (2008)



h) Desinfestación de segmentos colonizados. Colocar en tubos Eppendorf® con solución de cloro 10% por diez minutos en agitación. Posteriormente lavar tres tiempos con H₂O estéril y colocar en solución de antibiótico 5min en agitación.

Figura 24. Proceso de recolección de raíces de orquídeas y desinfección de raíces para aislamiento de hongos.

3. Aislamiento fúngico



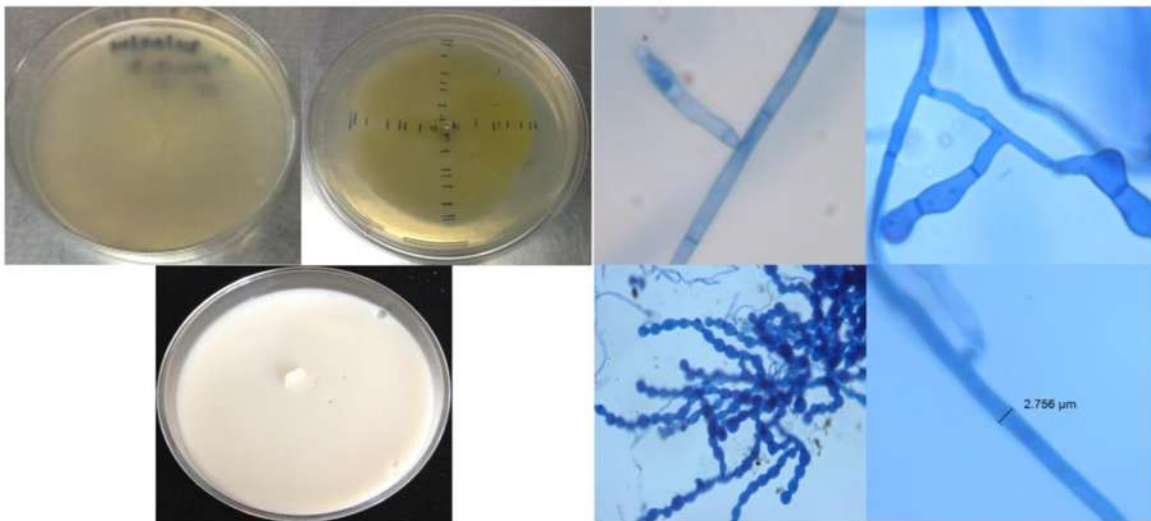
i) Disección de raíz y aislamiento de segmentos colonizados en MAF

4. Caracterización e identificación

Mitchell (1989)



j) Transferencia de hongos a medio PDA.



K) Caracterización e identificación de los aislados micorrícicos

Figura 25. Técnica de aislamiento, caracterización e identificación de los HMO.

Anexo 4. Metodología de las pruebas de germinación de semillas



Figura 26. Técnica de desinfección de semillas, y pruebas de germinación.