



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Programa Institucional de Doctorado
en Ciencia Biológicas

**Diversidad fúngica en raíces de orquídeas mexicanas y su
contribución para la germinación y desarrollo inicial de
plántulas *in vitro***

T E S I S

Que como requisito para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS EN
CONSERVACIÓN Y MANEJO DE RECURSOS NATURALES**

Presenta:

M.C. MARÍA DE LOS ANGELES BELTRÁN NAMBO

Directores de tesis:

Dra. Yazmín Carreón Abud
Dr. Miguél Martínez Trujillo

MORELIA, MICHOACÁN, MEXICO, AGOSTO DE 2018



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Programa Institucional de
Doctorado en Ciencias Biológicas

DRA. ESPERANZA MELÉNDEZ HERRERA
COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "DIVERSIDAD FÚNGICA EN RAÍCES DE ORQUÍDEAS MEXICANAS Y SU CONTRIBUCIÓN PARA LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO INICIAL DE PLÁNTULAS *IN VITRO* " presentado por la M.C MARÍA DE LOS ÁNGELES BELTRÁN NAMBO , con matrícula No. 8407502J, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Doctora en Ciencias.

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

A T E N T A M E N T E

Morelia, Mich., a 02 de agosto de 2018

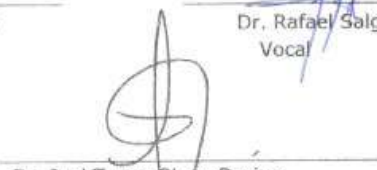
MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA


Dra. Nazmin Carreón Abud
Directora de Tesis


Dr. Miguel Martínez Trujillo
Co director


Dr. Juan Carlos Montero Castro
Vocal


Dr. Rafael Salgado Garciglia
Vocal


Dr. Joel Tupac Otero Ospina
Vocal

c.c.p. Archivo de la O CyMRN

Coordinación de Posgrado de la Facultad de Biología. Edif. "R" Planta Baja. Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán.
CP 58060. Tel/Fax. (443) 3167412. Email: oazul74@yahoo.com.mx o pceritusbarriga@gmail.com

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA Y MICROBIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA ASESORÍA DE LA DRA. YAZMÍN CARREÓN ABUD Y EL DR. MIGUEL MARTÍNEZ TRUJILLO, CON EL APOYO DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO Y LA COORDINACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA A TRAVÉS DEL PROYECTO 05/2014 Y 2018.

Dedico este trabajo:

A mis padres Raúl (Tulo) y Guadalupe (Pipis), que tuvieron la paciencia y el amor para educarme y formarme como persona. Por sus lecciones de vida. Por su sacrificio y esfuerzo para que pudiera llegar a donde ahora me encuentro.

A mis hermanos Vicky, Rulas, Güerejo, Pollo y Beba por su cariño y apoyo. Por sus enseñanzas, aventuras compartidas y por la gran familia que me regalaron.

A todos, los amo

***Todo es posible, si ponemos la pasión, la razón y el corazón,
detrás de nuestra voluntad***

P. I. Taibo II

AGRADECIMIENTOS

A la D. C. Yazmín Carreón Abud y al D. C. Miguel Martínez Trujillo

Por su asesoría para el desarrollo de este trabajo. Por sus comentarios y sugerencias que permitieron mejorar la calidad del mismo. Por la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo y por compartir experiencias de vida.

Al comité sinodal

D. C. Rafael Salgado Garciglia por la dedicación profesional e intelectual invertida para enriquecer este trabajo. Por ser guía cuando lo necesité. Gracias por la confianza y la amistad.

D. C. Juan Carlos Montero Castro por la gran cantidad de conocimientos transmitidos, por su sencillez y paciencia, por darme la confianza para preguntar y por su ayuda en todo momento.

D. C. Joel Tupac Otero Ospina por los conocimientos, comentarios y sugerencias aportados durante la investigación y durante cada una de las evaluaciones semestrales. Por su disponibilidad, trato amable y apoyo durante la realización de la misma.

A mis compañeros de colecta

Por su invaluable ayuda durante la ubicación de poblaciones de orquídeas y colectas: Martín en Acutzio, María Elena en Coeneo, Luis en Cucuchucho, Yuca en Cuanajillo, Lalo en Oponguio, Nubya en San Andrés, Román en Santa Fe, Rafa y su equipo en Tingambato, Nuria, Yola y mis papás en Uruapan. Griselda y Ariadna. Este trabajo también es suyo.

A mis compañeros de laboratorio

Aarón, Amanda, Fátima, Fer, Gloria, Hilda, Juanita, Julieta, Karina, Magda, Mónica, Nancy, Sandy, Scally. Por la convivencia y compañerismo, por todo lo compartido.

Y a tí, ñoño, gracias por todo el apoyo moral y técnico, por el tiempo que me regalaste, gracias por tu amistad.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 ESTADO DE CONSERVACIÓN DE LAS ORQUÍDEAS MEXICANAS.....	4
2.2. HONGOS ENDÓFITOS Y MICORRÍDICOS DE ORQUÍDEAS....	6
2.3. ORQUÍDEAS ANALIZADAS.....	10
2.4. SITIOS DE COLECTA.....	14
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
4. HIPÓTESIS.....	17
5. OBJETIVOS.....	18
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	18
5.1.1. Objetivos particulares.....	18
6. RESULTADOS.....	19
CAPITULO I. DIVERSIDAD FUNGICA ASOCIADA A LAS RAÍCES DE SIETE ESPECIES DE ORQUÍDEAS MEXICANAS	19
RESUMEN.....	19
ABSTRACT.....	20
I.1. Introducción.....	20
I.2. Metodología.....	23
Plantas y sitios de colecta.....	23
Aislamiento.....	25
Caracterización morfológica.....	26
Determinación molecular.....	27

Alineamiento taxonómico y relaciones filogenéticas.....	27
Análisis de diversidad.....	28
I.3. Resultados.....	29
Aislamiento y caracterización.....	29
Determinación molecular.....	32
Alineamiento taxonómico y relaciones filogenéticas.....	34
Análisis de diversidad.....	36
I.4. Discusión.....	42
I.5. Conclusiones.....	48
I.6. Referencias.....	49
CAPITULO II. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE HONGOS ASOCIADOS A LAS RAÍCES DE ORQUÍDEAS MEXICANAS	55
RESUMEN.....	55
ABSTRACT.....	56
II.1. Introducción.....	57
II.2 Metodología.....	60
Aislamiento y condiciones de cultivo.....	60
Preparación de muestras.....	60
Análisis de ácidos grasos.....	61
Análisis de datos.....	62
II. 3. Resultados.....	63
II.4. Discusión.....	66
II.5. Conclusiones.....	69
II.6 Referencias.....	70
CAPITULO III. CONTRIBUCIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS Y MICORRÍZICOS PARA LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO INICIAL <i>IN VITRO</i> DE PLÁNTULAS DE ORQUÍDEAS MEXICANAS	74
RESUMEN.....	74
ABSTRACT.....	75

III.1. Introducción.....	77
III.2 Metodología.....	80
Selección de hongos.....	80
Colecta de semillas.....	80
Prueba de viabilidad.....	81
Desinfección de semillas.....	82
Germinación simbiótica y asimbiótica.....	82
Porcentaje de germinación y evaluación del desarrollo.....	83
Análisis estadísticos.....	84
III.3. Resultados.....	84
Viabilidad.....	84
Germinación simbiótica y asimbiótica.....	86
Supervivencia.....	90
III.4. Discusión.....	93
Viabilidad.....	93
Germinación simbiótica y asimbiótica.....	94
Supervivencia.....	99
III.5. Conclusiones.....	101
III.6. Referencias.....	102
7. DISCUSIÓN GENERAL	107
8. CONCLUSIONES GENERALES.....	110
9. REFERENCIAS GENERALES	111
10. ANEXO 1. DETALLE ESTRUCTURAL DE ORQUÍDEAS ANALIZADAS.....	117
ANEXO 2. ARTÍCULO DE DIVULGACIÓN.....	118
ANEXO 3. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS.....	122

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Listado de orquídeas incluidas en la lista de especies prioritarias para su conservación.....	5
Tabla 2. Géneros de hongos que se han reportado asociados a la familia Orchidaceae.....	8
Tabla 3. Géneros de orquídeas con más de 20 especies y/o alta proporción de endemismo.....	10
Tabla 4. Datos de referencia de los sitios de colecta y orquídeas en cada sitio.....	16
Tabla 5. Identidad de los morfotipos secuenciados.....	33
Tabla 6. Distribución de géneros fúngicos identificados en las especies de orquídeas analizadas y número de cepas aisladas.....	37
Tabla 7. Diversidad beta de hongos entre las especies de orquídeas estudiadas.....	39
Tabla 8. Diversidad beta de hongos por sitio de muestreo.....	40
Tabla 9. Cepas utilizadas para la determinación de ácidos grasos y su identidad con secuencias de GenBank.....	61
Tabla 10. Proporción de ácidos grasos de amplio espectro en las muestras analizadas.....	63
Tabla 11. Ácidos grasos poco frecuentes y géneros en los que se presentaron.....	64
Tabla 12. Cepas fúngicas seleccionadas para las pruebas de germinación simbiótica.....	81
Tabla 13. Porcentaje de viabilidad de cápsulas por especie de orquídea.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Especies de orquídeas mexicanas analizadas.....	12
Figura 2. Provincias fisiográficas del estado de Michoacán y sitios de colecta.....	15
Figura 3. Ubicación de sitios de muestreo.....	24
Figura 4. Diseño experimental.....	25
Figura 5. Árbol de distancias generado a partir de características morfológicas.....	29
Figura 6. Características morfológicas del grupo A	30
Figura 7. Características morfológicas de los grupos B y C.....	31
Figura 8. Características morfológicas del grupo D	32
Figura 9. Árbol de inferencia filogenética del grupo de basidiomicetos identificados	35
Figura 10. Árbol de inferencia filogenética del grupo de ascomicetos identificados.....	36
Figura 11. Diversidad alfa y especies fúngicas compartidas.....	38
Figura 12. Curvas de acumulación de las especies de orquídeas epífitas.....	41
Figura 13. Curvas de acumulación de las especies de orquídeas terrestres.....	41
Figura 14. Árbol de distancias de basidiomicetos, generado a partir de la composición de ácidos grasos.....	65
Figura 15. Árbol de distancias de ascomicetos generado a partir de su composición de ácidos grasos.....	65
Figura 16. Semillas de orquídea.....	77
Figura 17. Especificidad fúngica en orquídeas.....	79
Figura 18. Etapas de germinación de la semilla.....	83
Figura 19. Tinción de semillas con CTT.....	85
Figura 20. Porcentaje de viabilidad en las cápsulas de las orquídeas analizadas.....	86
Figura 21. Estadios de germinación a los 30 días de siembra.....	87
Figura 22. Porcentaje de germinación e índices de desarrollo de las especies de orquídeas analizadas.....	89
Figura 23. Colonización de protocormos por hongos simbioses a los 90 días de siembra.....	90
Figura 24. Porcentaje de supervivencia e índices de desarrollo de las especies de orquídeas analizadas.....	92
Figura 25. Desarrollo de plántulas a los 150 días de siembra.....	93
Figura 26. Detalles estructurales de la planta de las especies estudiadas.....	117

RESUMEN

La familia Orchidaceae es un grupo de plantas conformado por aproximadamente 27, 800 especies, incluidas en 600-800 géneros, que además de su valor estético tienen un alto valor biológico ya que muchas de sus especies son consideradas prioritarias para la conservación por la gran cantidad de interacciones que presentan con diferentes grupos de organismos. En los ecosistemas naturales el desarrollo de las orquídeas está ligado a la colonización por hongos micorrícicos que proporcionan carbono y nutrientes inorgánicos a las semillas para su germinación y desarrollo. Además, durante la etapa adulta, la cantidad de hongos endófitos presentes en sus raíces es muy amplia y existe un gran interés en su estudio debido a sus funciones fisiológicas, de protección, a su posible contribución durante la etapa germinativa y a su potencial como fuente de compuestos bioactivos que liberan durante su interacción con estas plantas.

En México el estudio de los hongos asociados a esta familia de plantas y su papel funcional ha sido poco explorado. En este contexto el presente estudio tuvo como finalidad contribuir en la comprensión de las interacciones ecológicas entre las especies de orquídeas terrestres y epífitas de México y sus hongos micorrícicos y endófitos asociados, a través del conocimiento de la diversidad fúngica presente en las raíces de orquídeas adultas silvestres, la relación de esta diversidad con su distribución y las consecuencias ecológicas de la compatibilidad orquídea-hongo durante la germinación *in vitro* de semillas.

El trabajo se dividió en dos secciones. En la primera se abordan aspectos generales y las especies de orquídeas seleccionadas, que fueron 7: *Bletia purpurata*, *Euchile citrina*, *Govenia lagenophora*, *Habenaria flexuosa*, *Laelia autumnalis*, *L. speciosa* y *P. squalida* y los sitios de muestreo que se ubicaron en 9 municipios del estado de Michoacán. En esta sección también se detallan los objetivos y la hipótesis de trabajo. En la segunda sección se reportan los resultados de esta investigación divididos en tres capítulos. En el Capítulo I se muestran los resultados de la caracterización morfológica e identificación molecular de los hongos asociados a las especies de orquídeas seleccionadas, sus relaciones filogenéticas y los análisis de diversidad realizados. En el capítulo II se aborda lo referente a la determinación de perfiles de ácidos grasos de los hongos identificados molecularmente. Finalmente, el capítulo III muestra los resultados derivados del análisis de compatibilidad entre orquídeas y hongos para el proceso de germinación y su eficiencia para promover el desarrollo de plántulas en cultivo *in vitro*.

Los resultados muestran el aislamiento de 299 cepas fúngicas (268 de orquídeas epífitas y 31 de terrestres) e identificación de 85 representativas, que las colocan en 23 géneros, de los cuales 5 corresponden a basidiomicetos, incluidos dos

géneros micorrícicos orquideoides *Tulasnella* y *Serendipita*, los 18 restantes fueron géneros de hongos ascomicetos como *Trichoderma* y *Xylaria* que fueron los más abundantes. La mayor diversidad fúngica se presentó en las orquídeas epífitas del género *Laelia* de las que se aislaron 20 de los 23 géneros identificados. La diversidad más baja se presentó en *E. citrina* especie endémica de México en categoría de riesgo. Y los sitios de mayor diversidad de especies de hongos estuvieron relacionados con los sitios de mayor riqueza de orquídeas (San Andrés Coru, Mpio. Ziracuaretiro y Santa Fe de la Laguna, Mpio. Quiroga).

Los perfiles de ácidos grasos mostraron 7 ácidos de amplio espectro, de los cuales el 14:0, 18:0 y 18:1w9c se presentaron en todos los hongos analizados. *Preussia* presentó como ácido graso único el 15:1w5c, *Coprinus* el 16:0 2OH y *Fusarium* los ácidos 18:1 2OH y 19:0w8c.

Los hongos endófitos estimularon la germinación de la semilla con igual eficiencia que los hongos micorrícicos orquideoides (HMO) (índice germinativo IG > 1 a los 30 días), pero fueron poco eficientes para promover el desarrollo posterior de la mayoría de orquídeas. La supervivencia más alta se presentó en plántulas de las orquídeas terrestres *B. purpurata* y *H. flexuosa* germinadas *in vitro* con HMO (mayor al 60%), que alcanzaron el estadio 6 de desarrollo a los 30 días (IG > 3). El hongo ascomiceto *Trichocladium* formó estructuras típicas de hongos micorrícicos (pelotones y células monilioides) y estimuló la germinación, desarrollo y supervivencia de plántulas en la mayoría de las orquídeas analizadas, con igual eficiencia que los hongos micorrícicos del complejo *Rhizoctonia* (IG > 3, estadio 6 a los 30 días en orquídeas terrestres). El género *Morchella*, reportado como ectomicorrícico, también fue eficiente durante el desarrollo postgerminativo en las orquídeas terrestres *B. purpurata* (IG = 3.6, estadio 6 a los 150 días) y *H. flexuosa* (IG = 1, estadio 4 a los 150 días).

Las orquídeas mostraron diferentes niveles de eficiencia en la relación con hongos durante el proceso germinativo siendo menos selectivas las orquídeas epífitas en la primera etapa, pero en el desarrollo posterior la mayoría de los hongos endófitos fueron poco eficientes y no se estableció la asociación simbiótica, de manera que a los 150 días únicamente sobrevivieron las plántulas asociadas a hongos del complejo *Rhizoctonia* (*Tulasnella* y *Serendipita*) y a los endófitos *Morchella* y *Trichocladium*. Evidenciando que algunos hongos endófitos pueden establecer asociaciones que favorecen la germinación y el desarrollo de plántulas con la misma eficiencia que los hongos micorrícicos. Las orquídeas terrestres fueron selectivas hacia los hongos durante el proceso germinativo y estas asociaciones fueron altamente eficientes para el desarrollo posterior.

Los resultados indican que en la etapa adulta las especies de orquídeas mexicanas más generalistas hacia la asociación con hongos endófitos y micorrícicos se encuentran más ampliamente distribuidas que aquellas en asociación con menor variedad fúngica. Y que parecen existir procesos de

segregación que les permite a las orquídeas una mejor supervivencia y adaptación al asociarse con diferentes especies fúngicas cuando comparten sitios.

ABSTRACT

Orchidaceae is a group of plants with approximately 27, 800 species, included in 600-800 genera. These plants have a high biological value due to their interactions with different groups of organisms, so many species are considered important for conservation purposes. In natural ecosystems, orchids' development is linked to mycorrhizal fungi colonization for carbon and inorganic nutrients absorption for seeds germination and development. In addition, during the adult stage, they have a high amount of endophyte fungi in their roots and exist a great interest in their study due to their physiological and protection functions, their possible contribution during germinative stages and their potential as bioactive compounds source.

In Mexico the study of orchid-fungi associations and their functional role has been little explored. In this context, the objective of this work was to contribute to understanding of ecological interactions between terrestrial and epiphytic Mexican orchids species and their mycorrhizal and endophytic fungi associated, through the knowledge of fungal diversity present in roots of wild adult orchids and the relationship of this diversity with its distribution and the ecological consequences of orchid-fungus compatibility during *in vitro* seeds germination.

The work was divided in two sections. The first of them addresses general topics and descriptions of the selected orchid species to carry out this research, which were 7: *Bletia purpurata*, *Euchile citrina*, *Govenia lagenophora*, *Habenaria flexuosa*, *Laelia autumnalis*, *L. speciosa* and *P. squalida* and the sampling sites that were located in 9 municipalities of Michoacán state. The objectives and work hypothesis are also included in this chapter.

Results were included in three chapters in the second section. Chapter I reports the results obtained from morphological characterization and molecular identification of the fungi associated with the selected orchid species, their phylogenetic relationships and the diversity analysis. Chapter II deals with the fungi fatty acid profiles determination. Finally, chapter III shows the results derived from compatibility analysis between orchids and endophytic and mycorrhizal fungi for the germination process and its efficiency to promote the development of seedlings in *in vitro* culture.

Among the most relevant results, there is the isolation of 299 fungal strains (268 of epiphytic orchids and 31 of terrestrial ones) and identification of 85 of them that were classified into 23 genera: 5 basidiomycetes, including two orchid mycorrhizal genera: *Tulasnella* and *Serendipita*; and 18 ascomycetes fungi such as *Trichoderma* and *Xylaria* that were the most abundant genera. In adult orchids, the highest fungal diversity was found in the epiphytic orchids of genus *Laelia*, in which

20 of the 23 genera identified were isolated. The lowest diversity was presented in *E. citrina* (in risk category) and *H. flexuosa*, that are endemic species from Mexico. Sites with greatest diversity of fungus species were related to the richest sites of orchids (San Andrés Coru, Mpio, Ziracuaretiro and Santa Fe de la Laguna, Mpio, Quiroga).

The fatty acid profiles showed 7 broad-spectrum acids, of which 14: 0, 18: 0 and 18: 1w9c were present in all fungi analyzed. *Preussia* presented as a unique fatty acid 15: 1w5c, *Coprinus* the acid 16:0 2OH and *Fusarium* presented the acids 18: 1 2OH and 19: 0w8c.

Endophytic fungi stimulated germination of seed with the same efficiency as mycorrhizal fungi (germinative index IG > 1 at 30 days), but they were less efficient to promote the subsequent development of most orchids. The highest survival was observed in *in vitro* seedlings germinated with HMO of the terrestrial orchids *B. purpurata* and *H. flexuosa* (higher than 60%), which reached stage 6 development at 30 days (IG > 3). *Trichocladium*, an ascomycete fungus, formed the typical structures of mycorrhizal fungi (coils and monilioid cells) and it stimulated the germination, development and survival of seedlings in most of the orchid species analyzed, to the same way as the mycorrhizal fungi of the *Rhizoctonia* complex (IG > 3, stage 6 at 30 days in terrestrial orchids). And the genus *Morchella*, reported as an ectomycorrhizal fungus, was also efficient during the post-germinative development in the terrestrial orchids *B. purpurata* (IG = 3.6, stage 6 at 150 days) and *H. flexuosa* (IG = 1, stage 4 at 150 days).

The analyzed orchids showed different levels of efficiency in its relation with fungi during the germination process, epiphytic orchids were more generalists in the first stage, but in the subsequent development the majority of the endophytic fungi were inefficient and did not establish the symbiotic association with the orchid, so after 150 days, only survived the plantlets associated with fungi of the *Rhizoctonia* complex (*Tulasnella* and *Serendipita*) and the endophytes *Morchella* and *Trichocladium*. This is an evidence that some endophytic fungi can establish symbiotic associations that stimulate the germination and seedlings development with the same efficiency as mycorrhizal fungi. The terrestrial orchids were more selective towards the fungi during the germinative process but these associations were highly efficient for further development.

The results indicate that in adult stage, Mexican orchid species which have more generalist associations with endophytic and mycorrhizal fungi are better distributed than those in association with little fungal variety. And there seem to be processes of segregation that allows the orchids a better survival and adaptation because of their association with different fungal species when they share sites.

1. INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae es un grupo de plantas conformado por aproximadamente 27, 800 especies, incluidas en 600-800 géneros (The plant list, 2013) y su mayor diversidad se concentra en las regiones tropicales de América y Asia (Sahuquillo, 2008). México, situado en el límite norte del trópico americano, alberga una notable riqueza de orquídeas y han sido registrados en el país alrededor de 170 géneros y 1260 especies, de las cuales se estima que cerca del 40% son endémicas (Salazar, 2013). Esta familia destaca por la belleza de sus flores, pero además de su valor estético, presentan un importante valor biológico ya que al ser plantas de alta sensibilidad a cambios ambientales, muchas de sus especies pueden ser utilizadas como indicadoras de perturbación; y además, dado que en las diferentes etapas de su ciclo de vida interaccionan con una gran diversidad de organismos incluyendo insectos, aves, mamíferos y hongos, una gran variedad de ellas son consideradas especies prioritarias para la conservación, al considerarse especies clave o bandera (CONABIO, 2012). Sin embargo, para poder proteger y conservar a esta familia de plantas, es necesario percatarse de los factores que determinan su persistencia (Klironomos, 2002).

Algunos investigadores señalan que existen tres factores clave e interdependientes que han permitido la gran diversificación de esta familia: los mecanismos de polinización, la morfología de la semilla y su asociación con hongos micorrícicos y/o algunos endófitos (Cozzolino & Widmer, 2005; Bayman & Otero, 2006; Smith & Read, 2009; Otero, et al., 2013; Gamboa-Gaitán & Otero-Ospina, 2016). Los cambios en la diversidad y/o abundancia de los polinizadores sólo se percibe a largo plazo mientras que, generalmente se asume, que la pérdida de sus hongos micorrícicos y algunos endófitos tiene un impacto inmediato en la dinámica de poblaciones de las orquídeas, particularmente en especies de vida corta (Swarts & Dixon, 2009; Porras-Alfaro & Bayman, 2011). Los hongos que facilitan el proceso conocido como germinación simbiótica, producen enrollamientos intracelulares (denominados pelotones) en los embriones de las plántulas de orquídeas en desarrollo y en el rizoma o raíz de

las plantas adultas. Estas estructuras son fácilmente distinguibles por sus patrones de distribución en los tejidos de la planta y por su apariencia, de manera que constituyen la característica más distintiva de esta asociación denominada Micorriza Orquideoide (MO) (Wang et al., 2004).

El crecimiento en ausencia de un hongo micorrícico (HM) es conocido como germinación asimbiótica y en algunas especies permite el desarrollo de plantas adultas bajo condiciones *in vitro*. En la naturaleza, sin embargo, el suministro de azúcares solubles y otros nutrientes esenciales no disponibles en el suelo hacen indispensable la presencia de estos hongos (Ortega-Larrocea & Rangel-Villafranco, 2007; Martínez-Palacios & Chávez, 2012). Razón por la cual deben de ser considerados para la conservación y reintroducción de estas plantas a sus hábitats naturales. Sin embargo, aún falta mucho por conocer sobre la biología de las orquídeas y el papel de sus simbiontes fúngicos para desarrollar estrategias efectivas para su conservación.

En adición al establecimiento de este tipo de simbiosis, muchos hongos ascomicetos y algunos basidiomicetos forman interacciones de tipo endófitas con una gran variedad de plantas, incluidas las orquídeas. Se reporta que algunos de estos hongos liberan exudados que estimulan el desarrollo de las mismas (Stone et al., 2004; Garnica et al., 2016), o bien, que pueden interactuar con otros organismos de la rizósfera estableciendo relaciones de tipo sinérgicas, antagónicas y de competencia física y bioquímica, de manera que estas asociaciones inciden en la interacción suelo-planta-microorganismo-ambiente y repercuten de forma directa en el crecimiento y desarrollo de las especies vegetales (Cano, 2011), por lo que es probable que la disponibilidad de hongos benéficos compatibles en ciertos hábitats pueda determinar un desarrollo exitoso e influir en la supervivencia, competencia y distribución de estas plantas (Stone et al., 2004; Contreras-Cornejo et al., 2009; Oliveira et al., 2014). Aunque a nivel mundial existen algunos estudios relacionados con hongos endófitos de orquídeas (Bayman et al., 1997; Otero et al., 2002; Waller et al., 2005; Porras-Alfaro & Bayman, 2011; Ordóñez, et al., 2012), en México existen pocos trabajos que abordan este tópico, algunos de ellos señalan la presencia de

endófitos que han sido reportados como benéficos en otros grupos de plantas como el género *Trichoderma* y algunos investigadores observan la estimulación en el desarrollo de las plántulas de orquídeas terrestres y epífitas con algunos de estos endófitos (Magaña-Lemus, 2011; Ordóñez et al., 2012; Ávila-Díaz et al., 2013; Xiaoya et al., 2015).

A nivel mundial se ha observado que la compatibilidad fúngica que muestran las orquídeas para la germinación de la semilla, desarrollo y supervivencia de plántulas bajo condiciones *in vitro* varía entre especies y se asume que existe un continuo desde aquellas capaces de establecer interacciones con una gran variedad de hongos hasta aquellas que sólo son compatibles con un número más restringido de ellos (Smith & Read, 2009; Dearnaley et al., 2012; Rasmussen et al., 2015). Se señala que este hecho pudiera estar relacionado con la escasez o capacidad de adaptación que muestran algunas especies de orquídeas en su medio ambiente (Otero et al., 2004; Swarts et al., 2010). De ahí que la propagación, restauración y conservación exitosa de estas plantas, y de forma indirecta de otras especies de organismos, está ligada a la disponibilidad de los hongos micorrícicos críticos en su ciclo de vida y de algunos endófitos promotores de su desarrollo. Poniendo de manifiesto la importancia de conocer la identidad de los hongos asociados con la mayor cantidad posible de especies de orquídeas en diferentes hábitats.

Por todo lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue la caracterización e identificación de hongos micorrícicos y endófitos presentes en las raíces de siete especies de orquídeas mexicanas: *Bletia purpurata* A. Rich. & Galeotti, *Euchile citrina* (Lex.) Whitner, *Govenia lagenophora* Lindl., *Habenaria flexuosa* Lindl., *Laelia autumnalis* (Lex.) Lindl., *L. speciosa* (Kunth.) Schltr., y *P. squalida* (Lex.) Soto Arenas & Salazar, así como analizar la relación entre la diversidad fúngica y la distribución de las orquídeas y determinar el grado de compatibilidad en la interacción y su eficiencia para promover la germinación de la semilla y supervivencia de plántulas *in vitro*, como una alternativa para la propagación de esta familia de plantas, con fines de conservación.

2. ANTECEDENTES

2.1. ESTADO DE CONSERVACIÓN DE LAS ORQUÍDEAS MEXICANAS

Actualmente la totalidad de especies de la familia Orchidaceae se encuentran incluidas en el Apéndice II de las regulaciones establecidas por el CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres) (CITES, 2017).

En México, a partir del año 2000 la CONABIO es la autoridad científica ante la CITES y la encargada de dar seguimiento a la conservación de especies silvestres a través del Método de Evaluación del Riesgo de Extinción de las Especies Silvestres en México (MER), plasmado en la Norma Oficial Mexicana 059 del 2010 (NOM- 059) (SEMARNAT, 2010) y de implementar programas de recuperación y conservación, como el Programa de Conservación de Especies en Riesgo (PROCER) 2007-2014 a cargo de la CONANP (CONANP, 2014). La NOM- 059 está diseñada para reducir el impacto de las actividades humanas sobre las especies en alguna categoría de riesgo de extinción de México y en ella la familia Orchidaceae es una de las tres familias que presenta mayor cantidad de especies categorizadas. Se citan 187 especies de orquídeas en alguna categoría de riesgo (1 extinta, 14 en peligro de extinción, 64 amenazadas y 108 bajo protección especial) (Serna, 2012), sin embargo esta lista está basada en estudios realizados hasta antes del 2009, mientras que es un hecho que la velocidad de desaparición de orquídeas o deterioro de sus hábitats supera, en gran medida, al tiempo en el que se logra generar información suficiente sobre su biología (Ortega-Larrocea, 2008; Martínez-Palacios & Chávez, 2012).

Soto-Arenas et al., (2007) señalan que en el país existen al menos 15 especies reportadas como extintas que no se contemplan en la NOM-059. También estima que la tasa de extinción de orquídeas en México va del 1.75 al 2.71% y que es probable que aproximadamente 34 especies endémicas estén extintas de acuerdo a esta estimación. Estas tasas son más altas que las consideradas para países como Sudáfrica (0.21%) y Australia (0.625%) (IUCN/SSC, 2017).

La *Estrategia Nacional sobre Biodiversidad de México y Plan de Acción 2016-2030* (CONABIO, 2016), plantea la conservación y restauración de áreas protegidas y la conservación *in situ* y *ex situ* de especies señaladas como prioritarias, en las que se incluyen 24 orquídeas, 8 de ellas presentes en el estado de Michoacán (Tabla 1), como es el caso de *Laelia speciosa* y *Euchile citrina* (SEMARNAT, 2010).

Tabla 1. Listado de orquídeas presentes en el estado de Michoacán que están incluidas en la lista de especies prioritarias para la conservación de la SEMARNAT-2010. Categorías de riesgo de acuerdo a la NOM-059 (A = amenazada; Pr = Sujeta a protección especial).

ESPECIE	NOMBRE COMÚN	CATEGORÍA DE RIESGO
<i>Barkeria scandens</i>	Barkeria morada	Pr
<i>Clowesia rosea</i>	Clowesia rosada	A
<i>Cuiltauzina pendula</i>	Cuiltlauzina perfumada, espíritu santo	A
<i>Encyclia adenocaula</i>	Encyclia conejo, angelitos	A
<i>Laelia speciosa</i>	Laelia de mayo, lirio, flor de corpus	Pr
<i>Oncidium tigrinum</i>	Oncidium atrigado	A
<i>Euchile citrina</i>	Limoncillo, Azucena amarilla	Pr
<i>Rossioglossum insleayi</i>	Odontoglossum insleayi	A

2.1.1 Situación estatal

Michoacán fue el primer estado de nuestro país en publicar un estudio sobre la situación en la que se encontraba su biodiversidad (CONABIO, 2000) y es indudable que muchas de las especies enfrentan serios problemas de conservación. En el caso de las orquídeas, de las 200 especies reportadas en el estado, el 12.5 % se encuentra en alguna categoría de riesgo y de estas el 4% están señaladas como especies prioritarias para su conservación (SEMARNAT, 2010, 2014; CONABIO, 2012). Esto es debido en gran medida, a los problemas de deforestación ya que se reporta que entre 1976 y 2008 se desmontaron más de 350, 000 ha de bosque y se estima que actualmente se pierden aproximadamente 20, 000 ha cada año (PROFEPA, 2016). Se señala como principal pérdida de los bosques el crecimiento de la superficie dedicada a monocultivos de aguacate y a la urbanización. Además existe un deterioro gradual de los bosques remanentes

por el efecto combinado de la tala ilegal, la extracción de madera, el sobrepastoreo y los incendios forestales frecuentes (CONABIO et al., 2007, 2016). Por otra parte, es importante señalar que algunas de las orquídeas en el estado son utilizadas en diferentes ramas artesanales como es la elaboración de pasta de caña o la elaboración de altares. A los mercados tradicionales de tipo regional se añade ahora el mercado nacional y global, de manera que la demanda es mucho mayor, y en consecuencia el uso de las materias primas requeridas; de manera que al menos 3 especies de orquídeas se encuentran en riesgo, y algunas de ellas, como es el caso de la “flor de Corpus” (*Laelia speciosa*), es endémica de México (Hagsater et al., 2005).

2.2. HONGOS ENDÓFITOS Y MICORRÍDICOS DE ORQUÍDEAS

Existen numerosos trabajos de investigación realizados a nivel mundial, que corroboran que las asociaciones de tipo simbióticas con hongos micorrícicos y/o endófitos en los diferentes ecosistemas naturales pueden tener efectos significativos en la salud de las plantas, en su ecología y evolución, así como en la estructura de las comunidades (Rodríguez et al., 2009; Porras-Alfaro & Bayman, 2011; Talbot et al., 2014). La relación de las orquídeas con los hongos micorrícicos se considera una asociación benéfica que se desarrolla en un continuo que abarca desde el mutualismo hasta el antagonismo dependiendo de la filogenia, la genética, geografía y otras condiciones bióticas y abióticas (Faeth & Fagan, 2002; Dearnaley, 2012). La relación de las orquídeas con los hongos endófitos se puede presentar en toda la planta y su significancia ecológica ha sido poco estudiada aunque se considera que los hongos endófitos influyen en el crecimiento de la planta y que afectan su respuesta a patógenos, herbívoros y cambios ambientales; otros producen metabolitos secundarios de efecto benéfico (Faeth & Fagan, 2002; Porras-Alfaro & Bayman, 2011).

Xiaoya y colaboradores (2015) reportan que a nivel mundial se ha realizado investigación concerniente a la diversidad de hongos endófitos y micorrícicos en aproximadamente 200 géneros de orquídeas, lo que corresponde al 30% del total

de géneros para esta familia de plantas y de estos, aproximadamente dos terceras partes corresponden a orquídeas terrestres que ocupan una alta proporción en la lista de especies amenazadas de la International Union for Conservation of Nature (IUCN) 2017. Los trabajos realizados sobre estos tipos de hongos abarcan todos los grupos tróficos (fotosintéticas, mixótrofas y micoheterotróficas), en una gran diversidad de hábitats (selva, bosque de neblina, bosques de pino-encino, entre otros), en diferentes sustratos de crecimiento en la naturaleza (terrestres, epífitas, litofíticas) y prácticamente en todos los continentes en que se desarrollan (Bidartondo & Read, 2008; Ogura-Tsujita & Yukawa, 2008; Pecoraro et al., 2013; Huang et al., 2014; McCormick & Jaquemyn, 2014). Bayman y Otero (2006) señalan que es difícil separar a los hongos micorrícicos y endófitos, ya que aunque se asume que los hongos del complejo *Rhizoctonia* son micorrícicos, no siempre se demuestra el beneficio funcional que tienen en la planta y por el contrario pueden actuar como patógenos o saprobios y se ha demostrado que muchos endófitos pueden desarrollar estructuras micorrícicas. Los principales géneros de hongos reportados en orquídeas se muestran en la Tabla 2.

A nivel de América se han realizado estudios sobre estos hongos en prácticamente todo el continente, en países como Brasil, Canadá, Chile, Colombia, Costa Rica, Ecuador y Puerto Rico, que reportan como principales hongos micorrícicos asociados a orquídeas terrestres y epífitas a *Ceratobasidium* y *Tulasnella*, en menor proporción *Serendipita* y *Thanatephorus* (Otero et al., 2003; Otero et al., 2004; Ordoñez et al., 2012; Valadares et al., 2012; Oliveira et al., 2014; Pereira et al., 2014a y b; Atala et al., 2015); mientras que como principales géneros de hongos endófitos no micorrícicos se encuentran *Xylaria*, *Phomopsis*, *Alternaria*, *Phialophora*, *Trichoderma* y *Colletotrichum* (Otero et al., 2002; Bayman & Otero-Ospina, 2006; Porras-Alfaro & Bayman, 2011; Ordoñez et al., 2012; Guimarães et al., 2013; Camargo-Cepeda y Ávila, 2014; Oliveira et al., 2014; Pereira et al., 2014a; Gamboa-Gaitán & Otero-Ospina, 2016; Salazar, 2017).

Tabla 2. Géneros de hongos micorrícicos y endófitos no micorrícicos que se han reportado asociados a la familia Orchidaceae (Tomada de Xiaoya et al., 2015).

MICORRÍCICOS		ENDÓFITOS NO MICORRÍCICOS		
<i>Ceratobasidium</i>	<i>Acephala</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>Hebelom</i>	<i>Sclerotinia</i>
<i>Coprinus</i>	<i>Acremonium</i>	<i>Cryptosporiopsis</i>	<i>Helicomycetes</i>	<i>Scytalidium</i>
<i>Lactarius</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Curvularia</i>	<i>Humicola</i>	<i>Strumella</i>
<i>Leptodontidium</i>	<i>Ampelomyces</i>	<i>Cylindrocarpon</i>	<i>Hyalodendrom</i>	<i>Talaromyces</i>
<i>Moniliopsis</i>	<i>Amphinema</i>	<i>Daldinia</i>	<i>Hypocrea</i>	<i>Terfezia</i>
<i>Serendipita</i>	<i>Annulohypoxyton</i>	<i>Davidiella</i>	<i>Laccaria</i>	<i>Thelephora</i>
<i>Thanatephorus</i>	<i>Armillaria</i>	<i>Didymella</i>	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Tomentella</i>
<i>Trichosporiella</i>	<i>Arthrimum</i>	<i>Dioszegia</i>	<i>Lepiota</i>	<i>Trechisphora</i>
<i>Tuber</i>	<i>Ascobolus</i>	<i>Entonaema</i>	<i>Meliniomyces</i>	<i>Trichoderma</i>
<i>Tulasnella</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Exidia</i>	<i>Menispora</i>	<i>Umbelopsis</i>
	<i>Aureobasidium</i>	<i>Exophiala</i>	<i>Mortierella</i>	<i>Varicosporium</i>
	<i>Bionectria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Nectria</i>	<i>Verticillium</i>
	<i>Botrytis</i>	<i>Fusicoccum</i>	<i>Nigrospora</i>	<i>Wicolsina</i>
	<i>Candida</i>	<i>Galactomyces</i>	<i>Olpidium</i>	<i>Xylaria</i>
	<i>Cercophora</i>	<i>Geomyces</i>	<i>Paecilomyces</i>	
	<i>Chaetomella</i>	<i>Geopora</i>	<i>Penicillium</i>	
	<i>Chaetomium</i>	<i>Geotrichum</i>	<i>Phaenosphaeria</i>	
	<i>Cladophialophora</i>	<i>Gibberella</i>	<i>Phialophora</i>	
	<i>Cladosporium</i>	<i>Gliocladium</i>	<i>Phoma</i>	
	<i>Clonostachys</i>	<i>Gloeophyllum</i>	<i>Phomosis</i>	
	<i>Cochliobolus</i>	<i>Glomerularia</i>	<i>Pleospora</i>	
	<i>Colletotrichum</i>	<i>Guignardia</i>	<i>Podospora</i>	
	<i>Conocybe</i>	<i>Gymnomyces</i>	<i>Psathyrella</i>	
	<i>Cortinarius</i>	<i>Gymnopus</i>	<i>Resinicium</i>	
	<i>Cosmospora</i>	<i>Halocyphina</i>	<i>Schizophyllum</i>	

2.2.1 Situación nacional

El estudio de los hongos asociados a las orquídeas a nivel nacional es relativamente reciente. Los primeros trabajos de identificación y eficiencia funcional de micorriza orquídeoide los realizó la Dra. Pilar Ortega Larrocea y su equipo de colaboradores en orquídeas terrestres de los géneros *Bletia*, *Dichromanthius*, *Habenaria* y *Malaxis* en el Estado de México (Castillo, 2002; Rangel, 2004, 2006; Ortega-Larrocea, et al., 2005; Ortega-Larrocea & Rangel-Villafranco, 2007; Rangel-Villafranco & Ortega-Larrocea, 2007; Ortega-Larrocea & González, 2008; Ortega-Larrocea, 2008; Ortega-Larrocea et al., 2008). Posteriormente, con otro grupo de colaboradores se extendió el estudio de esta interacción a otros estados del país como Chiapas, Michoacán, Oaxaca, Puebla y Veracruz con especies de orquídeas terrestres y epífitas de géneros como

Acineta, *Chysis*, *Cycnoches*, *Epidendrum*, *Erycina*, *Leochilus*, *Notylia*, *Oncidium*, *Stanhopea*, *Specklinia*, *Stelis* y *Trichocentrum* y en aproximadamente 30 especies, lo que representa aproximadamente el 2.4 % del total de especies de orquídeas registradas en el país (Cruz-Balsí, 2007; Beltrán-Nambo et al., 2010; Moreno-Martínez, 2011; Rendón-Lara et al., 2013; Jacinto-Hernández et al., 2013; Jacinto-Hernández & Ortega-Larrocea, 2013; Gómez-Aguilar et al., 2013; Osorio-Morales et al., 2013; Montes, 2016; Segundo, 2016). Estos trabajos reportaron como hongos micorrícicos asociados a esta familia de plantas principalmente, a los géneros incluidos en el complejo *Rhizoctonia*: *Tulasnella* y *Ceratobasidium* y en menor proporción *Serendipita* y señalan, además, la eficiencia de estos hongos para promover la germinación y el desarrollo de plántulas *in vitro* y en algunos casos como *Bletia urbana*, *Bletia campanulata* y *Dichromantus aurantiacus*, la supervivencia bajo condiciones *in situ* y *ex situ* o en sitios con perturbación (Ortega-Larrocea & Rangel-Villafranco, 2007; Rangel-Villafranco & Ortega-Larrocea, 2007; Beltrán-Nambo et al., 2010; Montes, 2016). En cuanto a hongos endófitos en México, existe un número sustancial de estudios realizados, sin embargo la mayoría de ellos se realizaron con otros grupos de plantas y muy pocos en orquídeas (Contreras-Cornejo et al., 2009; Magaña-Lemus, 2011; Ávila-Díaz et al., 2013; Suazo-Ortuño & Zermeño Hernández, 2017). En los trabajos con orquídeas se reportan como principales géneros de hongos asociados a diferentes tejidos de las plantas analizadas a *Mycena*, *Trichoderma*, *Xylaria*, *Phomopsis*, *Alternaria*, *Phialophora* y *Colletotrichum*.

En el estado, donde se reporta el 15.6 % de la diversidad nacional de orquídeas, los estudios sobre sus hongos asociados son escasos y estos reportan algunos hongos endófitos y muy pocos del tipo micorrícico. Entre los géneros de orquídeas analizados se encuentran *Laelia*, *Bletia*, *Govenia* y *Habenaria*; los principales géneros de hongos identificados en estos estudios son: los hongos micorrícicos del género *Tulasnella* pertenecientes al complejo *Rhizoctonia*; y entre los hongos endófitos se mencionan *Alternaria*, *Curvularia*, *Tetracladium*, *Helotiales* e *Hypocreales* (Ávila 2007; Ávila et al., 2009; Beltrán-Nambo, 2010; Magaña-Lemus, 2011; Montes, 2016; Segundo, 2016).

2.3. ORQUÍDEAS ANALIZADAS

Las orquídeas seleccionadas para el presente estudio se eligieron considerando géneros reportados con alta cantidad de especies o alta proporción de endemismos en México y que además estuvieran presentes en el estado de Michoacán, como es el caso de *Laelia* (81.8%), *Habenaria* (68%) y *Prosthechea* (52.17%), o bien que tuvieran su centro de diversificación en México como sucede con los géneros *Bletia* y *Govenia* en las que se reporta que más del 40% de sus especies se diversificaron en nuestro país (Tabla 3) (Soto Arenas et al., 2007; Espejo-Serna, 2012).

Tabla 3. Géneros de orquídeas seleccionados en los que se registran más de 20 especies y/o alta proporción de endemismos en México (construida a partir de datos proporcionados por Espejo- Serna, 2012).

GÉNERO	TOTAL DE ESPECIES EN MÉXICO	ESPECIES ENDÉMICAS DE MÉXICO O ENDEMISMOS (%)
<i>Bletia</i>	34	Más del 60%
<i>Govenia</i>	20	8(40)
<i>Habenaria</i>	75	51 (68)
<i>Prosthechea</i>	46	24 (52.17)
<i>Laelia</i>	11	9 (81.8)

Las especies terrestres elegidas fueron *Bletia purpurata*, *Habenaria flexuosa* y *Govenia lagenophora* que se distribuyen del territorio mexicano hasta Guatemala y el Salvador (Espejo-Serna, 2012; Salazar, 2013). Se consideraron además especies epífitas que experimentan extracción masiva en la región, como sucede con *Laelia autumnalis* y *Prosthechea squalida*, o que estuvieran señaladas en alguna categoría de riesgo en la NOM-059 como *Laelia speciosa* y *Euchile citrina* que se encuentran sujetas a protección especial y que además se incluyen en la lista de especies prioritarias para la conservación.

***Bletia purpurata* A. Rich & Galeotti.** Es una orquídea terrestre con distribución geográfica en México, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. Se encuentra en bosques de pino, pino-encino, encino, bosques mesófilos y matorrales xerófilos en alturas de 1900 a 2200 msnm, sobre paredones expuestos

a mucha luz (Llamacho et al., 2005). En México florecen de julio a octubre y se caracteriza por sus flores color magenta con blanco, curvadas, con el perianto cerrado, el labelo entero y en forma de embudo (Fig. 1a) (García Cruz, 1999; Sosa, 2002). Su estado de conservación es **desconocido**; sin embargo, no se considera en riesgo ya que es la especie del género que se presenta con mayor frecuencia en hábitats perturbados en estados del centro y sur del país como Morelos y Michoacán (García-Cruz, 1999).

***Euchile citrina* (Lex.) Whitner. (*Prosthechea citrina*).** Es una especie epífita endémica del centro y sur de México en estados como Jalisco, Nayarit, San Luis Potosí, Hidalgo, Puebla, Oaxaca, Guerrero y Michoacán. Esta especie es poco frecuente, aunque a veces abundante en los lugares en donde crece. Suele encontrarse en bosques secos de encino y pino-encino a altitudes de 1300 a 2600 msnm. Florece de marzo a junio (García-Cruz et al., 2003). Sus flores tienden a orientarse hacia el suelo y presentan un color amarillo y aroma a limón. Sus hojas son verde grisáceas (Hagsater et al., 2005) (Fig. 1f). Detalles de la planta en Anexo I, al final del documento. Su estado de conservación es: **vulnerable**. Es una planta de área restringida cuyas poblaciones se han visto disminuidas debido a su uso como flor decorativa en semana santa y preparación de agua aromática (“agua de gloria”) y cataplasmas para la disentería; así como para extraer mucilago utilizado como pegamento en el arte de plumería (García Cruz, 1999).

***Govenia lagenophora* Lindl.** Las flores de *G. lagenophora* varían en tonalidad de amarillo a café, dependiendo de las zonas donde se distribuye y presenta los dos pétalos superiores rayados en tonalidades rojizas. Florece de julio a diciembre en racimos con una gran cantidad de flores (Fig. 1b) (Dressler, 1965). Se distribuye en México, El Salvador y Guatemala. En la parte central de México se le puede encontrar en los estados de Jalisco, Colima, Michoacán y Veracruz en bosques mixtos con zonas rocosas. También se ha reportado al norte del país, en estados como Durango y Tamaulipas, en sitios abiertos de bosques de pino, pino-encino (Dressler, 1965). Su estado de conservación es **desconocido**. En algunos

estados del país las flores de *G. lagenophora* se extraen para venta en los mercados locales. (Detalles de la flor en anexo 1, al final del documento).



Figura 1. Especies de orquídeas mexicanas analizadas. a) *Bletia purpurata*. Inflorescencia en vista frontal que muestra el perianto cerrado. b) *Govenia lagenophora*. Racimo que muestra la tonalidad de las flores. c) *Habenaria flexuosa*. Inflorescencia con 4 flores de color verde, dispuestas en espiral. d) *Laelia speciosa*. Flor color lila con labelo blanco y márgenes coloreados. e) *Laelia autumnalis*. Coloración de la flor. f) *Eucile citrina* con flores de color amarillo y colgando hacia abajo. g) *Prosthechea squalida*. Detalle de la flor que muestra las 5 líneas longitudinales color rojizo en los sépalos y labelo blanco; Fotografías tomadas en los Mpios. de Quiroga (a, c), Ziracuaretiro (b, f), Erongaricuario (d), Tzintzuntzan (e) y Coeneo (g) por Beltrán-Nambo.

***Habenaria flexuosa* Lindl.** Es una orquídea terrestre que algunos consideran endémica de México y que se distribuye en los estados de Chiapas, Jalisco, Michoacán, Morelos y Oaxaca, mientras que otros la reportan con distribución en Guatemala y Costa Rica (Batista et al., 2011). Crece entre gramíneas y otras hierbas, en cañadas o laderas de encinar abierto en suelo rico, bosque de pino y encino en suelos rocosos de origen volcánico, de 1500 a 2660 msnm. Florecen desde finales de julio hasta principios de septiembre (González-Tamayo & Hernández, 2010). La inflorescencia en racimo, a veces unilateral con cuatro a

nueve flores dispuestas en espiral. Flores de color verde poco atractivas que abren en sucesión (González-Tamayo & Hernández, 2010) (Fig. 1c). Detalles en Anexo 1 (al final del documento). Su estado de conservación es **desconocido**, debido a la similitud que guarda con otras especies como *Habenaria diffusa* (A. Rich. Et Gal.) (González-Tamayo & Hernández, 2010).

***Laelia autumnalis* (Lex.) Lindl.** Es una planta epífita o litófita endémica de México, que se localiza a lo largo del Eje Neovolcánico Transversal en estados como Nayarit, Jalisco, Colima, Guanajuato y principalmente en el estado de Michoacán (Halinberg & Soto, 1997; García-Cruz et al., 2003). A esta especie se le ve frecuentemente creciendo sobre *Quercus* en los bosques de encino y pino-encino, a altitudes entre 2000 y 2600 msnm. Florece de octubre a noviembre y ocasionalmente en diciembre. Inflorescencias erectas a curvas de 40 a 100 cm de longitud. Flores grandes de color lila a magenta, labelo con lóbulos laterales blancos y columna de blanco a magenta, las hojas son verdes con tinte color magenta (Halbinger & Soto, 1997) (Fig. 1e). Detalles de la planta en Anexo I, al final del documento. Su estado de conservación puede definirse como **no vulnerable**, ya que no se cita en la NOM-059. Sin embargo, debido a que es una especie vistosa y apreciada por los cultivadores de orquídeas, se encuentra bajo una fuerte presión de colecta, lo que aunado a la perturbación de su hábitat la define como una especie amenazada (Halinberg y Soto, 1997; García-Cruz et al., 2003).

***Laelia speciosa* (Kunth) Schltr.** Es una de las orquídeas con mayor importancia cultural en el centro del país. Es una especie endémica de México de hábitos principalmente epífitos que se distribuye en el Eje Volcánico Transversal y en montañas aledañas de la Sierra Madre Oriental y Occidental, en estados como Durango, Aguascalientes, Zacatecas, Jalisco, Michoacán, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, San Luis Potosí y Tamaulipas. Crece generalmente en bosques de encino de *Quercus deserticola*, pero también en bosques xerófitos sobre “Mezquite” (*Prosopis*), *Yucca* y cactus, a altitudes de 1400 a 2400 msnm (Halbinger & Soto, 1997). Florece de mayo a julio, o excepcionalmente a principios

de agosto. Las flores son grandes y resupinantes, de color lila a lila purpura, labelo blanco con los márgenes frecuentemente coloreados, columna rosa en la parte dorsal y blanca en la ventral (Fig. 1d). Los detalles de la planta están en el Anexo 1, al final del documento. Su estatus de conservación es: **Vulnerable**, debido a la colecta de ejemplares silvestres para su venta en mercados locales. A pesar de sus amplios rangos geográficos, esta especie tiene poblaciones pequeñas y raramente son abundantes. En algunos sitios de Michoacán la especie es colectada en exceso provocando que las poblaciones hayan disminuido debido a la extracción de plantas completas en floración y por lo tanto una baja producción de cápsulas (Hágsater, 1990).

***Prosthechea squalida* (La Llave & Lex.) Soto Arenas & Salazar.** Es una especie epífita o rupícola endémica de México, que se distribuye en la Sierra Madre Occidental, Eje Volcánico Transversal, Sierra Madre del Sur en las montañas al norte del Balsas; en estados como Durango, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Morelos y Guerrero; en los bosques del oeste de México de pino, pino-encino, bosques mesófilos y en la zona de transición del bosque tropical deciduo, a altitudes de 1400 a 2300 mnsn. Florece principalmente de febrero a mayo (junio) (Hágsater, 2008). La planta presenta hojas apicales, 2-4, lineares, verde pálidas o amarillentas, varios pseudobulbos unidos en un rizoma. Los sépalos presentan 5 líneas longitudinales café rojizas, labelo color crema, quillas algo verdosas, lóbulos laterales con líneas purpura (Hágsater, 2008) (Fig. 1g). Detalles de la planta en Anexo I, al final del documento. Su estado de conservación es: **desconocido**. Se considera una de las especies más comunes en las estaciones secas.

2.4. SITIOS DE COLECTA

La colecta se realizó en 11 sitios de muestreo ubicados en diferentes municipios de la Provincia Fisiográfica Cinturón Volcánico Transversal en el Estado de Michoacán (Fig. 2) que fueron elegidos con base en los registros de distribución en el estado de las 4 especies seleccionadas (Instituto de Ecología A.C. -INECOL)

y recorridos en campo para localizar poblaciones de las plantas seleccionadas. Los datos de referencia de cada uno de los sitios y las especies de orquídeas encontradas en cada uno se muestran en la Tabla 4.



Figura 2. Provincias fisiográficas del estado de Michoacán y sitios de colecta. Se muestran en diferentes colores cada una de las provincias fisiográficas del estado. La Provincia del Cinturón Volcánico Transversal en color café en el mapa; el área de estudio se encuentra delimitada en color verde en esta provincia. Los sitios de muestreo se señalan con números en la proyección. (Mapa elaborado en el programa Qgis V. 2.1.8 a partir de las provincias fisiográficas propuestas por Garduño et al., 1999 y coordenadas georreferenciadas en el Portal de Geoinformación de CONABIO <http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/>).

Los suelos más importantes en el área de estudio son los andosoles, los cuales son suelos jóvenes derivados de cenizas volcánicas que sustentan extensas plantaciones de aguacate, bosque de pino y bosque de pino-encino, principalmente. En menor proporción se encuentran luvisol, vertisol, acrisol, leptosol, regosol y cambisol. En algunas regiones se presenta el tipo de suelo denominado malpaís como en las localidades de San Andrés Coru y Uruapan (CONABIO, 2005).

En las localidades de San Andrés Coru y Santa Fe de la Laguna fue posible coleccionar todas las especies de orquídeas seleccionadas, tanto terrestres como epífitas, a excepción de *E. citrina* que no se encontró en Santa Fe. De cada especie de orquídea se tomaron fotografías para corroborar su identidad y en algunos casos se coleccionaron flores.

Tabla 4. Datos de referencia de los sitios de colecta y especies de orquídeas analizadas en cada uno de los puntos de muestreo. (Tipos de vegetación observada y corroborada de acuerdo a INEGI, 1985).

No.	SITIOS DE COLECTA		DATOS DE REFERENCIA (coordenadas, altitud)	VEGETACIÓN	ORQUÍDEA
	MUNICIPIO	LOCALIDAD			
1	Acuitzio	Acuitzio	N19° 29'36.35" W 101° 20'49.73" 2145 msnm	Bosque de pino- encino, cedro y oyamel	<i>L. autumnalis</i>
2	Erongaricuaro	Oponguio	N 19° 38'42" W 101° 39'43.9" 2114 msnm	Bosque de encino	<i>L. autumnalis</i> <i>L. speciosa</i>
3	Morelia	Cuanajillo	N 19° 38' 34.18" W 101° 20' 45.09" 2200 msnm	Bosque de encino	<i>L. speciosa</i>
4, 5	Quiroga	Sta. Fe de la Laguna	N 19° 41'37.37" W 101° 33'45" N 19° 41' 26.4" W 101° 31'20" 2281 msnm	Bosques de Pino- encino y encino	<i>L. speciosa</i> <i>B. purpurata</i> <i>G. lagenophora</i> <i>H. flexuosa</i>
7	Tingambato	Tingambato	N 19° 30'3.49" W 101° 50'17.49" 2151 msnm	Bosque de pino - encino	<i>B. purpurata</i> <i>G. lagenophora</i> <i>H. flexuosa</i>
6	Tzintzuntzan	Cucuchucho	N 19° 36'18.4" W 101° 37'18.62" 2049 msnm	Bosque mixto de pino, encino y cedro, algunas nopaleras y copal	<i>L. autumnalis</i>
11	Uruapan	Reserva Natural Uruapan	N19° 25' 41.41" W102° 06'21.5" 1780 msnm	Bosques de pino, pino – encino y mesófilo de montaña.	<i>B. purpurata</i> <i>G. lagenophora</i> <i>H. flexuosa</i>
8	Coeneo	Carretera	N 19° 43'02.16" W 101° 37'45.53" 2239 msnm	Bosque de pino - encino	<i>L. autumnalis</i> <i>P. squalida</i>
9, 10	Ziracuaretiro	San Andrés Coru	N 19° 27'41.5" W 101° 56'55.2" 1700 msnm N 19° 26'14.24" W 101° 57'07.71"	Bosque mixto con pino – encino y bosque tropical deciduo con ceiba, cedro, parota, tepeguaje.	<i>L. autumnalis</i> <i>E. citrina</i> <i>P. squalida</i> <i>B. purpurata</i> <i>G. lagenophora</i> <i>H. flexuosa</i>

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que se han encontrado patrones diferentes en la asociación entre orquídeas y hongos micorrícicos (HM), y a que se conoce muy poco sobre el papel que desempeñan los hongos endófitos no micorrícicos presentes en sus raíces, es importante explorar estas interacciones dentro de la gran cantidad de orquídeas nativas de México y América, las cuales cuentan con escasos estudios al respecto. Para ello se requiere examinar los diferentes taxa de hongos y evaluar cuantos de ellos facilitan la germinación de la semilla y el crecimiento de plántulas hasta su madurez con la finalidad de analizar si estas interacciones favorecer la distribución y abundancia de las orquídeas. Una vez que estos dos grupos de hongos hayan sido caracterizados los estudios podrán entonces enfocarse en su aplicación para programas de conservación de estas plantas por medio de propagación simbiótica, a partir de semillas para reintroducción.

4. HIPÓTESIS

Las especies de orquídeas mexicanas asociadas con una mayor diversidad de hongos micorrícicos y endófitos no micorrícicos se encuentran más ampliamente distribuidas y sus procesos germinativos son más eficientes que aquellas que tienen asociaciones con poca variedad fúngica.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las comunidades fúngicas asociadas a las raíces de siete orquídeas silvestres mexicanas (*Bletia purpurata*, *Govenia lagenophora*, *Habenaria flexuosa*, *Laelia autumnalis*, *L. speciosa*, *Euchile citrina* y *P. squalida*) y determinar su eficiencia para promover la germinación y supervivencia de plántulas *in vitro*.

5.1.1. Objetivos particulares

1. Caracterizar morfológicamente e identificar molecularmente los hongos micorrícicos y endófitos no micorrícicos presentes en las raíces de las orquídeas silvestres mexicanas en estudio.
2. Inferir preliminarmente las relaciones filogenéticas de los hongos identificados.
3. Comparar la diversidad fúngica presente en las raíces de las diferentes especies de orquídeas y entre los sitios de colecta.
4. Elaborar el perfil de ácidos grasos de los hongos micorrícicos y endófitos no micorrícicos identificados.
5. Determinar el grado de compatibilidad entre los principales hongos identificados y las diferentes especies de orquídeas y su eficiencia para promover la germinación y supervivencia de plántulas *in vitro*.

6. RESULTADOS

CAPITULO I. DIVERSIDAD FUNGICA ASOCIADA A LAS RAÍCES DE SIETE ESPECIES DE ORQUÍDEAS MEXICANAS

RESUMEN

Los hongos asociados a las raíces de las plantas son importantes para diferentes procesos, entre los que se incluyen el desarrollo de plántulas y su dispersión. En México, es muy limitado el conocimiento sobre los hongos que interactúan con las raíces de orquídeas y su posible función para su supervivencia y dispersión en diferentes sitios geográficos. Por esta razón el objetivo de este trabajo fue determinar la composición, diversidad y relaciones filogenéticas de las comunidades fúngicas asociadas a raíces de 7 especies de orquídeas mexicanas: *Bletia purpurata*, *Euchile citrina*, *Govenia lagenophora*, *Habenaria flexuosa*, *Laelia autumnalis*, *L. speciosa* y *P. squalida*. Las muestras se colectaron en 11 sitios del Cinturón Volcánico Transversal en Michoacán, México. De 299 endófitos aislados, se caracterizaron 100 morfotaxa representativos utilizando métodos morfológicos y moleculares, obteniendo la identidad de 85 e identificando 5 géneros de hongos basidiomicetos, incluidos dos micorrícicos (*Tulasnella* y *Serendipita*) y 18 géneros de hongos ascomicetos, como *Trichoderma* y *Xylaria* que fueron los más abundantes. Se comparó la diversidad fúngica en las 7 especies de orquídeas y en los 11 sitios de muestreo utilizando los índices Chao 1, Jackknife 1, Simpson, Shannon-Wiener y Whittaker. Se elaboraron curvas de acumulación de especies. En este trabajo especies como *Laelia autumnalis*, *L. speciosa* y *P. squalida* que fueron encontradas en diferentes sitios, parecen ser más generalistas hacia los endófitos con los que se asocian mostrando una alta diversidad y se encontraron en simbiosis con el género *Tulasnella*. Mientras que otras orquídeas parecen ser más específicas como *E. citrina* y *Habenaria flexuosa* que mostraron bajos índices de diversidad y una distribución local pobre. Estos resultados han sido reportados para especies con alto grado de endemismo. Las orquídeas terrestres presentaron menor diversidad y se encontraron en simbiosis con *Tulasnella* y *Serendipita*. La diversidad más alta de hongos por sitio de muestreo se presentó en los sitios 9 y 10 (San Andrés Coru), en los que se localizaron 6 de las especies analizadas y de manera inversa los sitios con menor diversidad fúngica fueron el 1 y el 3 (Acuitzio y Cuanajillo) en donde se presentó una sola especie de orquídea. Además, parecen existir procesos de segregación que les permite a las orquídeas una mejor supervivencia y adaptación al asociarse con diferentes especies fúngicas cuando comparten sitios.

Palabras clave: Hongos micorrícicos, hongos no micorrícicos, índice de Shannon-Wiener, diversidad beta.

ABSTRACT

Fungi associated with plants roots are important for different plant processes including germination and development. In Mexico, is still very limited the knowledge about fungal species that interacts with orchids roots and their possible role to plant success and dispersion in different geographical locations. For this reason, the aim of this work was to determine the community composition, diversity and phylogenetic relationship of fungi associated with orchids roots of seven mexican orchids species: *Bletia purpurata*, *Euchile citrina*, *Govenia lagenophora*, *Habenaria flexuosa*, *Laelia autumnalis*, *L. speciosa* y *P. squalida*. The samples were collected in 11 sites of Transversal Volcanic System in Michoacán, Mexico. From 299 isolated endophytes, 100 representative morphotaxa were characterized using morphological and molecular methods. The identity of 85 of them was obtained. Five Basidiomycota fungi genera were identified, including two reported as mycorrhizal fungi (*Tulasnella* and *Serendipita*) and 18 genera of ascomycete fungi, such as *Trichoderma* and *Xylaria*, which were the most abundant. Diversity of fungi in the 7 orchids species and in the 11 sampling sites was calculated with Chao 1, Jackknife 1, Simpson, Shannon-Wiener and Whittaker indexes. Accumulation curves were performed. In this work, species such as *L. autumnalis*, *L. speciosa* and *P. squalida* that were found in different sites, seem to be more generalists to endophytes which are associated and were found in symbiosis with the orchid mycorrhizal genera *Tulasnella*, while others orchids seem to be more specific as *E. citrina* and *Habenaria flexuosa* that showed the lowest indexes of diversity and poor local distribution. This situation has been reported for species with high endemism degree. Terrestrial orchid showed a lower diversity and they were found in simbiosis with *Tulasnella* and *Serendipita*. Highest fungi diversity per sampling site was presented at sites 9 and 10 (San Andrés Coru), where 6 of analyzed species were located and inversely the sites with lowest fungal diversity were sites 1 and 3 (Acutzio and Cuanajillo) in each of which a single species of orchid was found. Also, it could be segregation processes, so that the association with different fungal species when plants are presents in the same sites allows orchids a better survival and adaptation.

Key words: Non-mycorrhizal fungi; mycorrhizal fungi; Shannon-Wiener index; beta diversity.

I.1. Introducción

Algunas revisiones describen una gran cantidad de hongos asociados a la familia Orchidaceae (Rasmussen & Rasmussen, 2007; Liu, et al., 2010; Dearnaley et al, 2012; Xiaoya et al., 2015). Sin embargo, la investigación sobre la diversidad en

sus raíces se había enfocado principalmente en los hongos que forman la denominada Micorriza Orquideoide (MO), debido a su papel primordial en los procesos de germinación de las semillas y su contribución en el desarrollo y nutrición de las plantas (Noval et al., 1999; Rasmussen & Rasmussen, 2007; Wright et al., 2011; Nurfadilah et al., 2013; Rasmussen et al., 2015; Freudenstein & Chase, 2015). Recientemente, ha sido reportado que es probable que también co-existan asociaciones benéficas con otros hongos endófitos (Herrera et al., 2017) y por esto se ha incrementado el interés en los hongos endófitos no micorrícicos de las orquídeas, debido a sus funciones fisiológicas posibles, las relaciones sinérgicas o antagónicas que pudieran tener con otros organismos y que benefician a las plantas y a su potencial como fuente de compuestos bioactivos (Bayman & Otero-Ospina, 2006; Nontachaiyapoom et al., 2011; Khamchatra et al., 2016).

La presencia de ambos grupos de hongos (micorrícicos y no micorrícicos) en las raíces de otras familias de plantas ayuda a la absorción de agua y nutrientes para su transporte hacia los tejidos vegetales, incrementan la resistencia de las plantas al liberar sustancias tóxicas o metabolitos e incrementan la germinación y el desarrollo de plántulas; por esta razón pueden tener un profundo impacto en la evolución, ecología, salud, estructura y diversidad de las comunidades vegetales con las que se asocian (Contreras-Cornejo et al., 2009; Otero-Ospina & Bayman, 2009; Jiménez et al., 2011; Otero et al., 2011; Mapperson & Kotiw, 2014; Ye et al., 2014). De manera que el conocimiento de los diferentes hongos asociados a las raíces de las orquídeas puede mostrar un mejor panorama sobre las interacciones que se presentan en los hábitats naturales de las orquídeas (Gamboa-Gaitán, 2006) y como estos hongos contribuyen a su supervivencia y adaptación (Swarts y Dixon, 2009).

Algunos trabajos señalan que la diversidad de hongos micorrícicos y no micorrícicos cambia de acuerdo con la especie de orquídea y con su ciclo de vida y que pueden existir diferentes patrones: algunas orquídeas permanecen en asociación con un solo simbiote, mientras que otras pueden cambiar de simbiontes durante el proceso de transición de la etapa juvenil a la adulta o

durante algún cambio ambiental (Rasmussen *et al.*, 2015), por esta razón, se considera que el estudio de endófitos que pueden estimular el desarrollo del embrión y promover el crecimiento de la planta en combinación con hongos micorrícicos o por si solos, es un tema que permanece poco explorado, aunque es muy prometedor (Teixeira *et al.*, 2015).

Uno de los retos principales de la ecología y biología de la conservación es la determinación de los factores que influyen en la distribución espacial y abundancia de especies de plantas escasas o en riesgo (Waud *et al.*, 2014) y se conoce muy poco sobre el papel fisiológico y el grado de asociación o especificidad de los hongos en las raíces de orquídeas epífitas comparados con los de las orquídeas terrestres, aunque la mayoría de las orquídeas son epífitas tropicales y subtropicales (Ávila *et al.*, 2013). A escala global, se menciona que los hongos micorrícicos se presentan menos consistentemente pero la relación parece ser más altamente eficiente en orquídeas epífitas que en las terrestres (Bailarote *et al.*, 2012; McCormick *et al.*, 2018) y que muchos de los hongos en estas plantas son endófitos no micorrícicos que forman un componente importante de la diversidad fúngica en sus raíces (Yuan *et al.*, 2009).

En México la desaparición anual de grandes extensiones de bosques de pino, pino encino y bosque mesófilo de montaña trae consigo la pérdida de poblaciones enteras de orquídeas cuya mayor diversidad se ubica en este tipo de ecosistemas (Gual-Díaz y Rendón-Correa, 2014). En el estado de Michoacán se encuentra parte de esta vegetación en la zona de la cadena montañosa denominada Eje Neovolcánico Transversal que ocupa una porción de su territorio y que se encuentra en grave problema de deforestación por la conversión de sus bosques a huertas para el cultivo de aguacate (CONABIO-SUMA, 2005), de manera que se reportan 25 especies de orquídeas en categoría de riesgo en este estado (SEMARNAT, 2010) y por esta razón es importante tomar acciones que permitan el desarrollo de estrategias para su conservación. Una de ellas es el uso de hongos simbiosis que pudieran incrementar la germinación, estimular su desarrollo y su capacidad adaptativa, ya que se menciona que la distribución de algunas orquídeas está determinada por el grado de disturbio de los sitios en que

se desarrollan, la adaptabilidad de la especie y la asociación con hongos de amplia dispersión, entre otros factores (Beltrán et al., 2012; Oliveira et al., 2013). En el país más del 40% de las especies de orquídeas son endémicas y sus asociaciones fúngicas con hongos micorrícicos y no micorrícicos han sido poco estudiadas, aunque algunos trabajos señalan que la distribución, abundancia y heterogeneidad de los simbiosiontes fúngicos son factores importantes a escala local para la adaptación y distribución de las orquídeas (McCormick et al., 2018). Por ello, la finalidad de este trabajo fue comparar la diversidad de hongos asociados a las raíces de 7 especies de orquídeas mexicanas, algunas con fuerte presión sobre sus poblaciones debido a su uso ornamental y artesanal: las especies epífitas *Laelia autumnalis* (Lex.) Lindl., *L. speciosa* (Kunth) Schltr, *Euchile citrina* (La Llave & Lex.) W. E. Higgins y *Prosthechea squalida* (La Llave & Lex.) Soto Arenas & Salazar y las especies terrestres *Bletia purpurata* A. Rich & Galeotti, *Govenia lagenophora* Lindl. y *Habenaria flexuosa* Lindl. Además, se analizó si la presencia de una mayor diversidad de hongos (asociación generalista) se relaciona con una mayor dispersión de las orquídeas o alternatively, si una asociación más eficiente con pocos hongos de amplia distribución (asociación específica) es uno de los factores que permite un mayor éxito adaptativo a estas plantas.

I.2 Metodología

Plantas y sitios de colecta

La colecta se realizó en 11 sitios de muestreo ubicados en diferentes municipios de la Provincia Fisiográfica Cinturón Volcánico Transversal en el Estado de Michoacán (Fig. 3) que fueron elegidos con base en los registros de distribución en el estado de las 7 especies seleccionadas (Instituto de Ecología A.C. -INECOL) y recorridos en campo para localizar poblaciones de las plantas seleccionadas. Los datos de referencia de cada uno de los sitios y las especies de orquídeas encontradas en cada uno se muestran en la Tabla 4 (sección de Generalidades).

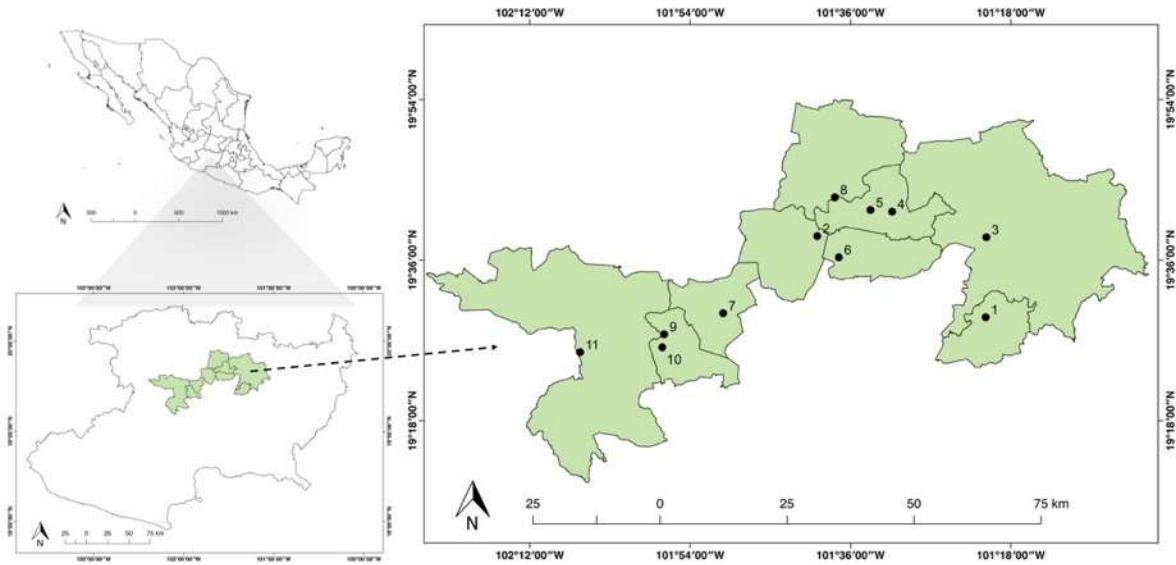


Figura 3. Ubicación de sitios de muestreo. Se muestran la localización geográfica de los 11 sitios de colecta y los límites de los 9 municipios en los que se ubican. (Imagen elaborada en el programa Qgis V. 2.1.8, a partir de coordenadas municipales obtenidas del Portal de Geoinformación de la CONABIO).

En cada sitio se estableció un cuadrante de 100 m², que fue dividido en áreas de 20 x 33 m, y en cada una de ellas se seleccionó un árbol con plantas de cualquiera de las especies seleccionadas (Fig. 4) para un total de 15 árboles muestreados por sitio y/o especie (cuando fue posible ya que no todas las especies estuvieron presentes en todos los sitios). Para la toma de muestra se eligieron al azar de 3 a 5 raíces de cada árbol para un total de 63 raíces de *L. autumnalis*, 75 de *L. speciosa*, 30 de *P. squalida*, 10 de *E. citrina*, 75 de *B. purpurata*, 65 de *G. lagenophora* y 30 de *H. flexuosa*. Las raíces fueron debidamente etiquetadas y transportadas a laboratorio en refrigeración.

Los nombres taxonómicos de las especies de orquídeas que se plasman en este documento se basan en la nomenclatura aceptada por el Kew Royal Garden, reportados en “The Plant List” (2013) que fue consultada electrónicamente.

Los muestreos se realizaron en la época de floración de las orquídeas en los años 2014-2016 y su identidad se corroboró mediante la toma de fotografías y/o colecta de flores.

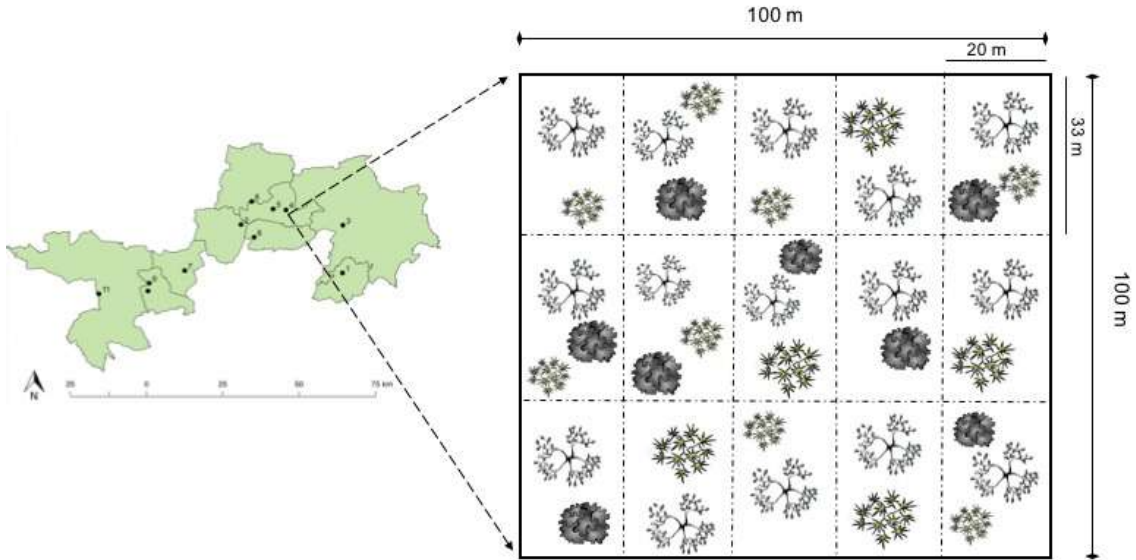


Figura 4. Diseño experimental. Dimensiones del área de colecta en cada sitio (100 m²) y de los cuadrantes de muestreo (20 x 33 m) en los que se seleccionó un árbol con orquídeas para la toma de muestras.

Aislamiento

Las raíces fueron cortadas manualmente en fragmentos transversales de 1 cm y de cada uno de estos fragmentos se realizó un corte de 1 mm aproximadamente para su montaje en alcohol polyvinil-lactoglicerol y su observación en microscopio, con la finalidad de detectar la presencia de hifas o pelotones de los hongos. Se seleccionaron de 3 a 5 fragmentos colonizados por raíz para el aislamiento de los hongos.

Los fragmentos seleccionados fueron desinfestados superficialmente siguiendo la metodología de Ortega-Larrocea (2008) utilizando hipoclorito de sodio comercial diluido al 10%, seguido de solución de antibióticos (eritromicina al 2% y gentamicina al 1%) y enjuagando con agua destilada estéril 3 veces. Para asegurar el aislamiento de hongos endófitos no micorrícicos y micorrícicos se extrajeron hifas que no estaban formando pelotones fúngicos e hifas en enrollamientos por medio de la disección de los fragmentos de raíz seleccionados y removiendo el velamen y la exodermis bajo microscopio estereoscópico y campana de flujo laminar (Rasmussen & Whigham, 2002), que fueron posteriormente dispersados en medio de cultivo de aislamiento fúngico (MAF) (Clements, 1988; Mitchell 1989) utilizando gotas de agua destilada estéril

e incubados a 26° C en obscuridad hasta que se observaron hifas en crecimiento. Se cortaron segmentos de estas hifas con bisturí y se transfirieron a cajas de Petri con medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) e incubados a 26° C para su caracterización e identificación.

Caracterización morfológica

Se determinó el color de la superficie de los cultivos a los 15 días con las cartas de color para suelo Munsell (2000). Se analizaron otras características macroscópicas del cultivo: brillo, textura, olor, modo de crecimiento (Pereira et al., 2005), tasas de crecimiento con la técnica de Currah *et al.*, (1987) y representadas en valores promedios, con base en 3 réplicas por cepa. A los 30 días se analizó la formación de esclerocios, ascosporas, basidiosporas y/o células monilioides (Shan *et al.*, 2002). Se hicieron montajes en portaobjetos y tinción con azul de tripan y/o fucsina ácida, se hicieron mediciones de largo y ancho de las células monilioides y esporas. Para ambas mediciones se utilizó un microscopio marca Leica con cámara integrada Z1000 y el programa AMScope V. 3.7. Se realizaron pruebas de capacidad enzimática por reacción a la presencia de polifenil oxidasas mediante la preparación de medio de cultivo con ácido tánico propuesto por Davidson *et al.*, (1938) y Zelmer (1994). Se inocularon 3 cajas por cada una de las cepas obtenidas del aislamiento en PDA con un fragmento de micelio de 1 mm³ y llevadas a incubación a 25 °C por periodos de 5 a 15 días; después de lo cual se observó la reacción de los aislados, considerando negativos a aquéllos que no mostraron cambio de coloración en el medio o crecimiento y positivos en el caso contrario.

Con las características obtenidas se elaboró una matriz codificada numéricamente de acuerdo a estados de carácter para su utilización en el análisis de agrupación. Las cepas fueron agrupadas con el criterio aglomerativo WARD sobre las distancias euclidianas estimadas a partir de la similitud en las características cualitativas y cuantitativas, estimando su coeficiente de correlación cofenética en el ambiente R versión 3.3 (Development Core Team, 2008).

Determinación molecular

Para la determinación molecular se seleccionaron cepas representativas de cada uno de los grupos formados con el análisis aglomerativo. Se hicieron cortes de 1 mm³ de los aislados en PDA que se colocaron en medio papa-dextrosa broth (PDB), por 15 a 20 días a una temperatura de 25°C en agitación y en presencia de luz. Los hongos crecidos en el medio PDB se licuaron en 150 mL de agua destilada por 1 minuto, y se tomaron alícuotas de 1 mL que se vaciaron en una membrana de diálisis montada en vacío (manifall). La identificación se realizó por medio de los espaciadores internos transcritos ribosomales (ITS). Se extrajo ADN total de tejido fresco crecido previamente en medio PDB y lavado con bomba de vacío, utilizando el miniKit Dneasy Plant (Qiagen). Para la amplificación se utilizaron los primers universales ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990), siguiendo el protocolo sugerido por Swarts y colaboradores (2010) pero utilizando una ADN-polimerasa de la marca Qiagen. La secuenciación en los dos sentidos (5'-3' y 3'-5') la realizó la empresa MacroGen (Seul, Korea).

Alineamiento taxonómico y relaciones filogenéticas

Todas las secuencias fueron editadas en el programa Sequencher 5.2.4 (GeneCodes, Ann Arbor, Michigan, USA) y posteriormente se realizó una búsqueda de secuencias similares en la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con la opción MegaBLAST (Morgulis *et al.*, 2008). Las secuencias obtenidas en este estudio se alinearon con las secuencias de referencias con el programa MUSCLE (Edgar, 2004), mejorando manualmente con el programa PhyDe® (Müller *et al.*, 2005). Con base en la identificación molecular, las secuencias se dividieron para su análisis filogenético, considerando el phylum de inclusión. Para el grupo de Basidiomicetos se eligió como grupo externo a *Dacrymyces stillatus* y para el grupo de Ascomycetos se eligió a *Saccharomyces cerevisiae* por ser géneros ubicados en las clases Dacrymycetes y Hemisacomycetes consideradas ancestrales de acuerdo al trabajo de Hibbet *et al.*, (2007). Para el alineamiento se incluyeron algunas secuencias que pudieran ayudar a definir las ramas de los árboles por su relación filogenética con las

secuencias identificadas de acuerdo a los trabajos de Xing y colaboradores (2013) y Prieto y Wedin (2013). Las relaciones filogenéticas entre taxa fueron estimadas mediante análisis de máxima parsimonia utilizando el programa Mega V. 7.0 (Tamura et al., 2011) estimando su apoyo estadístico con 100 réplicas Bootstrap, utilizando un modelo de sustitución nucleotídica de tipo TrNef + G para el caso de basidiomicetos y TPM2 uf + G para ascomicetos, estimados con jModeltest (Posada, 2008). Las inferencias filogenéticas se ejecutaron con el programa MrBayes V. 3.2 (Ronquist *et al.*, 2012) ejecutando en paralelo cuatro cadenas de Markov de 10,000,000 generaciones cada una. Se eligió el mejor árbol con apoyo bootstrap.

Análisis de diversidad

Se comparó la diversidad fúngica entre las especies de orquídeas seleccionadas y después la diversidad fúngica por sitio de muestreo.

Se determinó la riqueza específica y diversidad alfa utilizando dos métodos no paramétricos reportados como los más adecuados para muestras pequeñas y de diferente tamaño: Chao 1 (Chao, 1984) y Jackknife (Palmer, 1990) e índices de Shannon-Wiener (Shannon & Weaver, 1949) e índice de igualdad de Pielou (1981) (J') que ha referencia a que tan cerca se encuentran por número de individuos las especies en un medio ambiente. Se determinó además el esfuerzo de muestreo utilizando curvas de acumulación en el programa EstimateS V.9.0 (Colwell, 2013). Se determinó la diversidad beta general (que indicó la magnitud de cambio en la composición de especies fúngicas entre las 7 especies de orquídeas estudiadas y entre los 11 sitios de muestreo, utilizando el índice de reemplazo de especies de Whittaker (1972), calculado en el programa PAST V. 3.17 (Hammer et al., 2001). Además se determinó la diversidad beta para cada par de combinaciones de especies de orquídeas y para cada par de combinaciones de sitios de muestreo, por medio del mismo índice.

I. 3. Resultados

Aislamiento y caracterización de los aislados fúngicos. Se aislaron un total de 299 cepas fúngicas de 143 de las 348 raíces procesadas (41%) de las 7 especies de orquídeas analizadas, de las cuales más del 60 % se obtuvieron de las raíces de orquídeas del género *Laelia*. Con base en la caracterización morfológica, el árbol de distancias generado, separó a los aislados en 4 grupos principales (A,B,C y D) (Fig. 5).

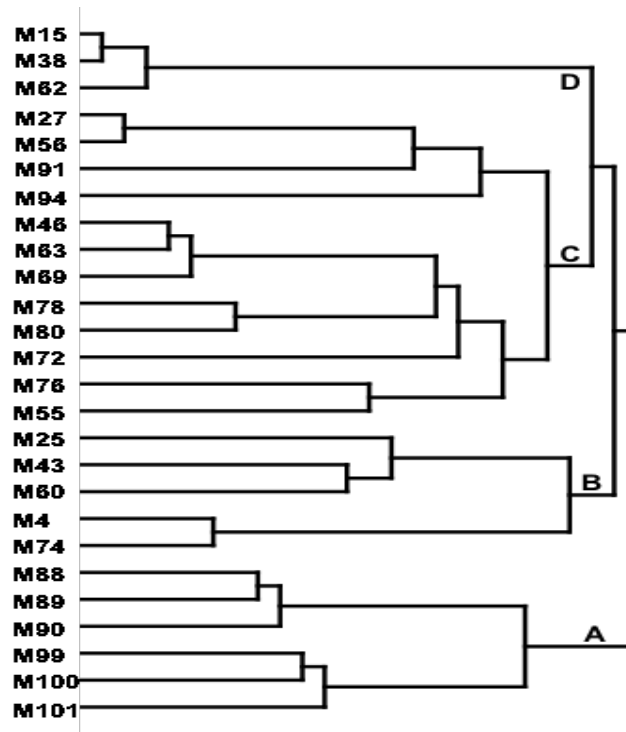


Figura 5. Árbol de distancias generado a partir de características morfológicas de las cepas aisladas de las 4 especies de orquídeas utilizando criterio aglomerativo WARD basado en distancias euclidianas y analizando su coeficiente de correlación cofenética en ambiente R V. 3.3. (Se muestran solo algunas de las cepas incluidas en cada grupo generado, se indican los cuatro grupos mayores generados, distancia D-A = 12.8).

Grupos generados:

Grupo A. Integrado por 18 morfotipos: M1, M34, M37, M85 a M90, M92, M93, M95 a M101. En este grupo quedaron incluidas las cepas con características afines a hongos micorrícicos orquídeoides, entre las que se destacan la formación de células moniloides, ángulos de ramificación en 90°, una ligera constricción en el punto de ramificación, no presentaron esporulación o formación

de cuerpos fructíferos, tuvieron una reacción negativa a la prueba enzimática de oolyphenyl oxidasas y presentaron aroma ligeramente cítrico (Fig. 6).

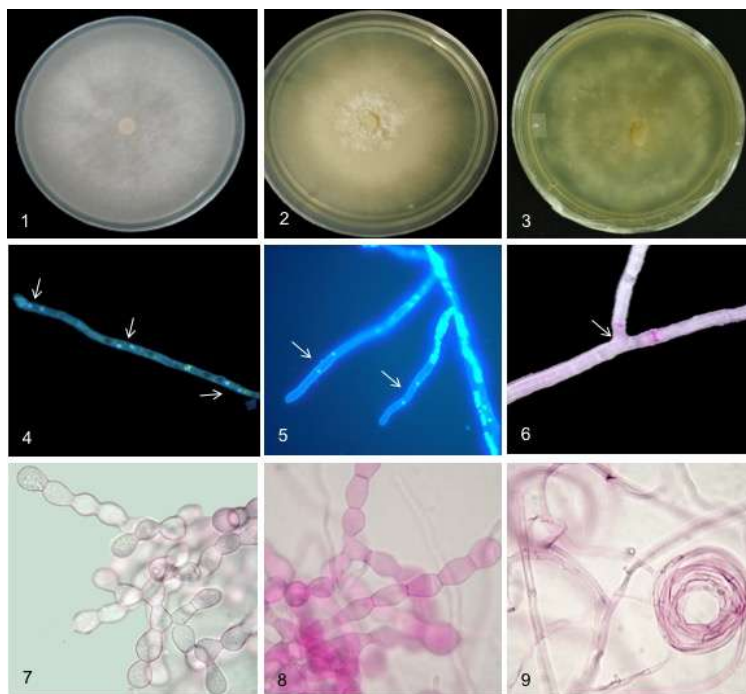


Figura 6. Características morfológicas de grupo A. Imágenes 1, 2 y 3: apariencia de la colonia (M86, M1 y M90 respectivamente). Imágenes 4 y 5: hifas binucleadas M1 y M90 (aumento 100x). Imagen 6: constricción en el punto de ramificación M98 (100x). Imágenes 7 y 8: células moniloides M1 y M90 (aumento 100x), (imagen 8 teñida con fucsina ácida). Imagen 9: enrollamientos hifales en M96 (tinción con fucsina ácida, aumento 100x). (Fotografías: Beltrán-Nambo).

Grupos B y C. En estos grupos quedaron incluidas las cepas que en su mayoría tuvieron formación de ascosporas (Fig. 7-7 y 7-8), algunas con reacción enzimática positiva y apariencia de la colonia algodonosa como características distintivas. El grupo B con cepas de apariencia serosa a afelpada y crecimiento de las hifas sumergido a ligeramente aéreo, con coloraciones gris verdosas (3/1 2.5Y) o pardo-rojizas (6/4 10YR) y reacción enzimática positiva. Tasas de crecimiento de 2 a 3 mm / día. Se incluyeron en este grupo 121 morfotipos (algunos ejms. M3, M4, M9, M17, M25, M35, M39, M40, M43, M47-M50, M60-M61, M65-M68, M73, M77) Fig. 7-1, 7-2 y 7-6). El grupo C quedo integrado por morfotipos de colonias con apariencia de afelpada a muy algodonosa y por lo tanto micelio de crecimiento aéreo, la coloración de la colonia fue blanca (8/2 5Y)

aunque en ocasiones mezcladas con tonalidades grisáceas (3/1 2.5Y) y reacción enzimática negativa, sus tasas de crecimiento mayores a 3 mm / día. Los miembros de estos subgrupos presentaron hifas de 2 a 4 μm de diámetro (Fig. 7-3 a 5). En este grupo se incluyeron 147 morfotipos (M16, M18, M29, M33, M41-42, M44-M46, M51-M54, M56, M57, M59, M74-M75, M78-79, M83, M94, M102, entre otros).

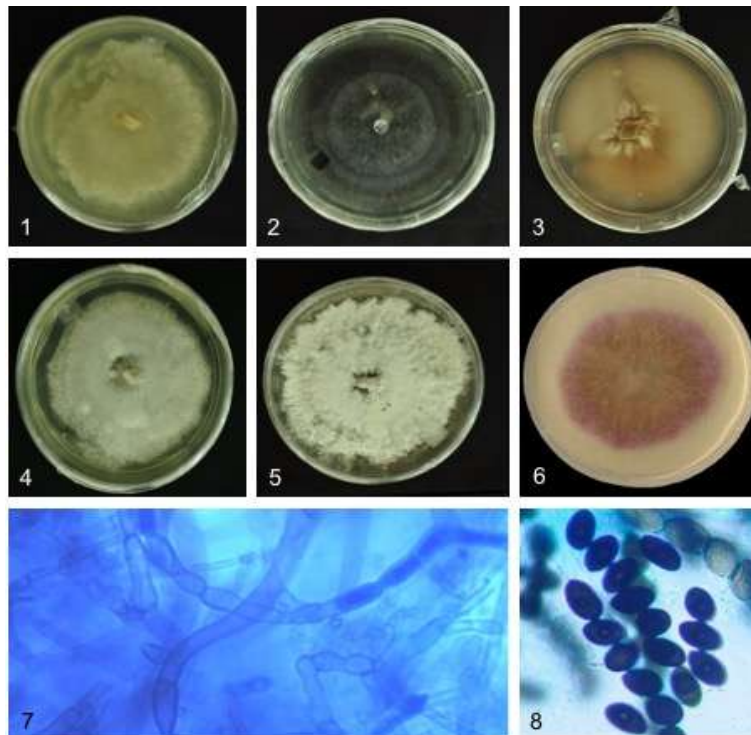


Figura 7. Características morfológicas de los grupos B y C. Imágenes 1-3: apariencia de la colonia serosa y coloración crema, pardo, rojiza u oliva (M77, M4 y M51). Imágenes 4-6: apariencia de la colonia de afelpada a algodonosa (M47, M83 y M82). Imágenes 7 y 8: apariencia de las hifas y formación de ascoporas. (Fotografías: Beltrán-Nambo).

Grupo D. Este grupo presentó como característica distintiva la formación de cuerpos fructíferos y esporulación con formación de basidiosporas. La apariencia de la colonia varió de ligeramente serosa a afelpada u algodonosa. Células alargadas no moniloides de 10 a 15 μm de largo (Fig. 8). El grupo incluyó 13 morfotipos (M15, M38, M55, M62, M103 al M111).

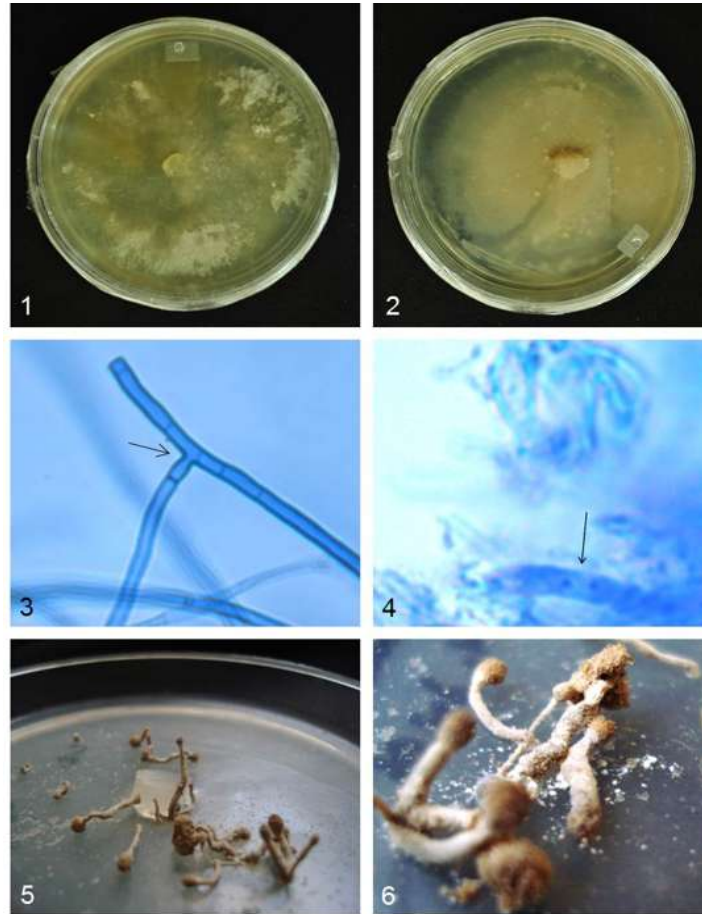


Figura 8. Características morfológicas del grupo D. Imágenes 1 y 2: apariencia de la colonia (M38 izquierda y M15 derecha). Imagen 3: Presencia de constricción el punto de ramificación semejante a grupo A (M38) (100x; tinción con azul de tripano). Imagen 4: hifas binucleadas (M15) (100x; tinción con azul de tripano) y formación de enrollamientos (al fondo). Imágenes 5 y 6: formación de cuerpos fructíferos (M15 y M62). (Fotografías: Beltrán-Nambo).

Determinación molecular. De los 299 hongos aislados se seleccionaron 100 de ellos para su determinación molecular. Debido a que los grupos A y D estaban integrados por pocos individuos, se decidió incluir a todos sus miembros en el análisis (18 y 13 respectivamente); se seleccionaron 34 aislados del grupo B, y 35 muestras se tomaron del grupo C. Se obtuvo la identidad de 85 morfotipos (18 del grupo A, 28 del grupo B, 35 del grupo C y 4 del grupo D), los cuales se enlistan en la Tabla 5. Se identificaron 23 géneros de hongos, de los cuales 5 corresponden a basidiomicetos, incluidos dos micorrícicos de orquídeas (*Tulasnella* y *Serendipita*), los 14 restantes son géneros de hongos ascomicetos.

Tabla 5. Identidad de los morfotipos secuenciados. Se muestra la clave de los morfotipos y el porcentaje de identidad que tuvieron con secuencias de Genbank, de las que se proporciona No. de acceso.

CLAVE	GRUPO	IDENTIDAD GENBANK	No. DE ACCESO	% IDENTIDAD	CLAVE	GRUPO	IDENTIDAD GENBANK	No. DE ACCESO	% IDENTIDAD
M1	A	<i>Tulasnella</i> sp	EF393628.1	97	M60	B	<i>Chaetomium</i> sp.	JN650595.1	99
M3	B	<i>Trichoderma viridarium</i>	KJ482545.1	100	M61	B	<i>Ascomycete</i>	AY273301.2	90
M4	B	<i>Micorrhiza o Russula</i>	EU880593.1	97	M62	D	<i>Coprinus</i> sp.	GU234153.1	90
M9	B	<i>Trichoderma viridae</i>	KM357288.1	100	M63	C	<i>Hypocreales</i>	AB734785.1	98
M15	D	<i>Coprinus</i> sp.	AB071802.1	90	M64	B	<i>Endófito</i>	KF436342.1	99
M16	C	<i>Muscador albus</i>	AY927993.1	99	M65	B	<i>Chaetomium</i> sp.	GU934508.1	99
M17	B	<i>Chaetomium nigricolor</i>	EU543258.1	99	M66	B	<i>Chaetomium</i> sp.	JN168655.1	99
M18	C	<i>Xylaria enteroleuca</i>	KR534721.1	99	M67	B	<i>Trichoderma atroviride</i>	KU942400.1	99
M19	B	<i>Sordariomycete</i>	KF709550.1	99	M68	B	<i>Trichoderma viride</i>	HM776435.1	99
M25	B	<i>Trichoderma rossicum</i>	KR995113.1	99	M69	C	<i>Hypocreales</i>	JQ411376.1	97
M26	C	<i>Preussia minima</i>	KY124642.1	99	M70	C	<i>Hypocreales</i>	JQ411376.1	97
M27	C	<i>Neofabreae actinidiae</i>	KU194425.1	99	M71	B	<i>Paecilomyces inflatus</i>	HQ631041.1	93
M28	B	<i>Sordariomycete</i>	JF720035.1	97	M72	C	<i>Endófito</i>	EU686200.1	99
M29	C	<i>Sordariomycete</i>	GQ153245	99	M73	B	<i>Trichoderma viride</i>	KU727807.1	84
M32	B	<i>Sordariomycete</i>	FN386298.1	99	M74	C	<i>Helotiales</i>	JX317139.1	99
M33	C	<i>Hypocreales</i>	AB734785.1	98	M75	C	<i>Muscador albus</i>	AY927993.1	100
M34	A	<i>Tulasnella</i> sp	EF393627.1	97	M76	C	<i>Ascomycete</i>	EF672300.1	92
M35	B	<i>Paecilomyces inflatus</i>	GU566291.1	97	M77	B	<i>Trichoderma rossicum</i>	KR995112.1	99
M36	C	<i>Cephalotea</i> sp.	EU823315.1	98	M78	C	<i>Preussia minima</i>	KY124642.1	100
M37	A	<i>Tulasnella calospora</i>	JQ247558.1	98	M79	C	<i>Preussia minima</i>	KY124642.1	99
M38	D	<i>Clitopilus giovanellae</i>	EF413030.1	79	M80	C	<i>Alternaria alternata</i>	MF141012.1	100
M39	B	<i>Fusarium tricinctum</i>	KR011974.1	99	M81	B	<i>Unculture</i>	KP889967.1	99
M40	B	<i>Trichoderma viride</i>	KU202216.1	99	M82	B	<i>Fusarium</i> sp.	EU860071.	99
M41	C	<i>Nemania</i> sp.	JQ761655.1	98	M83	C	<i>Xylaria</i> sp.	KR154920.1	100
M42	C	<i>Ascovirgaria occulta</i>	AB740957.1	98	M84	B	<i>Trichoderma rossicum</i>	KY764880.1	100
M43	B	<i>Fusarium tricinctum</i>	KP137448.1	99	M85	A	<i>Tulasnella calospora</i>	GU166407.1	96
M44	C	<i>Xylaria</i> sp.	KU747662.1	99	M86	A	<i>Serendipita</i> sp.	HQ154256.1	95
M45	C	<i>Preussia minima</i>	KY124642.1	99	M87	A	<i>Tulasnella calospora</i>	GU166407.1	87
M46	B	<i>Sordariomycete</i>	FJ524322.1	96	M88	A	<i>Trichocladium opacum</i>	KX611533.1	88
M47	B	<i>Trichoderma viridae</i>	KX099655.1	99	M89	A	<i>Trichocladium</i> sp.	KM062090.1	86
M48	B	<i>Fusarium tricinctum</i>	KR011974.1	100	M90	A	<i>Trichocladium</i> sp.	KM062090.1	88
M49	B	<i>Sordariomycete</i>	HM123351.1	99	M91	B	<i>Colletotrichum</i> sp.	KP127992.1	85
M50	B	<i>Trichoderma viride</i>	AF456921.1	99	M92	A	<i>Trichocladium</i> sp.	KM062090.1	89

M51	C	<i>Helotiales</i>	<u>HQ207039.1</u>	99	M93	A	<i>Trichocladium opacum</i>	<u>KX611533.1</u>	84
M52	C	<i>Xylaria sp.</i>	<u>HQ130668.1</u>	98	M94	C	<i>Xylaria sp.</i>	<u>KJ512146.1</u>	99
M53	C	<i>Preussia minima</i>	<u>KY124642.1</u>	99	M95	A	<i>Trichocladium sp.</i>	<u>KM062090.1</u>	90
M54	C	<i>Preussia minima</i>	<u>KY124642.1</u>	99	M96	A	<i>Morchella sp.</i>	<u>KP670940.1</u>	85
M55	D	<i>Preussia cymatomera</i>	<u>HQ607896.1</u>	99	M97	A	<i>Tulasnella calospora</i>	<u>FJ613176.1</u>	98
M56	C	<i>Lachnum sp.</i>	<u>AB847053.1</u>	99	M98	A	<i>Serendipita vermifera</i>	<u>JQ711842.1</u>	98
M57	C	<i>Nemania sp.</i>	<u>KP133226.1</u>	99	M99	A	<i>Tulasnella calospora</i>	<u>AB369939.1</u>	99
M58	B	<i>Spegazzinia sp.</i>	<u>FN394703.1</u>	97	M100	A	<i>Tulasnella calospora</i>	<u>AY373286.1</u>	98
M59	C	<i>Virgaria nigra</i>	<u>AB670712.1</u>	99	M101	A	<i>Tulasnella calospora</i>	<u>HQ889722.1</u>	98
					M102	C	<i>Neofabreae actinidiae</i>	<u>KU194425.1</u>	99

Alineamiento taxonómico y relaciones filogenéticas. Debido a que no en todas las muestras identificadas se pudo realizar el consenso de las secuencias en ambos sentidos y a que algunas de ellas coincidieron en identidad, para el análisis filogenético se seleccionaron 54 de los hongos identificados. Se generaron dos árboles, en uno se incluyó a los hongos del phylum Basidiomycota (Fig. 9) y en el otro quedaron integrados los hongos que mostraron identidad con el phylum Ascomycota (Fig. 10).

En el grupo de los basidiomicetos los morfotipos que mostraron identidad con el género *Serendipita* (M86 y M98) quedaron separados de las secuencias de referencia seleccionadas y se alinearon con una especie del género *Russula*. En el caso de los morfotipos identificados como *Tulasnella calospora*, dos mostraron cercanía con *Tulasnella deliquescens* (M37, M85 y M87) y tres más con *T. brifons* (M97, M99 y M101), el resto quedó como un clado aparte (Fig. 9).

En el caso de los ascomicetos la mayoría de los morfotipos quedaron alineados con las secuencias de referencia con las que mostraron identidad y sus relaciones concuerdan con lo citado en la literatura, quedando en las ramas inferiores géneros como *Lachnum*, *Morchella* y *Neofabrea*. Algunas excepciones fueron el morfotipo 96 que mostró identidad con *Morchella* pero quedo relacionado con el género *Trichocladium* y el M91 cuya identidad fue afín a *Colletotrichum* pero se relacionó con *Paecilomyces* y *Chaetomium* en el análisis filogenético (Fig. 10).

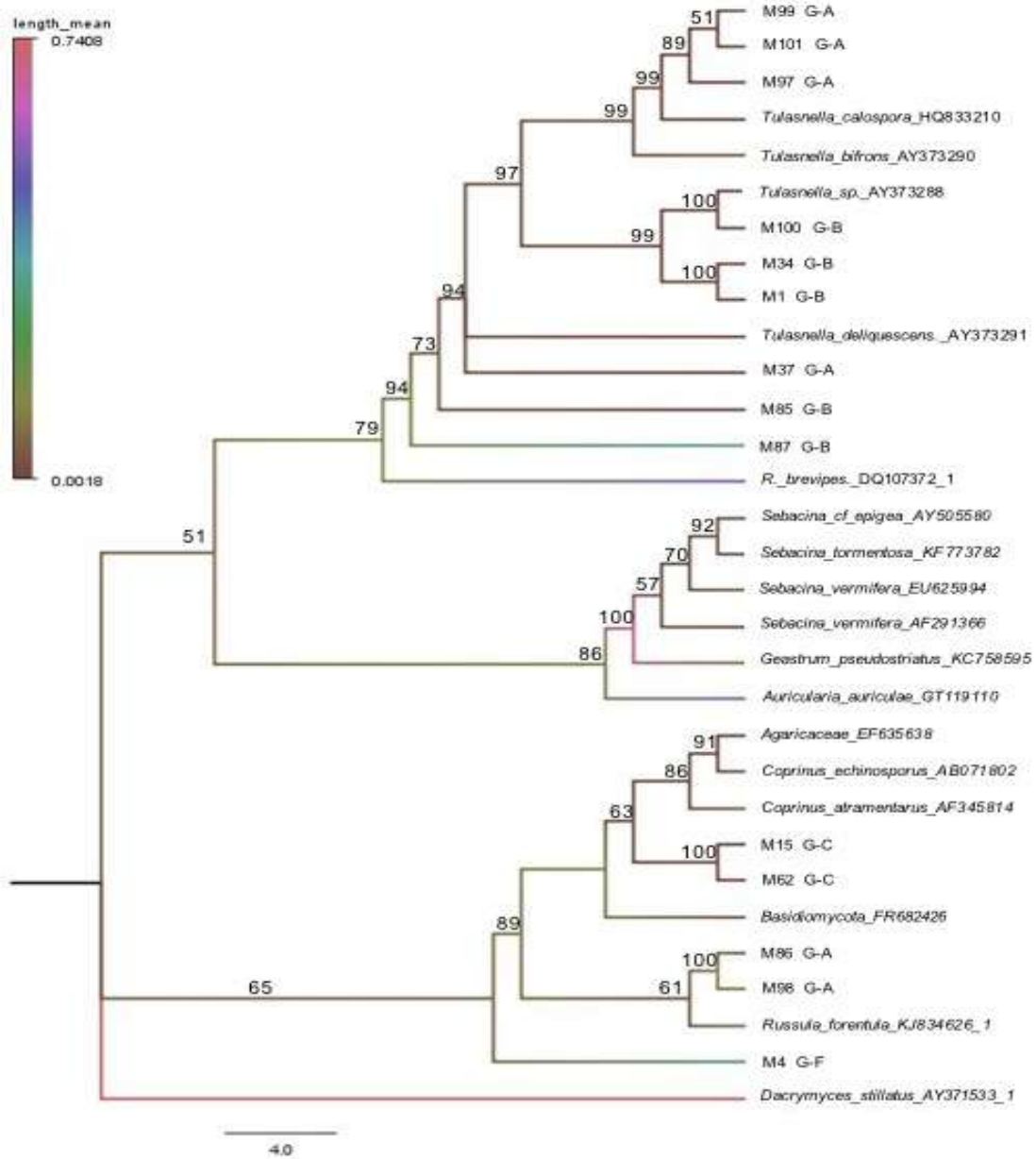


Figura 9. Árbol de inferencia filogenética del grupo de basidiomicetos identificados en este estudio, generado por análisis de máxima parsimonia (IC = 0.64, IR = 0.85, CR = 0.56) y ratificado mediante análisis Bayesiano. Los nodos con soporte estadístico muestran probabilidad posterior y se señalan las relaciones entre las secuencias generadas en este estudio y los grupos obtenidos con el análisis morfológico (indicados como G) (Se indican las secuencias de referencia de NCBI).

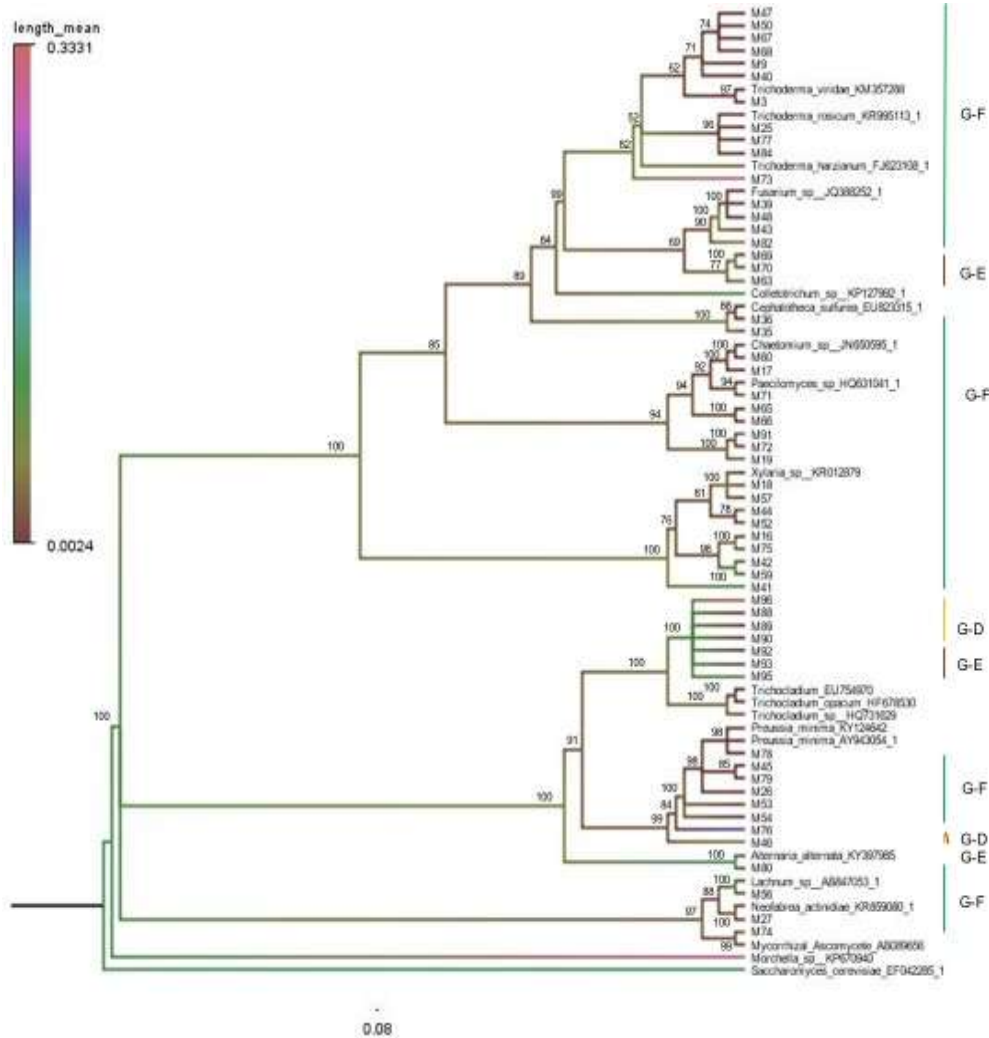


Figura 10. Árbol de inferencia filogenética del grupo de ascomicetos identificados en este estudio, generado por análisis de máxima parsimonia (IC = 0.54, IR = 0.81, CR = 0.43) y ratificado mediante análisis Bayesiano. Los nodos con soporte estadístico muestran probabilidad posterior y se señalan las relaciones entre las secuencias generadas en este estudio y los grupos obtenidos con el análisis morfológico (indicados como G) (Se indican las secuencias de referencia de NCBI).

Análisis de diversidad. Para comparar la diversidad de hongos presentes en las diferentes especies de orquídeas analizadas, las 299 cepas obtenidas fueron agrupadas por número de individuos de cada especie o género de hongo identificado (Tabla 6). El género fúngico dominante fue *Trichoderma* tanto en número de especies como de cepas aisladas y se aisló de las orquídeas del género *Laelia*.

Tabla 6. Distribución de los géneros fúngicos identificados en las especies de orquídeas estudiadas y número de cepas de hongos aislados en cada una de ellas.

ENDÓFITO		HOSPEDERO	L. <i>autmnalis</i>	L. <i>speciosa</i>	P. <i>squalida</i>	P <i>citrina</i>	B. <i>purpurata</i>	G. <i>lagenophora</i>	H. <i>flexuosa</i>		
DIVISIÓN	ORDEN	GÉNERO									Total
Basidiomycota (5)	Agaricales	<i>Clitopilus giovanealle</i>	2							2	
		<i>Coprinus</i> sp.	10							10	
	Russulales	<i>Micorrícico o Russula</i>	1							1	
	Tulasnellales	<i>Tulasnella calospora</i>	1	1	1		5	1		9	
	Serendipitale	<i>Serendipita vermifera</i>					1		1	2	
Ascomycota (14)	Eurotiales	<i>Paecilomyces inflatus</i>		1			1			2	
	Glomerellales	<i>Colletotrichum</i> sp	1							1	
	Helotiales	<i>Lachnum</i> sp.		4						4	
		<i>Neofabraea actinidia</i>	1			4				1	
		<i>Neofabraea</i> sp.								4	
		<i>Ascomiceto</i> sp.	14	1	4	2	2		2	25	
		<i>Trichoderma atroviride</i>		10						10	
	Hypocreales	<i>Trichoderma rossicum</i>		38						38	
		<i>Trichoderma viride</i>	24	4						28	
		<i>Trichoderma viridarium</i>	3							3	
		N/D	3		9					12	
		<i>Morchella</i> sp					1			1	
	Pezizales	<i>Alternaria alternata</i>		6						6	
		<i>Preussia minima</i>	8	6				3		17	
		<i>Preussia cymatomera</i>		2						2	
		<i>Chaetomium nigricolor</i>	7							7	
		<i>Chaetomium</i> sp.	5							5	
	Sordariales	<i>Cephalotheca</i> sp.						1		1	
		<i>Fusarium tricinctum</i>	1	2						3	
		<i>Fusarium</i> sp.		4						4	
		<i>Trichocladium opacum</i>	1				1			2	
		<i>Trichocladium</i> sp.	2				2			4	
		<i>Xylaria</i> sp.	7	19	4	3	10	6	2	51	
	Xylariales	<i>Xylaria enteroleuca</i>	2							2	
		<i>Ascovirgaria occulta</i>	22							22	
		<i>Muscodor albus</i>	7		1					8	
		<i>Nemania</i> sp.	3	4						7	
		<i>Virgaria nigra</i>		3						3	
		<i>Spegazzinia</i> sp.		1						1	
	Apiosporaceae	<i>Spegazzinia</i> sp.		1						1	
N/D			1						1		
Total de cepas		125	107	23	5	24	10	5	299		
Total géneros.		14	11	4	1	7	3	2			

Los resultados para la diversidad alfa, muestran que las especies de orquídeas con mayor riqueza y abundancia de hongos en sus raíces fueron las incluidas en el género *Laelia* que tuvieron una distribución amplia ya que estuvieron presentes en 3-6 sitios de muestreo y en las orquídeas terrestres fue *Bletia purpurata* presente en 5 sitios. Los índices de uniformidad señalan la existencia de especies fúngicas dominantes (Fig. 11a), como *T. atroviride*, *T. rossicum* y

Xylaria (de acuerdo con la cantidad de cepas aisladas y reportadas en la Tabla 6).

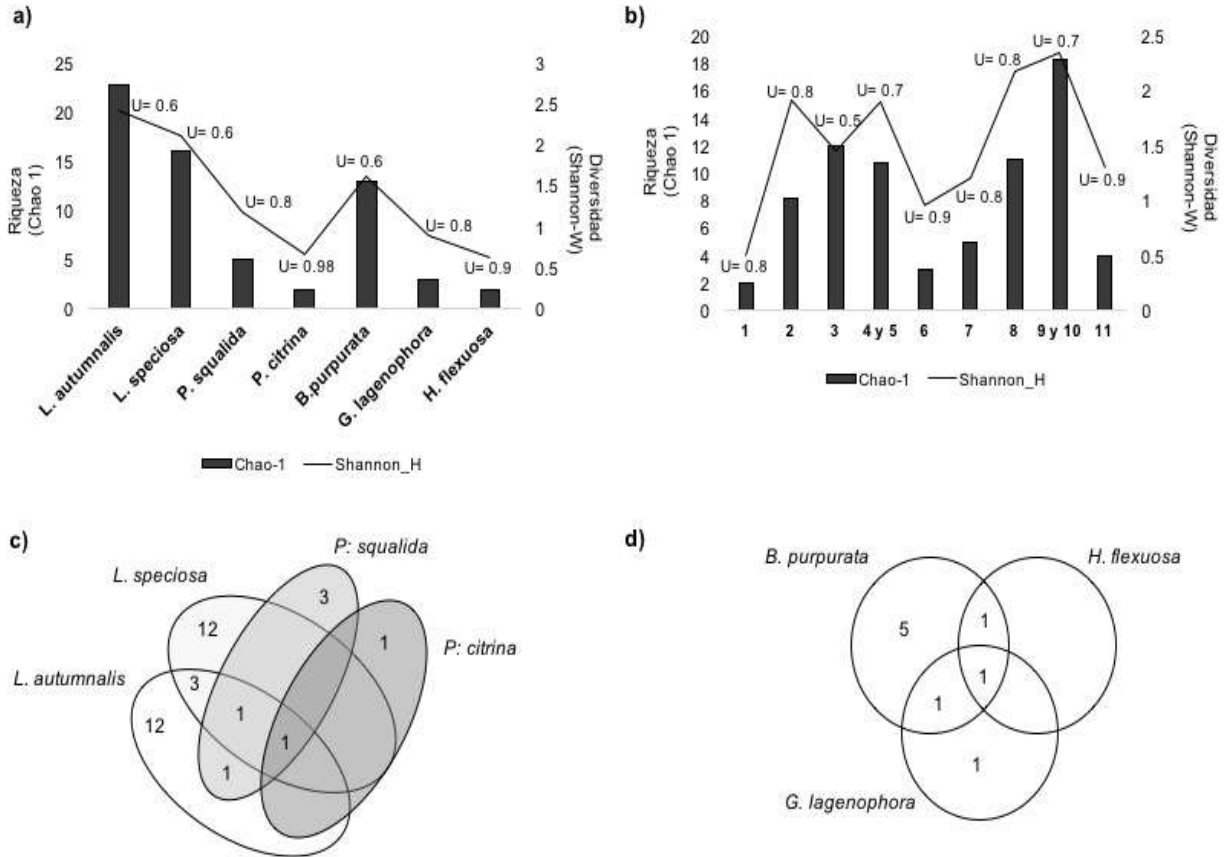


Figura 11. Diversidad alfa y especies fúngicas compartidas. a) Diversidad alfa fúngica en las 7 especies de orquídeas estudiadas; b) Diversidad alfa fúngica en los 11 sitios de muestreo; c) Diagrama de Venn que muestra número de especies fúngicas únicas y compartidas para cada especie de orquídea epífita; d) Diagrama de Venn que muestra número de especies fúngicas únicas y compartidas para cada especie de orquídea terrestre. (Riqueza calculada mediante índice de Chao 1, abundancia (estructura) calculada mediante índice de Shannon-W, U = índice de uniformidad).

Al realizar el análisis de diversidad alfa de hongos por sitio de muestreo se observa que la mayor riqueza y diversidad de especies fúngicas se presentó en los sitios 9 y 10 (San Andrés Coru) en donde se encontraron 6 de las 7 orquídeas analizadas y de manera inversa los sitios con menor riqueza de especies de hongos fueron el 1 y el 6 (Acuitzio y Cucuchucho) en donde se presentó una sola

especie de orquídea (*L. autumnalis*). Mientras que la menor uniformidad de especies se presentó en el sitio 3 (Cuanajillo) con *T. rossicum* como especie dominante (Fig. 11b). Debido a que el índice de Jackknife mostró resultados semejantes a Chao 1 no se reportan los resultados.

La diversidad beta general para las orquídeas muestreadas fue de 3.36 de acuerdo al índice de Whittaker calculado. Al analizar la diversidad beta entre pares de especies de orquídeas, se observa que las orquídeas del mismo género presentaron los valores más bajos de este índice y comparten especies fúngicas, como *L. autumnalis*, *L. speciosa* o *P. squalida* y *E. citrina*. También se observa que especies como *P. squalida* y *L. autumnalis* que se encontraron compartiendo sustrato con las orquídeas terrestres presentan valores bajos (Tabla 7). Las orquídeas terrestres mostraron índices semejantes entre ellas. Estos resultados se corroboran al analizar número de especies o géneros compartidos entre orquídeas (Fig. 11c y d). *T. calospora*, *P. inflatus* y *P. minima* son especies fúngicas presentes en orquídeas epífitas y terrestres.

Tabla 7. Diversidad beta de hongos entre las especies de orquídeas estudiadas, calculada en el programa PAST V. 3.17 (Se reportan los valores obtenidos con el índice de Whittaker).

	<i>L. autumnalis</i>	<i>L. speciosa</i>	<i>P. squalida</i>	<i>E. citrina</i>	<i>B. purpurata</i>	<i>G. lagenophora</i>
<i>L. autumnalis</i>	0					
<i>L. speciosa</i>	0.65	0				
<i>P. squalida</i>	0.74	0.79	0			
<i>E. citrina</i>	0.90	0.88	0.67	0		
<i>B. purpurata</i>	0.70	0.74	0.67	0.80	0	
<i>G. lagenophora</i>	0.73	0.67	0.43	0.60	0.64	0
<i>H. flexuosa</i>	0.90	0.88	0.67	0.50	0.60	0.60

Al realizar el análisis por sitio de muestreo, la diversidad beta global fue de 3.64. La diversidad beta encontrada se relacionó con la presencia de cada una de las especies de orquídeas en los sitios, ya que por ejm. El sitio 2, donde estuvieron presentes *L. autumnalis* y *L. speciosa* mostró menor índice de recambio con el sitio 1 del que se aisló *L. speciosa* y con el sitio 8 donde estuvo presente *L. autumnalis* o el sitio 6 con el sitio 8 (Tabla 8).

Tabla 8. Diversidad beta de hongos por sitio de muestreo, calculada en el programa PAST V.3.17 (Se reportan los valores obtenidos con el índice de Whittaker).

SITIOS	Acuitzio (1)	Oponguio (2)	Cuanajillo (3)	Sta Fe (4 y 5)	Cucuchucho (6)	Tingambato (7)	Coeneo (8)	San Andrés (9 y 10)
Acuitzio (1)	0							
Oponguio (2)	0.60	0						
Cuanajillo (3)	0.82	0.88	0					
Sta Fe (4 y 5)	0.67	0.78	0.79	0				
Cucuchucho (6)	1.00	0.82	0.83	0.85	0			
Tingambato (7)	0.33	0.69	0.85	0.57	1.00	0		
Coeneo (8)	1.00	0.68	0.70	0.90	0.57	1.00	0	
San Andrés (9 y 10)	0.76	0.74	0.75	0.68	0.78	0.68	0.62	0
Uruapan (11)	0.33	0.69	0.69	0.71	0.71	0.50	0.87	0.68

Las curvas de acumulación de especies de las orquídeas epífitas indican que en el caso de *L. speciosa* se requiere un esfuerzo de muestro mayor, ya que el número de especies se incrementará si se expanden los sitios de muestreo (Fig. 12b). Y la curva para los sitios de colecta nos indica que el esfuerzo de muestreo también fue adecuado ya que la curva obtenida fue asintótica, lo que indica que el número de especies permanecerá constante aún si se aumentan los muestreos (Fig. 12d).

Para las orquídeas terrestres los análisis señalan que para *G. lagenophora* y *H. flexuosa* se requiere un esfuerzo de muestro mayor (Fig. 13b y c), mientras que para *B. purpurata* el tamaño de muestra fue suficiente (Fig. 13a). Y la curva para la los sitios de colecta nos indica que el esfuerzo de muestreo fue adecuado (Fig. 13d).

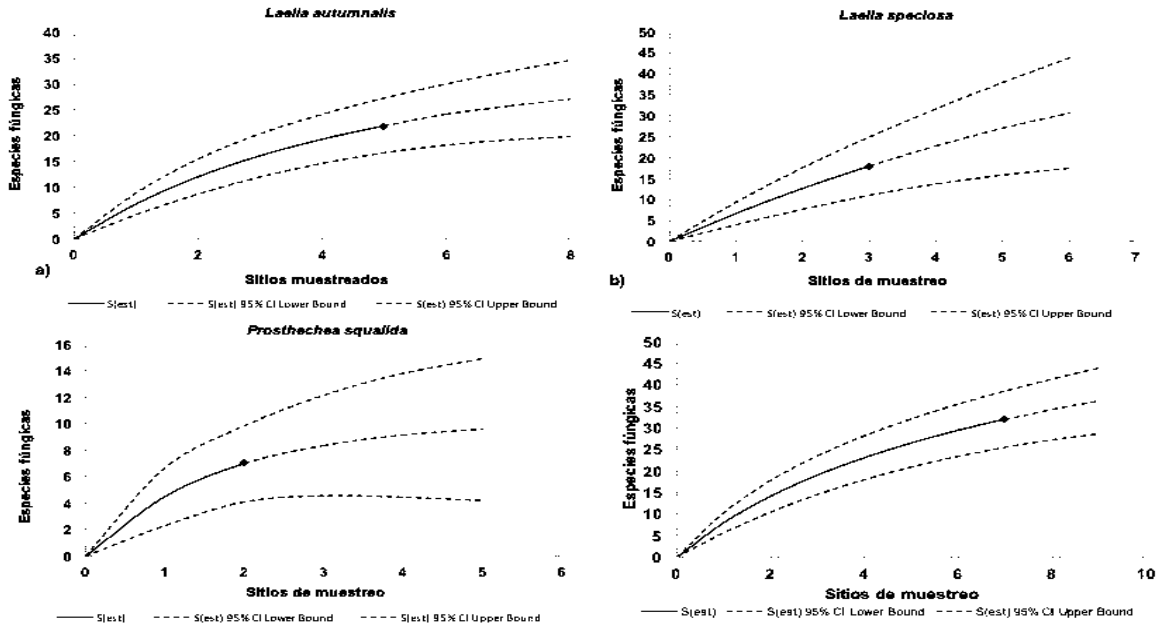


Figura 12. Curvas de acumulación de las especies de orquídeas epífitas. Resultados obtenidos para las 4 especies de orquídeas epífitas analizadas (se muestran los intervalos de confianza). a) *L. autumnalis*, b) *L. speciosa*, c) *P. squalida*, d) resultado obtenido de especies fúngicas por cantidad de sitio de muestreos, sin considerar orquídea de procedencia.

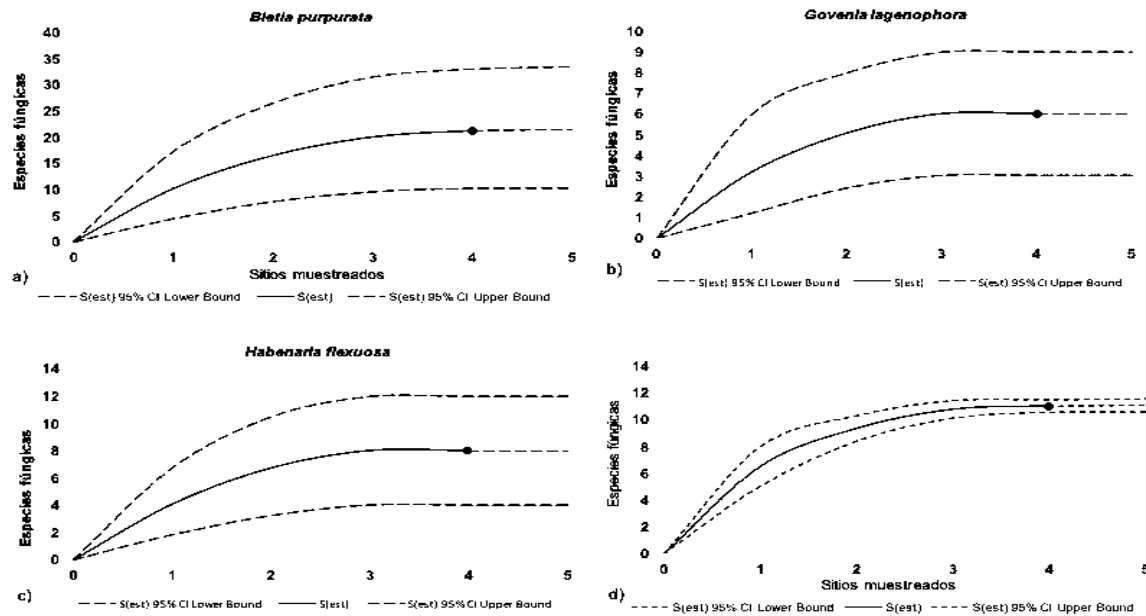


Figura 13. Curvas de acumulación de las especies de orquídeas terrestres. Resultados obtenidos para las 4 especies de orquídeas terrestres analizadas (se muestran los intervalos de confianza) y cantidad de sitios de muestreo. a) *B. purpurata*, b) *G. lagenophora*, c) *H. flexuosa*. d) resultado obtenido de especies fúngicas por cantidad de sitio de muestreos, sin considerar orquídea de procedencia.

I.4. Discusión

Aislamiento fúngico y rareza de orquídeas. La mayor cantidad de aislamientos fúngicos obtenidos en este trabajo procedieron de *L. autumnalis* y *L. speciosa*. Es de considerar que *L. autumnalis* estuvo presente en cinco de los nueve sitios de colecta con poblaciones grandes mientras que la especie *E. citrina* sólo se localizó en San Andrés Coru (sitio 10). Aunque el número de plantas muestreadas fue un factor importante en el número de hongos obtenidos (Kassem & Nanniperi, 1995), se reporta que existen otros factores que influyen en el aislamiento de algunos hongos como los requerimientos especiales que pueden tener algunas especies y que les impide desarrollarse en medios de cultivo estándar (Garden & Whitbeck, 2007) y la sensibilidad que tienen algunos microorganismos hacia los cambios ambientales (Gadd et al., 2007). La suma de los aislados obtenidos de *H. flexuosa*, la cual se localizó en 4 de los 11 sitios estudiados y de la que se muestrearon plantas en la misma proporción que las demás especies de orquídea, es similar a lo obtenido de *E. citrina*. Las especies de plantas que son críticamente dependientes de sus simbiositos son más selectivas y sensibles que otras durante el establecimiento de la asociación, por lo que se deduce que esto tiene un mayor impacto en el éxito de colonización y establecimiento, lo que deriva finalmente en la rareza de algunas especies (Bonnardeaux et al., 2007; Otero et al., 2013; Roche et al., 2010; Swarts et al., 2010; Waud et al., 2017). *E. citrina* es una especie en categoría de riesgo que se desarrolla en hábitats con deterioro y sólo se aislaron dos morfoespecies fúngicas de sus raíces. *H. flexuosa* es una especie de la cual se desconoce con certeza su distribución, ambas endémicas de México.

Identidad de los hongos y su posible función ecológica. En el grupo A se identificaron dos géneros de hongos micorrícicos *Tulasnella calospora* (aislado de 5 especies de orquídeas) y *Serendipita vermifera* (aislado de 2 orquídeas terrestres). Estos géneros son ampliamente reportados, junto con *Ceratobasidium* (Jacquemyn et al., 2017), como géneros micorrícicos de diferentes especies de orquídeas de la subtribu Laeliinae (en la que se incluyen la mayoría de las orquídeas analizadas) y su función en los procesos

germinativos y de desarrollo de estas plantas es bien conocido (Ding et al., 2014; Linde et al., 2014; Pereira et al., 2014; Phillips et al., 2014). En México, así como en Centroamérica y Sudamérica, *Tulasnella* se reporta principalmente asociado a algunas orquídeas rupícolas, epífitas y terrestres como *Epidendrum*, *Coppensia*, *Cypripedium*, *Vanilla*, *Acyneta*, *Bletia* y *Oncidium* (Otero et al., 2004; Almeida et al., 2007; Cruz-Blasí, 2007; Beltrán-Nambo et al., 2010; Moreno-Martínez, 2011; Jacinto-Hernández & Ortega-Larrocea, 2013; Rendón-Lara et al., 2013; Nogueira et al., 2014; Montes, 2016; Segundo, 2016); *Serendipita* es un género que ha sido poco reportado asociado con orquídeas en América y en México y que a nivel mundial se reporta más frecuentemente formando ectomicorrizas, micorriza ericoides, cavendisiodes y con orquídea aclorofilicas (Basiewicz et al., 2012; Tedersoo et al., 2014; Garnica et al., 2016). El grupo A también incluyó a *Trichocladium*, en adición a los hongos micorrícicos; este género comprende 18 especies aceptadas (Teik-Khiang and Hyde, 1999), la mayoría de ellas saprobias de madera, corteza u otros tejidos vegetales y que también ha sido aislado del suelo. Aunque este género no es considerado micorrícico, muchas de sus especies se reproducen principalmente de manera asexual y al menos en dos especies consideradas benéficas (*Trichocladium lignicola* I. Schmidt y *T. opacum*) se ha observado la formación de células tipo monilioides (Teik-Kiang & Hyde, 1999) y por esta razón el análisis aglomerativo lo incluyó en el grupo A. En América este género se ha encontrado en plantas como *Fraxinus*, *Quercus*, *Psuedotsuga* y *Castanea* (Seidl, 2009), como los forofitos de este trabajo. Dado que los endófitos asociados a las orquídeas han sido poco estudiados se desconoce la función o el rol que muchos de ellos desempeñan al asociarse con estas plantas (Rodríguez et al., 2009).

Muchos de los hongos identificados en este trabajo fueron no micorrícicos. En el phylum Ascomycota (grupos B y C) se encontraron grupos muy diversos que incluyen organismos patógenos como *Fusarium*, *Alternaria*, *Colletotrichum* y *Neofabraea*; ectomicorrícicos como *Morchella*; endófitos considerados benéficos o sinérgicos como *Trichoderma*, *Preussia*, *Chaetomium*, *Cephalotheca*, *Paecilomyces*; y saprobios como *Trichocladium*, *Lachnum* y *Xylaria*. Entre los

géneros de endófitos más ampliamente reportados en orquídeas se encuentran *Xylaria*, *Trichoderma* y *Colletotrichum* (Ávila-Díaz et al., 2013; Gamboa-Gaitán y Otero-Ospina, 2016; Almanza-Álvarez et al., 2017). En este trabajo los géneros dominantes fueron *Trichoderma* y *Xylaria*, tanto en número de especies como de aislados y fueron mayormente aislados de *L. speciosa* y *L. autumnalis*. Se considera que estos géneros estimulan la producción de auxinas o actúan de manera antagónica con otros organismos que pudieran dañar a las especies de plantas (Rivera-Orduña et al., 2011). Se ha sugerido que el reemplazo del complejo *Rhizoctonia* por hongos ectomicorrícicos u otros endófitos puede ser una estrategia de las orquídeas porque estos hongos son más estables para asegurar el acceso a carbohidratos y nutrientes (Stark et al., 2009). Xiaoya y colaboradores (2015) señalan que existen más de 100 géneros de endófitos no micorrícicos reportados en orquídeas que incluyen órdenes como Sordariales, Hypocreales, Pleosporales; Xylariales e incluso Pezizales y que pueden estar asociados con orquídeas distantes taxonómicamente pero que se encuentran en el mismo sitio, en este estudio algunas especies de orquídeas que compartían la misma localidad se encontraron asociadas con los mismos géneros identificados, como *L. autumnalis* que comparte dos localidades con *P. squalida* (San Andrés y Coeneo - sitios 8, 9 y 10) y se encontraron compartiendo géneros como *Neofabraea*, *Trichoderma*, *Xylaria* y *Tulasnella*. Algunas secuencias únicamente fueron identificadas a nivel de subdivisión y otras como hongos no cultivados por lo que, como mencionan otros autores, pudiera tratarse de nuevas especies que aún no han sido aisladas en cultivos axénicos u hongos cuyas secuencias no han sido depositadas en las bases de datos (Oliveira et al., 2013).

El grupo D incluyó a morfotipos que esporularon y/o tuvieron formación de cuerpos fructíferos y que el análisis molecular identificó como *Coprinus* y *Clitopilus*. Algunos estudios señalan que algunas orquídeas pueden ser micorrizadas por hongos no incluidos en el complejo *Rhizoctonia*, como *Coprinus* y *Russula* (Kikuchi et al., 2008; Osgura-Tsujita et al., 2009), incluso *Coprinus* ha sido reportado como micorrícico de especies de orquídeas como *Epipogium roseum* (Yamato et al., 2005). Existen estudios que señalan la función que

desempeñan los hongos como puente de comunicación entre varias plantas cumpliendo diferentes funciones, como promover la germinación (Dearnaley et al., 2012; Rasmussen et al., 2015; Marmeisse & Girlanda, 2016).

Relaciones filogenéticas de los hongos aislados. Al analizar los árboles filogenéticos elaborados se puede observar en el grupo de los basidiomicetos que los morfotipos 15 y 62 identificados como *Coprinus* de acuerdo a la base de datos de GenBank quedaron relacionados con secuencias de este género pero en un clado aparte al de las especies de referencia incluidas, por lo que es posible que se trate de una especie diferente. En el caso de los morfotipos 86 y 98 identificados como *Serendipita* se puede observar que no mostraron relación con las secuencias de referencia seleccionadas y quedaron alineadas con *Russula foetentula*. En la literatura se habla de que el orden Sebaciales es un grupo muy diverso que ha sufrido procesos de diversificación muy recientes, sobre todo en América y que por esta razón resulta difícil establecer adecuadamente sus relaciones filogenéticas, sin embargo se considera un grupo ancestral de los basidiomicetos (Basiewicz et al., 2012; Garnica et al., 2016), también se menciona que debido a que forman micorrizas de diferentes tipos y con diferentes familias de plantas han existido procesos de diversificación de forma que no pueden ser fácilmente identificados utilizando las regiones ITS (Tedersoo et al., 2014).

Por otra parte también se reporta que existe un alto número de errores en la asignación taxonómica de secuencias de genes de la región ITS del rDNA que están depositadas en las bases de datos internacionales y que más del 20% de las secuencias de hongos presentan errores en la asignación del linaje en estas bases, debido a la ocurrencia de especies crípticas (Bidartondo et al., 2008; Bueé et al., 2009). En el grupo de las “Tulasnellas” se puede observar que aunque todos los morfotipos mostraron identidad con *Tulasnella calospora* en las bases de datos, en el alineamiento tres de estos (37, 85 y 87) quedaron más relacionados con *T. deliquescens*, tres más (97, 99, 101) con *T. calospora* y cercanos a *T. bifrons* y tres en un clado aparte. *T. deliquescens* y *T. bifrons* se han encontrado asociadas a otras orquídeas terrestres fotosintéticas de Canadá

y Norte América como *Tripularia discolor* y *Goodyera pubescens* principalmente en bosques de pino- encino (McCormick et al., 2004, Rasmussen & Rasmussen 2007), al igual que las zonas de colecta en este trabajo. McCormick & colaboradores (2014) señalan que las asociaciones micorrícicas de muchas orquídeas han corroborado que los hongos simbiosntes pueden exhibir un amplio rango de distribución y son capaces de adaptarse a diferentes condiciones ambientales. De manera que aunque los morfotipos mencionados presentaron identidad con el género *Tulasnella* quedaron separados en clados relacionados con otras especies como en otros trabajos realizados en Sur América (Suárez et al., 2006; Xing et al., 2013; Pereira et al., 2014; Suárez & Kottke, 2016).

En cuanto al grupo de los ascomicetos como ya se mencionó en la sección de resultados, la mayoría de los morfotipos se relacionaron con las especies que mostraron identidad y la relación de las ramas en el árbol, salvo algunas excepciones, es congruente con la historia evolutiva de estos hongos que se ha reportado, en donde colocan como grupos más ancestrales a los Pezizales en donde se ubica a *Morchella* y a los *Helotiales* donde se incluyen *Lachnum* y *Neofabrea* y después a los Sordariales (Hibbet et al., 2007; Prieto & Wedin, 2013; Drozhinina y Kiubicek 2016), esto confirma lo que señalan algunos autores acerca de que las secuencias ITS pueden ser utilizadas como secuencias estándar para identificar hongos porque estas regiones poseen la habilidad de resolver secuencias estrechamente relacionadas con alta posibilidad de éxito en su secuenciación (Schoch et al., 2012; Suwannasai et al., 2013).

Diversidad fúngica y distribución de las orquídeas. Los índices de diversidad de Shannon-Wiener obtenidos en este estudio entre orquídeas y entre sitios de muestreo son semejantes o ligeramente más bajos a los reportados en otros estudios para orquídeas terrestres y epífitas y cuyos rangos van de 1.3 a 3.5 (Tao et al., 2008; Stark et al., 2009) y de acuerdo con los resultados de diversidad beta, se observó que la diversidad de especies fúngicas en los sitios de muestreo estuvo relacionada con la riqueza de orquídeas y con la presencia de ciertas especies de orquídeas. Las especies del género *Laelia* son evidentemente capaces de mantener diversas especies fúngicas en sus raíces y

esta habilidad puede ser una ventaja significativa ya que incrementa la oportunidad de establecer una asociación con cualquier especie de hongos que este presente o de obtener algunos beneficios en un sitio determinado, y por lo tanto la probabilidad de que las semillas comiencen a germinar o mejorar sus procesos de dispersión (Waud et al., 2017). *L. autumnalis* no sólo mostró los valores más altos de riqueza y diversidad de las comunidades fúngicas, sino que también fue la especie con mayor cubrimiento territorial. Esto confirma lo que se ha mencionado sobre algunas especies de orquídeas, en las que su talento adaptativo para dispersarse y colonizar nuevos ambientes está relacionado con su capacidad de interactuar con una mayor variedad de hongos, para ganar ventaja en los sustratos donde se desarrollan y probablemente en variaciones estacionales (Ercole et al., 2015; Waud et al., 2016). En adición, su plasticidad para cambiar de socio fúngico, asegura su supervivencia durante diferentes etapas de su ciclo de vida o condiciones ambientales (Rasmussen et al., 2015). Algunos investigadores señalan que las orquídeas raramente se ven limitadas por la disponibilidad del socio fúngico apropiado a una escala geográfica. Las orquídeas analizadas se asociaron localmente con muchos socios fúngicos diferentes a lo largo de su rango de distribución, y permitió que permanecieran como ecológicamente generalistas. En ese patrón, la asociación con hongos raros también podría hacer que las especies de orquídeas sean más susceptibles a la disminución, incluso a pequeña escala (Bailarote et al., 2012; McCormick and Jacquemyn, 2014), como lo observado con *E. citrina*.

La literatura menciona que las orquídeas epífitas parecen depender menos de la asociación con hongos que las orquídeas terrestres sin embargo esto parece estar más relacionado con su menor especificidad hacia el establecimiento de procesos simbióticos mientras que en las orquídeas terrestres parecen existir procesos de segregación que están mediados por sus interacciones con grupos diferentes de simbioses de manera que aseguran la obtención de nutrientes al utilizar diferentes hongos evitando la competencia y permitiendo su coexistencia (Bayman y Otero, 2006; Jacquemyn et al., 2014). Los resultados corroboran esto ya que si se compara esta misma diversidad entre orquídeas terrestres y epífitas

se puede observar que con excepción de *E. citrina* las especies epífitas registraron valores más altos para los índices de diversidad alfa probados.

La distribución geográfica de los hongos varió en el área de estudio, lo cual es un factor importante a considerar cuando se quieren establecer programas de conservación ya que como se puede observar, existen especies de orquídeas menos específicas hacia la asociación que se pueden desarrollar de manera exitosa en diferentes hábitats al asociarse con diferentes hongos pero existen otras orquídeas en las que la ausencia del simbiote adecuado en un sitio podría afectar su capacidad adaptativa y de dispersión. En este trabajo, especies como *L. autumnalis*, *L. speciosa* y *P. squalida* parecen ser más generalistas hacia los endófitos con los que se asocian aun cuando son especies endémicas de México, que sin embargo se encuentran bien distribuidas en la zona centro y sur del país mientras que otras parecen ser más específicas como *E. citrina* y *H. flexuosa*. Situación que se ha reportado para especies con alto grado de endemismo (Swart et al., 2010).

I.5. Conclusiones

Se encontró variación en la diversidad fúngica en las 7 especies de orquídeas analizadas. Esta diversidad fue más alta en las orquídeas epífitas, habiendo una mayor diversidad de hongos en *L. autumnalis*. Los índices de diversidad alfa y beta mostraron una relación entre la diversidad fúngica y las especies de orquídeas y/o los sitios en los que estas se desarrollan, siendo más homogénea entre especies cercanas y/o que comparten sustrato, y más heterogénea en sitios más alejados geográficamente.

Los hongos basidiomicetos que fueron identificados se reportan como hongos micorrícicos de orquídeas y/o de otros grupos de plantas, *Tulasnella calospora* se aisló de 5 de las especies estudiadas y *Serendipita* de 2, aunque la cantidad de individuos aislados fue baja para este grupo de hongos. Mientras que los hongos ascomicetos representaron un grupo muy diverso de hongos endófitos reportados como saprobios, endófitos benéficos o potencialmente patógenos, en donde los

géneros dominantes fueron *Xylaria* y *Trichoderma* con una gran abundancia de individuos aislados.

Los análisis filogenéticos corroboraron la identidad de los hongos aislados y la separación en diferentes clados del género *Tulasnella* en el grupo de los hongos micorrícicos.

En la etapa adulta, las especies de orquídeas mexicanas que son más generalistas hacia la asociación con hongos endófitos y micorrícicos se encuentran mejor distribuidas que aquellas en asociación con poca variedad fúngica. Las especies terrestres presentan asociaciones más específicas pero efectivas.

Parecen existir procesos de segregación que les permite a las orquídeas una mejor supervivencia y adaptación al asociarse con diferentes especies fúngicas cuando comparten sitios.

I.6. Referencias

- Almanza-Álvarez, J., Garibay-Origel R., Salgado-Garciglia, R. Fernández-Pavía S., Lappe-Oliveras P., et al., 2017. Identification and control of pathogenic fungi in neotropical valued orchids (*Laelia* spp.). *Tropical Plant Pathology* 42 (5), 339-351. DOI 10.1007/s40858-017-0171-3.
- Almeida, P.M., Van Den Berg C., Goes-Neto A. (2007). Morphological and molecular characterization of species of *Tulasnella* (Homobasidiomycetes) associated with Neotropical plants of Laeliinae (Orchidaceae) occurring in Brazil. *Lankesteriana* 7(1-2), 23-27.
- Ávila-Díaz, I., Orijel R., Magaña-Lemus R., Oyama K. (2013). Molecular evidence reveals fungi associated within the epiphytic orchid *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. *Botanical Sciences*, 91(4), 523–529.
- Baev, P.V. & Penev L.D. (1995). BIODIV: program for calculating biological diversity parameters, similarity, niche overlap and cluster analysis. Version 5.1. Pensoft, Sofia, Moscow. 57 pp.
- Bailarote, B.C., Lievens B. and Jacquemyn H., 2012. Does mycorrhizal specificity affect orchids decline and rarity? *American Journal of Botany* 99(10): 1655-1665.
- Basiewicz, M., Weiß M., Kogel K., Langen G., Zorn H., Zuccaro A. 2012. Molecular and phenotypic characterization of *Serendipita vermifera* strains associated with orchids, and the description of *Piriformospora williamsii* sp. Nov. *Fungal Biology*, 116: 204-213
- Bayman, P. & Otero-Ospina J. T. (2006). Microbial Endophytes of orchid roots, 9, 153–177. <https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9>
- Beltrán-Nambo, M.A. (2010). Aislamiento y caracterización de hongos micorrícicos asociados a orquídeas terrestres del género *Bletia* (Orchidaceae) en la reserva natural Barranca del Cupatitzio, del Mpio. De Uruapan, Michoacán. Tesis de Maestría. Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas. U.M.S.N.H. Michoacán, México. 139pp.
- Bidartondo M., Bruns T., Blackwell M., Edwards I., Taylor A., Horton T. et al., (2008). Preserving accuracy in GenBank. *Science* 319: 1616-16620.
- Bonnardeaux Y, Brundrett M, Batty A, Dixon K, Koch J, Sivasithamparam K. (2007). Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien's invasions. *Mycological Research* 111, 51-61.
- Bueé, M., Reich M., Murat C., Morini E., Nilsson R.H., et al., (2009). 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytol.* 184: 449-456.

- Chao, A. (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11: 265-270.
- Clements, M. A., (1988). Orchid mycorrhizal associations. *Lindleyana* 3:73–86.
- Colwell, R.K., 2013. Statistical estimation of species richness and shared species for samples. Version 9. Persistent URL <purl.ocic.org/estimates>, consulted January 12, 2018.
- CONABIO, SUMA. (2005). *La biodiversidad en Michoacán. Estudio de Estado*. (L. Villaseñor-Gómez, Ed.). 1ª edición. México: CONABIO, SUMA, UMSNH. 258 pp.
- CONABIO, 2012. Portal de Geoinformación. Sistema Nacional de Información sobre Biodiversidad. Cartografía digital No. comercial 2.5. Acceso en línea: <http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/>, consulted December 13, 2017.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez L., Cortés-Penagos C., López-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149(3), 1579–1592. <https://doi.org/10.1104/pp.108.130369>
- Cruz-Blasí, J. (2007). Colonización micorrízica y diversidad de hongos micorrízicos de algunas especies de orquídeas epífitas tropicales en el sureste de Chiapas, México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. 66 pp.
- Currah, R.S., Sigler L., Hambleton S. (1987). New records and new taxa of fungi from the mycorrhizae of terrestrial orchids of Alberta. *Canadian Journal of Botany* 65: 2473-2482.
- Davidson, R.W., Cambell W.A., Blaisedel D. J. (1938). Differentiation of wood-decaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. *Journal Agriculture Research* 57: 683-695.
- Dearnaley, J. D. W. D., Artos F. M., Elosse M. S. (2012). Orchid Mycorrhizas : Molecular Ecology , Physiology , Evolution and Conservation Aspects. In: *Fungal Associations. The Mycota IX* . B. Hock (Ed.), 2ª edición. Queensland, Toowoomba: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 207–224.
- Ding R., Chen X.H., Zhang L.J., Yu X.D., Qu D., Duan R., Xu Y.F. (2014). Identity and specificity of *Rhizoctonia*-like fungi from different populations of *Liparis japonica* (Orchidaceae) in northeast China. *PlosONE* 9(8), e105573. doi: 10.1371/journal.pone.0105573.
- Drozhinina I.S. & Kiubicek C. P. (2016). *Mycota IV. Environmental and microbial relationship*. Drozhinina I.S. and Kiubicek C. P. (eds.). 3a edition. Springer. Pp 189-204. Doi: 10.1007/978-3-319-29532-9.
- Edgar, R.C., (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *Bioinformatics* 5 (113): 1-19.
- Ercole, E., Adamo M., Rodda M., Gebauer G., Giralda M., Perotto S. (2015). Temporal variation in mycorrhizal diversity and carbon and nitrogen isotope abundance in the wintergreen meadow orchid *Anacamptis morio*. *New Phytol.* 205: 1308-1319.
- Freudenstein, J. V. & Chase M. W. (2015). Phylogenetic relationships in Epidendroideae (Orchidaceae), one of the great flowering plant radiations: Progressive specialization and diversification. *Annals of Botany*, 115(4), 665–681. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu253>
- Gadd, G., Watkinson S., Dylor P. (2007). *Fungi in the environment*. 1a edition. Cambridge University Press. 379 pp.
- Gamboa-Gaitán, M. (2006). Hongos Endófitos Tropicales : Conocimiento actual y perspectivas. *Acta Biológica Colombiana*, 11(1), 3–20.
- Gamboa-Gaitán, M. A., & Otero-Ospina, J. T. (2016). Colombian vanilla and its microbiota. III. Diversity and structure of the endophytic community. *Acta Botanica Hungarica*, 58(3–4), 241–256. <https://doi.org/10.1556/ABot.58.2016.3-4.2>
- Garden, Z. & Whitbeck J. (2007). *The rhizosphere. An ecological perspective*. 1a. edition. Elsevier Press. U.S.A. 201 pp. ISBN-13: 978-0-12-088775-0.
- Garnica, S., Riess K., Schön M. E., Oberwinkler F., Setaro S. D. (2016). Divergence times and phylogenetic patterns of Serendipitales, a highly diverse and widespread fungal lineage. *PLoS ONE*, 11(3), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149531>
- Gual-Díaz, M. & Rendón-Correa A. (2014). *Bosques Mesófilos de Montaña de México. Diversidad , ecología y manejo*. (CONABIO, Ed.). *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*. México. 1a Edición. México. Retrieved from http://www.biodiversidad.gob.mx/ecosistemas/pdf/BosquesMesofilos_montana_baja.pdf

- Hammer, Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D., 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1), 9pp. Harley J.L. & Smith S.E. 1983. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London, UK.
- Herrera, H., Valadares R., Contreras D., Bashan Y., 2017. Mycorrhizal compatibility and symbiotic seed germination of orchids from the voastal range and Andes in South central Chile. *Mycorrhiza* 27, 175-188.
- Hibbet, D., Binder M., Bischoff J., Blackwell M., Cannon F., et al., (2007). A higher level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111: 59-547.
- Jacinto-Hernández, A. & Ortega-Larrocea, M.P. (2013). Germinación simbiótica de *Oncidium* affn. *sphacelatum*. En: Memorias del Segundo encuentro mexicano de orquideología. CONABIO-Viccon-Ávila-Nava Eds. (Ed.) . Guerrero, México. pp 38.
- Jacquemyn, H., Brys R., Merckx V.S., Waud M., Lievens B., Wiegand T. (2014). Coexisting orchid species have distinct mycorrhizal communities and display strong spatial segregation. *New Phytol.* 202: 616-627.
- Jiménez, C., Sanabria N., Altuna G., Alcano M. (2011). Efecto de *Trichoderma harzianum* (Rifai) sobre el crecimiento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 28, 1–10.
- Kassem, A. & Nanniperi P. (1995). *Methods in applied soil Microbiology and Biochemistry*. 1a edition. Elsevier. London. 575 pp.
- Khamchatra, N., Dixon K., Chayamarit, K., Apisitwanich S., Tantiwiwat, S. (2016). Using *in situ* seed baiting technique to isolate and identify endophytic and mycorrhizal fungi from seeds of a threatened epiphytic orchid, *Dendrobium friedericksianum* Rchb.f. (Orchidaceae). *Agriculture and Natural Resources*, 50(1), 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2016.01.002>
- Kikuchi, G., Higuchi M., Morota T., Nagasawa E., Suzuki A. (2008). Fungal symbiont and cultivation test of *Gastrodia elata* Blume (Orchidaceae). *Japan Journal of Botany*, 83: 88-95.
- Linde, C. C., Phillips R. D., Crisp M.D., Peakall R. (2014). Congruent species decline of *Tulasnella* using multiple loci and methods. *New Phytol.*, 201: 6-12.
- Liu, H., Luo Y., Liu H. (2010). Studies of mycorrhizal Fungi of Chinese Orchids and their role in orchid conservation in China –A review. *Bot. Rev.* 76: 241-262. Doi 10.1007/s12229-010-9045-9.
- Mapperson, R., Kotiw M., Davis R., Dearnaley, J. (2014). The Diversity and Antimicrobial Activity of *Preussia* sp. Endophytes Isolated from Australian Dry Rainforests. *Current Microbiology*, 68(1), 30–37.
- Marmesse, R. & Girlanda, M. (2016). Mycorrhizal fungi and the soil carbon nutrient cycling. In: *Mycota IV. Environmental and microbial relationship*. Drozhinina I.S. and Kiubicek C. P. (eds.). 3a edition. Springer. Pp 189-204. Doi: 10.1007/978-3-319-29532-9.
- McCormick, M.K., Whigham D. and Canchani-Viruet A., (2018). Mycorrhizal fungi affect orchid distribution and population dynamics. *New Phytologist*, Research review. doi: 10.1111/nph.15223
- McCormick, M. K., & Jacquemyn, H. (2014). What constrains the distribution of orchid populations? *New Phytologist*, 202, 392–400. <https://doi.org/10.1111/nph.12639>
- McCormick M.K, Whigham D.F., Neill J.O. (2004). Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist* 163, 425-438.
- Mitchell, R. (1989). Growing hardy orchids from seed at Kew. *The plants man* 3(2): 152-169.
- Montes, N.E. (2016). Especificidad potencial de hongos micorrícicos en el proceso de germinación y supervivencia in vitro de orquídeas terrestres. Tesis de Maestría. Programa Institucional de Ciencias Biológicas, U.M.S.N.H. Michoacán, Méx. 94 pp.
- Moreno-Martínez, D. (2011). Estudios de germinación *in vitro* e *in situ* de *Epidendrum parkinsonianum* Hook. y *Acineta barkeri* (Bateman) Lindl. (Orchidaceae). Tesis de Maestría. Universidad Veracruzana.
- Morgulis A., Koulouris G., Raytselis Y., Madden T.L., Agancuala R., Schaffer A. (2008). Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatica* 24 (16): 1757-1764.
- Muller, J., Muller, K., Neinhuis C., Quandt D. (2005). PhyDE: Phylogenetic Data Editor. Published at: www.phyde.de.
- Munsell, 2000. *Soil Color Charts*. Gretag Macbeth. 617 Life Britain Road, New Windsor, NY 12543.

- Nogueira, R.E., Van den Berg C., Pereira O.L., Kasuya M.M. (2014). Isolation and molecular characterization of *Rhizoctonia*-like fungi associated with orchid roots in the Quadrilátero Ferrífero and Zona da Mata regions of the state of Minas Gerais, Brazil. *Acta Botânica Brasileira* 28(2), 298-300.
- Nontachaiyapoom, S., Sasirat S., Manoch L. (2011). Symbiotic seed germination of *Grammatophyllum speciosum* Blume and *Dendrobium draconis* Rchb. f., native orchids of Thailand. *Scientia Horticulturae*, 130(1), 303–308. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.06.04>
- Noval, B.M., Oria L. Casadesus M., Gómez M. (1999). Aislamiento, caracterización e inoculación con endomicorizas orquídeas en especies de orquídeas. *Revista Chapingo. Serie Horticulture*, 5(2), 149–152.0
- Nurfadilah, S., Swarts N. D., Dixon, K. W., Lambers H., Merritt D. J. (2013). Variation in nutrient-acquisition patterns by mycorrhizal fungi of rare and common orchids explains diversification in a global biodiversity hotspot. *Annals of Botany*, 111(6), 1233–1241. <https://doi.org/10.1093/aob/mct064>
- Oliveira, S. F., Bocayuva M. F., Veloso T. G. R., Bazzoli D. M. S., da Silva, C. C., Pereira O. L., Kasuya M. C. M. (2013). Endophytic and mycorrhizal fungi associated with roots of endangered native orchids from the Atlantic Forest, Brazil. *Mycorrhiza*, 24(1), 55–64. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0512-0>
- Ortega-Larrocea, M. P. (2008). Propagación simbiótica de orquídeas terrestres con fines de restauración edafocológica. En: Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración. Álvarez-Sánchez J. y Monroy-Ata A. (Comps.). Facultad de Ciencias, UNAM. pp 85-96.
- Osgura-Tsujita, Y., Gebauer G., Hashimoto T., Umato H., Yukawa T. (2009). Evidence for novel and specialized mycorrhizal parasitism: The orchid *Gastrodia confusa* gains carbon from saprotrophic *Mycena*. *Prox. R. Soc. Lond B*, 276: 761-768.
- Otero, J. T., Ackerman J. D., Bayman P. (2004). Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology*, 13(8), 2393–2404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02223.x>
- Otero, J. T., Mosquera A. T., Flanagan N. S. (2013). Tropical orchid mycorrhizae: Potential applications in orchid conservation, commercialization, and beyond. *Lankesteriana*, 13(1–2), 57–63.
- 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(5), 480–497. <https://doi.org/10.1071/BT11053>
- Otero-Ospina, J.T. & Bayman P. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epifitas, *Acta Agronómica* 58(4), 270–276.
- Palmer, M. W. (1990). The estimation of species richness by extrapolation. *Ecology*, 71, 1195-1198.
- Pereira, M.C., Coelho I.S., Valadares R.B., Oliveira S.F., Bocayuva M., Pereira O.L., Araujo E.F., Kasuya M.K. (2014). Morphological and molecular characterization of *Tulasnella* spp. fungi isolated from the roots of *Epidendrum secundum*, a widespread orchid. *Symbiosis* 62, 111-121.
- Pereira, O. L., Kasuya M. C. M., Borges A. C., Araújo E. F. de. (2005). Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. *Canadian Journal of Botany*, 83(1), 54–65. <https://doi.org/10.1139/b04-151>
- Phillips, R. D., Peakall R., Hutchinson F., Linde C. C., et al.,(2014). Specialized ecological interactions and plant species rarity: The role of pollinators and mycorrhizal fungi across multiple spatial scales. *Biological Conservation*, 220-223. 1691285-295.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7): 1253-1256.
- Posada, D. & Crandall K. A. (1998). MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14(9), 817–818. <https://doi.org/10.1063/1.2218048>
- Prieto M. & Wedin M. (2013). Dating the diversification of the major lineages of Ascomycota (fungi). *PlosONE* 8 (6), e65576.
- Pielou, E.C., 1981. The Usefulness of Ecological Models: A Stock-Taking. *The Quarterly Review of Biology*. 56, 17–31.

- Rasmussen, H. N., Dixon K. W., Jersáková J., Těšitelová, T. (2015). Germination and seedling establishment in orchids: A complex of requirements. *Annals of Botany*, 116(3), 391–402. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv087>
- Rasmussen, H. & Rasmussen F. N. (2007). Trophic Relationships in Orchid Mycorrhiza – Diversity and Implications for Conservation. *Lankesteriana*, 7(1–2), 334–341.
- Rasmussen, H.N., Whigham D.F. (2002). Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. *New Phytologist* 154 (3): 797-807.
- R-Development Core Team. (2008). R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. URL: <http://www.R-proyect.org>.
- Rendón-Lara, C.E., Ortega-Larrocea M.P., Menchaca-García R., Lozano M. (2013). Colonización micorrizica de dos especies de orquídeas epífitas del Estado de Veracruz (*Cycnoches ventricosum*) Batemam y (*Chysis bractescens*) Lindley. En: Memorias del Segundo encuentro mexicano de orquideología. CONABIO-Viccon-Ávila-Nava Eds. (Ed.) . Guerrero, México.pp 45.
- Rivera-Orduña, F.N., Suárez-Sanchez R., Flores-Bustamante Z., Gracida-Rodríguez J. N., Flores-Cotera L.B. (2011). Diversity of endophytic fungi of *Taxus blobosa* (Mexican yew). *Fungal diversity*, 47, 65-74.
- Roche, S., Carter R.I., Peakall R. et al.,(2010). A narrow group of monophyletic *Tulasnella* (Tulasnelaceae) lineages are associated with multiple species of *Chiloglottis* (Orchidaceae) implications on diversity. *American Journal of Botany*, 97, 200-209. Doi. 10.3732/ajb.10000049.
- Rodríguez, R. J., White J. F., Arnold A. E., Redman R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2), 314–330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
- Ronquist, F., Teslenko M., Mark P.V., Ayres D. L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A., Huelsenbeck J.P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology* 61 (3), 539-542.
- Schoch, C. L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J. L., Levesque C.A. et al., (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *PNAS* 109: 6241-6246.
- Segundo, R. (2016). Efecto de cultivos simbióticos y asimbióticos sobre la germinación, desarrollo de plántulas in vitro y supervivencia ex vitro de *Laelia autumnalis*, *L. Speciosa* y *Govenia superba* (Orchidaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología, U.M.S.N.H. Michoacán, Méx. 77pp.
- Seidl, M. (2009). *Trichocladium*. The environmental reporter. *EMLab P. & K.* vol. 8 (10): 1-3.
- SEMARNAT, Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2010). Norma Oficial mexicana NOM-059. 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. Publicado 30 de diciembre de 2010.
- Shan, X.C., Liew E.C., Weatherhead M.A., Hodgkiss J.J. (2002). Characterization and taxonomic placement of *Rhizoctonia*-like endophytes from orchid roots. *Mycologia* 94 (2): 230-239.
- Shannon, C.E. and Weaver, W, 1949. The mathematical theory of communication. The University of Illinois Press, Urbana, 117 pp.
- Stark, C., Babik W., Durka W. (2009). Fungi from the root of the common terrestrial orchid *Gymnadenia conopsea*. *Mycol. Res.*, 113: 952-959.
- Suárez J.P., Weiß M., Abele A., Garnica S., Oberwinkler F., Kottke I. (2006). Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in Andean cloud forest. *Mycological Research* 110, 1257-1270.
- Suárez J.P., Kottke I. (2016). Main fungal partners and different levels of specificity of orchid mycorrhizae in the tropical mountain forests of Ecuador. *Lankesteriana* 16 (2), 299-305.
- Suwannasai, N., Martín M.P., Phosri C., Sihanonth P., Whalley A.J.S., Spouge J. L. (2013). Fungi in Thailand: a case of study of the efficacy of an ITS barcode for automatically identifying species within the *Annulohypoxylon* and *Hypoxylon* genera. *PlosONE* 8(2): e54529. Doi: 10.1371/journal.pone.0054529.
- Swarts, N. D. & Dixon K. W. (2009). Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals*

- of Botany*, 104(3), 543–556. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp025>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04736.x>
- Tamura, K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011). MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28 (10), 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Tao, G., Liu Z. Y., Hyde K. D., Liu X. Z., Yu Z. N. (2008). Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae). *Fungal Diversity* 33, 101–122.
- Teik-Khiang, G. & Hyde D. (1999). A synopsis of *Trichocladium* species, based on literature. *Fungal Diversity*, 2, 101–118.
- Tedersoo, L., Bahram M., Ryberg M., Otsing E., Kõljalg U., Abarenkov K. (2014). Global biogeography of the ectomycorrhizal *Serendipita* lineage (fungi Serendipitales) as revealed from comparative phylogenetic analyses. *Molecular Ecology*, 23, 4168–4183.
- Teixeira, Da Silva J., Tsavkelova E., Zeng S., Bun T.N., Parthibhan S., Dobránszki J., Cardoso J.C., Rao M.V. (2015). Symbiotic in vitro seed propagation of *Dendrobium*: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development. *Planta*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. DOI 10.1007/s00425-015-2301-9.
- Tesitelova, T., Jersakova, J., Roy M., Kubatova B., Tesitel J., Urfus T., Travníček P., Suda, J., (2013). Ploidy-specific symbiotic interactions: divergence of mycorrhizal fungi between cytotypes of the *Gymnadenia conopsea* group (Orchidaceae). *New Phytol.* 199, 1022e1033.
- The Plant List* (2013). Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st January, 2018).
- Waud, M., Busschaert P., Ruyters S., Jacquemyn H., Lievens B., 2014. Impact of primer choice on characterization of orchid mycorrhizal communities using 454 pyrosequencing. *Molecular Ecology Resources* 14: 679–699.
- Waud, M., Busschaert P., Lievens B., Jacquemyn H. (2016). Specificity and localized distribution of mycorrhizal fungi in the soil may attribute to co-existence of orchid species. *Fungal Ecology*, 20, 155–165.
- Waud, M., Brys R., Landuyt W., Lievens B., Jacquemyn H., 2017. Mycorrhizal specificity not limit the distribution of an endangered orchid species. doi: 10.1111/mec.14014
- White, T.J., Burns T., Lee S., Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, White T.J. (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York. pp. 315–322.
- Whittaker, R.H. (1972). Evolution and measurement of species diversity. *Taxon*, 21(2/3), 213–251.
- Wright, M., Cross R., Cousens R. D., May T. W., McLean C. B. (2011). The functional significance for the orchid *Caladenia tentaculata* of genetic and geographic variation in the mycorrhizal fungus *Serendipita vermifera* s. lat. complex. *Muelleria*, 29(2), 130–140.
- Xiaoya, M., Kang J., Nontachaiyapoom S., Wen T., Hyde K. D. (2015). Non-mycorrhizal endophytic fungi from orchids. *Current Science*, 109(1), 72–87.
- Xing, X., Ma X., Deng Z., Chen J., Wu F., Guo S. (2013). Specificity and preference of mycorrhizal associations in two species of the genus *Dendrobium* (Orchidaceae). *Mycorrhiza* 23, 317–324.
- Yamato, M., Yagame T., Suzuhi A., Iwase K. (2005). Isolation and identification of mycorrhizal fungi associating with an achlorophyllous plant, *Epipogium roseum* (Orchidaceae). *Mycoscience*, 43, 73–77. DOI 10.1007/s10267-004-0218-4.
- Ye, W., Shen C. H., Lin Y., Chen P. J., Xu X., Oelmüller R., et al., (2014). Growth promotion-related miRNAs in oncidium orchid roots colonized by the endophytic fungus *Piriformospora indica*. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084920>
- Yuan, Z. L., Chen Y.C., Yang Y. (2009). Diverse non-mycorrhizal fungi endophytes inhabiting an epiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*) estimation and characterization. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 295–303.
- Zelmer, C.D. (1994). Interactions between northern terrestrial orchids and fungi in nature. M. Sc. Thesis, University of Alberta, Canada.

CAPITULO II. PERFÍL DE ÁCIDOS GRASOS DE HONGOS ASOCIADOS A LAS RAÍCES DE ORQUÍDEAS MEXICANAS

RESUMEN

Cada grupo de seres vivos se distingue por el tipo de ácidos grasos que produce y por la concentración relativa de cada uno de ellos, de manera que actualmente son utilizados como una herramienta para la identificación y clasificación de grupos de organismos, como los hongos endófitos, patógenos o micorrícicos, asociados a diferentes familias de plantas. En el caso de la familia Orchidaceae el análisis del perfil de ácidos grasos para comparar a los hongos asociados a sus raíces es escaso, por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar el perfil de estos ácidos en hongos endófitos y micorrícicos extraídos de las raíces de diferentes orquídeas mexicanas, con la finalidad de detectar variaciones en la composición o concentración de los mismos, como una propuesta para la caracterización de este grupo de organismos. Se utilizaron 31 aislados fúngicos pertenecientes a 16 géneros, de los cuales 8 se relacionan con hongos basidiomicetos que han sido reportados como ectomicorrícicos y/u orquideoides. Los hongos fueron previamente aislados de raíces de 4 especies de orquídeas: *Bletia purpurata*, *Govenia lagenophora*, *Laelia autumnalis* y *L. speciosa*, de zonas templadas en siete municipios del estado de Michoacán. Se hizo la determinación de ácidos grasos totales por la técnica de metil esterificación (FAME). Para la lectura de los ésteres y su identificación se utilizó el método MIDI y el programa Sherlock V 6.2B. Los datos fueron transformados y sometidos a análisis de varianza (ANOVA) en el programa JMP V. 8.0 . La relación de las especies fúngicas estudiadas, se analizó con base en la composición y porcentajes de su perfil de ácidos grasos utilizando una matriz de distancias euclidianas con el método aglomerativo WARD.

Se obtuvieron un total de 14 ácidos grasos, de los cuales 7 son considerados de amplio espectro. La longitud de las cadenas de los ácidos grasos presentes en las diferentes muestras fue de 12 a 20 carbonos. La mayoría de los hongos presentaron una composición de ácidos grasos similar pero que varió en sus concentraciones. Los ácidos grasos de amplio espectro 14:0, 18:0 y 18:1w9c estuvieron presentes en todos los géneros de hongos endófitos de orquídeas analizados y sus concentraciones fueron diferentes para cada género lo que permitió su agrupamiento. *Coprinus* sp. presentó 16:0 2OH como ácido único, *Preussia* el 15:1w5c y *Fusarium* los ácidos 18:1 2OH y 19:0w8c, que pudieran ser utilizados como posibles marcadores de estos géneros, sin embargo se requiere de mayores estudios. Los hongos micorrícicos orquideoides no mostraron ácidos grasos particulares que pudieran permitir su identificación. La concentración de los

ácidos grasos en cada género así como la comparación de sus perfiles es una herramienta útil que puede ser utilizada en combinación con técnicas morfológicas y moleculares para la identificación correcta de los hongos asociados a las orquídeas.

Palabras clave: Hongos micorrícicos, endófitos no micorrícicos, metil-esterificación, método MIDI.

ABSTRACT

Each group of organisms is distinguished by the type of fatty acids that it produces and by their relative concentration, so they are currently used as a tool for the identification and classification of groups of organisms, such as endophytes, pathogens or mycorrhizal fungi, associated to different families of plants. In the case of the Orchidaceae family, the analysis of the fatty acid profiles to compare different fungi associated with their roots is scarce, so the objective of this work was to determine the profile of these acids in endophytic and mycorrhizal fungi extracted of the roots of different Mexican orchids, in order to detect variations in their composition or concentration, as an approach for the characterization of this group of organisms. We used 31 fungal isolates belonging to 16 genera, of which 8 are related to basidiomycete fungi that have been reported as ectomycorrhizal and / or mycorrhizal ones. The fungi were previously isolated from roots of 4 species of orchids: *Bletia purpurata*, *Govenia lagenophora*, *Laelia autumnalis* y *L. speciosa* from temperate zones in seven municipalities of Michoacán. The determination of total fatty acids was made by the methyl-ester (FAME) technique. The MIDI method and the Sherlock V 6.2B program were used to read the esters and identify them. The data were transformed and subjected to analysis of variance (ANOVA) in the JMP V. 8.0 program. The relationship of the fungal species studied was analyzed based on the composition and percentages of their fatty acid profile using a matrix of Euclidean distances with the WARD agglomerative method.

A total of 14 fatty acids were obtained, of which 7 are considered broad-spectrum. The length of the chains of the fatty acids present in the different samples was 12 to 20 carbons. Most fungi had a similar fatty acid composition but varied in their concentrations. The wide-spectrum fatty acids 14: 0, 18: 0 and 18: 1w9c were present in all the genera of endophytic orchid fungi analyzed and their concentrations were different for each genus, which allowed their grouping. *Coprinus* sp. presented 16:0 2OH as unique fatty acid, *Preussia* 15: 1w5c and *Fusarium* 18: 1 2OH and 19: 0w8c, which could be used as possible markers for these genera, however, further studies are required. Mycorrhizal fungi did not show particular fatty acids that could allow their identification. The concentration of fatty acids in each genus as well as the comparison of their profiles is a useful tool that

can be used in combination with morphological and molecular techniques for the correct identification of fungi associated with orchids.

Key words: Mycorrhizal fungi, not-mycorrhizal endophytes, methyl esters, MIDI method.

II.1 Introducción

Esta documentado de manera sustancial el papel que juegan los hongos endófitos y micorrícicos para la salud de las plantas y la importancia de conocer su identidad y el recambio de sus funciones entre los diferentes grupos de plantas y bajo diferentes condiciones o estados fenológicos (Smith & Read, 2008; Barraclough & Pauw, 2011; Morris et al., 2016). También se ha reportado como los organismos que forman parte de la rizósfera y del suelo son altamente sensibles a cambios ambientales o perturbación y de la importancia de identificarlos como primer paso para el mantenimiento de los ecosistemas (Atlas, 1984; Kaur et al., 2005).

Los métodos para la identificación de estos hongos que están presentes en la rizósfera y el suelo se basan en el uso de características morfológicas y en la utilización de marcadores filogenéticos y bioquímicos que permiten su correcta clasificación (Samson et al., 2014). Los marcadores quimiotaxonómicos utilizados en el campo de la micología incluyen numerosos compuestos, entre los que se encuentran aminoácidos, carbohidratos y ácidos grasos (Frisvad et al., 2007); en la actualidad, de manera particular, se ha incrementado el uso de ácidos grasos como una herramienta quimiotaxonómica para la identificación y clasificación de este grupo de organismos (Zain et al., 2013), de manera que un número sustancial de investigadores se apoya en esta técnica para el estudio de especies de hongos importantes ya sea por su patogenicidad, por la liberación de metabolitos de efecto benéfico en las plantas (Zain, 2010; Mahmoud et al., 2016).

Los ácidos grasos son un componente importante de los lípidos que se encuentran en las membranas celulares de plantas, animales y microorganismos en forma de fosfolípidos (PLFA) y se componen de cadenas largas de carbono y un grupo carboxilo (-COOH), estos ácidos no se encuentran en estado libre en la naturaleza y comúnmente se les encuentra enlazados a un grupo glicerol (Olsson, 1999;

Kaur et al., 2005). Se considera que cada grupo de organismo se distingue por el tipo de ácidos grasos PLFA que produce y por la concentración relativa de cada uno de ellos (Sasser, 1991), de modo que son una alternativa para la correcta identificación de organismos aislados que muestran pocas diferencias o variantes genotípicas y que no permiten su correcta diferenciación con el uso de pruebas moleculares (Larkin & Grovers, 2003), además se menciona que el uso de estos ácidos es una técnica menos tediosa y de bajo costo económico en comparación con las técnicas moleculares (Muller et al., 1994).

La determinación de ácidos grasos con el método de metil esterificación (FAME) de bajo costo, efectivo, definitivo y eficiente que ha sido utilizado para identificar y caracterizar bacterias (Sasser et al., 1984). Este procedimiento utiliza un paquete de software para computadora (Microbial Identification System; Microbial ID, INC., (MIDI), Newark, DE) que compara diferencias cuantitativas y cualitativas de los FAMES presentes en las bacterias analizadas (Baird, 2000). Es un método fácil, sensible y reproducible que ha sido adaptado para caracterizar cultivos de hongos (Johnk & Jones, 1992).

Aunque se ha visto que los hongos y los taxones relacionados con ellos generalmente producen bajas cantidades y menos tipos de ácidos grasos que otros organismos, como las bacterias, existen cada vez más evidencias sobre como el análisis del perfil de sus ácidos grasos, permite su identificación y caracterización de manera exitosa (Stahl & Klug, 1996; Lopes da Silva et al., 1998). Estos perfiles han permitido caracterizar y diferenciar grupos mayores y géneros como *Penicillium* (Mohamed et al., 2016), *Fusarium* (Zain et al., 2013), *Alternaria* (Hashem et al., 2014), *Rhizoctonia* (Stevens & Jones, 2001; Lanoiselet et al., 2005), y hongos micorrícicos (Madan et al., 2002; Pereira et al., 2011).

La técnica tiene dos niveles de resolución, primero los patrones de PLFA totales pueden ser comparados por métodos estadísticos de multivariables en donde cambios en estos patrones indican cambios en las comunidades de microorganismos en una muestra, o segundo, en ciertos casos existen ácidos grasos considerados específicos de ciertos grupos que pueden ser utilizados como biomarcadores para su identificación (Bááth, 2003). Una de las mayores

diferencias en la composición de los PLFA se presenta entre eubacterias y organismos eucariontes (Frostegard & Bááth, 1996). Por estudios en cultivos puros se sabe, por ejemplo, que los ácidos grasos 18:2w6,9 y 18:1w9 son comunes en organismos eucariontes como los hongos, pero raros en bacterias, por lo que se utilizan como indicadores de la biomasa de estos organismos en el suelo (Bááth, 2003). Sin embargo, otros ácidos grasos son reportados como comunes tanto en bacterias como en eucariontes, dos de ellos son el 15:0 y 17:0 (Zelles, 1999). Y además aunque se asuma que ciertos PLFA indican la presencia de algún grupo de organismo, estos ácidos pueden encontrarse en pequeñas cantidades en otros grupos (Baird et al., 2000) de manera que la decisión para asignar un biomarcador es siempre tentativa, debido a que estos ácidos se pueden repetir en varios grupos de organismos. Algunos ácidos grasos de amplio espectro, considerados así porque no se les puede asignar a algunos taxa en particular, son el 12:0, 15:0, 16:0, 18:0 y 20:0 (Niklaus et al., 2003; Kaur et al., 2005).

Entre los ácidos grasos utilizados para diferenciar grupos de hongos se mencionan por ejemplo: 16:1w5, 20:4 y 20:5 que son considerado biomarcadores de hongos micorrízico arbusculares; los ácidos grasos 14:1w9, 14:0, 20:4 y 20:5 para reconocer oomycetes (ahora considerados un grupo aparte) o la dominancia del 18:2w6,9 para detectar a hongos ectomicorrízicos (Larsen et al., 2000; Larsen & Bødker, 2000). Algunos otros ácidos grasos reportados en hongos como *Glomus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Penicillium* y *Rhizoctonia* se plasman en Larsen y colaboradores (1998), en donde reportan variación en el perfil de ácidos grasos dependiendo de la especie de hongo en cuanto a las concentraciones de los ácidos: 15:0, 16:0, 16:1w5, 16:1w7, 17:0, 17:1w8, 18:0, 18:1w7, 18:1w9, 18:2w6,9, 20:4 y 20:5.

Algunos otros estudios sobre la composición de ácidos grasos se han realizado con hongos patógenos del complejo *Rhizoctonia* (Sharon et al., 2006). Sin embargo, al analizar la literatura existente se observa que el análisis del perfil de estos ácidos para comparar a los hongos endófitos y micorrízicos asociados a las raíces de orquídeas es escaso y uno de los pocos trabajos existentes es el de

Pereira et al., (2011) que señalan la dominancia del ácido 18:1w9c presente únicamente en cepas del género *Epulorhiza* y el 16:0 2OH detectado sólo en el género *Ceratorhiza* que pudieran utilizarse como marcadores de hongos micorrícicos orquideoides.

Por lo anterior la finalidad de este trabajo fue analizar el perfil de ácidos grasos de hongos endófitos y micorrícicos extraídos de las raíces de diferentes orquídeas, con la finalidad de detectar variaciones en la composición o concentración de los mismos, como una propuesta para la caracterización de este grupo de organismos.

II.2 Metodología

Aislamiento y condiciones de cultivo

Se utilizaron 31 aislados fúngicos de los cuales 8 se relacionan con hongos basidiomicetos que han sido reportados como ectomicorrícicos y/u orquideoides (Yamato et al., 2005; Osgura-Tsujita et al., 2009; Pereira et al., 2014; Ding et al., 2014). Las 31 muestras pertenecen a 16 géneros. Los hongos fueron previamente aislados de raíces de 4 especies de orquídeas: *Bletia purpurata*, *Govenia lagenophora*, *Laelia autumnalis* y *L. speciosa*, de zona templadas en siete municipio del estado de Michoacán (Tabla 9). Previo al análisis, los cultivos fúngicos se mantuvieron almacenados en Agar Papa Dextrosa (PDA) en incubación a 27° C y bajo obscuridad después del aislamiento.

Preparación de muestras

Previo al análisis del perfil de ácidos grasos, las muestras fueron puestas a crecer en agar PDA en obscuridad durante 5 días a 27° C. Posteriormente se extrajo un disco de aproximadamente 7 mm de diámetro de micelio activo que fue inoculado en tubos de ensayo conteniendo 15 mL de Agar Papa Dextrosa Broth (PDB; Difco Laboratories). Los tubos se mantuvieron en agitación a 27° C por un periodo de 7 a 15 días y cuando hubo suficiente micelio, las muestras se filtraron en bomba de vacío bajo campana de flujo laminar y el micelio recuperado se almacenó en tubos

Eppendorf de 1.5 mL, posteriormente se pulverizó con nitrógeno líquido y se liofilizó, almacenándose a temperatura ambiente hasta su uso.

Tabla 9. Cepas utilizadas para la determinación de ácidos grasos en este estudio y su identidad con secuencias de GenBank. Se muestra la orquídea de procedencia y el municipio del que fueron extraídas.

DIVISIÓN	ORDEN	CLAVE ASIGNADA	IDENTIDAD GENBANK	No. DE ACCESO	% IDENTIDAD	HOSPEDERO	PROCEDENCIA
Basidiomycota (3)	Agaricales	M38 y M103	<i>Clitopilus giovanealle</i>	EF413030.1	79	<i>L. autumnalis</i>	Erongaricuario
		M15	<i>Coprinus sp.</i>	AB071802.1	90	<i>L. autumnalis</i>	Coeneo
		M62	<i>Coprinus sp.</i>	GU234153.1	90	<i>L. autumnalis</i>	Coeneo
Ascomycota (13)	Tulasnellales	M1, M34, 85	<i>Tulasnella sp.</i>	EF393628.1	97	<i>B. purpurata</i>	Uruapan
		M87	<i>Tulasnella calospora</i>	GU166407.1	96	<i>L. autumnalis</i>	Ziracuaretiro
		M91	<i>Colletotrichum sp.</i>	KP127992.1	85	<i>B. purpurata</i>	Ziracuaretiro
	Glomerellales	M56	<i>Lachnum sp.</i>	AB847053.1	99	<i>L. speciosa</i>	Morelia
		M47	<i>Trichoderma viride</i>	KX099655.1	99	<i>L. autumnalis</i>	Erongaricuario
	Hypocreales	M84	<i>Trichoderma rossicum</i>	KY764880.1	100	<i>L. speciosa</i>	Morelia
		M96 y M104	<i>Morchella sp.</i>	KP670940.1	85	<i>B. purpurata</i>	Ziracuaretiro
	Pleosporales	M80 y 103	<i>Alternaria alternata</i>	MF141012.1	100	<i>L. speciosa</i>	Quiroga, Ziracuaretiro
		M26 y M78	<i>Preussia minima</i>	KY124642.1	99	<i>L. autumnalis</i>	Ziracuaretiro
	Sordariales	M45				<i>G. Lagenophora</i>	Tingambato
		M17	<i>Chaetomium nigricolor</i>	EU543258.1	99	<i>L. autumnalis</i>	Ziracuaretiro
		M65, M66	<i>Chaetomium sp.</i>	GU934508.1	99	<i>L. autumnalis</i>	Ziracuaretiro
		M39 y M48	<i>Fusarium tricinctum</i>	KR011974.1	99	<i>L. speciosa</i>	Quiroga
		M89, M90, M92	<i>Trichocladium sp.</i>	KM062090.1	89	<i>B. purpurata</i>	Quiroga
	Xylariales	M105	<i>Sordariomycete</i>	EF672300.1	92	<i>L. speciosa</i>	Morelia
		M16	<i>Muscodora albus</i>	AY927993.1	99	<i>L. autumnalis</i>	Ziracuaretiro
		M18	<i>Xylaria enteroleuca</i>	KR534721.1	99	<i>L. autumnalis</i>	Ziracuaretiro
		M57	<i>Nemania sp.</i>	KP133226.1	99	<i>L. speciosa</i>	Morelia

Análisis de ácidos grasos

La extracción se realizó siguiendo el protocolo de Sasser (1990) para la determinación de ácidos grasos totales, que consiste en cuatro fases: saponificación, metilación, extracción y lavado básico.

Para la saponificación se colocó un fragmento de micelio liofilizado de aproximadamente 0.5 gr de cada muestra en tubos de ensayo con tapa de teflón y se le agregaron 2 mL de reagente 1 a cada tubo (45 gr de NaOH, 150 mL de metanol y 150 mL de agua desionizada). Se taparon y colocaron en agitación en vortex durante 10-15 segundos. Posteriormente se sometieron a temperatura de 100° C en agua (baño María) durante 30 min. Y finalmente se enfriaron para la segunda fase. En el proceso de metilación las sales sódicas de los ácidos grasos se convirtieron en metil ésteres, para lo cual se adicionó la solución reagente 2 (325 mL de 6NHCl en 275 mL de metanol). Se agitaron los tubos en vortex 10 seg. y se calentaron a 80° C en agua (baño María) por 10 min. Se enfriaron

rápidamente. Durante la extracción, los metil esteres fueron transferidos de la fase acuosa a la fase orgánica con extracción líquido-líquido. Para lo cual se adicionaron 2.5 mL del reagente 3 (1:1 v/v hexano: éter metil terbutílico). Los tubos se pusieron en rotación durante 10 min. Después se centrifugó por 3 min a 2000 rpm y se removió el sobrenadante a tubo nuevo. Finalmente para el lavado básico, en el que se eliminan los ácidos grasos libres y los agentes residuales, se agregó a cada tubo 6 mL de solución reagente 4 (solución básica de NaOH diluido en agua desionizada estéril -10.8 gr en 900 mL de agua). Se cerraron los tubos y se rotaron durante 3 min a 2000rpm. Se removió el sobrenadante y se colocó en frascos viales para su lectura.

Para la determinación de los ácidos grasos se utilizó un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard 6890, serie GS) acoplado a un espectrómetro de masas con columna capilar de silica (modelo GS18A) y se utilizó nitrógeno como gas promotor a una presión de 70 KPa. Para la lectura de los metil ésteres de los ácidos grasos (FAMES) y su identificación, se utilizó el software para computadora (Microbial Identification System; Microbial ID, INC., (MIDI), Newark, DE) utilizando el programa Sherlock V 6.2B que compara diferencias cuantitativas y cualitativas de los FAMES presentes. Los FAMES se reportan como porcentaje de los ácidos totales en las muestras (Stevens-Johnks & Jones, 1993).

Análisis de datos

Los datos fueron transformados mediante raíz cuadrada y los ácidos de amplio espectro entre las cepas fúngicas analizadas fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) en el programa JMP V. 8.0 . La relación de las especies fúngicas estudiadas, se analizó con base en la composición y porcentajes de su perfil de ácidos grasos utilizando una matriz de distancias euclidianas con el método aglomerativo WARD. Para la construcción de la matriz los hongos se clasificaron por género y se codificó considerando como estados de carácter los porcentajes y tipo de ácidos graso.

II.3. Resultados

Se identificaron un total de 14 ácidos grasos, de los cuales 7 son considerados de amplio espectro. La longitud de las cadenas de los ácidos grasos presentes en las diferentes muestras fue de 12 a 20 carbonos. La mayoría de los hongos presentaron una composición de ácidos grasos similar pero que varió en sus concentraciones. El perfil de ácidos grasos considerados de amplio espectro de los 14 géneros de hongos analizados y sus diferencias estadísticas se muestran en la Tabla 10.

Los ácidos grasos que estuvieron presentes en todas las cepas analizadas fueron ácido palmítico (16:0, ácido hexadecanoico), ácido esteárico (18:0, ácido octadecanoico) el ácido palmítoleico (16:1), ácido esteárico (18:0) y ácido oleico (18:1w9c, 9-octadecenoico), mientras que el ácido mirístico 14:0 (ácido tetradecanoico) estuvo presente en la mayoría de las muestras, siendo la excepción la cepa M91 que corresponde a *Colletotrichum* sp. Los análisis de varianza mostraron que hubo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en la composición de estos ácidos entre las diferentes especies fúngicas analizadas.

Tabla 10. Proporción de ácidos grasos de amplio espectro en las muestras analizadas (los datos representan los promedios por género y están transformados con raíz cuadrada). Letras diferentes representan diferencias significativas entre géneros para cada uno de los ácidos grasos.

GÉNERO	14:00	16:00	17:00	17:1 w8c	18:0	18:1 w9c
<i>Clitopilus giovanealle</i>	0.52 d	3.59 c	0.33 c	0.21 b	5.33 c	19.82 f
<i>Coprinus</i> sp.	0.91 c	4.03 b			1.27 d	17.03 f
<i>Tulasnella</i> sp.	0.41 d	3.05 c		0.5 a	2.42 d	39.15 b
<i>Tulasnella calospora</i>	0.41d	3.97c		0.82a	2.37 c	39.15b
<i>Colletotrichum</i> sp.		2.55 c		0.49 a	6.43 b	36.73 c
<i>Lachnum</i> sp.	1.00 b	5.06 a			7.33 b	29.96 d
<i>Trichoderma viride</i>	0.81 c	4.68 ab	0.33 c	0.53 a	2.20 d	25.13 e
<i>Trichoderma rossicum</i>	0.81 c	4.48 ab	0.56 b	0.77	1.48d	46.09a
<i>Morchella</i> sp.	0.88 c	5.97 a			4.83 c	31.54 c
<i>Alternaria alternata</i>	0.65 c	5.18 a			2.65 d	27.09 d
<i>Preussia minima</i>	0.74 c	4.67 ab	0.4 b	0.51 a	5.14 c	25.2 e
<i>Chaetomium nigricolor</i>	0.81 c	4.45 ab			2.21 c	40.3 a
<i>Chaetomium</i> sp.	4.97 a	4.83 ab			4.87 c	26.35 e
<i>Fusarium tricinctum</i>	0.39 d	4.53 ab	0.1 d	0.27 b	14.91 a	34.08 c
<i>Trichocladium</i> sp.	0.52 d	3.74 c			7.61 b	46.64 a
<i>Muscodor albus</i>	0.92 b	5.1 a	0.8 a		2.09 d	34.1 c
<i>Nemania</i> sp.	0.84 c	4.74 ab	0.8 a		6.19 b	38.13 b
<i>Xylaria enteroleuca</i>	1.08 b	5.11 a	0.7 a		6.19 b	38.13 b
<i>Sordariomycetes</i>	1.11 b	4.47 ab			4.93 c	45.43 a

Algunas muestras presentaron ácidos únicos y el ácido laurico (12:0 ácido dodecanoico) considerado como de amplio espectro, se presentaron únicamente en 2 géneros (Tabla 11).

Tabla 11. Ácidos grasos poco frecuentes y géneros en los que se presentaron (las proporciones se muestran transformadas con raíz cuadrada).

GÉNERO	12:00	13:0ANT	15:1 w5c	16:0 2OH	16:1w5c	18:1 2OH	19:0w8c	20:1 w9c
<i>Clitopilus giovanealle</i>	0.15	0.37			2.69			1.98
<i>Coprinus</i> sp.				1.95				
<i>Colletotrichum</i> sp								2.42
<i>Preussia minima</i>			1.81					
<i>Fusarium tricinctum</i>	0.23	0.51			6.91	2.61	2.00	

Se generaron dos árboles de distancias. El primero de ellos muestra el agrupamiento generado para hongos basidiomicetos con el criterio aglomerativo WARD (Fig. 14). En el que se puede observar una separación bien definida de las muestras con base en su perfil de ácidos, quedando agrupadas de acuerdo a su género correspondiente. *Coprinus* sp. presentó el ácido 16:0 2OH como único.

El árbol generado para hongos ascomicetos (Fig. 15) separa las muestras en dos grupos mayores, dejando fuera a las cepas M48 y M105 identificadas como *Fusarium tricinctum* y un *Sordariomycete*. Se puede observar que las muestras quedan relacionadas con su género correspondiente como sucedió para el grupo de basidiomicetos. *Fusarium tricinctum* presentó en su perfil dos ácidos únicos, el 18:1 2OH y 19:0w8c y *Preussia* el 15:1w5c.

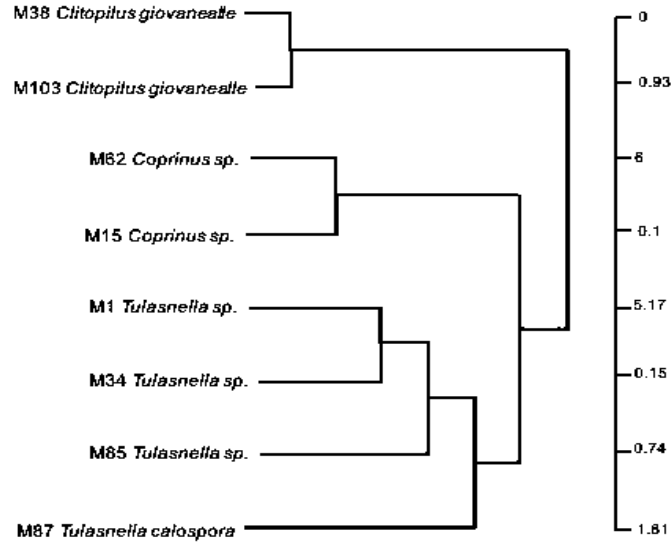


Figura 14. Árbol de distancias de Basidiomycota generado a partir de la composición de ácidos grasos de las muestras analizadas con criterio aglomerativo WARD. Se señalan las distancias entre cada rama generada iniciando de *Clitopilus* M38.

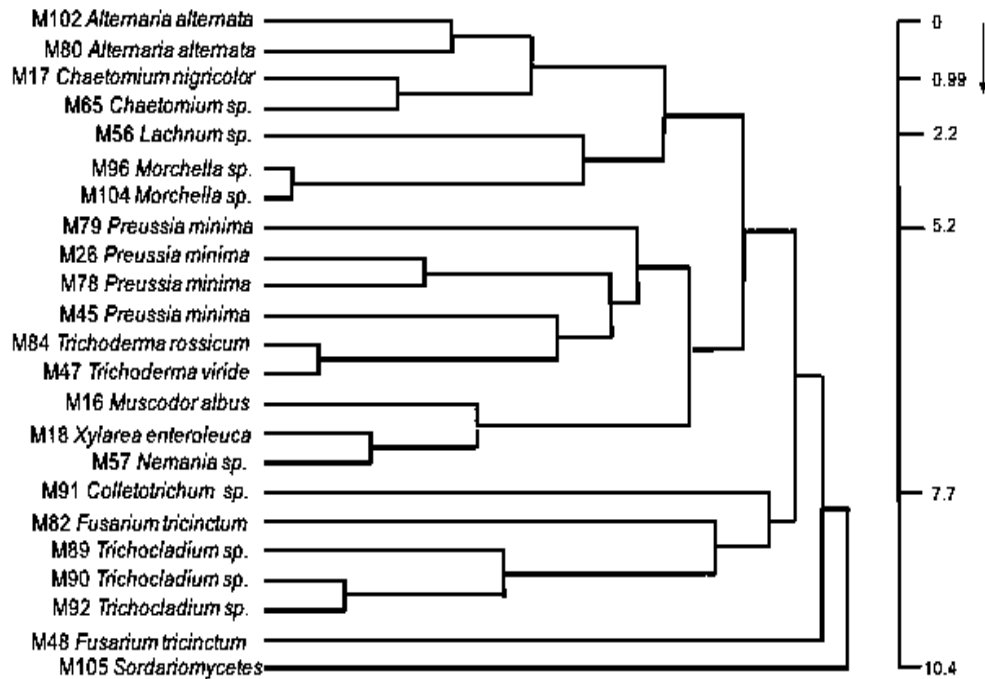


Figura 15. Árbol de distancias de hongos ascomicetos generado a partir de su composición de ácidos grasos utilizando análisis de agrupamiento con criterio aglomerativo WARD. Se muestran las distancias entre las principales ramas.

II.4. Discusión

La cantidad total de ácidos grasos encontrados en este estudio concuerdan con otros trabajos en donde se reportan de 11 a 20 ácidos en diferentes especies de hongos de géneros como *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* y *Rhizoctonia* (Larsen et al., 2000; Larkin & Groves, 2003; Lanoiselet et al., 2005; Matsumoto, 2006; Mohamed et al., 2016). Los perfiles con mayor cantidad de ácidos grasos fueron las muestras identificadas como *Fusarium tricinctum* y *Clitopilus giovanealle* con 11 y 10 ácidos respectivamente, mientras que en los demás grupos de hongos únicamente se detectaron de 4 a 5 ácidos diferentes. Muller et al., (1994) demostraron que el método MIDI es eficiente para la extracción de ácidos grasos en hongos, dando buenos resultados, sin embargo otros trabajos realizados con hongos han observado que este método no siempre es eficiente para algunos taxones ya que no permite identificar o diferenciar aislados a nivel de especies y que cuando este método es modificado aumentando el tiempo de saponificación se obtiene una mayor variedad de ácidos debido a una mayor destrucción de las membranas celulares (Matsumoto, 1996; Stevens-Johnk & Jones 2001; Priyatmojo et al., 2002; Larkin & Groves, 2003).

En el presente trabajo el paso de saponificación se realizó por 30 minutos y no las 2 horas y media que señalan otros trabajos, por lo que esto explicaría la poca variedad encontrada en la mayoría de los perfiles. Otro factor que pudo influir en la extracción fue el tiempo de incubación y la temperatura; se documenta que la edad de los cultivos y la temperatura son parámetros críticos, siendo 4 días el tiempo más comúnmente utilizado, aunque algunos reportan 7 días para algunos géneros como *Rhizoctonia* (Stevens-Johnk & Jones 1993; Pankhurst et al, 2001; Priyatmojo et al., 2002; Lanoiselet et al., 2005).

Se corroboró lo mencionado por otros investigadores que señalan que la variedad de ácidos grasos presentes en los hongos no es muy amplio y que se repiten entre los diferentes taxa de manera que resulta difícil la identificación y separación de géneros utilizando únicamente su perfil de ácidos grasos pero que la combinación con análisis morfológicos incrementa la exactitud en su identificación (Olsson,

1999; Fraga et al., 2008). Todas las muestras analizadas presentaron 6 de los ácidos grasos considerados de amplio espectro, sin embargo se pudo observar que las concentraciones de los mismos varió entre los taxa analizados y que la combinación de estas variaciones en los diferentes ácidos que conforman su perfil puede ayudar a su clasificación, que junto con la caracterización morfológica y molecular proporcionan una identificación más precisa de los organismos, como se menciona (Lanoiselet et al., 2005). El ácido graso 18:1w9c fue el ácido graso predominante en todas las muestras analizadas y el que presentó las mayores concentraciones, estos mismos resultados se han encontrado en otros trabajos en los que se señala que los ácidos grasos más comunes se encuentran en el rango del 14 a 18 carbonos, que pueden encontrarse en proporción del 80 % o más (Baird et al., 2000; Mohamed et al., 2016). Entre estos ácidos, el 18:1w6,9 es señalado como uno de los más abundantes junto con el 16:0, ambos considerados de amplio espectro y cuyas concentraciones fueron mayores al 80% en todas las muestras analizadas (Lechevalier & Lechevalier, 1998; Lanoiselet et al., 2005). Olsson (1999) señala que los ácidos grasos de 18 cadenas como el 18:2w6,9 son típicos en basidiomicetos, ascomicetos y deuteromicetes, y en muchos otros eucariontes y que en estos grupos se presentan en altas concentraciones, siendo un ejemplo el género *Suillus*, un hongo ectomicorrícico que presenta hasta 10 veces más cantidad del ácido 18:2w6,9 que otros hongos ectomicorrícicos.

Si bien a mayor escala es difícil identificar a los hongos presentes en las raíces de las orquídeas, a una escala más fina, se pudieron observar algunas diferencias en los perfiles de las muestras analizadas que permitieron su separación en grupos bien definidos como lo mostraron los arboles de distancia generados. Slabbinck y colaboradores (2010) señalan que la diferencias en la longitud de las cadenas, la posición de dobles enlaces, la concentración y su presencia en determinados grupos contribuye a una diferenciación exitosa entre grupos fúngicos.

Las muestras correspondientes al género *Clitopilus* presentaron algunos ácidos únicos en el grupo de basidiomicetos como fueron el 12:0, 16:1w5c y el 20:1w9c que únicamente se presentaron en *Fusarium* dentro del grupo de los ascomicetos y el 17:0 que no se presentó en *Coprinus* ni en *Tulasnella*. A su vez los perfiles de

las cepas de *Coprinus* reportaron la presencia del ácido 16:0 2OH que no se encontró en los otros basidiomicetos. Este ácido es reportado por Pereira y colaboradores (2011) presente en hongos del complejo *Rhizoctonia* y lo señala como posible marcador del género micorrícico de orquídeas *Ceratorhiza* ya que no se presenta en otros hongos micorrícicos orquideoides como el género *Tulasnella*. Sin embargo en este trabajo se pudo observar que está presente en *Coprinus* también registrado en la literatura como hongo micorrícico de orquídeas (Yamato et al., 2005; Smith y Read, 2008). Así mismo en el mismo trabajo se reporta la presencia de los ácidos 17:0 y 20:0 en cepas de *Tulasnella* pero en este trabajo el perfil de ácidos grasos de este género no los registro, también señalan como posible marcador al 18:1w9c que en este trabajo se presentó en todas las muestras analizadas de hongos asociados a las raíces de orquídeas. Esto demuestra la necesidad de realizar una mayor cantidad de estudios sobre la composición de sus ácidos grasos para poder establecer criterios para su identificación utilizando esta técnica.

El árbol de distancias separó a las cepas de hongos micorrícicos orquideoides de los otros basidiomicetos analizados, lo que sugiere que la combinación y concentración de los ácidos detectados en la determinación de su perfil pueden ser una buena herramienta si se documenta con mayor precisión para analizar si estas concentraciones son constantes bajo diferentes condiciones de cultivo. Otros trabajos han demostrado que la proporción de ácidos grasos presentes en diferentes organismos permite diferenciar especies o subespecies de diferentes grupos de manera exitosa, en hongos como *Penicillium*, *Phytophthora* y *Fusarium* (Larkin & Groves, 2003; Aye et al., 2008; Mohamed et al., 2016).

En el grupo de los ascomicetos, la separación en diferentes grupos con base en su perfil no fue reflejo de sus relaciones filogenéticas, pues géneros como *Alternaria* y *Preussia* incluidos en un mismo orden, en el análisis quedaron en grupos separados y las muestras de *Fusarium tricinctum* no se agruparon juntas. Sin embargo, diferentes trabajos indican que aislados provenientes de diferentes regiones geográficas pueden variar en la composición de sus ácidos grasos o en las concentraciones presentes debido a las diferentes condiciones bióticas y

abióticas que pudieran existir en cada lugar (Baird et al., 2000; Priyatmojo et al., 2002). En el presente estudio las muestras provenían de diferentes lugares y fueron extraídas de diferentes orquídeas. *Preussia minima* presentó como ácido graso único el 15:1w5c y *Fusarium tricinctum* los ácidos 18:1 2OH y 19:0w8c, otros trabajos han reportado una gran variedad de ácidos grasos en diferentes especies de *Fusarium* que van de ácidos de 14 a 18 carbonos y cuyos porcentajes individuales varían de menos del 1% a más del 35% del contenido total de ácidos, siendo los más comunes los esteáricos (18:0) oleicos (18:1n-9) y linoleicos (18:2n-6) que pueden encontrarse en concentraciones por encima del 90% en sus perfiles (Zain, 2010; Shahnazi et al., 2013). En este trabajo este género fue el que mayor cantidad de ácidos grasos reportó siendo el más abundante el 18:1w9c.

Con base en los resultados obtenidos en la caracterización de los ácidos grasos presentes en la gran variedad de hongos asociados a las raíces de orquídeas que incluye hongos endófitos ascomicetos y basidiomicetos, así como hongos micorrícicos, se requiere la estandarización de condiciones de cultivo y protocolos de extracción para la aplicación exitosa del análisis de estos ácidos en este grupo de hongos, para que ratifiquen los resultados obtenidos por diferentes laboratorios, así como la obtención de perfiles de ácidos grasos más completos que permitan analizar su composición y proporción como posible método alternativo para la identificación de estos hongos en las orquídeas.

II.5. Conclusiones

Los ácidos grasos de amplio espectro 14:0, 18:0 y 18:1w9c estuvieron presentes en todos los géneros de hongos endófitos de orquídeas analizados y sus concentraciones fueron diferentes para cada género lo que permitió su agrupamiento. El ácido graso más abundante en todas las muestras fue el 18:1w9c con proporciones mayores al 30% del total para la mayoría de los hongos analizados, lo cual puede ser una herramienta para detectar la presencia de estos hongos en las raíces de las orquídeas.

Coprinus sp. presentó como ácido graso único el 16:0 2OH, *Preussia* el 15:1w5c y *Fusarium* los ácidos 18:1 2OH y 19:0w8c, que pudieran ser utilizados como posibles marcadores de estos géneros, sin embargo se requiere de mayores estudios.

A diferencia de otros trabajos en donde se reportó a los ácidos 17:0 y 20:0 como posibles marcadores del género micorrícico *Tulasnella*, en el presente trabajo no se extrajeron estos ácidos de las diferentes cepas analizadas por lo que se requieren más estudios al respecto.

La concentración de los ácidos grasos en cada género así como la comparación de sus perfiles es una herramienta útil que puede ser utilizada en combinación con técnicas morfológicas y moleculares para la identificación correcta de los hongos asociados a las orquídeas a una escala fina.

II.6 Referencias

- Atlas, R. M. (1984). Use of microbial diversity measurements to assess the environmental stress. In: Current Perspectives in Microbiol Ecology. (Klug, M. J. and Reddy, C. A. Eds.). American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Aye S.S., Fukuda S., Matsumoto M. (2008). Chemotaxonomic characterization of rice seedling blight complex using fatty acid methyl ester (FAME) profiles. *Mycoscience*. 49, 373–378.
- Barraclough, T.G. & Pauw A. (2011). The effects of above and belowground mutualisms on orchid speciation and coexistence. *Am. Nat.* 177, E54eE68.
- Ding R., Chen X.H., Zhang L.J., Yu X.D., Qu D., Duan R., Xu Y.F. (2014). Identity and specificity of *Rhizoctonia*-like fungi from different populations of *Liparis japonica* (Orchidaceae) in northeast China. *PlosONE* 9(8), e105573. doi: 10.1371/journal.pone.0105573.
- Fraga M.E., Santana D.M.N., Gatti M.J., Direito G.M., Cavaglieri L.R, Rosa C.A.R. (2008). Characterization of *Aspergillus* species based on fatty acid profiles. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103, 540–544.
- Frisvad, J.C., Larsen T.O., de Vries R., et al., (2007). Secondary metabolite profiling, growth profiles and others tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. *Stud. Mycol.* 59: 31-37.
- Frostegard A. & Baath E. (1996). The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biol Fertil Soils*, 22:59–65.
- Hashem A, Abd-Allah E.F., Al-Huqail A.A., et al., (2014). Report and characterization of *Alternaria alternate* (Fr.) Keissler on *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh forests of industrial Yanb'a city, Saudi Arabia. *Pak J Bot.*, 46(2), 725–734.
- Johnk, J. S. & Jones R. K. (1992). Determination of whole cell fatty acids in isolates of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. *Phytopathology*, 82, 68-72.
- Kaur A., Chaudhary A., Kaur A., Choudhary R., Kaushik R. (2005). Phospholipid fatty acid.

- A bioindicator of environmental monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Science*, 89, 1103-1112.
- Lanoiselet, E.J., Cother N.J., Cother G.J., Ash J.D., Harper I. (2005). Comparison of two total cellular fatty acid analysis protocols to differentiate *Rhizoctonia oryzae* and *R. oryzae-sativae*. *Mycologia*, 97 (1), 77-83. DOI: 10.1080/15572536.2006.11832841
- Larkin, R.P. & Groves C.L. (2003). Identification and characterization of isolates of *Phytophthora infestans* using Fatty Acid Methyl Ester (FAME) profiles. *Plant Disease* 87 (10): 1233-1243.
- Larsen J., Mansfeld-Giese K., Bødker L. (2000). Quantification of *Aphanomyces euteiches* in pea roots using specific fatty acids. *Mycological Research*, 104, 858–864.
- Larsen J. & Bødker L. (2000). Interactions between pea root-inhabiting fungi examined using signature fatty acids. *New Phytologist*, 149 (3), 487-493.
- Larsen, J., Olsson P.A., Jakobsen I. (1998). The use of fatty acid signatures to study mycelial interactions between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and the saprotrophic fungus *Fusarium culmorum* in root-free soil. *Mycol. Res.* 102 (12), 1491–1496.
- Lechevalier, H. & Lechevalier M.P. (1998) Chemotaxonomic use of lipids an overview. In: *Microbial Lipids*, Vol. 1 (Ratledge C. & Wilkinson S.G., Eds.). Academic Press., San Diego, CA. pp. 869 -902.
- Lopes da Silva, T., de Sousa E., Pereira P. T., Ferrao A. M., and Roseiro J. C. (1998). Cellular fatty acid profiles for the differentiation of *Penicillium* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 164, 303-310.
- Madan, R., Pankhurst C., Hawke B., Smith S. (2002). Use of fatty acids for identification of AM fungi and estimation of the biomass of AM spores in soil. *Soil Biol. Biochem.* 34, 125-128.
- Matsumoto M., Furuya N., Takanami Y., Matsuyama N. (1996). A study of fatty acid analysis as a new taxonomic tool for differentiating *Rhizoctonia* spp. *J Fac Agr*, Kyushu Univ. 40, 279–286.
- Matsumoto M. (2006). Comparison of two fatty acid analysis protocols to characterize and differentiate *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F. oxysporum* f. sp. *radicislycopersici*. *Mycoscience*. 47(4), 190–197.
- Mohamed, A.M., Abeer R.M., Abd-El-Aziz, Monira R.A. (2016). Molecular and biochemical taxonomic tools for the identification and classification of plant-pathogenic *Penicillium* species. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(6), 1090-1096. Doi: <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2016.1228480>.
- Morris, S.J., Friese C.F., Allen M.F. (2016). Disturbance in natural ecosystems. Scaling from fungal diversity to ecosystem functioning. In: *Mycota VI. Environmental and microbial relationship*. (Drozhinina I.S. and Kiubicek C.P. Eds.). 3d. Edition. Springer. Pp 79-98. Doi: 10.1007/978.3.
- Müller, M. M., Kantola R., and Kitunen V. (1994). Combining sterol and fatty acid profiles for characterization of fungi. *Mycol. Res.*, 98, 593-603.
- Niklaus P.A., Alpeh J., Ebersberger D., Kampichler C., Kandeler E., Tscherko D. (2003). Six years of *in situ* CO₂ enrichment evoke changes in soil structure and soil biota of nutrient poor grassland. *Global Change Biology* 9, 585– 600.
- Olsson, P.A. (1999). Signature fatty acid provide tools for determination of the distribution and interactions of mycorrhizal fungi in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 29,303-310.

- Osgura-Tsujita, Y., Gebauer G., Hashimoto T., Umato H., Yukawa T. (2009). Evidence for novel and specialized mycorrhizal parasitism: The orchid *Gastrodia confusa* gains carbon from saprotrophic *Mycena*. *Prox. R. Soc. Lond B*, 276, 761-768.
- Pankhurst C.E., Pederson H., Hawke B.G. (2001). The usefulness of fatty acid analysis in differentiating species of *Pythium*, *Rhizoctonia* and *Gaeumannomyces* and as a tool for their detection in infected wheat roots. *Austral. Plant. Pathol.* 30, 191-197.
- Pereira M.C., Vieira N., Totola M. & Megumi C. (2011). Total fatty acid composition in the characterization and identification of orchid mycorrhizal fungi *Epulorhiza* spp., *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* 35(4), 1159-1165.
- Pereira, M. C., Da Silva Coelho I., Da Silva Valadares R. B., Oliveira S. F., Bocayuva M., Pereira O. L., et al.,(2014). Morphological and molecular characterization of *Tulasnella* spp. fungi isolated from the roots of *Epidendrum secundum*, a widespread Brazilian orchid. *Symbiosis*, 62(2), 111-121. <https://doi.org/10.1007/s13199-014-0276-0>
- Priyatmojo A., Yamauchi R., Carling D.E., Kageyama, Hyakumachi M. (2002). Differentiation of three varieties of *Rhizoctonia circinata* var. *oryzae* and var. *zeae* on the basis of cellular fatty acid composition. *Phytopath.*, 150, 1-5.
- Samson, R., Visagle C.M., Houbraken J., et al.,(2014). Identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol.* 78: 141-173.
- Sasser, M. J. (1991). Identification of bacteria through fatty acid analysis. In: Methods of Phytobacteriology. F. Klement, K. Rudolf, and D. C. Sands, eds. Akademiai Kiado, Budapest, Hungary. Pp 199-204.
- Sasser, M. J. (1990). Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. http://natasha.eng.usf.edu/gilbert/courses/Biotransport%20Phenomena/pdf/bacteria_gc_1.pdf (Accessed March 10, 2017).
- Sasser, J. M., Fieldhouse D. J., Carter C. N. (1984). Computer assisted identification of bacteria based on fatty acid analysis. *Phytopathology*, 74, 882.
- Shahnazi S., Sariah M., Mehdi E. (2013). Characterization, differentiation and biochemical diversity of *Fusarium solani* and *Fusarium proliferatum* based on cellular fatty acid profiles. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. DOI:10.1080/03235408.2013.770653
- Sharon, M. Kuninaga S., Hyakumachi M. & Sneh B. (2006). The advancing identification and classification of *Rhizoctonia* spp. using molecular and biotechnological methods compared with the classical anastomosis grouping. *Mycoscience*, 47:299-316.
- Slabbinck B, Waegeman W, Dawyndt P, De Vos P, De Baets B. (2010). From learning taxonomies to phylogenetic learning: Integration of 16S rRNA gene data into FAME based bacterial classification. *BMC Bioinformatics*. 11, 69. DOI: 10.1186/1471-2105-11-69.
- Smith, S.E., & Read J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. (Elsevier, Ed.). 3d edition. New York, Springer.
- Stahl, P. D., & Klug, M. J. (1996). Characterization and differentiation of filamentous fungi based on fatty acid composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4136-4146.
- Stevens-Johnk, J. & Jones R. K. (1993). Differentiation of populations of AG-2-2 of *Rhizoctonia solani* by analysis of cellular fatty acids. *Phytopathology* 83, 278-283.
- Stevens-Johnk, J. & Jones, R. K. (2001). Differentiation of three homogeneous groups of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 4 by analysis of fatty acids. *Phytopathology* 91, 821-830.

- Yamato, M., Yagame T., Suzuhi A., Iwase K. (2005). Isolation and identification of mycorrhizal fungi associating with an achlorophyllous plant, *Epipogium roseum* (Orchidaceae). *Mycoscience*, 43, 73-77. DOI 10.1007/s10267-004-0218-4.
- Zain, M.E. (2010). Biochemical markers in taxonomy of genus *Fusarium*. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 6 (1), 1-7.
- Zain, M.E., Bahkali A.H., Al-Othman M.R. (2013). Developments in using fatty acids in fungal chemotaxonomy. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7 (38), 4638-4645.
- Zelles, L. (1999). Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: a review. *Biol Fertil Soils* 29:111–129.

CAPITULO III. CONTRIBUCIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS Y MICORRÍCICOS A LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO INICIAL DE PLÁNTULAS *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS MEXICANAS

RESUMEN

La familia Orchidaceae es un grupo de plantas de los más diversos a nivel mundial que, sin embargo, depende de la interacción con otros microorganismos que le garantizan una estabilidad ecológica y mayores ventajas para su crecimiento. Bajo condiciones naturales algunas asociaciones benéficas se establecen entre las raíces de las orquídeas y ciertos grupos muy heterogéneos de bacterias y hongos. Además, debido a que sus semillas presentan un embrión que es escaso en endospermo requieren de la intervención de diferentes grupos de hongos que les garanticen la germinación y el desarrollo de mecanismos de defensa para su supervivencia. A pesar de que la germinación simbiótica actualmente es ampliamente utilizada en países como Australia, en México, el uso de esta metodología se encuentra subutilizada como herramienta de conservación. Por tal motivo la finalidad de este trabajo fue determinar el grado de compatibilidad de algunos hongos endófitos y micorrícicos y su contribución en la germinación y su eficiencia para el desarrollo del embrión y supervivencia *in vitro* con 7 especies de orquídeas mexicanas. Se colectaron semillas de cuatro orquídeas epífitas (*Laelia autumnalis*, *L. speciosa*, *Euchile citrina* y *P. squalida*) y tres orquídeas terrestres (*Bletia purpurata*, *Habenaria flexuosa* y *Govenia lagenophora*). Se corroboró su viabilidad utilizando CTT (Cloruro de Trifenil-tetrazolio) y se colocaron en germinación asimbiótica y simbiótica con 6 cepas de hongos micorrícicos y 11 cepas de hongos endófitos no micorrícicos en medios básico de avena (MBA). Se determinaron porcentajes de germinación a los 30 días y de supervivencia a los 150 días. Se corroboró la colonización fúngica en protocormos a los 90 días y se determinó el índice de desarrollo (índice germinativo IG) a los 30 y 150 días. Los resultados obtenidos mostraron que la presencia de hongos endófitos y micorrícicos promueven una mayor germinación de las semillas de orquídeas en comparación con la germinación asimbiótica en cultivos *in vitro* sin adición de reguladores de crecimiento. En las primeras etapas el proceso germinativo de las orquídeas analizadas fue estimulado por una gran variedad de hongos endófitos pero después del rompimiento de la testa, el embrión requirió de la interacción con los hongos, de manera que únicamente los que lograron establecer una asociación simbiótica con el protocormo, estimularon el desarrollo y crecimiento subsecuente de las plántulas. Únicamente los hongos del complejo *Rhizoctonia* (*Tulasnella* y *Serendipita*) reportados como hongos micorrícicos de orquídeas y los ascomicetos *Morchella* y *Trichocladium*

colonizaron los protocormos y estimularon el desarrollo del embrión hasta la etapa 6 (plántula con dos o más hojas verdaderas y raíces). Estas cepas fúngicas fueron más efectivas para las orquídeas terrestres logrando estadios de desarrollo 4, 5 y 6 (aparición de la primera hoja y raíces, en adelante) a los 30 días después de la siembra ($IG > 3$) y porcentajes de germinación superiores al 60%, mientras que las orquídeas epífitas se encontraban en estadios 1 y 2 (rompimiento de testa y formación de protocormo) ($IG < 1$) a este tiempo y sus porcentajes germinativos fueron inferiores al 40%. *G. lagenophora* no germinó en ninguno de los tratamientos y *E. citrina* no mostró compatibilidad por la mayoría de los hongos a excepción de *Tulasnella 4*, con el que únicamente alcanzó el estadio 4 de desarrollo (aparición de la primera hoja). El ascomiceto *Trichocladium* formó todas las estructuras típicas de la micorriza orquideoide, colonizó y promovió el desarrollo de plántulas hasta el estadio 6 (plántula con dos hojas y raíces) en *B. purpurata*, *H. Flexuosa*, *L. autumnalis*, *L. speciosa* y *P. squalida*, por lo que se comprobó su capacidad micorrícica. Los resultados obtenidos sugieren que las especies terrestres mexicanas tienen asociaciones específicas con hongos micorrícicos durante las primeras etapas de desarrollo, que resultan muy efectivas para el proceso germinativo, desarrollo y supervivencia de plántulas. Las orquídeas epífitas por el contrario resultaron más generalistas durante el proceso germinativo, de manera que una gran variedad de hongos endófitos estimuló su germinación, pero que para el desarrollo posterior no fueron efectivas, indicando variación en la interacción que probablemente involucra un cambio de sus socios fúngicos, o bien una mayor o una menor dependencia hacia la asociación simbiótica.

Palabras clave: semillas, estadios de desarrollo, asociación simbiótica

ABSTRACT

Orchidaceae is one of the most diverse plant families in the world and it is proven that they depend on interaction with other microorganisms that guarantee ecological stability and greater advantages for their growth. Under natural conditions some beneficial associations are established between the roots of orchids and certain very heterogeneous groups of bacteria and fungi. In addition, because their seeds have an embryo that is scarce in endosperm, these plants require the intervention of different groups of fungi that guarantee germination and development of defense mechanisms for their survival. Although symbiotic germination is currently widely used in countries such as Australia, in Mexico, the use of this methodology is underutilized as a conservation tool. For this reason, the purpose of this work was to determine the degree of compatibility of some endophytic and mycorrhizal fungi to promote germination, and its efficiency for embryo development and in vitro survival with 7 species of Mexican orchids. Seeds

of 4 epiphytic orchids were collected: *Laelia autumnalis*, *L. speciosa*, *Euchile citrina* and *P. squalida*; and 3 terrestrial orchids: *Bletia purpurata*, *Habenaria flexuosa* and *Govenia lagenophora*. Seeds viability was corroborated using TTC (Trifenil-tetrazodium Chloride) and then were placed in asymbiotic and symbiotic gestation with 6 strains of mycorrhizal fungi and 11 strains of non-mycorrhizal endophytic fungi in basic oatmeal media (MBA). Germination percentages were determined at 30 days and survival at 150 days. The fungal colonization in protocorms was corroborated at 90 days and the development index (germinative index) was determined at 30 and 150 days. The results showed that endophytic and mycorrhizal fungi promotes a higher orchid seeds germination in comparison with asymbiotic germination at *in vitro* cultures without the addition of hormones. In the first stages the germinative process of the analyzed orchids was stimulated by a great variety of endophytic fungi, but after testa breaking the embryo became more selective in the interaction with fungi, so only those strains that established a symbiotic association with the protocormo stimulated the development and subsequent growth of the seedlings. Only fungi of *Rhizoctonia* complex (*Tulasnella* and *Serendipita*) reported as orchid mycorrhizal fungi and the ascomycetes *Morchella* and *Trichocladium* colonized the protocormos and stimulated the development of the embryo until stage 6. These fungal strains were more effective for terrestrial orchids achieving stages of development 4, 5 and 6 at 30 days after sowing ($IG > 3$) and germination percentages higher than 60%, while epiphytic orchids were in stages 1 and 2 ($IG < 1$) at this time and their germination percentages were less than 40%. *G. lagenophora* did not germinate in any of the treatments and *E. citrina* did not show compatibility for most of the fungi except for *Tulasnella* 4, but only reached stage 4 of development. *Trichocladium* ascomycete formed all the typical structures of the orquideoid mycorrhiza, colonized and promoted the development of seedlings up to stage 6 in 5 of the orchid species analyzed, so its mycorrhizal capacity was verified. The results obtained suggest that the Mexican terrestrial species have specific associations with mycorrhizal fungi during the first stages of development, which are very effective for the germinative process, development and survival of seedlings. The epiphytic orchids on the contrary were more generalistists during germinative process, so that, a great variety of endophyte fungi stimulated their germination, but for later development they were not effective, indicating a variation in the association that probably involves a change of fungal interactions or more/less dependence on symbiotic associations.

Key woerds: seeds, development stages, symbiotic associations

III.1. Introducción

Las orquídeas son un grupo de plantas que presentan una serie de adaptaciones que les han permitido colonizar una gran diversidad de ambientes (Arditti & Abdul-Ghani, 2000). Una de estas adaptaciones es la producción de semillas consideradas como las más diminutas que se conocen, pero que como desventaja, presentan un embrión aún más pequeño que es escaso en endospermo (Dunn & Arditti, 2009) (Fig. 16). Debido a esto, un requisito indispensable para la germinación en su medio ambiente natural, en muchas especies de orquídeas, dado que estas semillas son incapaces de obtener nutrientes o que la disponibilidad de estos no siempre es la adecuada, es la interacción con otros organismos (Dearnaley et al., 2012).



Figura 16. Semillas de orquídea. En cápsula (izquierda) y semillas individuales (derecha). Fotos Munguía-Rodríguez y Beltrán-Nambo.

Para muchas especies de orquídeas, la expansión inicial del embrión y el rompimiento de la testa puede ocurrir bajo condiciones *in vitro* sin la intervención de hongos simbios (Smith & Read, 2008), sin embargo, en ausencia de una fuente de carbohidratos, la colonización por hongos micorrícicos es necesaria para el desarrollo del protocormo y el crecimiento de las plántulas que les garantizan una estabilidad ecológica y mayores ventajas para su crecimiento (Hynson et al., 2013; Teixeira et al., 2015).

Se menciona también que las plántulas crecidas bajo condiciones *in vitro* no desarrollan resistencia natural contra microorganismos patógenos y por esta razón son incapaces de sobrevivir bajo condiciones naturales (Liu et al., 2010),

pero que se puede incrementar el vigor y la fortaleza si durante las primeras etapas de desarrollo, se introduce al hongo endófito y /o micorrícico apropiado (Swarts & Dixon, 2009; Zhang et al., 2012), de manera que la presencia de estos hongos estimulen la expresión y producción de metabolitos secundarios relacionados con los mecanismos de defensa de las plantas y otros compuestos fúngicos que proporcionan protección contra estrés biótico y abiótico, lo que resulta en una mayor supervivencia de las plántulas al momento de reintroducirlas a sus hábitats naturales (Chen et al., 2012; Zeng et al., 2014; Xiaoya et al., 2015).

En diferentes trabajos se ha investigado el efecto que tienen hongos micorrícicos y no micorrícicos sobre el crecimiento de los protocormos y plántulas. El beneficio de hongos micorrícicos del complejo *Rhizoctonia* es bien conocido (Otero et al., 2003; Otero & Bayman, 2009; Swangmaneecherern et al., 2012; Zettler et al., 2013; Chávez et al., 2014; Pereira et al., 2015) y los resultados al utilizar otros hongos endófitos señalan que algunos de ellos promueven de manera significativa el crecimiento de las plántulas (Faeth & Fagan, 2002; Rodríguez et al., 2009; Hossain et al., 2013; Gamboa-Gaitán & Otero-Ospina, 2016). A nivel mundial la lista de hongos endófitos que promueven la germinación de la semilla incluye 35 géneros pertenecientes a 22 familias, 12 órdenes y 2 divisiones (Rasmussen et al., 2015), entre algunos de los géneros se mencionan los del complejo *Rhizoctonia* (*Tulasnella*, *Ceratobasidium*, *Serendipita* y *Tanathephorus*) (Nontachaiyapoom et al., 2010; Chen et al., 2012; Zi et al., 2014), y algunos otros como *Auricularia*, *Russula* y *Coprinus* (Taylor et al., 2004; Yagame et al., 2007; Dearnaley et al., 2012).

A pesar de que la germinación simbiótica actualmente es ampliamente utilizada en países como Australia y en Norteamérica (Batty et al., 2001; Stewart et al., 2002) en otras partes del mundo, incluyendo México y América del sur que cuentan con una gran diversidad de orquídeas, el uso de esta metodología se encuentra subutilizada como herramienta de conservación. En México por ejemplo, en donde más del 40% de las 1260 especies que se reportan son endémicas (Espejo-Serna, 2012) y donde 188 de ellas se encuentran en categoría de riesgo (SEMARNAT, 2010 - NOM-059), son contadas las especies que están siendo propagadas *ex situ* con hongos micorrícicos, como *Bletia urbana* y *Dichromantus aurantiacus* (Ortega-Larrocea et al., 2008) y se

desconoce la función benéfica que pueden tener otros hongos endófitos asociados a sus raíces.

Rasmussen y colaboradores (2015) compararon los micobiontes asociados a las semillas de orquídeas y encontraron diferentes patrones: algunas orquídeas se mantienen en asociación con un solo micobionte, mientras que otras pueden cambiar de simbionte en la transición de la etapa juvenil a la adulta o durante alguna perturbación ambiental o expandir sus asociaciones (Fig. 17). Se menciona que la especificidad del embrión y las plántulas hacia el micobionte es más estrecha que la de las plantas adultas, pero generalmente la asociación se establece mejor con hongos que provienen de las raíces de las plantas adultas (Jacquemyn et al., 2011).

Por todos estos patrones de comportamiento en la asociación orquídea –hongo se considera que la aplicación de endófitos que pueden estimular el desarrollo del embrión y promover el crecimiento de las plantas ya sea en cultivos puros o en combinación con hongos micorrícicos es una técnica que permanece aún poco explorada, aunque es muy prometedora (Teixeira et al., 2015).

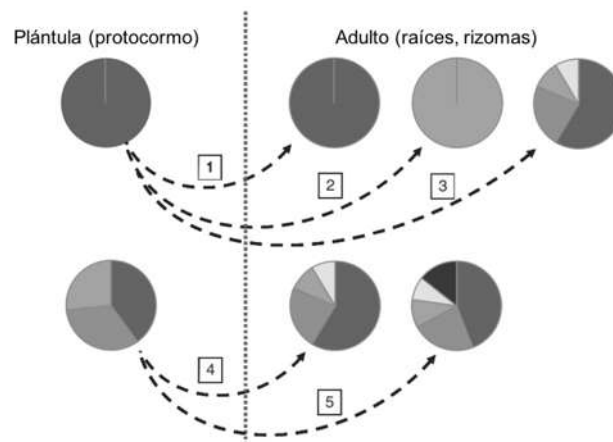


Figura 17. Especificidad fúngica en plántulas de orquídeas (izquierda) y plantas adultas (derecha). 1) Conservan al socio, ejm. *Drakaea* sp. 2) Cambian de un hongo a otro, ejm. *Gastrodia elata*. 3) Cambian de un hongo a varios, ejm. *Tripularia discolor*. 4) Plántula en asociación con varios hongos y aumentan en la etapa adulta, ejm. *Epictatis*. 5) muchos micobiontes que son diferentes a los de la primera etapa de desarrollo (Modificado de Rasmussen et al., 2015).

El estudio de la dependencia de la orquídea hacia los hongos para la germinación de la semilla y el desarrollo de plántulas, ayuda a entender el papel de estos hongos en el proceso de desarrollo de las orquídeas y los mecanismos que

aseguran su supervivencia en los diferentes ecosistemas en que se desarrollan. Por tal motivo la finalidad de este trabajo fue determinar el grado de compatibilidad de algunos hongos endófitos y micorrícicos con 7 especies de orquídeas mexicanas y su eficiencia para promover la germinación, desarrollo y supervivencia *in vitro*.

III.2. Metodología

Selección de hongos

Para analizar la compatibilidad fúngica de hongos endófitos y micorrícicos se seleccionaron 6 cepas de hongos micorrícicos orquideoides previamente identificados y 11 cepas de hongos endófitos, todos ellos provenientes de raíces de 6 orquídeas mexicanas: 3 epífitas (*Laelia autumnalis* (Lex.) Lindl., *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr y *Prosthechea squalida* (La Llave & Lex.) Soto Arenas & Salazar); y 3 orquídea terrestres (*Bletia purpurata* A. Rich & Galeotti, *Habenaria flexuosa* Lindl. y *Govenia lagenophora* Lindl.). La orquídea de procedencia de las cepas fúngicas utilizadas y su relación con secuencias de GenBank se muestra en la Tabla 12.

Previo al experimento las cepas fúngicas se mantuvieron en medio PDA en incubación a 27° C, trasladando periódicamente fragmentos de hifas en crecimiento a medio fresco para mantener su actividad.

Colecta de semillas

Se colectaron semillas de las orquídeas arriba mencionadas y se adicionó a la colecta de semillas la especie *Euchile citrina*. Las semillas se extrajeron de tres cápsulas maduras de plantas separadas, de cada una de las especies de orquídeas analizadas y de las mismas poblaciones en donde previamente se colectaron las raíces, para la extracción de los hongos utilizados en este análisis. Las cápsulas intactas se trasladaron en bolsas de papel y se almacenaron a temperatura ambiente en el laboratorio durante 15 días. Después de este tiempo las cápsulas secas se abrieron con un bisturí para extraer las semillas que fueron almacenadas en frascos de cristal estériles con tapón de corcho a temperatura ambiente (23-25° C) hasta su utilización.

Tabla 12. Cepas fúngicas seleccionadas, orquídea de procedencia y su identidad con secuencias referenciadas en Genbank.

NO. MUESTRA	ORQUÍDEA DE PROCEDENCIA	PHYLUM	ORDEN	HONGOS		IDENTIDAD GENBANK
				GÉNERO	TIPO	
MICORRIZOGENOS						
M85	<i>Bletia purpurata</i>	Basidiomycota	Tulasnellales	<i>Tulasnella calospora</i> 1	Orquideoide	<u>GU166407.1</u>
M87	<i>Bletia purpurata</i>			<i>Tulasnella calospora</i> 2	Orquideoide	<u>GU166407.1</u>
M1	<i>Laelia autumnalis</i>			<i>Tulasnella sp.</i> 3	Orquideoide	<u>EF393628.1</u>
M34	<i>Laelia speciosa</i>			<i>Tulasnella sp.</i> 4	Orquideoide	<u>EF393627.1</u>
M37	<i>Govenia lagenophora</i>			<i>Tulasnella calospora</i> 5	Orquideoide	<u>JQ247558.1</u>
M86	<i>Bletia purpurata</i>		Serendipitales	<i>Serendipita sp.</i>	Orquideoide	<u>FJ788847.1</u>
M15	<i>Laelia autumnalis</i>		Agaricales	<i>Coprinus sp.</i>	Orquideoide y saprobio	<u>AB071802.1</u>
M4	<i>Laelia autumnalis</i>		Russulales	<i>Russula sp.</i>	Ectomicorriza y Orquideoide	<u>HQ021866.1</u>
M96	<i>Bletia purpurata</i>	Ascomycota	Pezizales	<i>Morchella sp.</i>	Ectomicorriza	
ENDÓFITOS						
M45	<i>Govenia lagenophora</i>	Ascomycota	Pleosporales	<i>Preussia minima</i> 1	Simbionte benéfico	<u>KY124642.1</u>
M78	<i>Laelia autumnalis</i>			<i>Preussia minima</i> 2	Simbionte benéfico	<u>KY124642.1</u>
M35	<i>Bletia purpurata</i>		Sordariales	<i>Paecilomyces inflatus</i>	Slmbionte	<u>GU566291.1</u>
M82	<i>Laelia speciosa</i>			<i>Fusarium sp.</i>	Fitopatógeno	<u>EU860071.1</u>
M90	<i>Bletia purpurata</i>			<i>Trichocladium sp.</i> 1	Saprobio	<u>KM062090.1</u>
M93	<i>Bletia purpurata</i>			<i>Trichocladium opacum</i> 2	Saprobio	<u>HF678530.1</u>
M16	<i>Prosthechea squalida</i>		Xylariales	<i>Muscodor albus</i>	Saprobio	<u>JX298899.1</u>
M36	<i>Prosthechea squalida</i>		Helotiales	<i>Cephaloteca sulfurea</i>	Simbionte	<u>EU823315.1</u>

Prueba de viabilidad

La viabilidad de una porción de semillas fue analizada utilizando la prueba de cloruro 2,3,5-trifeniltetrazolio (CTT) reportada por Van Waes y Debergh (1986), para lo cual las semillas se colocaron en una solución de hipoclorito de calcio (CaOCl_2) al 2% (w/v) con unas gotas de Tween 80, para posteriormente dejarlas en agua destilada estéril durante 24 horas. Pasado este tiempo, las semillas se tiñeron con CTT al 1% (w/v) a pH 7 y se almacenaron en obscuridad a 30° C durante 24 horas. Después de lo cual se observaron en microscopio óptico y se calcularon porcentajes de las semillas viables considerando la presencia de

embriones robustos, ovoides y teñidos de color rojizo o pardo. Una vez comprobada su viabilidad, las semillas no utilizadas para la prueba (la mayoría) se prepararon para su germinación.

Desinfección de semillas

Para la desinfección de la semilla se utilizaron paquetes de papel filtro de 4 cm². En cada paquete se colocaron 0.05 g de semillas aproximadamente y se cerraron con grapas. Para la desinfección se siguió la metodología de Vujanovic (2000), con modificación en el tiempo de tratamiento de acuerdo a los resultados obtenidos por Segundo-Campos (2016). La técnica consistió en sumergir los paquetes en una solución de hipoclorito de sodio comercial (4-6 % de cloro activo) al 10% durante 10 minutos en agitación bajo campana de flujo laminar, para posteriormente enjuagarse tres tiempos con agua destilada estéril.

Germinación simbiótica y asimbiótica

Para la germinación simbiótica y asimbiótica, las semillas previamente esterilizadas se sembraron en cajas Petri con medio básico de avena (MBA) (Mitchell, 1989) mediante frotación del sobre de papel filtro en el que se esterilizaron. Posteriormente se adicionó al medio 1 cm³ aproximadamente del inóculo fúngico seleccionado. Se prepararon un total de 5 réplicas para cada uno de los inóculos y 5 replicas carentes de hongo para la prueba asimbiótica, con lo que se tuvo un total de 100 muestras a analizar. Los cultivos se incubaron en cámara de luz con fotoperiodo de 16 horas luz/8 h oscuridad a una temperatura de 25° C $\pm$ 2. Tres cajas de cada tratamiento fueron seleccionadas al azar cada 15 días para medir el estadio de germinación y desarrollo de plántulas.

Porcentaje de germinación y evaluación del desarrollo del embrión

El porcentaje de germinación de las semillas y el desarrollo del embrión fue medido utilizando una escala de 0 a 6 propuesta por Zettler y McInnis (1993):

Estadio 0= No germinación, Estadio 1 = ruptura de testa debido al hinchamiento del embrión, Estadio 2 = protocormo con presencia de rizoides, Estadio 3 = aparición del primer primordio foliar, Estadio 4 = aparición de la primera hoja, Estadio 5 = elongación de la hoja y emergencia de la raíz y Estadio 6 = presencia de dos hojas. (Fig. 18).

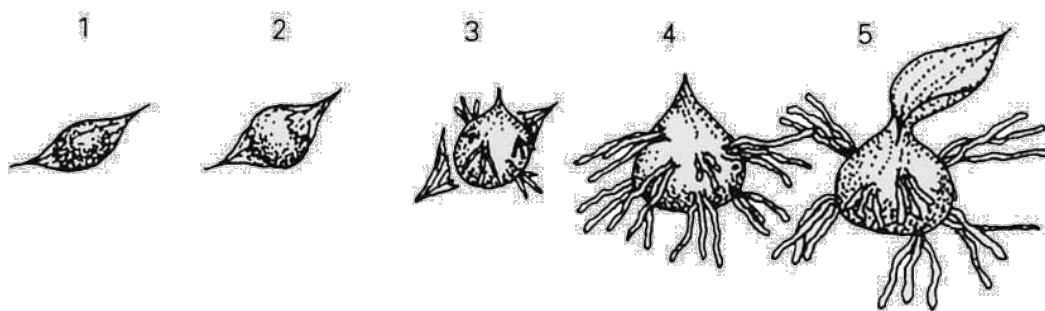


Figura 18. Etapas de germinación de la semilla. Estadios de desarrollo 0 a 5 de acuerdo a Zettler y McInnis (1993).

La infección fúngica fue confirmada después de los estadios 4 y 5 mediante la selección al azar de 2 o 3 protocormos de cada tratamiento y la observación en microscopio para detectar la presencia de pelotones y/o hifas.

Se calcularon los porcentajes de germinación a los 30 días de la siembra, considerando el estadio 1 como semilla germinada, de acuerdo a la fórmula:

$$\%G = (\text{No. de semillas en estadio 1 o superior} / \text{total de semillas contabilizadas}) \times 100$$

Se calculó el índice germinativo (IG) mediante el conteo de las semillas en 45 observaciones por tratamiento, de acuerdo a la metodología utilizada por Otero y colaboradores (2004) que evalúa la germinación considerando además el estadio de desarrollo del embrión, de tal manera que valores más altos son reflejo de un estado de desarrollo más avanzado en el embrión. La fórmula es:

$$IG = (N_1 + N_2(2) + N_3(3) + N_4(4) + N_5(5) + N_6(6)) / N_0 + N_1 + N_2 + N_3 + N_4 + N_5 + N_6$$

N = número de semillas en la etapa de desarrollo correspondiente al subíndice

El porcentaje de supervivencia se calculó a los 150 días después de la siembra por conteos al azar en cada una de las muestras con la fórmula:

$$\%S = (\text{No. de plántulas en estadios 3 a 6} / \text{total contado}) \times 100$$

Análisis estadísticos

Todos los resultados obtenidos se graficaron en valores promedio y para los análisis estadísticos los datos fueron transformados, se hizo la comparación de medias con análisis de varianza (T-Students y ANOVA) en el programa JMP V. 8.0 y cuando hubo diferencia significativa se aplicó prueba de Tukey-Kramer.

III.3. Resultados

Viabilidad

La viabilidad observada en las cápsulas colectadas de las diferentes especies de orquídeas fue más alta en las orquídeas epífitas como lo demostró el análisis de comparación de medias ($P = 0.05$) (Tabla 13), con un valor promedio de 75% , en comparación con el encontrado para las especies terrestres que fue de 49%.

Tabla 13. Porcentaje de viabilidad de cápsulas por especie de orquídea y gráfica que muestra la diferencia significativa en prueba t-Student.

ORQUÍDEA	Cápsula 1	Cápsula 2	Cápsula 3	Promedio
<i>L. autumnalis</i>	76	79	88	81
<i>L. speciosa</i>	73	76	75	74.7
<i>E. citrina</i>	77.5	82.5	79	79.7
<i>P. squalida</i>	89.6	71	65	75.2
<i>B. purpurata</i>	71	66	45	60.7
<i>G.</i>	74.5	58	33.2	55.2
<i>lagenophora</i>				
<i>H. flexuosa</i>	35	43	15	31

La prueba de CTT tiñó de color rojo a pardo los embriones de las semillas de todas las especies, demostrando que la prueba de viabilidad fue positiva (Fig. 19). Esta viabilidad varió significativamente ($P=0.05$, Tukey) entre las diferentes especies.

L. autumnalis y *E. citrina* presentaron los porcentajes de viabilidad más altos, mientras que los valores inferiores se presentaron en las semillas de *H. flexuosa*, que fueron del 31 % en promedio (Fig. 20).



Figura 19. Tinción de semillas con CTT. Viabilidad de la semillas positiva por tinción del embrión con tonalidad roja. 1. *L. speciosa*, aumento 20x; 2. *G. lagenophora*, aumento 10x; 3. *H. flexuosa*, aumento 10x; 4. *L. autumnalis*, aumento 10x. 5. *E. citrina*, aumento 10x. (Fotos: 1,3, 5 Beltrán-Nambo; foto 2, 4 Segundo-Campos).

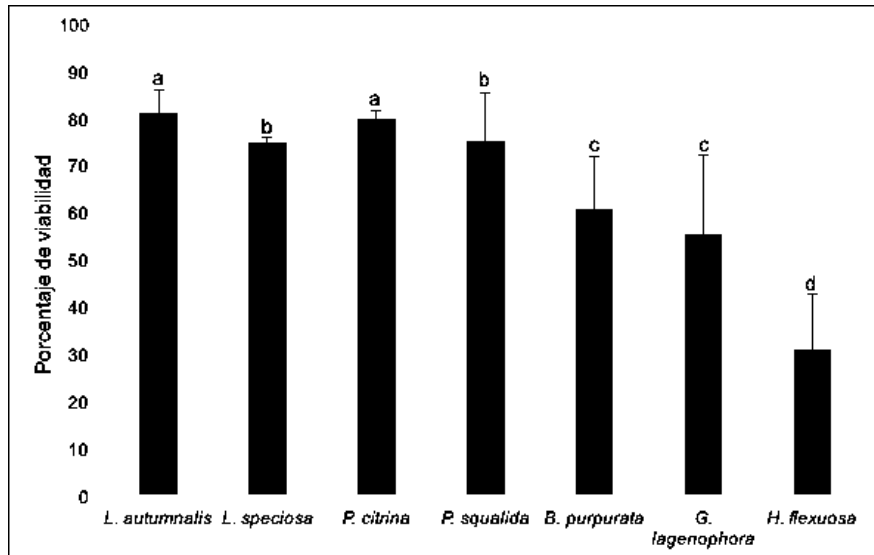


Figura 20. Porcentaje de viabilidad encontrado en las cápsulas de las especies de orquídeas analizadas. Los valores se representan en valores promedio por especie. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P = 0.05$, Tukey).

Germinación simbiótica y asimbiótica

Las pruebas de germinación simbiótica realizadas arrojaron diferentes resultados dependiendo de la orquídea en combinación con cada una de las cepas fúngicas. Las semillas de *G. lagenophora* no germinaron con ninguno de los tratamientos a pesar de que los embriones se encontraban viables y de sus porcentajes fueron más altos que los encontrados en *H. flexuosa* en la prueba con CTT.

En general, a los 30 días en todos los demás tratamientos las semillas comenzaron a germinar ya que presentaban semillas con embriones hinchados y/o rompimiento de testa (E1), y en algunos casos se detectó la presencia de rizoides (E2) y comienzo de emergencia de la primera hoja (E3) (Fig. 21 incisos 2, 3, 4). Los embriones de *B. purpurata* fueron la excepción, ya que se trata de una orquídea terrestre, que con la mayoría de las cepas fúngicas de hongos micorrícicos del género *Tulasnella* y *Serendipita* utilizadas, alcanzaron estadios de desarrollo notoriamente más avanzados (E4 y E5) que el resto de las especies de orquídeas, pero presentó una compatibilidad menor hacia otros hongos endófitos, con excepción de *Trichocladium* que estimuló la germinación y desarrollo a la par del complejo *Rhizoctonia*, de manera que a los 30 días se observaban protocormos con la primera hoja presente y la primera raíz (Fig. 21 incisos 5, 6).

Por esta razón, ésta fue la especie que presentó los índices germinativos más altos (IG = 2 a 5, los mejores tratamientos), seguida por *H. flexuosa* y *P. squalida* que presentaron estadio 3 de desarrollo (IG = 0.6 a 1, los mejores tratamientos). El resto de las especies mostraron índices germinativos inferiores a 0.5 (Fig. 22).



Figura 21. Estadios de germinación a 30 días de siembra. 1. Semillas en estadio 0 en medio asimbiótico, aumento 4.5x. 2 y 3. Rompimiento de testa e hinchamiento del embrión (E2) en *L. autumnalis*, en asociación con *Trichocladium 1*, aumento 4.5x. 4. Aparición de la primera hoja (E3) en *H. flexuosa*, en asociación con *Serendipita* sp. aumento 3.5x. 5. Elongación de la hoja (E5) en *B. purpurata*, en asociación con *Tulasnella* sp. 2, aumento 3.5x. 6. Emergencia de la raíz (E5) en *B. purpurata*, en asociación con *Trichocladium 1*, aumento 2.8x. (Fotos: Beltrán-Nambo).

En todas las especies de orquídeas, la germinación asimbiótica presentó porcentajes de germinación significativamente más bajos ($P = 0.05$, Tukey) que el 50% o más de las cepas fúngicas analizadas, lo que es prueba del efecto que tuvo la presencia de algunos de los hongos sobre la germinación de la semilla (Fig. 22). El efecto que tuvieron los hongos no mostró relación con la especie de orquídea de la cual se extrajeron a excepción de *B. purpurata*, en la que la germinación fue más exitosa con los hongos asociados a su planta adulta.

En las orquídeas epífitas, el efecto que tuvieron para estimular la germinación algunos hongos ascomicetos como *Cephalotheca*, *Preussia* y *Trichocladium* fue igual o superior ($P = 0.05$) al de las cepas de hongos micorrícicos de orquídeas como *Serendipita* y *Tulasnella*. Mientras que las orquídeas terrestres mostraron

diferente comportamiento, *B. purpurata* germinó mejor en presencia de hongos micorrícicos orquídeoides del complejo *Rhizoctonia* y del hongo ascomiceto *Trichocladium*, que aunque no está reportado como hongo micorrícico en la literatura, en su caracterización morfológica presentó formación de células monilioides y enrollamientos tipo pelotones. En *H. flexuosa* por el contrario, las semillas germinaron mejor con todos los tratamientos simbióticos que bajo condiciones asimbióticas (Fig. 22).

Los porcentajes de germinación significativamente más bajos se presentaron en *E. citrina* y *L. speciosa* que fueron inferiores al 15% con los tratamientos simbióticos y de menos del 4% con el tratamiento asimbiótico (Fig. 22). Para las demás especies la germinación más exitosa se presentó en asociación con hongos y fue superior al 60% dependiendo de la cepa fúngica y de la especie de orquídea.

Los hongos considerados como micorrícicos, en general tuvieron efecto positivo sobre la germinación de las orquídeas pero para algunas de las especies epífitas tuvieron efectos negativos ya que sus porcentajes de germinación fueron inferiores al tratamiento asimbiótico y lo mismo sucedió con algunos hongos endófitos como *Fusarium* que inhibió por completo la germinación (Fig. 22).

Cuando los embriones alcanzaron estadios 4 y 5 de desarrollo se corroboró la colonización de los hongos en el protocormo. Se pudieron observar los enrollamientos hifales denominados pelotones que son característicos de la micorriza orquídeoide en las cepas de *Tulasnella*, *Serendipita* y sorprendentemente en los protocormos desarrollados con el ascomiceto *Trichocladium*, no reportado como hongo micorrícico de orquídeas (Fig. 23). Y se observó la presencia de hifas en algunas de las cepas de los endófitos probados como *Morchella* y *Cephalotheca*.

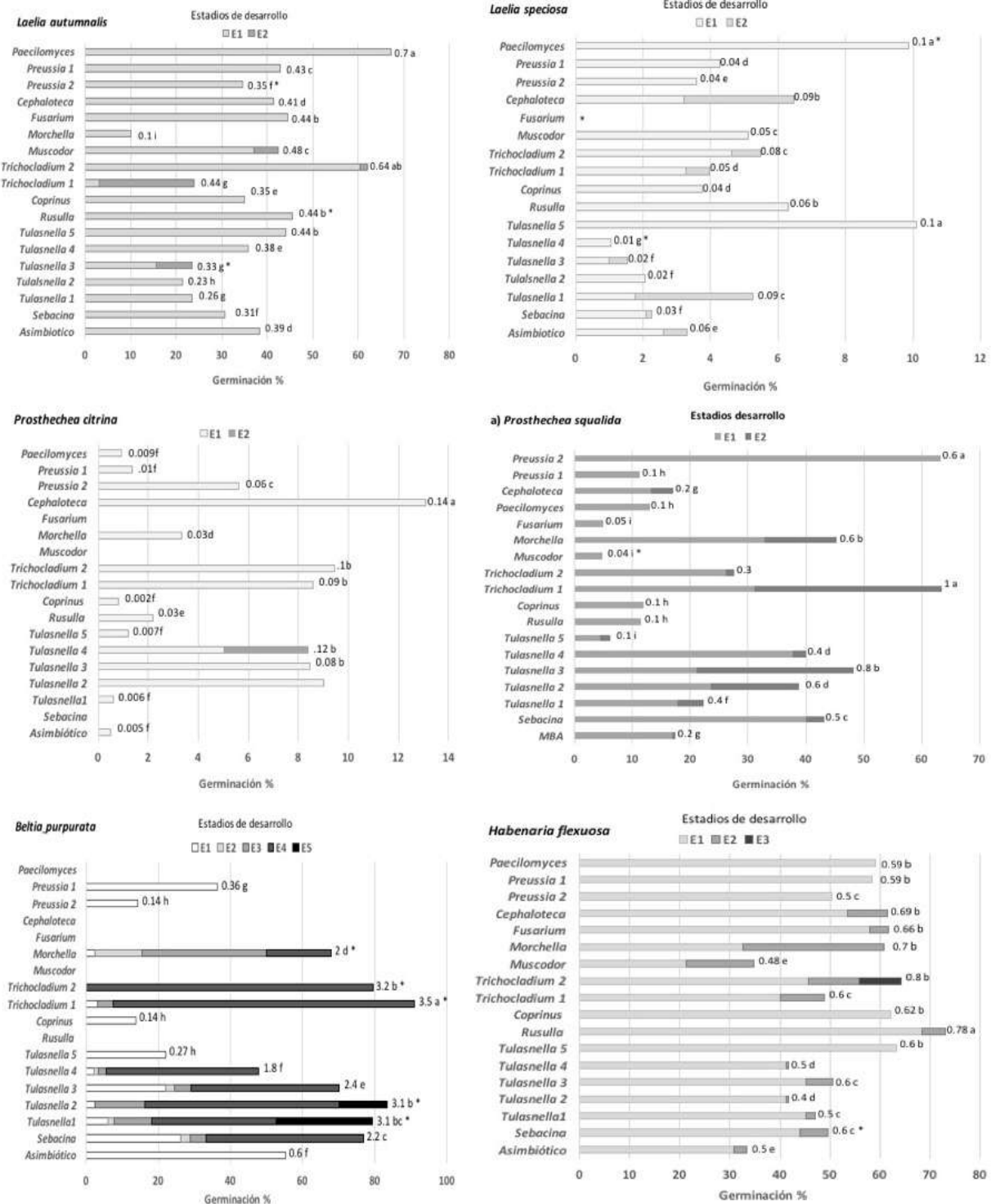


Figura 22. Porcentajes de germinación e índices de desarrollo de cada una de las especies de orquídeas con los diferentes tratamientos fúngicos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P = 0.05$, Tukey). Se marca en asterisco los hongos provenientes de la orquídea de referencia.

A los 90 días de iniciada la prueba se pudo observar que las hifas de algunas de las cepas de hongos endófitos invadieron el medio de cultivo y comenzaron a cubrir los protocormos en desarrollo provocando su oxidación (Fig. 23 inciso 6).

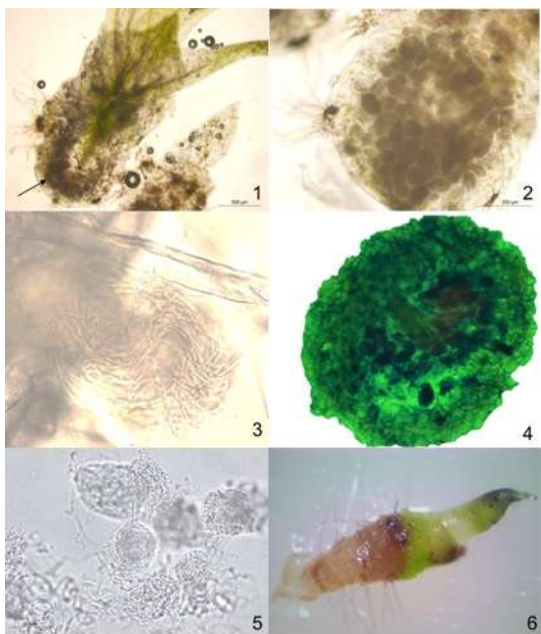


Figura 23. Colonización de protocormos por hongos simbioses a los 90 días de siembra. 1. Plántulas de *P. squalida* en estadio 5 y 6 colonizadas por *Tulasnella* sp., aumento 10x. 2 y 3. Pelotones de *Trichocladium* sp. en protocormo de *P. squalida*, imagen 2 aumento 20x e imagen 3 aumento 100x. 4. Pelotones de *Tulasnella* sp. 4 teñidos con azul de Tripán en protocormos de *L. autumnalis*, aumento 20x. 5. Pelotones liberados de protocormos de *B. purpurata* en asociación con *Serendipita* sp., aumento 100x. 6. Proceso oxidativo en protocormos de *H. flexuosa* con *Cephalotheca* sp., aumento 2.8x.

Supervivencia

A los 150 días se analizó la supervivencia de las plántulas, contabilizando únicamente aquellas que superaron el estadio 3 de desarrollo. Se pudo observar que en el caso de *E. citrina* ninguno de los tratamientos supero el estadio 2 de desarrollo, a excepción del cultivo con el inóculo de *Tulasnella*-4 en el que a los 90 días los embriones se encontraban en estadio 4, sin que se observara cambio alguno a los 150 días (datos no graficados).

En las demás especies de orquídeas la presencia de los endófitos inhibió el desarrollo del embrión debido principalmente a la invasión del medio de cultivo por parte de las hifas del hongo que invadieron a la plántula en desarrollo. La excepción fueron los inóculos de *Morchella* y *Trichocladium* que en las especies terrestres alcanzaron estadios 5 y 6 de desarrollo, y que en las especies epífitas este último fue el único inóculo que funcionó junto con los tratamientos *Tulasnella* 3 y *Tulasnella* 4. El efecto de los inóculos sobre la supervivencia y el desarrollo de los embriones se muestran en las Fig. 24 y 25.

El crecimiento asimbiótico no tuvo éxito para las especies analizadas pero se consideró en los análisis como punto de comparación, las gráficas muestran que los embriones no superaron el estadio 1 en donde se mantuvieron hasta los 150 días, con excepción de *Bletia purpurata* en donde se observaron algunos embriones en estadio 4 (Fig. 24). Al final del experimento las especies terrestres tuvieron mayor éxito en el desarrollo ontogénico ya que la presencia de hongos micorrícicos del complejo *Rhizoctonia* fue más exitoso para promover su desarrollo, observando que la mayoría de los embriones habían alcanzado los estadios 5 y 6 a los 150 días, mientras que las orquídeas epífitas se encontraban en estadios 3 y 4 (Fig. 24 y 25) y los porcentajes de supervivencia fueron significativamente diferentes entre tratamientos para cada especie de orquídea. Los tratamientos que presentaron los índices germinativos más altos fueron las cepas de *Trichocladium* ($IG \geq 3$) y *Tulasnella* ($IG \geq 1$) dependiendo de la especie de orquídea, siendo mayor en las terrestres (Fig. 24). La supervivencia fue mayor al 70% para especies terrestres y por encima del 30% para las especies epífitas (Fig. 24).

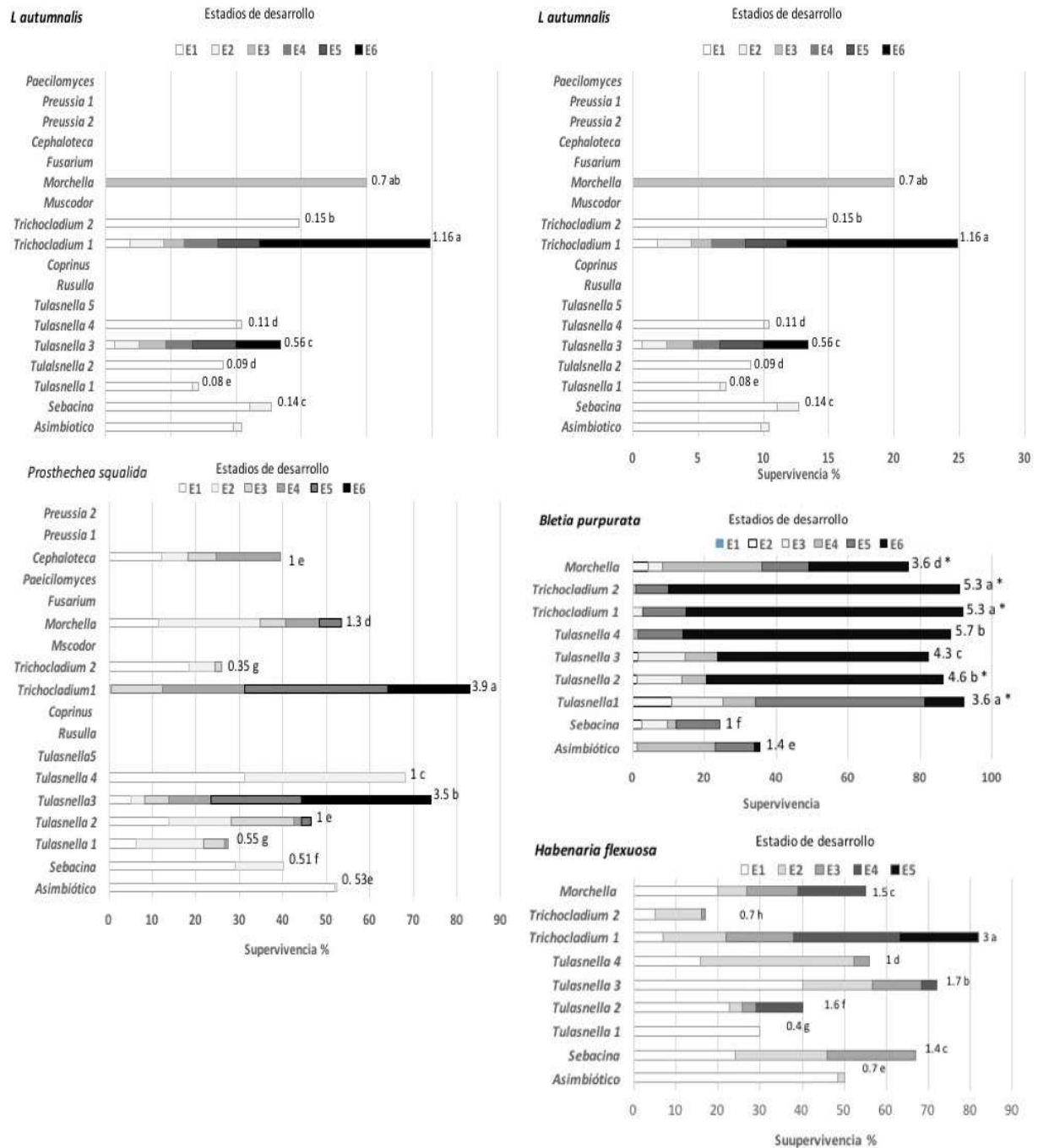


Figura 24. Porcentajes de supervivencia e índices de desarrollo de cada una de las especies de orquídeas con los diferentes tratamientos fúngicos a los 150 días. Letras diferentes indican diferencias significativas (P < 0.05, Tukey). Se marca en asterisco los hongos provenientes de la orquídea de referencia.



Figura 25. Desarrollo de plántulas a los 150 días de siembra. Imágenes 1, 2 y 3 *L. autumnalis* con *Tulasnella* sp. 2, *Tulasnella* sp. 3 y *Trichocladium* sp. 1 respectivamente. Imágenes 4, 5 y 6, *L. speciosa* con *Tulasnella* sp. 2, *Tulasnella* sp. 3 y *Trichocladium* sp. 1 respectivamente. Imágenes 7, 8 y 9 *P. squalida* con *Tulasnella* sp. 2, *Tulasnella* sp. 3 y *Trichocladium* sp. 1 respectivamente. Imágenes 10, 11 y 12, *B. purpurata* con *Tulasnella* sp. 2, *Tulasnella* sp. 3 y *Trichocladium* sp. 1 respectivamente. (Fotos: Beltrán-Nambo).

III.4. Discusión

Viabilidad

El CTT ha sido empleado muy frecuentemente para medir la viabilidad de las semillas de orquídeas epífitas y terrestres, de manera que la técnica es reconocida oficialmente por la Asociación Internacional para pruebas de semillas (Hartman & Kester, 1983), sin embargo la seguridad que se tiene sobre su eficiencia es limitada debido a que este método resulta excelente para algunas especies como *Cypripedium* (Van Waes & Debergh, 1986) pero ha dado resultados inconsistentes con otras especies (Huynh & Coates, 1999; Vujanovic, 2000). En el presente estudio la prueba generó excelentes resultados tanto para orquídeas terrestres como epífitas, tiñendo perfectamente el embrión y no la testa, permitiendo diferenciar de manera eficiente las semillas viables de las no viables, a diferencia de otros reactivos como el Diacetato de Fluoresceína (DFA) que puede teñir toda la semilla si no se aplica la técnica correctamente y generar falsos positivos (Segundo-Campos, 2016; Montes-Villa, 2016). Los resultados contradictorios de la técnica se atribuye a la variación en la permeabilidad de la testa o la reacción de

los tejidos de la semilla con determinados reactivos presentes en los colorantes empleados (Vierheiling et al., 1998), en el presente estudio todas las semillas se embebieron en agua destilada 24 h antes de aplicar la técnica y tal vez eso permitió que el colorante penetrara de manera eficiente, debido a que mucho se menciona a cerca de que el acceso al agua del embrión parece ser un requisito indispensable para que se suavice la testa y disminuya su impermeabilidad (Rasmussen, 1995).

El hecho de que la viabilidad de las semillas haya sido mayor en especies epífitas que terrestres puede explicarse también con base en la estructura de la testa que vuelve más impermeable la cubierta de las especies terrestres, se menciona que las pruebas de tinción pueden no ser efectivas debido a la testa hidrofóbica que en las orquídeas terrestres suele ser reticulada y por lo tanto presenta mayor resistencia a la entrada de agua y otras sustancias como los colorantes usados para estas pruebas, causando falsos negativos (Ramsey & Dixon, 2003). De hecho se menciona que las semillas de orquídeas terrestres tienen una longevidad mayor que las de las orquídeas epífitas porque están adaptadas para resistir algunos procesos de abrasión por organismos del suelo o de hongos parásitos (Whigham et al., 2005) y pueden resistir poca humedad y bajas temperaturas de manera que pueden permanecer viables por décadas a la intemperie y conservar además su vitalidad (Seaton & Pritchard, 2003). Otros estudios por el contrario reportan que las semillas de orquídeas terrestres tienen un periodo de vida muy corto, dependiendo del sitio donde se desarrollen, de la época de floración y producción de semillas de la planta adulta (Batty et al., 2001; Whigham et al., 2005), por lo que se requiere un mayor análisis en las orquídeas mexicanas para entender mejor los resultados obtenidos.

Germinación simbiótica y asimbiótica

E. citrina y *L. speciosa* mostraron porcentajes de germinación bajos a pesar de que la viabilidad de las semillas era alta y las semillas de *G. lagenophora* no germinaron con ninguno de los tratamientos después de 150 días. A este respecto algunos trabajos señalan que durante el proceso germinativo es importante el

estado de desarrollo del embrión, de manera que aún con alta viabilidad, las semillas pueden no germinar si el embrión no alcanza la maduración requerida (Naradajan et al., 2011) o que a medida que el embrión madura, se acumulan sustancias inhibitorias como fenoles o ácido abscísico y el carapacho se cutiniza y lignifica haciendo más difícil la entrada de agua o nutrientes y por lo tanto dificultando la germinación del embrión (Yamazaky & Miyoshi, 2006). Otros investigadores señalan que debido a que las orquídeas tienen tamaños muy pequeños y a que muchas de ellas, principalmente las semillas de las orquídeas terrestres, presentan semillas que son transportadas por el agua o por zoocoria, es muy probable que tengan diferentes mecanismos de dormancia y que requieran de condiciones especiales (Arditti & Abdul-Ghani, 2000; Dunn y Arditti, 2009), como pudieran ser la disponibilidad de los nutrientes adecuados, cierta temperatura o humedad en el suelo que estimulen su germinación (Smith & Read, 2008). Existen además evidencias de que las semillas de orquídeas terrestres de climas templados tienen mecanismos para la maduración tardía que previenen su germinación inmediatamente después de su liberación en otoño y que pueden sobrevivir por largos periodos en el suelo hasta que su inactividad se corta con ciertos regímenes de temperatura, imbibición larga, rompimiento de la testa con algunas sustancias y señalización por hongos (Rasmussen, 1995; Rasmussen et al., 2015). El hecho de que las semillas de *G. lagenophora* no hayan germinado con ninguno de los hongos probados, además de los factores antes mencionados, puede estar indicando la ausencia de alguna especie fúngica en específico, ya que se sabe que este tipo de plantas germinan en primavera, lo cual aunque parezca sorprendente puede ser debido a que en los tipos de vegetación templada existe una gran cantidad de biomasa muerta durante el otoño y a principios de invierno lo cual estimula la actividad intensa de los hongos en el suelo que podrían proporcionar condiciones ideales para el desarrollo de especies fúngicas, en particular los que pudieran estar involucrados en los procesos de germinación y que se encuentran ausentes en otras estaciones climáticas (Baskin & Baskin, 1998).

Los tiempos de germinación de las semillas de las demás especies analizadas son semejantes a los reportados en otros trabajos que señalan que alrededor de los 15 días comienza el rompimiento de la testa (E1) y la formación de rizoides y después de 11 semanas (90 días) se observa la elongación de la primera hoja (Tan et al., 2014). Esto también coincide con los tiempos de formación de pelotones alrededor de los 70 días. Sin embargo en el caso de *B. purpurata* con todas las cepas micorrícicas las plántulas ya presentaban dos hojas y raíces verdaderas a los 30 días, lo que indica la alta eficiencia en la asociación ya que la mayoría de estas cepas provenían de esta especie. Los resultados de diferentes trabajos indican que la eficiencia de los hongos micorrícicos para promover la germinación, varía con las especies y al parecer las cepas de *Serendipita* tienen menor efecto que las de *Tulasnella* que son altamente eficientes en especies como *Dendrobium*, *Ionopsis* y *Vanilla* (Otero et al., 2004; Otero-Ospina et al., 2009; Porras-Alfaro & Bayman, 2011).

El hecho de que *B. purpurata* haya tenido éxito en el desarrollo de sus embriones alcanzando los últimos estadios en los primeros 30 días de germinación y de que esta germinación fuera inducida solo por hongos micorrícicos indica una relación específica y efectiva. Mucho se ha debatido sobre la especificidad de las orquídeas durante el proceso germinativo y se menciona que algunas orquídeas forman asociaciones específicas con hongos particulares sobre otros, relacionándose con grupos filogenéticos muy estrechos del grupo de las “Tulasnellas” (Jacquemyn et al., 2012) y así, géneros como *Chiloglotis* (Roche et al., 2010) y *Coppensia* (Valadares et al., 2012) son selectivos en su asociación. Esta relación es altamente competente y les asegura la supervivencia en hábitats específicos y su alta capacidad de adaptación bajo ciertas condiciones ambientales (Swarts & Dixon, 2009), este efecto se puede ver incrementado si la distribución geográfica de los hongos con los que se relacionan es amplia, de manera que las vuelve menos vulnerables y de amplia distribución, como las especies del género *Dactylorhiza* (Swarts et al., 2010; Jacquemyn et al., 2012), o como es el caso de *B. purpurata* (Beltrán-Nambo et al., 2012), o si por el contrario, la distribución de los hongos es limitada y la relación de las orquídeas es

muy estrecha, pueden ser más susceptibles a cambios ambientales (Dearnaley et al., 2012). Lo anterior pudiera ser el caso de *E. citrina*, especie con poblaciones muy reducidas y en categoría de riesgo, ya que se observó que aunque se estimuló la germinación con la mayoría de los tratamientos, el desarrollo del embrión fue escaso. También se menciona que existen especies que son generalistas en su asociación durante las primeras etapas de desarrollo para garantizar la germinación, sin embargo, no siempre resultan funcionales para las siguientes etapas de desarrollo (Nurfadilah et al., 2013; Rasmussen et al., 2015) y otras que pueden estar cambiando de hongos asociados, dependiendo de las condiciones ambientales, lo que les asegura la colonización de diferentes sustratos y hábitats, como se ha observado en el *Orchis* (Jacquemyn et al., 2010) y como sucede con *L. autumnalis* y *P. squalida*, que se desarrollan en diferentes sustratos arbóreos o rocas. Se menciona además, la existencia de otros factores como es la incidencia de luz, tipo de forofito, humedad, etc., que pueden influir en el éxito germinativo y el desarrollo de las orquídeas (Beltrán-Nambo et al., 2012; Sathiyadash et al., 2014).

La promoción de la germinación de la mayoría de las cepas fúngicas probadas con 6 especies de orquídeas en este estudio, indican que la procedencia del hongo no es un factor importante para que se promueva la germinación, como lo señalan en géneros como *Cyrtopodium* (Pereira et al., 2015) y sustenta la afirmación de que en las primeras etapas las orquídeas germinan con una gran variedad de hongos incluso procedentes de otras especies de orquídeas, como *Dendrobium* y *Cymbidium* que fueron probadas con más de 40 endófitos encontrando que algunos de ellos como *Mycena*, *Geocladium* y *Cephalosporium* promovieron la germinación y crecimiento del embrión y plántulas (Dan et al., 2012). Se ha reportado que al igual que los hongos micorrícicos que secretan reguladores de crecimiento como auxinas, ácido giberélico, ácido abscísico, zeatina (Liu et al., 2010), existen algunos endófitos como *Trichoderma* sp. que incrementan la germinación hasta en 84% en orquídeas del género *Pleione* en comparación con medios asimbióticos (Yang et al., 2008); y *Preussia* y *Fusarium* que son considerados patogénicos, son productores de auxinas como el ácido indol acético

(Tsavkelova et al., 2003; Bayman & Otero, 2006), de forma que muchas de sus especies pueden promover la germinación, como lo demostró la inoculación de este último hongo en orquídeas del género *Dendrobium* que fue hasta 23% más efectiva que los medios asimbióticos (Teixeira et al., 2015).

Al realizar los análisis de los protocormos en los tratamientos que habían alcanzado estadios de desarrollo 4 y 5 a las 90 y 120 días, se observó una disminución considerable de los tratamientos que tuvieron éxito, observando que únicamente las cepas correspondientes a hongos micorrícicos *Tulasnella* y *Serendipita* y dos ascomicetos *Morchella* y *Trichocladium* establecieron asociación y promovieron el desarrollo hasta estadio 6. Existen trabajos que señalan que cuando la relación se establece de manera exitosa en el proceso germinativo, además de sustancias promotoras de crecimiento, algunos endófitos secretan compuestos antagónicos que previenen la invasión de otros hongos patógenos y por lo tanto favorecen la supervivencia de las plántulas y promueven su crecimiento (Chen et al., 2013), como sucedió con las cepas de los dos ascomicetos en este estudio que fueron igual de efectivos que las cepas de hongos micorrícicos.

Morchella es un género en el que su ciclo de vida incluye una etapa saprofita y otra etapa micorrícica de especies forestales, oscilando en un ciclo bianual, ya que se considera que durante el invierno y la primavera desarrolla la fase micorrícica en la que sus hifas penetran a las raíces de las plantas y aún cuando se le relaciona con la formación de ectomicorrizas, existen algunos estudios que señalan la asociación de orquídeas terrestres fotosintéticas de géneros como *Cephalanthera*, *Orchis* y *Epipactis* con hongos ectomicorrícicos que promueven su desarrollo y supervivencia (Bidartondo et al., 2004; Vendramin et al., 2010; Xiaoya et al., 2015). No se encontraron reportes que señalen al género *Trichocladium* como hongo micorrícico, sin embargo en el presente estudio este hongo además de establecer la asociación y promover el desarrollo de la mayoría de las orquídeas analizadas, también formó las estructuras típicas de la micorriza orquideoide, como son: la formación de células monilioides y de pelotones al interior del protocormo. En la literatura se reportan 18 especies aceptadas dentro

de este género, que incluye organismos saprófitos que han sido aislados del suelo y de madera y debido a su heterogeneidad, su identificación resulta complicada (Hyde et al., 1999). Sin embargo, se reportan al menos 2 géneros (*Trichocladium constrictum* y *T. lignícola*) que forman conidios septados, con apariencia monilioide y células de globosas a subglobosas, las cuales se presentan en hábitats terrestres y en árboles como pinos y encinos (Goh & Hyde, 1999). Por lo anteriormente expuesto, este trabajo presenta el primer reporte de la capacidad micorrícica del género.

Serendipita es un género que a nivel mundial se reporta como hongo micorrícico ericoide, ectomicorrícico y orquídeoide (Basiewicz et al., 2012; Tedersoo et al., 2014; Garnica et al., 2016), pero no se encontraron reportes de su presencia en orquídeas mexicanas y de su efecto sobre la germinación de las mismas, por lo que los resultados presentados también serían novedosos ya que a pesar de que promovió la germinación de la mayoría de las especies de orquídeas analizadas, mostró mejores resultados con las orquídeas terrestres de las cuales fue aislado. En México, la Dra. Pilar Ortega Larrocea también reporta la identificación del género *Serendipita* en orquídeas terrestres (datos no publicados).

Supervivencia

Aunque se observó un efecto positivo para estimular la germinación tanto de los hongos endófitos como micorrícicos al inicio del experimento, en las etapas posteriores de desarrollo, el efecto de la mayoría de los hongos endófitos fue nulo o presentó un efecto negativo inhibiendo el desarrollo del embrión. Algunos trabajos realizados señalan que después de las primeras fases del proceso germinativo de las orquídeas, la diversidad de taxones fúngicos que están presentes, se reduce sustancialmente con respecto a la diversidad observada en los sustratos en donde se desarrollan, en las raíces de la planta adulta o incluso en las semillas cuando la germinación apenas comienza (Sathiyadash et al. 2014). Por lo que, a medida que las plántulas se desarrollan, la cantidad de hongos que siguen interactuando de manera positiva con ellas, es sólo una fracción de los taxa fúngicos que fueron capaces de estimular su germinación durante la primera fase

de su ciclo de vida (Zelmer et al., 1996; Bidartondo & Read, 2008; Bateman et al., 2014; Pereira et al., 2014). Esto concuerda con nuestros resultados, ya que al final del experimento únicamente los hongos micorrícicos orquideoides tuvieron efecto positivo en el desarrollo y la supervivencia de las especies de orquídeas estudiadas, y en las etapas sucesivas de desarrollo hasta la etapa de plántula, sólo conservaron la asociación con un número reducido de ellos.

La mayoría de las cepas fúngicas del complejo *Rhizoctonia* que permitieron la sobrevivencia de los embriones en desarrollo, se extrajeron de plantas adultas de *B. purpurata*. Esto explica porqué al final del experimento, ésta fue la especie que tuvo mayor éxito. Existen trabajos que reportan que es probable que la presencia de cepas extraídas de la planta adulta, sean más efectivas durante los primeros estadios de desarrollo que otros hongos, cuando se conservan durante todo su ciclo de vida (Rasmussen et al., 2015) y que la presencia de asociaciones micorrícicas, es esencial para una colonización exitosa y el establecimiento de las orquídeas en la naturaleza (Liu et al., 2010). También se menciona que las especies de amplia distribución, como la especie *B. purpurata* en México, tienden a ser más especializadas hacia sus asociaciones, debido a que esto les garantiza su dispersión y éxito adaptativo, cuando la distribución de los hongos es amplia o bien, que son más generalistas hacia los hongos con lo que se asocian. Esto explicaría por qué *B. purpurata* y *H. flexuosa* respondieron favorablemente a la presencia de las cepas del complejo *Rhizoctonia* (*Tulasnella* y *Serendipita*), de *Trichocladium* y *Morchella*. También explicaría porque especies como *E. citrina*, que es una especie endémica del país, tiene una distribución más restringida y se considera más susceptible a la presión ambiental que se ejerce sobre sus poblaciones, de tal forma que se encuentra en categoría de riesgo y no fue capaz de establecer asociaciones exitosas con ninguna de las cepas fúngicas que estimularon su germinación, ya que las especies de distribución restringida o escasa, tienden a ser más específicas con sus socios fúngicos (Swarts et al., 2010). Finalmente los resultados obtenidos con las orquídeas epífitas, sugieren que éstas son más específicas hacia los hongos con los que se asocian en las

etapas siguientes a la germinación (Otero y Bayman, 2009), por lo que se requiere mayor investigación al respecto.

III.5. Conclusiones

La presencia de hongos endófitos y micorrícicos promueve la germinación de las semillas de orquídeas en comparación con la germinación asimbiótica.

En las primeras etapas el proceso germinativo de las orquídeas analizadas puede ser estimulado por una gran variedad de hongos endófitos debido probablemente a la liberación de sustancias promotoras de crecimiento y la orquídea de procedencia de las cepas fúngicas no parece ser un factor importante.

Después del rompimiento de la testa, el embrión se volvió más selectivo en la interacción con hongos, de manera que, únicamente los que lograron establecer una asociación simbiótica con el protocormo, estimularon el desarrollo y crecimiento subsecuente de las plántulas.

Únicamente los hongos del complejo *Rhizoctonia* (*Tulasnella* y *Serendipita*) reportados como hongos micorrícicos de orquídeas y, los ascomicetos *Morchella* y *Trichocladium* colonizaron los protocormos y estimularon el desarrollo del embrión hasta la etapa 6. Estas cepas fúngicas fueron más efectivas para las orquídeas terrestres logrando estadios de desarrollo 4, 5 y 6 a los 30 días después de la siembra ($IG > 3$) y porcentajes de germinación superiores al 60%, mientras que las orquídeas epífitas se encontraban en estadios 1 y 2 ($IG < 1$) y sus porcentajes germinativos fueron inferiores al 40%.

La supervivencia fue mayor en las orquídeas terrestres que en las orquídeas epífitas, alcanzando el estadio 6 a los 30 días, mientras que las orquídeas epífitas requirieron 150 días, esto comprueba la eficiencia y efectividad de la asociación micorrícica en *B. purpurata* y *H. flexuosa*.

G. lagenophora no germinó en ninguno de los tratamientos y, *E. citrina* no mostró compatibilidad por la mayoría de los hongos a excepción de *Tulasnella* 4 y únicamente alcanzó el estadio 4 de desarrollo.

El ascomiceto *Trichocladium* formó todas las estructuras típicas de la micorriza orquideoide, colonizó y promovió el desarrollo de plántulas hasta el estadio 6, en 5 de las especies de orquídeas analizadas.

Los resultados obtenidos sugieren que las especies terrestres mexicanas, tienen asociaciones específicas con hongos micorrícicos durante las primeras etapas de desarrollo, por tanto, resultan muy efectivas para el proceso germinativo, desarrollo y supervivencia de plántulas. Las orquídeas epífitas por el contrario resultaron más generalistas durante el proceso germinativo, de manera que una gran variedad de hongos endófitos estimulo su germinación, sin embargo, para el desarrollo posterior éstas no fueron efectivas, lo que nos indica una permuta hacia asociaciones más específicas, que probablemente involucran cambios de socios fúngicos o bien, una menor dependencia hacia la asociación.

III.6. Referencias

- Arditti, J. & Abdul Ghani A.K. (2000). Numerical and physical properties of orchids seeds and their biological implications. Transley Review No. 110. *Phytologist*, 145, 367-421.
- Basiewicz, M., Weiß M., Kogel K. H., Langen G., Zorn H., Zuccaro A. (2012). Molecular and phenotypic characterization of *Serendipita vermifera* strains associated with orchids, and the description of *Piriformospora williamsii* sp. nov. *Fungal Biology*, 116(2), 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.11.003>
- Baskin, C.C. & Baskin J.M. 1998. Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. San Diego, California, USA. Academy Press. Pp 482-489.
- Bateman, R. M., Rudall P. J., Bidartondo M. I., Cozzolino S., Tranchida-Lombardo V., Carine M. A., Moura, M. (2014). Speciation via floral heterochrony and presumed mycorrhizal host switching of endemic butterfly orchids on the Azorean archipelago. *American Journal of Botany*, 101(6), 979–1001. <https://doi.org/10.3732/ajb.1300430>
- Batty, A.L., Dixon K.W., Brundrett M., Sivasithamparam K. (2001). Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a Mediterranean bushland. *New Phytologist* 152, 511–520.
- Bayman, P. & Otero-Ospina J. T. (2006). Microbial Endophytes of orchid roots, 9, 153–177. <https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9>
- Beltrán-Nambo, M. Á., Larrocea P. O., Garciglia R. S., Ospina T. O., Trujillo M. M., Carreón-Abud Y. (2012). Distribution and abundance of terrestrial orchids of the genus *Bletia* in sites with different degrees of disturbance , in the Cupatitzio Natural Reserve , México. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 4(8), 316–325. <https://doi.org/10.5897/IJBC11.225>
- Bidartondo, M. I., Burghardt B., Gebauer G., Thomas D. B., David, J. R. (2004). Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proc. R. Soc., London Ser. B.*, 2004, 271, 1799–1806.
- Bidartondo, M. I. & Read D. J. (2008). Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. *Molecular Ecology*, 17(16), 3707–3716. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03848.x>
- Chávez, H.K., Mosquera-Espinosa A., Otero-Ospina J.T. (2014). Propagación *in vitro* de semillas de la orquídea *Comparettia falcata* Poepp. & Endl. (Orchidaceae) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas. *Acta Agronómica*, 64(2), 125-133.

- Chen, J., Wang H., Guo S.X. (2012). Isolation and identification of endophytic and mycorrhizal fungi from seeds and roots of *Dendrobium* (Orchidaceae). *Mycorrhiza* 22, 297e307.
- Chen J, Zhang L-C., Xing Y-M., Wang Y-Q., Xing X-K., Zhang D-W., et al., (2013). Diversity and Taxonomy of Endophytic Xylariaceous Fungi from Medicinal Plants of *Dendrobium* (Orchidaceae). *PloSONE* 8(3): e58268. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058268>
- Dan Y., Meng Z.X., Guo S.X. (2012) Effects of forty strains of Orchidaceae mycorrhizal fungi on growth of protocorms and plantlets of *Dendrobium candidum* and *D. nobile*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6, 34–39.
- Dearnaley, J. D., Artos F. M., Elosse M. S. (2012). Orchid Mycorrhizas: Molecular Ecology, Physiology, Evolution and Conservation Aspects. In B. Hock (Ed.), *Fungal Associations. The Mycota IX*. 2d edition. Queensland, Toowoomba: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 207–224.
- Dunn, A.S. & Arditti J. (2009). Are orchids mentioned in the Bible?. In: Orchid biology: Reviews and perspectives, X. Kull, Arditti and Wong (Eds.). Springer + Business Media B.V. pp 142-156.
- Espejo-Serna, A. (2012). El endemismo en las liliopsida mexicanas. *Acta Botánica Mexicana*, 100, 195–257.
- Faeth, S. H. & Fagan, W. F. (2002). Fungal endophytes: Common host plant symbionts but uncommon mutualists. *Integ. and Comp. Biol.*, 42, 360–368. <https://doi.org/10.1093/icb/42.2.360>
- Gamboa-Gaitán, M. A., & Otero-Ospina, J. T. (2016). Colombian vanilla and its microbiota. III. Diversity and structure of the endophytic community. *Acta Botanica Hungarica*, 58(3–4), 241–256. <https://doi.org/10.1556/ABot.58.2016.3-4.2>
- Garnica, S., Riess K., Schön M. E., Oberwinkler F., Setaro S. D. (2016). Divergence times and phylogenetic patterns of Serendipitales, a highly diverse and widespread fungal lineage. *PLoS ONE*, 11(3), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149531>
- Goh, T.K. & Hyde K. D. (1999). A synopsis of *Trichocladium* species, based on the literature. *Fungal Diversity*, 2, 101–118.
- Hartman, H.T. & Kester D.E. (1983). Plant propagation. Principles and practices. 4th edition. Engelwood Cliffs, New Jersey. Prentice- Hall.
- Hossain, M.M., Kant R., Van P.T., Winarto B., Zeng S.J., Teixeira da Silva J.A. (2013). The application of biotechnology to orchids. *Critical. Rev. Plant. Sci.* 32(2), 69–139.
- Huynh, T. & Coates F. (1999). Propagation and seed viability of the endangered orchid *Prasophyllum correctum*. Final report to the Australian Flora Fundation. project: 97/98-14. Melbourne, Victoria.
- Hyde, K.D., Goh T.K., Lu B.S. Alias S.A. (1999). Eleven new intertidal fungi from *Nypa jruticans*. *Mycological Research* 103: 71-87.
- Hynson, N.A., Madsen T.P., Selosse M.A., Adam I.K.U., Osgura-Tsujita Y., Roy M., Gebauer G. (2013). The physiological ecology of mycoheterotrophy in mycoheterotrophy. In: Merckx VSFT (eds) The biology of plants living on fungi. Springer Science + Business Media, New York, pp 297–343.
- Jacquemyn, H., Deja A., de Hert K., Cachapa-Bailarote, B., Lievens, B. (2012). Variation in mycorrhizal associations with tulasnelloid fungi among populations of five Dactylorhiza species. *PLoS ONE*, 7(8), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042212>
- Jacquemyn, H., Merckx V., Brys R., Tyteca D., Cammue B.P.A., Honnay O., Lievens B. (2011). Analysis of network architecture reveals phylogenetic constraints on mycorrhizal specificity in the genus *Orchis* (Orchidaceae). *New Phytologist* 192, 518–528.
- Jacquemyn, H., Honnay O., Cammue B. P. A., Brys R., Lievens, B. (2010). Low specificity and nested subset structure characterize mycorrhizal associations in five closely related species of the genus *Orchis*. *Molecular Ecology*, 19(18), 4086–4095. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04785.x>
- Liu, H., Luo Y., Liu H. (2010). Studies of mycorrhizal fungi of chinese orchids and their role in Orchid conservation in China-A review. *Botanical Review*, 76(2), 241–262. <https://doi.org/10.1007/s12229-010-9045-9>
- Mitchell. R. (1989). Growing hardy orchids from seed at Kew. *The plants man* 3(2), 152-169.

- Naradajan, J., Wood S., Marks T.R., Senton P.T., Pritchard. (2011). Nutritional requirements for in vitro germination of 12 terrestrial, lithophytic and epiphytic orchids. *Journal of Tropical Forest Science* 23(2): 204-212.
- Nontachaiyapoom, S., Sasirat S., Manoch L. (2011). Symbiotic seed germination of *Grammatophyllum speciosum* Blume and *Dendrobium draconis* Rchb.f., native orchid of Thailand. *Sci. Hort.* 130: 303e308.
- Nurfadilah, S., Swarts N. D., Dixon K. W., Lambers H., Merritt, D. J. (2013). Variation in nutrient-acquisition patterns by mycorrhizal fungi of rare and common orchids explains diversification in a global biodiversity hotspot. *Annals of Botany*, 111(6), 1233–1241. <https://doi.org/10.1093/aob/mct064>
- Ortega-Larrocea, M. P., Martínez A. Chávez V. M. (2008). Conservación y propagación de orquídeas. En: *Restauración, conservación y manejo*. México. pp. 483–495.
- Otero, J.T., Bayman P., Ackerman J. (2003). Variación en germinación simbiótica entre semillas de *Tolumnia variegata* y entre hongos micorrízicos. *Lankesteriana*, 2(3), 145.
- Otero, J. T., Ackerman J. D., Bayman P. (2004). Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology*, 13(8), 2393–2404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02223.x>
- Otero-Ospina, J.T., Bayman P. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epífitas. *Acta Agronómica*, 58 (4), 270–276.
- Pereira, G., Romero C., Suz L. M., Atala C. (2014). Essential mycorrhizal partners of the endemic Chilean orchids *Chloraea collicensis* and *C. gavilu*. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 209(2), 95–99. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2013.12.001>
- Pereira, M. C., Rocha D. I., Veloso T. G. R., Pereira O. L., Francino D. M. T., Meira R. M. S, Kasuya M. C. M. (2015). Characterization of seed germination and protocorm development of *Cyrtopodium glutiniferum* (Orchidaceae) promoted by mycorrhizal fungi *Epulorhiza* spp. *Acta Botanica Brasilica*, 29(4), 567–574. <https://doi.org/10.1590/0102-33062015abb0078>
- Porras-Alfaro, A. & Bayman P. (2011). Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 291–315. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081831>
- Ramsey, M.M. & Dixon, K.W. (2003). Propagation science, recovery and translocation of terrestrial orchids. In: Dixon, K.W., Kell, S.P., Barrett, R.L., Cribb, P.J. (Eds.), *Orchid Conservation*. Natural History Publications (Borneo), Kotai Kinabulu, Sabah. pp. 259–288.
- Rasmussen, H.N. (1995). *Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press, Cambridge. 1ª edición. 444 pp.
- Rasmussen, H. N., Dixon K. W., Jersáková J., Těšitelová T. (2015). Germination and seedling establishment in orchids: A complex of requirements. *Annals of Botany*, 116(3), 391–402. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv087>
- Roche, S., Carter R.L., Peakall R., et al., (2010) A narrow group of monophyletic *Tulasnella* (Tulasnellaceae) lineages are associated with multiple species of *Chiloglottis* (Orchidaceae) implications for diversity. *American Journal of Botany*, 97. doi: 10.3732/ajb.1000049
- Rodríguez, R. J., White J. F., Arnold A. E., Redman R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2), 314–330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
- Sathiyadash, K., Muthukumar T., Murugan S. B., Sathishkumar R., Pandey R. R. (2014). *In vitro* symbiotic seed germination of South Indian endemic orchid *Coelogyne nervosa*. *Mycoscience*, 55(3), 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2013.08.005>
- Seaton, P.T. & Pritchard H.W. (2003). Orchid germplasm collection, storage and exchange. In: Dixon, K.W., Kell, S.P., Barrett, R.L., Cribb, P.J. (Eds.), *Orchid Conservation*. Natural History Publications (Borneo), Kotai Kinabulu, Sabah, pp. 227–258.
- Segundo-Campos, R. (2016). Efecto de cultivos simbióticos y asimbióticos sobre la germinación, desarrollo de plántulas in vitro y supervivencia ex vitro de *Laelia autumnalis*, *L. Speciosa* y *Govenia superba* (Orchidaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología, U.M.S.N.H. Michoacán, Méx. 77pp.
- SEMARNAT, Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2010). Norma Oficial mexicana NOM-059. 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. Publicado 30 de diciembre de 2010.
- Smith, S.E. & Read J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. (Elsevier, Ed.). 3ª edición. New York: Springer.
- Stewart, S.L., Zettler L.W. (2002). Symbiotic germination of three semiaquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinquiseta*, *H. macroceratitis*) from Florida. *Aquat. Bot.* 72, 25–35.
- Suárez, J.P., Michael W, Abele A, Garnica S, Oberwinkler F, y Kottke I. (2006). Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycol. Res.* 110, 1257 - 1270.
- Swangmaneecharern, P., Serivichyaswat P., Nontachaiyapoom S. (2012). Promoting effect of orchid mycorrhizal fungi *Epulorhiza* isolates on seed germination of *Dendrobium* orchids. *Sci. Hortic.* 148, 55–58.
- Swarts, N. D. & Dixon K. W. (2009). Perspectives on orchid conservation in botanic gardens. *Trends in Plant Science*, 14(11), 590–598. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.07.008>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04736.x>
- Tan, X. M., Wang C. L., Chen X. M., Zhou Y. Q., Wang Y. Q., Luo A. X., et al., (2014). *In vitro* seed germination and seedling growth of an endangered epiphytic orchid, *Dendrobium officinale*, endemic to China using mycorrhizal fungi (*Tulasnella* sp.). *Scientia Horticulturae*, 165, 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.10.031>
- Taylor, D.L., Bruns T.D., Hodges S.A. (2004). Evidence for mycorrhizal races in a cheating orchid. *Proc R Soc Lond B*, 271, 35–143.
- Tedersoo, L., Bahram M., Ryberg M., Otsing E., Kõljalg U., Abarenkov K. (2014). Global biogeography of the ectomycorrhizal *Serendipita* lineage (Fungi, Serendipitales) as revealed from comparative phylogenetic analyses. *Molecular Ecology*, 23(16), 4168–4183. <https://doi.org/10.1111/mec.12849>
- Teixeira, Da Silva J., Tsavkelova E., Zeng S., Bun T.N., Parthibhan S., Dobránszki J., Cardoso J.C., Rao M.V. (2015). Symbiotic in vitro seed propagation of *Dendrobium*: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development. *Planta*. Springer-Verlang, Berlin Heidelberg. DOI 10.1007/s00425-015-2301-9.
- Tsavkelova, E.A., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I. (2003). Phytohormones production by the fungi associated with orchids. *Mycol. Phytopathol.* 37, 75–83.
- Valadares, R. B., Pereira M. C., Otero J. T., Cardoso E. J. (2012). Narrow fungal mycorrhizal diversity in a population of the orchid *Coppensia doniana*. *Biotropica*, 44(1), 114–122. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2011.00769.x>
- Van Waes, J.M. & Dbergh P.C. (1986). Adaptation of the Tetrazolium method for testing the seed viability, and scanning electron microscopy study of some Western European orchids. *Physiology of plants* 66, 435-442.
- Vendramin, E., Gastaldo A., Tondello A., Baldan B., Villani M., Squartin A. (2010). Identification of two fungal endophytes associated with the endangered orchid *Orchis militaris* L. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20(3), 630–636.
- Viereiling, H., Coughlan A.P., Wiss U., Piché Y. (1998). Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 631-641.
- Vujanovic, V. (2000). Viability Testing of Orchid Seed and the Promotion of Colouration and Germination. *Annals of Botany*, 86(1), 79–86. <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1162>
- Whigham, D.F., O'Neill J.P., Rasmussen H.N., Caldwell B. A., McCormick M. (2005). Seed longevity in terrestrial orchids – Potential for persistent in situ seed Banks. *Biological Conservation*, 129, 24-30
- Xiaoya, M., Kang J., Nontachaiyapoom S., Wen T., Hyde K. D. (2015). Non-mycorrhizal endophytic fungi from orchids. *Current Science*, 109(1), 72–87.
- Yagame, T, Yamato M, Mii M, Suzuki A, Iwase K, (2007), Developmental processes of achlorophyllous orchid, *Epipogium roseum*: from seed germination to flowering under symbiotic cultivation with mycorrhizal fungus. *J. Plant. Res.* 120, 229–236.
- Yamazaky, J. & Miyoshi K. (2006). *In vitro* asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae).

- Yang, Y.L., Liu Z.Y., Zhu G.S. (2008). Study on symbiotic seed germination of *Pleione bulbocodioides* (Franch) Rolfe. *Microbiology* 35(6), 909–912. (in Chinese with English abstract).
- Zelmer, C.D. & Currah R.S. (1997). Symbiotic germination of *Spiranthes lacera* (Orchidaceae) with a naturally occurring endophyte. *Lindleyana*, 142–148.
- Zeng, S.J., Zhang Y., Teixeira da Silva J.A., Wu K.L., Zhang J.X., Duan J. (2014). Seed biology and *in vitro* seed germination of *Cypripedium*. *Crit Rev Biotechnol* 34, 358–371.
- Zettler, L.W., Corey L.L., Jacks A.L., Gruender L.T., Lopez A.M. (2013). *Tulasnella irregularis* (Basidiomycota: Tulasnellaceae) from roots of *Encyclia tampensis* in South Florida, and confirmation of its mycorrhizal significance through symbiotic seed germination. *Lankesteriana* 13, 119–128.
- Zettler, L. W. & McInnis T.L. (1993). Symbiotic seed germination and development of *Spiranthes Cernua* and *Goodyera Pubescens* (Orchidaceae: Spiranthoideae). *Lindleyana* 8 (3): 155-162.
- Zhang, L., Chen J., Lv Y., Gao C., Guo S. (2012). *Mycena* sp., a mycorrhizal fungus of the orchid *Dendrobium officinale*. *Mycol. Progress*. 11(2), 395–401.
- Zi, X.M., Sheng C.L., Goodale U.M., Shao S.C., Gao J.Y. (2014). *In situ* seed baiting to isolate germination-enhancing fungi for an epiphytic orchid *Dendrobium aphyllum* (Orchidaceae). *Mycorrhiza* 24, 487–499.

7. DISCUSIÓN GENERAL

Diversidad fúngica y distribución de las orquídeas. Diversos trabajos han mencionado que la diversidad, abundancia y distribución de los hongos en el medio ambiente pueden ser algunos de los factores que influyen sobre la distribución de las plantas (Swarts et al., 2010), y que en el caso de las orquídeas, juegan un papel importante debido a que presentan diferentes etapas en su ciclo de vida, en las que la presencia de hongos simbióticos en sus raíces es necesaria para su persistencia (Rasmussen et al., 2015). A una escala local, se reporta que la dinámica en las poblaciones de las orquídeas parece estar más influenciada por la distribución irregular de los hongos en los sustratos donde se desarrollan (McCormick & Jacquemyn, 2014). En este trabajo, las especies de orquídeas analizadas compartieron hongos cuando se localizaron en los mismos sustratos de desarrollo y sitios, pero se segregaron espacialmente cuando las especies fúngicas en sus raíces fueron diferentes, y a escala local se pudo observar que las especies de orquídeas con mayor diversidad fúngica en sus raíces también fueron las más ampliamente distribuidas en el área de estudio.

Se menciona que las orquídeas terrestres dependen más de la presencia de hongos micorrícicos en embriones y protocormos que las orquídeas epífitas (McCormick et al., 2016). En las plantas adultas muestreadas, las orquídeas epífitas mostraron una interacción generalista ya que presentaron una mayor riqueza de hongos que las orquídeas terrestres. En estas últimas se identificaron principalmente hongos del complejo *Rhizoctonia*, lo que hace suponer una asociación específica pero eficiente, que ha permitido la dispersión de especies como *B. purpurata* más allá de México. Mientras que en *L. autumnalis*, la asociación de varios hongos tanto endófitos como micorrícicos podría ser uno de los factores que le ha permitido colonizar diferentes sustratos y una mayor distribución en comparación con las demás orquídeas epífitas analizadas. Sin embargo se requieren de nuevos análisis con técnicas de metagenómica que permitan una identificación más precisa de los hongos presentes en sus raíces, ya que en el presente estudio la identificación se hizo de cultivos axénicos, por lo que la diversidad presente pudo haber sido subestimada. Se requiere además analizar la distribución de los hongos en los sustratos de desarrollo de las orquídeas en un gradiente geográfico para determinar si la distribución espacial de algunas

especies fúngicas determinan la distribución de algunas especies de orquídeas y analizar la posible función que juegan los hongos endófitos no micorrícicos presentes en sus raíces.

Perfil de ácidos grasos. Los perfiles de ácidos grasos mostraron ácidos comunes a la mayoría de los hongos y muy pocos que pudieran servir como marcadores para la identificación de especies en particular, sin embargo una mayor cantidad de análisis pueden permitir determinar si las concentraciones presentes de cada uno de estos ácidos muestran un patrón en los diferentes géneros de hongos, ya que el análisis de agrupamiento separó a las cepas probadas en sus géneros correspondientes. Muy pocos trabajos se han realizado sobre perfiles de ácidos grasos en las diferentes especies de orquídeas (Pereira et al., 2011) y en ese sentido, este trabajo amplió este conocimiento.

Contribución de los hongos identificados en el proceso germinativo. Se encontraron diferentes panoramas en la interacción orquídea-hongo en la etapa de germinación en las diferentes especies de orquídeas analizadas. Por una parte las orquídeas epífitas mostraron ser más generalistas hacia la asociación durante el proceso de germinación ya que la semilla fue estimulada por la mayoría de las 19 cepas fúngicas probadas y que incluían tanto hongos micorrícicos como endófitos, mientras que *Bletia purpurata*, una orquídea terrestre germinó únicamente con los hongos micorrícicos extraídos de su planta adulta y *G. lagenophora* no germinó con ningún tratamiento. Después del estadio 2 y 3 de desarrollo del embrión, la relación cambió y las orquídeas epífitas se volvieron más selectivas desarrollándose solamente con algunas cepas de hongos micorrícicos, encontrando algunas como *E. citrina* que únicamente mantuvo su relación con una cepa de *Tulasnella* y no fue eficiente. De manera que al término del proceso germinativo las interacciones más eficientes se presentaron con los basidiomicetos micorrícicos *Tulasnella* y *Serendipita* y con dos ascomicetos *Morchella* y *Trichocladium*, encontrando que las tasas de supervivencia más altas se presentaron en las orquídeas terrestres *B. purpurata* y *H. flexuosa*.

Algunos trabajos sugieren que la distribución local y espacial de algunas orquídeas probablemente estén influenciadas por hongos micorrizales y algunos endófitos (Swarts et al., 2010) y que aunque la distribución de las orquídeas no está limitada por los hongos, es la combinación de diversos factores de forma estocástica, la que determina su dispersión. Otros requisitos ambientales, y la

distribución y abundancia de hongos de manera irregular, pueden limitar el reclutamiento de orquídeas; como lo demuestra el trabajo de McCormick et al., (2016), en el que se menciona que la separación de los factores que determinan el establecimiento exitoso de las orquídeas es un desafío importante para la conservación y una de las dificultades para lograrlo, ha sido el conocimiento limitado de la distribución de hongos micorrizales de orquídeas en el medio ambiente, así como la función de otros endófitos presentes en sus raíces. En ese estudio, que representa uno de los pocos casos en que la distribución de hongos en el suelo se examinó independientemente de las orquídeas, se encontró que la germinación de la semilla y el desarrollo de protocormos reflejaban tanto la distribución como la abundancia de hongos micorrícicos apropiados. Otros trabajos señalan la importancia que parecen tener otros endófitos en el proceso germinativo (Xiaoya et al., 2015; Herrera et al., 2017).

La eficiencia mostrada durante el proceso germinativo por *Morchella* y *Trichocladium* indican que además de los hongos del complejo *Rhizoctonia*, existen géneros que pueden establecer este tipo de asociación. *Trichocladium* formó las estructura típicas de este complejo, incluyendo formación de pelotones y células monilioides. Lo que confirma la necesidad de estudiar a las especies de orquídeas endémicas mexicanas que parecen interaccionar con géneros fúngicos no reportados a nivel mundial. Se debe analizar además el papel de endófitos, que si bien estimulan la germinación de la semilla, en las etapas posteriores pueden tener un efecto negativo sobre el desarrollo del embrión. Por ello se debe analizar si la interacción de algunos de ellos, en consorcio con los hongos micorrícicos, es más eficiente a través de relaciones sinérgicas o antagónicas que favorezcan el desarrollo de las plántulas y cuál es su papel funcional en plantas adultas. Se requiere un mayor estudio sobre la distribución geográfica que tienen los hongos asociados a las orquídeas ya que muchos de ellos, si bien pueden favorecer el desarrollo de esta familia de plantas, también están reportados como organismos patógenos de otras familias de plantas. Por lo que el conocimiento de sus gradientes de distribución evitará alterar las interacciones naturales de los ecosistemas en los que se desarrollan las orquídeas y una mejor comprensión sobre los mecanismos que pudieran resultar más adecuados para la reintroducción y conservación tanto de las orquídeas como de sus interactuantes fúngicos.

8. CONCLUSIONES GENERALES

La distribución geográfica de los hongos varió en el área de estudio, lo cual es un factor importante a considerar cuando se quieren establecer programas de conservación ya que como se puede observar, existen especies de orquídeas menos específicas hacia la asociación, que se pueden desarrollar de manera exitosa en diferentes hábitats al asociarse con diferentes hongos, pero existen otras orquídeas en las que la ausencia del simbionte adecuado en un sitio podría afectar su capacidad adaptativa y de dispersión.

Las especies de orquídeas epífitas analizadas que presentaron una mayor diversidad de hongos endófitos y micorrícicos en sus raíces, en la etapa adulta, se encontraron mejor distribuidas y sus procesos germinativos en la etapa de rompimiento de testa fueron más eficientes, que aquellas en asociación con poca variedad fúngica. Las orquídeas terrestres analizadas presentaron asociaciones más específicas tanto en la etapa geminativa como en la etapa adulta, lo que les permitió un desarrollo germinativo más rápido.

Existen procesos de segregación que en el medio ambiente les permite a las orquídeas una mejor supervivencia y adaptación al asociarse con diferentes especies fúngicas cuando comparten sitios.

Algunos hongos asomicetos no reportados como micorrícicos de orquídeas y extraídos de las raíces de plantas adultas silvestres, establecieron asociación simbiótica con las semillas de las especies de orquídeas analizadas, como *Trichocladium* y *Morchella* y estimularon la germinación y el desarrollo posterior del embrión. Demostrando la importancia de estudiar el papel funcional de los hongos endófitos de la familia Orchidaceae.

9. REFERENCIAS GENERALES

- Atala, C., Pereira G., Romero C., Muñoz-Tapia L., Vargas R., & Suz, L. M. (2015). Orchidioid fungi of the form-genus *Rhizoctonia* associated with the roots of *Chloraea cuneata* Lindl. from Araucanía, Chile. *Gayana. Botánica*, 72(1), 145–148. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432015000100017>.
- Ávila-Díaz, I., Orijel R. O., Magaña-Lemus R., & Oyama, K. (2013). Molecular evidence reveals fungi associated within the epiphytic orchid *Laelia speciosa* Schltr. *Botanical Sciences*, 91(4), 523–529.
- Ávila-Díaz, I., Oyama K., Gómez-Alonso C. & Salgado-Garciglia R. (2009). *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 99:335-343.
- Ávila-Díaz, I. (2007). Biología de poblaciones de *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. (Orchidaceae) para su manejo y conservación. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, CIEco-UNAM. Morelia, Michoacán, México. Pp. 121-151.
- Batista, J. A. N., Bianchetti L. de B., González-Tamayo R., Figueroa X. M. C., & Cribb, P. J. (2011). A Synopsis of new world *Habenaria* (Orchidaceae) I. *Harvard Papers in Botany*, 16(2), 233–273. <https://doi.org/10.3100/0.25.016.0202>.
- Bayman, P., Lebrón L. L., Tremblay R. L., & Lodge D. J. (1997). Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). *New Phytologist*, 135(1), 143–149. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00618.x>
- Bayman, P. & Otero-Ospina, J. T. (2006). 9. Microbial Endophytes fungi of orchid roots, 9, 153–177. <https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9>.
- Beltrán-Nambo, M. A., Ortega-Larrocea M. P. & Carreón-Abud Y. (2010). Mycorrhizal Colonization Patterns of Three *Bletia* Species in a Natural Forest Reserve in Michoacán , Mexico. *Acta Horticulture*, 878 (1er int. Orchid Symposium), 43–52.
- Beltrán-Nambo, M.A. (2010). Aislamiento y caracterización de hongos micorrícicos asociados a orquídeas terrestres del género *Bletia* (Orchidaceae) en la reserva natural Barranca del Cupatitzio, del Mpio. De Uruapan, Michoacán. Tesis de Maestría. Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas. U.M.S.N.H. Michoacán, México. 139pp.
- Bidartondo, M. I. & Read D. J. (2008). Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. *Molecular Ecology*, 17(16), 3707–3716. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03848.x>.
- Camargo-Cepeda, D. F. & Ávila E. R. (2014). Efectos del *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento y desarrollo de la arveja (*Pisum sativum* L.). *Ciencia y Agricultura*, 11 (1), 91–100.
- Cano, M. A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp . y *Pseudomonas* sp. Una revisión. *Rev.U.D.C.A Act. E Div. Cient.*, 14(2), 15–31.
- Castillo, M. (2002). Micorrización *in vitro* de *Bletia urbana* (Orchidaceae) como una estrategia para su reintroducción. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 77 pp.
- CITES, Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. (2017). Appendices I, II, and III, CITES, Journal of minimal access surgery. <https://doi.org/10.1080/13880290590913822>.
<https://cites.org/sites/default/files/eng/app/2017/E-Appendices-2017-04-04.pdf>
- CONANP, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. (2014). *Estrategia hacia 2040*. Retrieved from http://e2040.conanp.gob.mx/docs/E-2040_completa.pdf.
- CONABIO. (2000). Estrategia Nacional sobre Biodiversidad de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 103 pp.
- CONABIO. (2012). *Propuesta de lista de especies prioritarias para la conservación en México*. Retrieved from http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/pdf/EspeciesPrioritarias/PropuestaEspPrioritarias_ago2012_VerAct_Sept2013.pdf

- CONABIO. (2016). *Estrategia Nacional sobre biodiversidad en México y plan de acción 2016 - 2030*. México. Gobierno de la República. 1ª edición. 373 pp.
- CONABIO, SUMA, UMSNH. (2005). *La biodiversidad en Michoacán. Estudio de Estado*. (L. Villaseñor-Gómez, Ed.) 1ª edición. México. ISBN: 970 900 028 4.
- CONABIO, Suma, & Sedagro. (2007). *Estrategia para la conservación y uso sustentable de la diversidad biológica del estado de Michoacán*. (S. CONABIO, SUMA, Ed.) 1ª edición. Morelia, Michoacán: Gobierno del Estado. Retrieved from http://www.biodiversidad.gob.mx/region/EEB/pdf/EEB_MICHOACAN_2007.pdf
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez L., Cortés-Penagos C., & López-Bucio J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149(3), 1579–1592. <https://doi.org/10.1104/pp.108.130369>.
- Cozzolino, S., & Widmer A. (2005). Orchid diversity: An evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecology and Evolution*, 20(9), 487–494. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.06.004>.
- Cruz-Balsí, J. (2007). *Colonización micorrízica y diversidad de hongos micorrízicos de algunas especies de orquídeas epifitas tropicales en el sureste de Chiapas, México*. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.
- De Long, J. R., Swarts N. D., Dixon K. W., & Egerton-Warburton L. M. (2013). Mycorrhizal preference promotes habitat invasion by a native Australian orchid: *Microtis media*. *Annals of Botany*, 111(3), 409–418. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs294>.
- Dearnaley, J. D., Artos F. M., & Elosse M. S. (2012). Orchid Mycorrhizas : Molecular Ecology , Physiology , Evolution and Conservation Aspects. In B. Hock (Ed.), *Fungal Associations. The Mycota IX*. Queensland, Toowoomba: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2d edition, pp. 207–224.
- Dressler, R. L. (1965). Notes on the genus *Govenia* in Mexico (Orchidaceae). *Brittonia*, 17, 266–277.
- Espejo-Serna, A. (2012). El endemismo en las liliopsida mexicanas. *Acta Botánica Mexicana*, 100, 195–257.
- Faeth, S. H., & Fagan W. F. (2002). Fungal endophytes: Common host plant symbionts but uncommon mutualists. *Integ. and Comp. Biol.*, 42, 360–368. <https://doi.org/10.1093/icb/42.2.360>
- Fay, M. F., & Chase M. W. (2009). Orchid biology: From Linnaeus via Darwin to the 21st century. *Annals of Botany*, 104(3), 359–364. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp190>.
- Fay, M. F., Pailler T., & Dixon K. W. (2015). Orchid conservation: Making the links. *Annals of Botany*, 116(3), 377–379. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv142>.
- Gamboa-Gaitán, M. A., & Otero-Ospina J. T. (2016). Colombian vanilla and its microbiota. III. Diversity and structure of the endophytic community. *Acta Botanica Hungarica*, 58(3–4), 241–256. <https://doi.org/10.1556/ABot.58.2016.3-4.2>.
- García-Cruz, J., Sánchez S. L. M., Jiménez M. R., & Solano-Gómez R. (2003). Orchidaceae, Tribu Epidendreae. *Fascículo 119. Flora Del Bajío Y de Regiones Adyacentes*, 178.
- García Cruz, C. J. (1999). Manual ilustrado de las orquídeas silvestres del estado de Morelos. Instituto Chinoín A.C. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. H043. México, D.F.
- Garduño-Monroy, V.H., Corona-Chávez P., Israde-Alcántara I., Mennella L., Arreygüe E., Bigioggero B. & Chiesa S. (1999). Carta geológica de Michoacán 1:250,000. 111 pp.
- Garnica, S., Riess K., Schön M. E., Oberwinkler F. & Setaro S. D. (2016). Divergence times and phylogenetic patterns of Serendipitales, a highly diverse and widespread fungal lineage. *PLoS ONE*, 11(3), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149531>.
- Gómez-Aguilar W.E., Ortega-Larrocea, M.P. & Chávez-Ávila, V.M. (2013). Propagación simbiótica y asimbiótica de *Bletia campanulata*. En: Memorias del Segundo encuentro mexicano de orquideología. CONABIO-Viccon-Ávila-Nava Eds. (Ed.) . Guerrero, México.pp 32.
- González-Tamayo, J.R., Hernández L. (2010). *Las Orquídeas del Occidente de México*.

- Volumen 1. (COECYT-JAL, Ed.). 1ª edición. México. 301 pp.
- Gual-Díaz, M. y Rendón-Correa, A. (Comps.) (2014). *Bosques Mesófilos de Montaña de México. Diversidad, ecología y manejo*. (CONABIO, Ed.), *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*. México. Primera Ed. México. Retrieved from http://www.biodiversidad.gob.mx/ecosistemas/pdf/BosquesMesofilos_montana_baja.pdf.
- Guimarães, F. A. R., Pereira M. C., Felício C. da S., Torres D. P., Oliveira S. F., Veloso T. G. R. & Kasuya M. C. M. (2013). Symbiotic propagation of seedlings of *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi (Orchidaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 27(3), 590–596. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062013000300016>.
- Hágsater, E. (2008). Orchids of Mexico. Fascicle 10, Part 4. *Icones orchidacearum*. (H. Hágsater & M. Soto eds.). 240pp.
- Hágsater, E., Soto-Arenas M., Salazar-Chávez G., Jiménez-Machorro R., López-Rosas M., & Dressler L. (2005). Las orquídeas de México. (I. Chinoín, Ed.) (1a edición). México, D.F. 304pp.
- Hágsater, E. y G. A. S. (1990). Orchids of México. Fascicle 1. Part 1. *Icones Orchidacearum*, 1(1), 1–100.
- Halbinger, F. & Soto M. (1997). Laelias of Mexico. (Revista del Herbario AMO, Ed.), *Orquídea*. Número Úni, Vol. 15. México. Retrieved from <http://biblat.unam.mx/es/revista/orquidea-mexico-d-f/articulo/laelias-of-mexico>.
- Herrera, H., Valadares R., Contreras D., Bashan Y., 2017. Mycorrhizal compatibility and symbiotic seed germination of orchids from the voastal range and Andes in South central Chile. *Mycorrhiza* 27, 175-188.
- Huang, C. L., Jian F. Y., Huang H. J., Chang W. C., Wu W. L., Hwang C. C., et al., (2014). Deciphering mycorrhizal fungi in cultivated *Phalaenopsis* microbiome with next-generation sequencing of multiple barcodes. *Fungal Diversity*, 66(1), 77–88. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0281-x>.
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática: Síntesis Geográfica del Estado de Michoacán, Iztacalco, México, D.F., 1985, 315 págs.
- IUCN, Red List of Threatened Species. Version 2017-1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on **26 June 2017**.
- Jacinto-Hernández A., Ortega-Larrocea M.P., González-Caballero O. & Chávez-Ávila V.M. (2013). Micorrización *in vitro* de plantulas de *Stanhopea tigrina* (Orchidaceae) especie amenazada endémica de México. En: Memorias del Segundo encuentro mexicano de orquideología. CONABIO-Viccon-Ávila-Nava Eds. (Ed.) . Guerrero, México. pp 37.
- Jacinto-Hernández A. & Ortega-Larrocea M.P. (2013). Germinación simbiótica de *Oncidium* affn. *sphacelatum*. En: Memorias del Segundo encuentro mexicano de orquideología. CONABIO-Viccon-Ávila-Nava Eds. (Ed.) . Guerrero, México. pp 38.
- Klironomos, J. N. (2002). Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. *Nature*, 417(6884), 67–70. <https://doi.org/10.1038/417067a>.
- LLamacho, J. A. & Larramendi, J. A. (2005). Las Orquídeas de Cuba. Sevilla, España. Greta.
- Magaña-Lemus, R. E. (2011). Colonización de hongos endófitos en las semillas de *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *UMSNH*. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. 47 pp.
- Martínez-Palacios, A, Chávez V.M. (2012). Cultivo asimbiótico de orquídeas y seguimiento de reintroducción. En: La biodiversidad de Michoacán. Estudio de estado. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad (CONABIO). ISBN: 970 900 028 4.
- McCormick, M. K., & Jacquemyn H. (2014). What constrains the distribution of orchid populations? *New Phytologist*, 202, 392–400. <https://doi.org/10.1111/nph.12639>.
- McCormick, M. K., Taylor D. L., Whigham D.F. & Burnett R.K. (2016). Germination patterns in three terrestrial orchids relate to abundancia of mycorrhizal fungi. *Journal of Ecology*, 104, 744-754. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12556>.
- Montes, N.E. (2016). Especificidad potencial de hongos micorrícicos en el proceso de

- germinación y supervivencia in vitro de orquídeas terrestres. Tesis de Maestría. Programa Institucional de Ciencias Biológicas, U.M.S.N.H. Michoacán, Méx. 94 pp.
- Moreno-Martínez, D. (2011). Estudios de germinación *in vitro* e *in situ* de *Epidendrum parkinsonianum* Hook. y *Acineta barkeri* (Bateman) Lindl. (Orchidaceae). Tesis de Maestría, Universidad Veracruzana. 99pp.
- Ogura-Tsujita, Y., & Yukawa T. (2008). High mycorrhizal specificity in a widespread mycoheterotrophic plant, *Eulophia zollingeri* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 95(1), 93–97. <https://doi.org/10.3732/ajb.95.1.93>
- Oliveira, S. F., Bocayuva M. F., Veloso T. G. R., Bazzolli D. M. S., da Silva C. C., Pereira O. L., & Kasuya M. C. M. (2014). Endophytic and mycorrhizal fungi associated with roots of endangered native orchids from the Atlantic Forest, Brazil. *Mycorrhiza*, 24(1), 55–64. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0512-0>.
- Ordóñez, N. F., Otero J. T., & Díez-Gómez M. C. (2012). Orchid endophytes and their effect on growth in *Vanilla planifolia* Andrews. *Acta Agronómica*, 61(3), 282–290.
- Ortega-Larrocea M. P., Martínez A., & Chávez V. M. (2008). Conservación y propagación de orquídeas. En: *Restauración, conservación y manejo*. México, D.F. pp. 483–495.
- Ortega-Larrocea, M., & Rangel-Villafranco M. (2007). Fungus-assisted reintroduction and long-term survival of two Mexican terrestrial orchids in the natural habit.
- Ortega-Larrocea, M. P., Sandoval E., Ramos C., Chávez-Ávila V.M. (2005). Histological development of *Bletia urbana* an endangered terrestrial orchid from Mexico. *Selbyana* 26: 309-317.
- Ortega-Larrocea, M. P., González D. (2008). Los hongos asociados a las orquídeas terrestres en la restauración. En: *Tópicos sobre diversidad, ecología y usos de los hongos microscópicos en Iberoamérica*. Heredia A.G. (Eds). Instituto de Ecología A.C. México. pp 219-227.
- Ortega-Larrocea, M. P. (2008). Propagación simbiótica de orquídeas terrestres con fines de restauración edafoecológica. En: *Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración*. Álvarez-Sánchez J. y Monroy-Ata A. (Comps.). Facultad de Ciencias, UNAM. pp 85-96. *Lankesteriana*, 7, 317–321.
- Osorio-Morales J.E., Romero-Aguilar L.J., Ortega-Larrocea M.P. & Montañón-Arias G. (2013). Colonización micorrízica de *Bletia roezlii* (Orchidaceae) en tres sitios con distinto grado de degradación en la selva baja caducifolia del Rincon de la Vía, Guerrero. En: *Memorias del Segundo encuentro mexicano de orquideología*. CONABIO-Viccon-Ávila-Nava Eds. (Ed.) . Guerrero, México. pp 45.
- Otero, J.T., Bayman P. & Ackerman J. (2003). Variación en germinación simbiótica entre semillas de *Tolumnia variegata* y entre hongos micorrízicos. *Lankesteriana*, 2(3), 2003.
- Otero, J. T., Ackerman J. D., & Bayman P. (2002). Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*, 89(11), 1852–1858. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.11.1852>.
- Otero J. T., Ackerman J. D. & Bayman P. (2004). Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology*, 13(8), 2393–2404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02223.x>
- Otero, J. T., Mosquera A. T., & Flanagan N. S. (2013). Tropical orchid mycorrhizae: Potential applications in orchid conservation, commercialization, and beyond. *Lankesteriana*, 13(1–2), 57–63.
- Pecoraro, L., Girlanda M., Kull T., Perini C., & Perotto S. (2013). Fungi from the roots of the terrestrial photosynthetic orchid *Himantoglossum adriaticum*. *Plant Ecology and Evolution*, 146(2), 145–152. <https://doi.org/10.5091/plecevo.2013.782>.
- Pereira M.C., Vieira N., Totola M. & Megumi C. (2011). Total fatty acid composition in the characterization and identification of orchid mycorrhizal fungi *Epulorhiza* spp., *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* 35(4), 1159-1165.
- Pereira, G., Romero C., Suz L. M., & Atala C. (2014a). Essential mycorrhizal partners of the endemic Chilean orchids *Chloraea collicensis* and *C. gaviu*. *Flora: Morphology*,

- Distribution, Functional Ecology of Plants*, 209(2), 95–99.
<https://doi.org/10.1016/j.flora.2013.12.001>
- Pereira, M. C., Da Silva Coelho I., Da Silva Valadares R. B., Oliveira S. F., Bocayuva M., Pereira O. L., Araujo F., Kasuya M. C. (2014b). Morphological and molecular characterization of *Tulasnella* spp. fungi isolated from the roots of *Epidendrum secundum*, a widespread Brazilian orchid. *Symbiosis*, 62(2), 111–121.
<https://doi.org/10.1007/s13199-014-0276-0>
- Porras-Alfaro, A. & Bayman P. (2011). Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 291–315.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081831>
- PROFEPA. (2016). Hasta el 40% de la deforestación en Michoacán es por aguacate. *La Jornada En Línea*. Michoacán. Retrieved from <http://www.jornada.unam.mx/ultimas/2016/10/31/hasta-el-40-de-la-deforestacion-en-michoacan-es-por-aguacates-profepa>.
- QGIS Development Team, 2009. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation. URL <http://qgis.osgeo.org>
- Rangel, V.M. (2004). Aislamiento de hongos micorrízicos de orquídeas terrestres de la Reserva Ecológica “El Pedregal” de San Ángel, México, D.F. Tesis de Maestría. Instituto de Geología, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Rangel, V.M. (2006). Reintroducción de algunas especies de orquídeas de la Reserva del Pedregal de San Ángel, México, D.F. Tesis Profesional. Facultad de Estudios Superiores, Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Rangel-Villafranco, M., & Ortega-Larrocea M. P. (2007). Efforts to conserve endangered terrestrial orchids *in situ* and *ex situ* at two natural reserves within central Mexico. *Lankesteriana*, 7(1–2), 326–333.
- Rasmussen, H. N., Dixon K. W., Jersáková J. & Těšitelová T. (2015). Germination and seedling establishment in orchids: A complex of requirements. *Annals of Botany*, 116(3), 391–402. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv087>.
- Rendón-Lara, C.E., Ortega-Larrocea M.P., Menchaca-García R., & Lozano M. (2013). Colonización micorrízica de dos especies de orquídeas epífitas del Estado de Veracruz (*Cycnoches ventricosum*) Batemam y (*Chysis bractescens*) Lindley. En: Memorias del Segundo encuentro mexicano de orquideología. CONABIO-Viccon-Ávila-Nava Eds. (Ed.) . Guerrero, México. pp 45.
- Rodriguez, R. J., White J. F., Arnold A. E., & Redman R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2), 314–330.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
- Rzendowski, J. (1996). Análisis preliminar de la flora vascular de los bosques mesófilos de montaña de México. *Acta Botánica Mexicana* 35:25-44.
- Sahuquillo, E. (2008). Guía de las Orquídeas. (C. del medio ambiente Xunta de Galicia, Ed.). 1ª edición. Galicia, España: Dirección General de Conservación de la Naturaleza. 72 pp.
- Salazar, G. (2013). Orquídeas. *Instituto de Biología*, 3(12), 1–18. Retrieved from http://www.ibiologia.unam.mx/pdf/directorio/s/salazar/orquideas_pedregal.pdf
- Salazar, M. (2017). Estudio comparativo de la riqueza de hongos endófitos asociados a la diversidad de orquídeas epífitas en los bosques de Mazán y la zona de influencia del Parque Nacional El Cajas. Tesis de Maestría. Universidad de Cuenca, Ecuador. 47 pp.
- Sánchez-Salas, J., Muro G., Estrada-Castillón E. & Alba-Ávila J. A. (2013). El Mer: Un Instrumento Para Evaluar El Riesgo De Extinción De Especies En México. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, XII(1), 30–34. <https://doi.org/10.5154/r.rchsza.2012.06.037>
- Segundo, R. (2016). Efecto de cultivos simbióticos y asimbióticos sobre la germinación, desarrollo de plántulas *in vitro* y supervivencia *ex vitro* de *Laelia autumnalis*, *L. Speciosa* y *Govenia superba* (Orchidaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología, U.M.S.N.H. Michoacán, Méx. 77pp.
- SEMARNAT, Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2010). NOM-059-

- protección ambiental de 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/diciembre/2010.
- SEMARNAT, (2014). Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales Dof: Lista de especies y poblaciones prioritarias para la conservación. Diario Oficial de la Federación. 30/05/2014.
- Serna, A. E. (2012). El endemismo en las liliopsida mexicanas. *Acta Botanica Mexicana*, 100(1), 195–258.
- Smith, S.E. & Read J. (2009). Mycorrhizal symbiosis. (Elsevier, Ed.) (Third). New York: Springer.
- Sosa, V. (2002). *Bletia purpurata* La Llave & Lex. In: Orchids of Mexico. Parts 2-3. Hágsater, E. y Soto, M. (Eds.). *Icones Orchidacearum* 5-6. 426 p.
- Soto Arenas, M. Á., Gómez R. S., & Hágsater E. (2007). Risk of extinction and patterns of diversity loss in Mexican orchids. *Lankesteriana*, 7(1–2), 114–121.
- Stone, J.K., Polishook J.D. White J. F. (2004). Endophytic fungi. *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*, 241–270. <https://doi.org/10.13140/2.1.3835.2169>
- Suazo-Ortuño, I., & Zermeno-Hernández, I. (2017). Estudio de estado: sección III “Biodiversidad.” Michoacán, México. Retrieved from Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Swarts, N. D. & Dixon K. W. (2009). Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany*, 104(3), 543–556. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp025>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04736.x>
- Talbot, J. M., Bruns T. D., Taylor J. W., Smith D. P., Branco S., Glassmas S. I., et al., (2014). Endemism and functional convergence across the North American soil mycobiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(17), 6341–6346. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402584111>
- The Plant List* (2013). Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st January, 2017).
- Valadares, R. B., Pereira M. C., Otero J. T. & Cardoso E. J. (2012). Narrow fungal mycorrhizal diversity in a population of the orchid *Coppensia doniana*. *Biotropica*, 44(1), 114–122. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2011.00769.x>
- Waller, F., Achatz B., Baltruschat H., Fodor J., Becker K., Fischer M., et al., (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(38), 13386–13391. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504423102>
- Wang, R.L., Hu H. & Li Y. (2004). Notes on symbiotic relationship between *Cypripedium flavum* and its mycorrhizal fungi. *Acta Botanica Yunnanica* 26 (4): 445-450.
- Xiaoya, M., Kang J., Nontachaiyapoom S., Wen T., & Hyde K. D. (2015). Non-mycorrhizal endophytic fungi from orchids. *Current Science*, 109(1), 72–87.
- Yukawa, T., Ogura-Tsujita Y., Shefferson R. P. & Yokoyama J. (2009). Mycorrhizal diversity in *Apostasia* (Orchidaceae) indicates the origin and evolution of orchid mycorrhiza. *American Journal of Botany*, 96(11), 1997–2009. <https://doi.org/10.3732/ajb.0900101>

10. ANEXO 1

DETALLES ESTRUCTURALES DE LA PLANTA DE LAS ESPECIES DE ORQUÍDEAS ANALIZADAS.

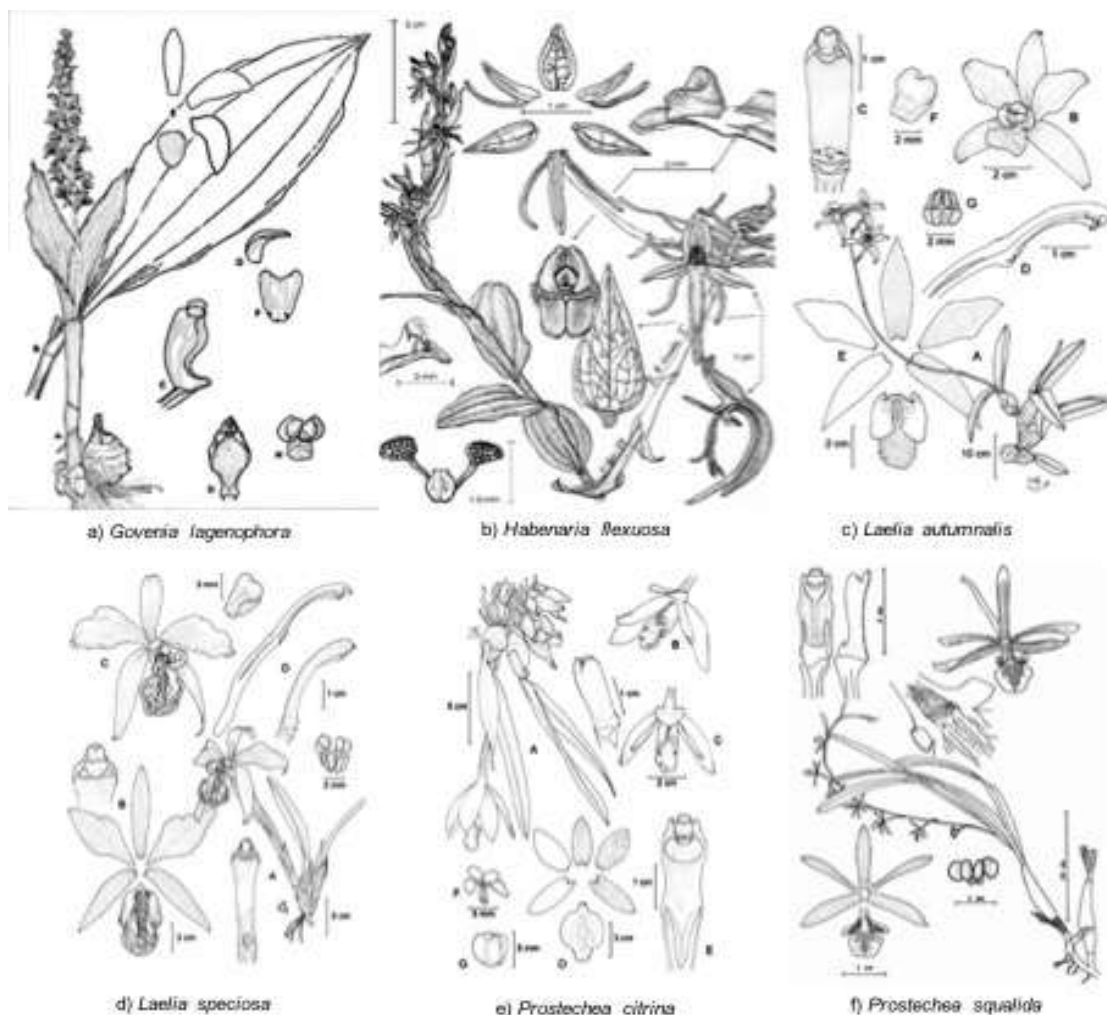


Figura 26. a) *Govenia lagenophora*. Hoja completa (B); Vista lateral de la columna (C); Vista ventral de la columna (D); Cotiledones de los sépalos, pétalos y labelo separados (E); Vista superior del labelo en su posición natural (F); Vista lateral del labelo en su posición natural (G); polinario mostrando 4 polinias; (Tomado de Dressler 1965). b) *Habenaria flexuosa*. Detalles de la planta, flor, columna y polinias. Dibujo de González-Tamayo 2010. c) *Laelia autumnalis*. Inflorescencia de la planta (A); Flor vista de tres cuartos (B); Vista frontal de la columna (C); Corte longitudinal de la columna (D); Disección floral (E); antera (F); Polinias (G). Ilustrado por Rolando Jiménez basado en una planta de Morelos (Halbinger & Soto, 1997). d) *Laelia speciosa*. Planta con inflorescencia y vista ventral de la columna (A); Disección floral y detalle del ápice de la columna (B); Flor vista de tres cuartos y antera (C); Vista lateral de la columna, corte longitudinal de la columna y del ovario y detalle de los polinias (D). Ilustrado por Rolando Jiménez, basado en una planta de Michoacán (Halbinger & Soto, 1997). e) *Euchile citrina*. Planta con inflorescencia (A); Flor vista de tres cuartos (B); Flor en vista frontal (C); Disección floral (D); Vista vertical de la columna (E); Antera (F); Polinias (G). Ilustrado por Ricardo Jiménez basado en una planta de Morelos (Salazar, 2006). f) *Prosthechea squalida*. Se muestran detalles de las hojas, flores, columna y polinias (tomada de Soto-Arenas & Salazar, 2008, en Hagsater, 2008).

Salazar, G. A. (2006). Orquídeas y otras plantas nativas de la cañada Cuicatlán. México. Instituto de Biología-UNAM

ANEXO 2. ARTÍCULO DE DIVULGACIÓN

Año 5 / Noviembre - Diciembre / No. 30 U.M.S.N.H.

Artículos

Una amistad ancestral: orquídeas y hongos

Maria de los Ángeles Beltrán Nambo y Yazmin Carreón Abud

Foto: MA Beltrán Nambo. *Laelia autumnalis* (Flor de todos los santos).

Las fascinantes orquídeas!

Las orquídeas han fascinado desde mucho tiempo atrás y han sido apreciadas por su belleza y particularidad, por lo que han sido comercializadas con gran interés y se ubican entre las plantas más buscadas por los coleccionistas. También han sido objeto de estudio de prominentes naturalistas como Charles Darwin, Christian K. Sprengel y Robert Brown, que se interesaron en conocer los procesos de polinización y gran variabilidad que mostraba esta familia de plantas (Orchidaceae). Un grupo de plantas catalogado como uno de los más amplios, ya que cuenta con aproximadamente 30,000 especies de distribución mundial. Esta familia además, cuenta con extraordinarias adaptaciones, que le han permitido la colonización de diferentes hábitats y la supervivencia a largo plazo.

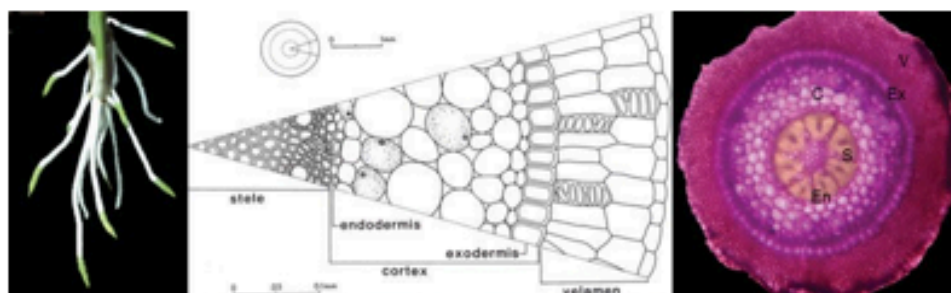
¿Cómo estas plantas se han adaptado a diferentes hábitats?

Uno de los mecanismos de adaptación de las orquídeas, es que sus raíces, especialmente las de las especies tropicales, tienen una cubierta de múltiples células muertas, llamadas velamen, que protege a las células de la corteza de la raíz de un exceso de sequedad y ayuda en la absorción de agua. Además, las raíces de muchas de las orquídeas que habitan sobre los árboles son capaces de realizar fotosíntesis.

Otra de las adaptaciones que resulta muy asombrosa es que tienen mecanismos increíbles y muy ingeniosos de reproducción. Cuando uno ve sus flores, es atraído por su belleza y no se imagina que la planta esconde un propósito en cada curva, forma, color y aroma que presenta y que, en su ambiente natural, el fin es atraer a los

La M. en C. Ángeles Beltrán Nambo es estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas.

La D. en C. Yazmin Carreón Abud es Profesora e Investigadora, ambas del Laboratorio de Genética y Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.



Raíz aérea y corte transversal de raíz.

Fotografías: MA Beltrán Namba. Esquema de raíz: Gregory y Cutler (2014).

polinizadores, que se encargan de llevar el polen de una flor a otra y de esta manera las fecundan. Las flores de algunas orquídeas, como en muchas plantas comunes, producen néctar para atraerlos. Pero muchas otras orquídeas utilizan estrategias mucho más complejas en las que imitan elementos y formas que son de interés para los polinizadores.

Además, las orquídeas presentan otro tipo de adaptación muy importante, que aunque no es tan espectacular como la que muestran sus flores, sí resulta de suma importancia para la germinación y nutrición de la planta. Ésta es la

asociación que tienen con antiguos "amigos" microscópicos, llamados hongos micorrícicos orquídeoides.

Relación ancestral entre las orquídeas y los hongos micorrícicos

De verdad, esta relación es tan ancestral, que uno depende del otro para llevar a cabo su ciclo vital y es uno de los factores que ha permitido a las orquídeas persistir en diferentes tipos de hábitats y que se distribuyan casi en cualquier parte de nuestro planeta. Solamente en áreas muy desérticas y frías, estas interesantes plantas no habitan.



Esquema de polinización (S. Elártegui, 2009).

Chloraea cuneata que imita la forma de un insecto (Novoa et al. 2013).

La relación de orquídeas con estos hongos se produjo hace aproximadamente cien millones de años, cuando esta familia de plantas se originó y es relativamente única en el reino vegetal, ya que durante la interacción forman estructuras diferentes a las que se forman en otras familias de plantas que se asocian con hongos micorrícicos.

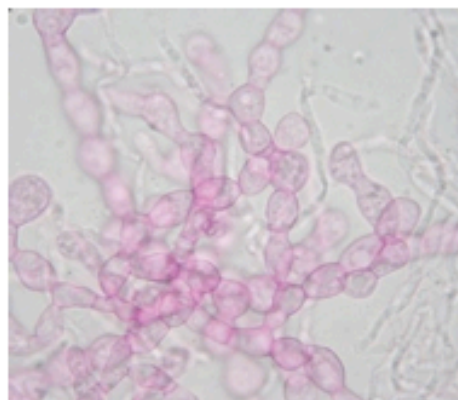
Una de estas estructuras son las células a manera de rosario (células moniloides) formadas por el hinchamiento de las hifas del hongo y que son utilizadas por éste como estructuras de reproducción y de resistencia. Otra estructura es la formación de enrollamientos de las hifas del hongo dentro de las células de la corteza de la raíz de la planta denominados ovillos o pelotones.

Se considera, que los hongos micorrícicos orquídeoides, derivan de una relación patógena ancestral, llegando a convertirse en simbioses o "amigos" que han evolucionado a la par con

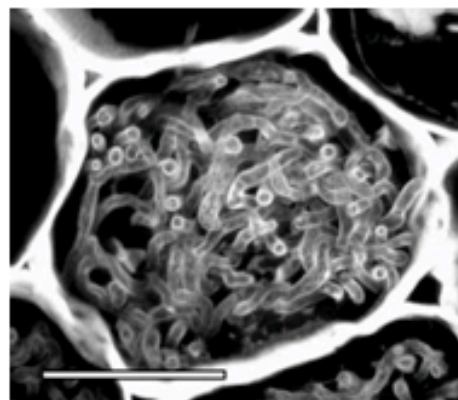
juveniles y adultas de las orquídeas. Los hongos al penetrar y una vez que forman los enrollamientos con sus hifas, ayudan a la planta para la captación de nutrientes del suelo, debido a la formación de espacios por los cuales se realiza el intercambio y de esta manera se asegura la supervivencia durante su ciclo de vida.

A su vez, la orquídea le retribuye al hongo proporcionándole alojamiento y alimento. La versatilidad trófica de los hongos podría ser un factor importante en la capacidad de adaptación ecológica de las orquídeas y la proliferación de la familia en los diferentes ecosistemas del planeta. Esto convierte al hongo en un "amigo invaluable" para la familia Orchidaceae.

Los hongos micorrícicos orquídeoides pertenecen a diferentes clases. El principal grupo de hongos que habita en las raíces de la orquídea pertenece a Basidiomycetes, aunque se han encontrado Ascomycetes. Algunos de los hongos con los que las orquídeas forman una relación,



Células moniloides. Fotografía: MA Beltrán Nambu. (izq.)



Pelotón en raíz (Peterson y Massicotte, 2004). (der.)

ellas, los que le ayudan a la germinación, ya que las semillas de orquídeas generalmente no pueden germinar en la naturaleza en ausencia de este tipo de hongos —los micorrícicos orquídeoides—, debido a que carecen de nutrientes por su tamaño tan pequeño, pues miden menos de 1 mm.

¿Qué son y cuáles la función de los hongos micorrícicos orquídeoides?

Estos hongos micorrícicos se desarrollan de forma intracelular en las células corticales y se limitan a las raíces y protocormos de plantas

son patógenos (dañinos) para algunos cultivos de interés agrícola, por ejemplo, *Rhizoctonia solani* que causa enfermedades en plantas de la familia Solanaceae como tomate y papa.

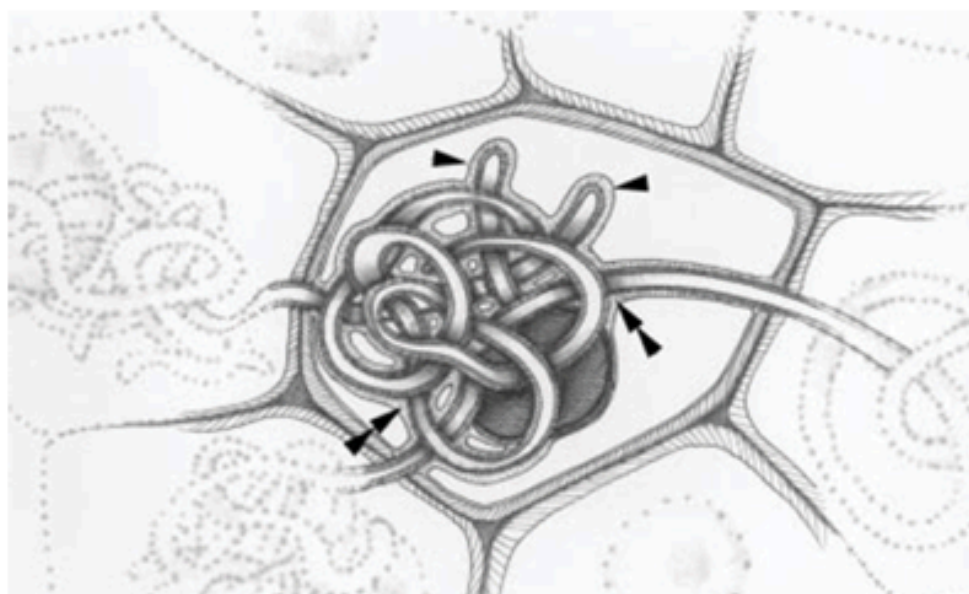
En investigaciones recientes se ha establecido que algunos hongos simbióticos de una especie en particular de orquídea, pueden no ser afines a otras especies, incluso hasta ser perjudiciales para otras plantas silvestres. Sin embargo, la mayoría de las orquídeas son capaces de regular la infección y el crecimiento de los hongos micorrícicos orquídeoides, estableciendo de esta manera una "amistad" o relación simbiótica.

Todas las orquídeas se asocian con hongos micorrícicos orquídeoides en algún momento de su vida y se sugiere que estas plantas han desarrollado mecanismos mediante los cuales son capaces de atenuar la virulencia que algunos de estos hongos muestran cuando invaden las raíces de otros tipos de plantas.

Estos dos mecanismos hacen que la micorriza orquídeolide se convierta en un excelente modelo para estudiar las interacciones plan-

ta-hongo y desarrollar nuevas estrategias que permitan menguar las interacciones patógenas en otras especies de plantas.

¡Al entender cómo las orquídeas y hongos son capaces de formar una sociedad "amistosa", en la que muchas veces la orquídea es la parte dominante, será posible obtener un mayor conocimiento sobre la evolución y transformación de las interacciones simbióticas y patógenas!



Espacios de intercambio planta-hongo (Peterson y Massicotte, 2004).



Murray J. 1877. Fertilization of Orchids by Charles Darwin. The complete work of Charles Darwin online. <http://darwin-online.org.uk>.

Navea et al. 2015. Guía de campo de las orquídeas Chilenas. Segunda edición. Ed. Corporación Chilena de la Madera, Concepción, Chile. 244 p. http://www.corma.cl/_file/material/guia-de-campo-orquideas-2015-web.pdf

Peterson y Massicotte. 2004. Exploring structural definitions of mycorrhizas, with emphasis on nutrient-exchange interphases. Canadian Journal Botany. 82: 1074-1088.

www.yumpu.com/en/document/view/13302828/exploring-structural-definitions-of-mycorrhizas-with-emphasis-on.

ANEXO 3. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS (ABSTRACT)

Rhizosphere 7 (2018) 49–56

Contents lists available at ScienceDirect

Rhizosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rhisph

Fungal diversity in the roots of four epiphytic orchids endemic to Southwest Mexico is related to the breadth of plant distribution

María de los Angeles Beltrán-Nambo^a, Miguel Martínez-Trujillo^a, Juan Carlos Montero-Castro^b, Rafael Salgado-Garciglia^c, Joel Tupac Otero-Ospina^d, Yazmín Carreón-Abud^{a,*}

^a Genetic and Microbiology Laboratory, Biology Faculty, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Francisco J. Múgica s/n, Col. Felicitas del Río, C.P. 58060 Morelia, Michoacán, Mexico

^b Plants' Molecular Systematics Laboratory, Biology Faculty, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Francisco J. Múgica s/n, Col. Felicitas del Río, C.P. 58060, Mexico

^c Vegetal Biotechnology Laboratory, Chemical-Biological Research Institute, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Francisco J. Múgica s/n, Col. Felicitas del Río, C.P. 58060, Mexico

^d Biological Sciences Department, Agricultural Sciences Faculty, Universidad Nacional de Colombia, Palmira sede, Colombia

ARTICLE INFO

Keywords:
 Nonmycorrhizal fungi
 Mycorrhizal fungi
 Shannon-Wiener index
 Beta diversity
 Fungal diversity
 Orchid
 Mycorrhiza
 Endemic

ABSTRACT

Fungi associated with plant roots are important for different plant processes, including germination and development. In Mexico, the knowledge about fungal species that interact with orchid roots and their possible roles in plant success and dispersion in different geographical locations is still very limited. For this reason, this work aimed to determine the community composition and diversity of fungi associated with orchid roots at seven sites in the Transversal Volcanic Belt region in Michoacán, México. The roots of four endemic orchid species were analyzed: *Laelia autumnalis*, *L. speciosa*, *Eulalia citrina* and *P. aqualida*. In total, 71 isolates were obtained and classified into 20 genera, including one mycorrhizal genus (*Tulasnella*) ; oetes and ascomycetes, such as *Coprinus*, *Trichoderma* and *Tylospora*. The d and sampling sites was compared using the Chao 1, Shannon-Wiener and Whittaker indexes. In this work, species such as *L. autumnalis*, *L. speciosa* and *P. aqualida* were found in different sites and seemed to be more generalists with regard to endophytes; they were typically associated with and found to be in symbiosis with species from the orchid mycorrhizal genus *Tulasnella*. Other orchids seem to be more specific, such as *E. citrina*, which showed the lowest diversity index and poor local distribution. This situation has been reported for species with a high degree of endemism.

Menú de visualización

1. Introduction

A large number of fungi associated with the Orchidaceae family are described in some reviews (Dearnaley et al., 2012; Liu, et al., 2010; Rasmussen and Rasmussen, 2007; Xiaoya et al., 2015). However, research about fungal diversity in orchid roots is mainly focused on the fungi forming orchid mycorrhiza (OM), due to their primordial role in seed germination and their contribution to plant development and nutrition (Freudenstein and Chase, 2015; Rasmussen et al., 2015; Wright et al., 2011). Recently, it was reported that beneficial associations with other endophytic fungi might also coexist (Herrera et al., 2017), so interest in the nonmycorrhizal fungi of orchids has increased, due to their possible physiological functions, the synergistic or

antagonistic relationships with other organisms to provide advantages to plants and their potential as a source of bioactive compounds (Bayman and Otero-Ospina, 2006; Khamchatra et al., 2016; Nontachaiyapoom et al., 2011).

In other plant families, fungi from both groups (mycorrhizal and nonmycorrhizal) present in the roots support water and nutrient absorption, increase plant resistance to various stresses by releasing metabolites, and stimulate germination and seedling development. For this reason, these organisms have a profound impact on the evolution, ecology, health, structure and diversity of plant communities (Jiménez et al., 2011; Mapperson et al., 2014; Otero-Ospina and Bayman, 2009; Otero et al., 2011; Ye et al., 2014). Therefore, knowledge about the different fungi associated with orchid roots can provide a better

* Corresponding author.

E-mail addresses: angelesb2008@gmail.com (M.d.L.A. Beltrán-Nambo), codigogenetico@gmail.com (M. Martínez-Trujillo), cestrum2003@yahoo.com.mx (J.C. Montero-Castro), rafael.salgadogarciglia@gmail.com (R. Salgado-Garciglia), joteroo@unal.edu.co (J.T. Otero-Ospina), ycabud@gmail.com, ycabud@umich.mx (Y. Carreón-Abud).

<https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.07.001>

Received 31 May 2018; Received in revised form 22 July 2018; Accepted 23 July 2018

Available online 24 July 2018

2452-2198/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Revista Anales del Jardín Botánico de Madrid

De: Margarita Dueñas Carazo <mduenas@rjb.csic.es>

Fecha: El jue, 24 de mayo de 2018 a la(s) 09:29

Asunto: Manuscrito AJBM 8237

Para: Yazmin Carreon Abud <ycabud@gmail.com>

Estimada Yazmín:

En primer lugar te pido disculpas por la demora en responder a la publicación de vuestro artículo. Los revisores a veces se hacen de rogar, pero después de varios correos ya tenemos los dos.

El trabajo es aceptado para su publicación en Anales del Jardín Botánico de Madrid, pero con cambios mayores como aconseja el revisor 1. Creo que siguiendo sus sugerencias mejorará considerablemente.

Os envío los comentarios y quedo a la espera de recibir las revisiones.

Un saludo,

Margarita

Characterization of orchid mycorrhizal fungi in the genus *Bletia* in Mexican forests

Beltrán-Nambo MA¹, Montero-Castro JC², Martínez-Trujillo M¹
 Salgado- García R³, Otero-Ospina JT⁴ and Carreón-Abud Y^{1*}

¹Genetic and Microbiology Laboratory. Biology Faculty. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. angelab2008@gmail.com; orcid.org/0000-0003-2240-5933; codigogenetico@gmail.com; orcid.org/0000-0002-6523-6618; ycabud@gmail.com; orcid.org/0000-0002-6148-6513.

²Plant molecular systematics Laboratory. Biology Faculty. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. cestrum2003@yahoo.com.mx; orcid.org/0000-0002-3098-1415.

³Plant Biotechnology Laboratory. Chemical Biological Research Institute. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. rafael.salgadogarcia@gmail.com; orcid.org/0000-0001-5920-6562.

⁴Biological Sciences Department. Agricultural Sciences Faculty. Universidad Nacional de Colombia, Palmira sede. jotero@una.edu.co; orcid.org/0000-0002-0810-183X.

*Corresponding author: Yazmín Carreón Abud. ¹ Genetic and Microbiology Laboratory. Biology Faculty. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Francisco J. Múgica s/n. Col. Felicitas del Río C.P. 58060. Morelia, Michoacán. ycabud@gmail.com/ycabud@umich.mx Tel: (443) 3 22 35 00 Ext. 4224, Fax: (443) 3 04 08 09

Abstract

This study involved the isolation, morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi associated to three terrestrial orchids: *Bletia roezlii* Richb. F., *B. purpurata* A. Rich Galeotti and *B. punctata* Lex. Roots were collected in Cupatitzio Nature Reserve, Michoacán, México, in order to analyze the orchid's fungal species variability. We isolated 39 strains that were morphologically characterized and some of them were molecularly identified. The species *B. punctata*, present only in Mexico, showed the lower fungi variability. Morphological characteristics correspond to those described for *Rhizoctonia*-like fungi complex. According with Euclidian distances tree generated by WARD analysis, all isolates were included into four subgroups (A, B, C y D), all related to genus *Tulasnella*. Molecular identification of 9 strains and tree construction, using Bayesian analysis, corroborated fungi morphological identity, dividing them in 4 principal clades related to *Tulasnella*. Subgroups A and B were related with *Tulasnella* spp., subgroup C strains showed connection with reference sequences identified as *Tulasnella calospora* and *T. deliquescens*; finally, subgroup D was related with *T. calospora* and *T. bifrons*. These results indicate that *Bletia* genus plants from the same site can be associated with multiple clades of *Tulasnella* genus at the same time, at least during adult stage. It was confirmed that a meticulous macroscopic and microscopic morphological characterization is a good tool to identify

orchid mycorrhizal fungi in combination with molecular analysis or as an alternative to confirm or elucidate molecular identification results.

Keywords: Orchid-fungal partnership, terrestrial orchids, *Tulasnella*.