

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

"INFLUENCIA DE LA DISPONIBILIDAD DE CARBOHIDRATOS EN LA  
SINTESIS DE MICORRIZAS *in vitro* DE DOS ESPECIES DE ORQUIDEAS  
MEXICANAS"

TESIS DE LICENCIATURA  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A :

ISABEL HERNANDEZ URIBE

LOS REYES IZTACALA  
EDO. DE MEXICO

1988



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



ESCUELA DE MEDICINA  
PROFESORAL DE IZAZALA

"INFLUENCIA DE LA DISPONIBILIDAD DE CARBOHIDRATOS  
EN LA SINTESIS DE MICORRIZAS in vitro DE DOS ESPECIES DE  
ORQUIDEAS MEXICANAS"

DEDICATORIA

A MIS PADRES

LUIS HERNANDEZ CABRERA

Y

MAGDALENA URIBE RODRIGUEZ

COMO UNA SATISFACCION  
A SUS ANHELOS

A MIS HERMANOS

CON CARÍÑO

AL M.V.Z. ARTURO CANCINO O.

CON TODO MI AMOR

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi sincero agradecimiento

Al M.C. Ernesto Aguirre León por su dirección y orientación en la elaboración de la presente investigación, por su amistad y valiosos consejos.

Al Dr. Harold G. Hills quien me alentó y apoyó para concluir el presente trabajo.

A Sergio Alvarez por su inapreciable ayuda en la impresión del presente trabajo.

Finalmente agradezco a todos los que de alguna forma u otra intervinieron en la realización de este trabajo.

## INDICE

|  |    |
|--|----|
| INTRODUCCION   | 1  |
| ANTECEDENTES Y OBJETIVOS   | 7  |
| Antecedentes   | 8  |
| Objetivos  | 17 |
| METODOLOGIA  | 18 |
| 1. Localización de la Infección Micorrícica en las Raíces de Orquídea  | 18 |
| 2. Aislamiento y Cultivo Axénico de los Endófitos Asociados con las Raíces de Orquídea                       | 22 |
| 3. Influencia de la Disponibilidad de Carbohidratos en la Síntesis de Micorrizas <u>in vitro</u> de Orquídea | 26 |
| RESULTADOS Y DISCUSION   | 31 |
| 1. Localización de la Infección Micorrícica en las Raíces de Orquídea  | 31 |
| 2. Aislamiento y Cultivo Axénico de los Endófitos Asociados con las Raíces de Orquídea                       | 34 |
| 3. Influencia de la Disponibilidad de Carbohidratos en la Síntesis de Micorrizas <u>in vitro</u> de Orquídea | 38 |
| CONCLUSIONES   | 54 |
| BIBLIOGRAFIA   | 57 |
| ANEXO 1  | 60 |

## INTRODUCCION

Las orquidáceas producen un vasto número de semillas diminutas, las cuales están formadas por un pequeño embrión esférico escasamente diferenciado que no presenta cotiledón ni endospermo, por lo que sus reservas alimenticias son muy limitadas y sólo permiten un desarrollo escaso del embrión. En consecuencia, todos los nutrimentos esenciales como carbohidratos deben ser suministrados al embrión en crecimiento a partir de una fuente exógena. De este hecho se deriva la importancia de los hongos micorrícicos en orquidáceas, ya que se ha comprobado que dichos hongos son los encargados de suministrar los azúcares solubles que requieren los embriones de estas plantas en las primeras etapas de su desarrollo (22), cuando aún son incapaces de sintetizarlos por sí mismos (19).

En la naturaleza todas las orquídeas son micorrícicas, ya que la germinación y el desarrollo posterior de los embriones de estas plantas sólo es posible si son infectados por un hongo micorrícico adecuado que les suministre las cantidades de nutrimentos esenciales, en especial de azúcares solubles o elementos que se lixivian fácilmente como el nitrógeno, ya que en el ambiente epífita donde se desarrollan la mayoría de estas plantas dichos elementos pueden ser muy escasos o estar sometidos a fuertes fluctuaciones.(5, 32)

Se le da el nombre de micorriza (hongo-raíz) a las estructuras formadas por la asociación de las raíces de plantas superiores con un hongo (13, 14, 17). Las condiciones necesarias para la formación de micorrizas es un problema de importancia, ya que las raíces de muchas plantas son simbióticas con un hongo en condiciones naturales (13)

Las orquidáceas presentan un tipo de micorriza endotrófica, en la cual las hifas fúngicas penetran al interior de los tejidos formando enrollamientos o

agregados hifales más o menos regulares dentro de las células de la raíz de su hospedero. Dichas estructuras son conocidas como pelotones. (3, 9, 14, 30, 31).

La mayoría de los hongos micorrícicos están restringidos a las regiones de sus plantas hospederas, y son dependientes de nutrimentos esenciales como los carbohidratos y factores de crecimiento suministrados por sus hospederas (13, 14, 17, 20, 27). A diferencia de los otros tipos de endomicorriza, los endófitos de orquidáceas son capaces de tener vida libre como saprófitos debido a su actividad celulolítica (1, 12, 22, 27). Dicha capacidad les permite degradar y hacer disponibles los carbohidratos y otras sustancias complejas que de otra manera serían inaccesibles para la orquídea, pero al mismo tiempo les permite atacar y llegar a destruir a su hospedero (1, 9, 20, 27, 28).

Aún cuando ha sido reconocida ampliamente la importancia del hongo micorrícico de orquidáceas en el suministro de azúcares solubles (2, 3, 4, 14, 22, 31, 32), falta investigar la forma como afectan ciertos factores externos; como pueden ser la luz, la temperatura, la humedad, y la concentración y calidad de los nutrimentos externos, al establecimiento de la micorriza entre la orquídea y su endófito (27, 28).

El interés en el aspecto simbiótico del cultivo de las orquidáceas a partir de semilla declinó después del descubrimiento en 1922 de un método asimbiótico para la germinación de las semillas de estas plantas, en el cual se les suministran los azúcares solubles y sales minerales indispensables. Con dicho método asimbiótico ha sido posible germinar una gran variedad de orquídeas epífitas y terrestres de interés comercial (2, 4, 31). Sin embargo, no todas las especies de orquidáceas pueden propagarse usando dicha técnica asimbiótica, y en otros casos el desarrollo es muy lento, pudiendo pasar hasta dos años antes de que las plántulas estén listas para transferirse a invernadero (8). Por otro lado, en Australia se ha encontrado que la germinación simbiótica de orquídeas terrestres difíciles de cultivar ha

resultado en un desarrollo rápido de los protocormos, obteniendo plántulas grandes que pueden ser transplantadas al invernadero en cuatro meses, siempre y cuando se proporcione el balance correcto entre el hongo y la orquídea (8).

Ya que sigue siendo importante investigar las condiciones necesarias para la síntesis de micorrizas de orquídeas in vitro, el motivo del presente trabajo fué investigar como influye la disponibilidad de un carbohidrato simple; la sacarosa, y uno complejo; el almidón en la síntesis de micorrizas de dos especies de orquídeas mexicanas bajo condiciones de cultivo ascépticas o in vitro.

## ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

### ANTECEDENTES

Por mucho tiempo se ha reconocido a los hongos como simbioses de las orquídeas, el término micorriza fué descrito por Franck (1855) para recalcar la capacidad simbiótica del hongo. Sin embargo, no fué sino hasta 1899 cuando Noel Bernard se percató del papel de la micorriza en la germinación de las semillas. En 1919 Lewis Knudson demostró que el verdadero modo de acción del hongo era transformar las moléculas de carbohidratos complejas como el almidón y celulosa en azúcares simples que eran posteriormente asimilados por las plántulas de orquídea. El éxito en la germinación simbiótica sólo fué alcanzado en 1971 como parte de un estudio exhaustivo de las micorrizas de las orquídeas Australianas hecho por Warcup en el Instituto Waite del Sur de Australia. En 1979 los logros académicos de Warcup fueron aplicados en la práctica por Clements y Ellyard del Jardín Botánico Nacional de Australia mediante un método a gran escala para el aislamiento del hongo y la germinación simbiótica de semillas de orquídeas terrestres; para lo cual se desarrollaron técnicas estériles y semiestériles para trasplantar a invernadero (sacar del frasco) las plantulas. Recientemente en Francia se ha tenido éxito en la germinación simbiótica de géneros Europeos aún cuando se han usado aislados fúngicos obtenidos de especies Australianas (18). Sin embargo, el aspecto simbiótico de las especies mexicanas ha sido poco estudiado.

Existen dos tipos de hongos que forman micorrizas con las orquídeas. El primero corresponde a Basidiomicetos como Armillaria mellea y especies de Fomes, Xerotus, Corticium, y Marasmius, todos son organismos bien conocidos que desdoblan la lignina y la celulosa de la madera y la hojarazca, los cuales están asociados especialmente con saprófitos tropicales. El segundo tipo es un grupo de

hongos imperfectos con hifas septadas y en la mayoría de los casos con afinidades a los Basidiomicetos, todos en conjunto constituyen la forma-género Rhizoctonia, han sido aislados de muchos tipos de orquídeas, principalmente de las raíces de orquídeas con clorofila, y se sabe que muchos de ellos estimulan el crecimiento y diferenciación de las plántulas.. La mayoría de este tipo de hongos también son capaces de desdoblar carbohidratos insolubles, y en los casos en que se ha logrado fructificar sus cepas en cultivo aséptico, los carpóforos siempre corresponden a Basidiomicetos como Corticium, Ceratobasidium, Sebacina, y Tulasnella (1, 8, 13, 20, 22).

Todos los endófitos de orquídeas han demostrado ser capaces de utilizar en su nutrición una amplia variedad de substratos de carbono como azúcares simples, almidón, celulosa, y en algunos casos lignina (2, 8, 20, 22).

El grado en el cual el hongo ayuda en la nutrición de las orquídeas verdes epífitas no se conoce totalmente. Si bien no hay duda de que dichas plantas necesitan de la simbiosis fúngica para la nutrición del carbono en los primeros estadios de su desarrollo, se ha comprobado que este requerimiento puede variar a lo largo de la vida de la planta (2, 4), y de acuerdo con la especie de que se trate (19).

Las pruebas de germinación de las semillas en presencia de los aislados fúngicos han sido consideradas tradicionalmente como el único método confiable para comprobar la efectividad de los endófitos, debido en gran parte a lo poco que se conoce sobre las relaciones que estos hongos puedan tener con la planta adulta (20). Los aislados fúngicos obtenidos de las raíces de la planta adulta que no son capaces de inducir la germinación son considerados biológicamente incompatibles con su hospedero (20). Sin embargo, las plántulas en etapas de desarrollo diferentes de la germinación pueden ser igualmente utilizadas para evaluar la efectividad de la micorriza, ya que es razonable suponer que las plántulas micorrizadas crecerán en mayor proporción que las plántulas no micorrizadas,

como resultado de la transferencia neta de carbohidratos y de otros nutrimentos desde las hifas fúngicas hasta las plántulas (22).

La relación micorrícica entre el endófito y su hospedero en micorrizas de orquidáceas se trata de un delicado balance entre ambos simbioses y su medio (2, 9, 22, 32). Es probable que al igual que en las endomicorrizas de tipo Vesículo-Arbuscular los niveles de infección micorrícica disminuyan con el incremento de fósforo y nitrógeno en el medio, con los niveles de humedad altos, las bajas temperaturas, intensidades luminosas bajas y longitudes de día cortos (14). En trabajos en los que se ha sintetizado micorrizas de orquídeas *in vitro* se ha encontrado que la concentración de nutrimentos debe ser baja, ya que al parecer existe una relación directa entre este parámetro y la capacidad del hongo para atacar y destruir a su hospedero. Se ha reportado que la celulosa en una concentración del 5% favorece el establecimiento de la micorriza, mejor aún que se la glucosa estuviera presente en el medio (11, 22). Otro factor que influye en el establecimiento de una simbiosis ventajosa para la orquídea es la agresividad del endófito; la mayoría de las veces la orquídea sólo presenta una buena germinación y crecimiento cuando es infectada por hongos poco agresivos, de crecimiento lento, que hayan sido aislados de plantas emparentadas o de la misma especie (1, 8, 20, 22).

Como se ha dicho, los carbohidratos son uno de los principales requerimientos para la germinación y desarrollo de las semillas de orquídea, por lo que no resulta difícil suponer que la disponibilidad de estos compuestos en el medio de cultivo influya en la síntesis de la micorriza *in vitro* de estas plantas. Este fué el motivo de que en el presente trabajo se valorara la influencia de la disponibilidad de dos fuentes de carbohidratos en la formación de micorrizas en condiciones asépticas, para lo cual se eligieron los siguientes compuestos: la

sacarosa, un disacárido soluble que puede ser asimilado fácilmente por las plántulas de orquídea; y el almidón, un polisacárido que no puede ser utilizado por las plántulas, ya que las membranas celulares de la orquídea son impermeables a dicho polisacárido (2, 4).

## OBJETIVOS

- I. Determinar la localización de la infección micorrícica a lo largo de las raíces de plantas adultas de Cuitlauzinia pendula y Encyclia meliosma.
  
- II. Aislar y cultivar axénicamente los hongos micorrícicos asociados con las raíces de las plantas adultas de Cuitlauzinia pendula y Encyclia meliosma.
  
- III. Evaluar si la disponibilidad de sacarosa o almidón en el medio de cultivo influye en la síntesis de micorrizas in vitro entre las plántulas de Cuitlauzinia pendula y Encyclia meliosma y sus respectivos endófitos asociados con las plantas adultas.

## METODOLOGIA

### I. LOCALIZACION DE LA INFECCION MICORRICICA EN LAS RAICES DE DOS ESPECIES DE ORQUIDEAS MEXICANAS.

Para detectar el sitio de mayor infección micorrízica en las raíces de las plantas adultas de Cuitlauzinia pendula y de Encyclia meliosma se obtuvieron a principios de diciembre de 1986 tres ejemplares de cada una de las especies antes mencionadas, procurando que el sistema radicular fuera lo más completo posible, y que todos los ejemplares procedieran de recolecciones recientes.

Los ejemplares de C. pendula fueron donados por el Ing. Sandro Cusi, procedentes de una localidad próxima a Valle de Bravo; los ejemplares de E. meliosma se recolectaron en una salida al campo dirigida por el M. en C. Ernesto Aguirre León, en la meseta volcánica adyacente a la presa de Ixtapantongo, Edo. de México (10).

Una vez obtenidos los ejemplares de ambas especies se procedió a lavarlos individualmente con agua corriente para eliminar las raíces dañadas o muertas, las partículas de corteza, y materia orgánica adherida a las raíces. Se seleccionaron al azar 30 raíces de apariencia saludable por cada especie de orquídea, después de haberlas separado de la planta mediante un corte transversal en la zona de unión con los seudobulbos. Las raíces seleccionadas se lavaron nuevamente con agua corriente, y se guardaron en refrigeración envueltas en papel secante húmedo durante toda una noche.

Al día siguiente se continuaron los trabajos en una campana de flujo laminar bajo condiciones asépticas para evitar el riesgo de contaminación. De cada raíz se seleccionaron tres fragmentos de tejido de 1.0 cm., uno procedente de la región apical, otro de la región central, y por último uno procedente de la región de unión al pseudobulbo, conservándolos por separado en un recipiente con agua destilada estéril mientras se terminaban de realizar todos los cortes. Inmediatamente después se procedió a desinfectar superficialmente los fragmentos de tejido sumergiéndolos durante 3 minutos en una solución saturada de hipoclorito de calcio y al final se lavaron con agua destilada estéril para eliminar los residuos de cloro (15). Una vez desinfectados los fragmentos de raíz, se procedió a realizar varios cortes transversales por cada fragmento, utilizando una navaja delgada, hasta obtener un corte lo suficientemente delgado para ser observado en el microscopio óptico (objetivo 10x) y detectar la presencia o ausencia de los pelotones o enrollamientos intracelulares de hifas fúngicas en el interior de las células de la raíz, característicos de la micorriza en orquídeas (Vease la Fig. No. 1). No se utilizó ninguna tinción para hacer las observaciones ya que en ensayos previos habíamos comprobado que los pelotones eran fáciles de detectar en cortes en fresco, y por otro lado sólo teníamos un número limitado de raíces por lo que utilizamos los mismos cortes de las observaciones para el aislamiento del endófito, en consecuencia no era conveniente usar ningún fijador o colorante. En los cortes histológicos de las raíces de orquídea donde se había detectado la presencia de pelotones se conservaron por separado en un recipiente con agua destilada estéril para ser utilizados posteriormente en la disección y aislamiento del endófito.

## II. AISLAMIENTO Y CULTIVO AXENICO DE LOS ENDOFITOS ASOCIADOS CON LAS RAICES DE DOS ESPECIES DE ORQUIDEAS MEXICANAS.

Para aislar y cultivar axénicamente los hongos micorrícicos asociados con las plantas adultas de C. pendula y de E. meliosma se utilizaron como fuente del endófito los cortes de tejido de raíz en los que ya se había comprobado la presencia de pelotones (Ver metodología I).

El aislamiento se llevó a cabo en una campana de flujo laminar para evitar el riesgo de contaminación, siguiendo una técnica similar a la reportada por Ramsay, et al. (1986) (20). Los cortes histológicos se desinfectaron superficialmente sumergiéndolos durante 30 seg. en una solución saturada de hipoclorito de calcio, enjuagándolos con agua destilada estéril para eliminar los residuos de cloro. Posteriormente se procedió a disectar la zona del corte con mayor número de pelotones, que invariablemente se encontraba en el punto donde las raíces se unen al sustrato, por lo que se eliminó el velamen, el estele, y una buena parte de parénquima del corte realizando cortes tangenciales con una navaja delgada (Ver Fig. No. 2). El pequeño fragmento de tejido del corte que contenía los pelotones se inoculó en recipientes con medio de cultivo de Merlin-Norkans (16) previamente esterilizado (Ver Anexo 1.1), se eligió este medio para el aislamiento de los endófitos debido a que se ha reportado (20) que algunos endófitos de orquidáceas son difíciles de cultivar y no sobreviven en medios menos enriquecidos como el de Papa-Dextrosa-Agar. Los recipientes inoculados se colocaron en condiciones de laboratorio y se dejaron crecer; después de 5 a 10 días comenzaron a aparecer las primeras hifas fúngicas a partir del tejido infectado. Todos los crecimientos fúngicos que se observaron se traspasaron a frascos con medio de cultivo nuevo

tomando un pequeño fragmento de hifas marginales. Esta operación se repitió hasta obtener aislamientos puros que pudieran emplearse en la síntesis de micorrizas in vitro de las dos especies de orquídeas empleadas en el presente trabajo. Ya que ninguno de los aislados fúngicos obtenidos presentó estructuras de reproducción sexual en el tiempo que duró el presente trabajo, sólo se observará la morfología de la colonia, y algunas características de las hifas como la presencia de septos, de fíbulas, y ramificaciones cortas y engrosadas que permitieran incluirlas en la forma-género Rhizoctonia, utilizando en la observación de las hifas lactofenol de Amman para aclarar y Azul de Algodón para teñir las estructuras (3, 25, 31).

### III. INFLUENCIA DE LA DISPONIBILIDAD DE ALMIDON Y SACAROSA EN LA SINTESIS DE MICORRIZAS in vitro DOS ESPECIES DE ORQUIDEAS MEXICANAS.

Para evaluar si la disponibilidad de almidón o sacarosa en el medio de cultivo influye en la síntesis de micorrizas in vitro entre plántulas de 45 días de edad de C. pendula y de E. meliosma con sus respectivos aislados se llevó a cabo el siguiente procedimiento

A) Siembra y Desarrollo de las Semillas de Orquídea.

Semillas provenientes de cápsulas maduras de C. pendula y E. meliosma se sembraron bajo condiciones de esterilidad en el medio de cultivo de Knudson C (Ver Anexo 1.2) después de desinfectarlas superficialmente agitándolas fuertemente en una solución de hipoclorito de calcio al 10% durante 5 minutos (24). Dicha siembra se realizó con la finalidad de comprobar la viabilidad de las semillas, eliminar todas aquellas que no fueran capaces de germinar; y al mismo tiempo permitirles crecer lo suficiente para superar la etapa crítica de la germinación y alcanzar un estado de desarrollo (45 días después de la germinación) en el que las plántulas son más estables (7, 18, 22) antes de someterlas al contacto con sus aislados fúngicos correspondientes.

B) Inoculación de las Plántulas de Orquídea con sus Aislamientos Fúngicos Correspondientes.

Las plántulas de orquídea de 45 días de edad que presentaban un aspecto saludable se removieron cuidadosamente de la superficie del medio de cultivo donde se habían desarrollado (Knudson C), y se traspasaron a frascos que contenían medio de Thompson modificado para la síntesis de micorrizas (Ver Anexo 1.3) (16, 24). En dicho medio se suministraba almidón o sacarosa como fuente de carbohidratos disponible para ambos

simbiontes (21). En cada frasco se colocaron 50 plántulas sobre la superficie del agar cerca a las paredes del frasco, formando un círculo, al mismo tiempo se inoculó en el centro de la placa de agar un pequeño fragmento de los aislados fúngicos obtenidos de las raíces de la planta adulta correspondiente (Ver Metodología I y II). De esta manera todas las plántulas se encontraban aproximadamente a la misma distancia del inóculo, por lo que tenían igual probabilidad de ser infectadas al mismo tiempo.

Por cada tratamiento (aislado fúngico y fuente de carbohidratos) se realizaron tres repeticiones de las inoculaciones antes descritas, para cada una de las especies de orquídeas utilizadas en el presente trabajo. Simultáneamente se estableció un control con 3 repeticiones por cada tratamiento en el que no se inocularon los aislados fúngicos, con el fin de obtener plántulas no micorrizadas que crecieran bajo las mismas condiciones que las plántulas en las que se intentaba sintetizar la micorriza y nos sirvieran como punto de comparación para evaluar la eficacia de la micorriza. Los frascos de cada tratamiento junto con su control se dejaron crecer por un lapso de 60 días, bajo una fuente luminosa de 2,500 lux, con un fotoperíodo de 12 horas, y una temperatura mínima de 18°C y máxima de 29°C.

C) Evaluación de la Influencia de la Fuente de Carbohidratos en la Eficacia de la Micorriza Sintetizada in vitro

La influencia de la fuente de carbohidratos en la eficacia de la micorriza se evaluó en base a la comparación del crecimiento en diámetro y longitud de las plántulas bajo cada tratamiento tomando como referencia el

crecimiento obtenido en el tratamiento control, al final de los 60 días de cultivo. Todos los frascos se abrieron y se registró el crecimiento de cada plántula mediante un ocular micrométrico (Ver Tablas 4, 5, 6, y 7). Los datos provenientes de dichas mediciones se sometieron a un Análisis de Varianza, y a Comparaciones Múltiples por el Método de Scheffé, para localizar las diferencias significativas entre los tratamientos.

## RESULTADOS Y DISCUSION.

### I LOCALIZACION DE LA INFECCION MICORRICICA EN LAS RAICES DE DOS ESPECIES DE ORQUIDEAS MEXICANAS.

Como se aprecia en la Tabla No.1 el porcentaje de los cortes de tejido de raíz que carecían de enrollamientos intracelulares de hifas o "pelotones" fué del 74.50% para C. pendula y del 72.20% para E. meliosma. Sin embargo, no es posible descartar la presencia de hifas individuales ya que como se ha dicho no fué posible utilizar ninguna tinción en el momento de realizar las observaciones, por lo que no se podría asegurar la ausencia total de micorriza. En la proporción restante de los cortes la micorriza sí fué claramente distinguible ya que se detectaron los "pelotones" característicos de la micorriza de orquidáceas.

Los cortes que presentaban en mayor proporción la presencia de pelotones provenían de la región central de las raíces (el 13.30% en C. pendula y el 14.40% en E. meliosma), posteriormente los cortes provenientes de la zona de unión con los pseudobulbos (el 8.90% en C. pendula y el 10.0% para E. meliosma), y finalmente los cortes provenientes de la región apical (el 3.30% en ambas especies) (Ver Tabla No. 1)

En trabajos anteriores se ha reportado que la abundancia de la infección micorrícica en determinadas regiones del sistema radicular o de los pseudobulbos es característico de cada género de orquídeas terrestres Australianas (18, 20). En el presente trabajo se encontró que la localización de la infección micorrícica es muy similar en los dos géneros de orquídeas epífitas utilizados; a pesar de que provenían de localidades diferentes y de que no se encuentran estrechamente emparentados el

uno con el otro. Esto puede ser un indicio de que la micorriza en orquídeas epífitas sigue patrones diferentes a los que hasta ahora se han encontrado para las terrestres.

Se ha encontrado que Rhizoctonia solani infecta las raíces de dos especies del género Vanilla penetrando por la región apical (1). En el presente trabajo la región apical de las raíces de C. pendula y de E.meliosma fué la que presentó menor abundancia de "pelotones", esto puede deberse a la época del año en que se recolectaron las plantas (a principios de Diciembre de 1986), ya que en esa época las raíces ya habían detenido su crecimiento vegetativo, y las condiciones climáticas adversas como las bajas temperaturas (27, 28, 29) pudieron haber limitado la proporción de infección micorrícica encontrada.

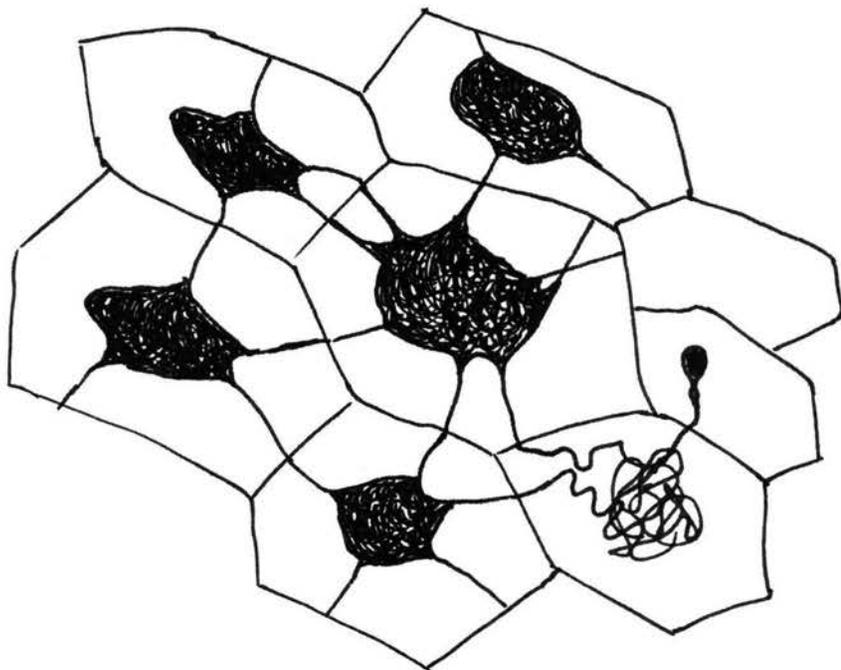


FIGURA NO. 1

Ilustra los enrollamientos intracelulares de hifas o "pelotones" característicos de la micorriza de las orquídeas presentes en cortes transversales de raíces de C. pendula y de E. meliosma.

TABLA NO. 1

Diciembre 1986

LOCALIZACION DE LA INFECCION MICORRICICA ENCONTRADA EN LAS RAICES DE PLANTAS ADULTAS DE *C. pendula* Y DE *E. meliosma*  
 LOS DATOS REPRESENTAN EL PORCENTAJE DE CORTES INFECTADOS CON PELOTONES POR SITIO DE MUESTREO.

| Sitio de Muestreo | <i>Cuitlauzinia pendula</i> |                      | <i>Encyclia meliosma</i> |                      |
|-------------------|-----------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|
|                   | Cortes Infectados           | Cortes No Infectados | Cortes Infectados        | Cortes No Infectados |
| A                 | 3.30                        | 30.0                 | 3.30                     | 30.0                 |
| B                 | 13.30                       | 20.0                 | 14.40                    | 18.90                |
| C                 | 8.90                        | 24.50                | 10.00                    | 23.30                |
| TOTAL:            | 25.50                       | 74.50                | 27.70                    | 72.20                |

Nota: A: Región Apical  
 B: Región Central  
 C: Región de Unión a los Seudobulbos

## II AISLAMIENTO Y CULTIVO AXENICO DE LOS ENDOFITOS ASOCIADOS CON LAS RAICES DE DOS ESPECIES DE ORQUIDEAS MEXICANAS.

Los hongos que se encontraron asociados con las raíces de las plantas adultas de C. pendula y de E. meliosma se muestran en la Tabla No. 2. A pesar de la abundancia de pelotones en los fragmentos de tejido de raíz utilizados como inóculo, en la mayoría de los casos no se obtuvo ningún crecimiento fúngico a partir de dicho inóculo (el 73.90% para C. pendula y el 56.00% para E. meliosma del total de inóculos). En trabajos previos se ha reportado que los endófitos de orquídeas varían en su capacidad para sobrevivir en un medio de cultivo axénico (sin el hospedero, en condiciones asépticas) (8, 18, 20), lo cual puede deberse a la carencia de vitaminas o ciertos factores indispensables para el crecimiento del endófito que normalmente son suministrados por la planta hospedero.

Sin embargo, en algunos casos fué posible aislar y cultivar axénicamente los endófitos asociados con las raíces de C. pendula, y los asociados con E. meliosma. De acuerdo a las características generales del micelio de los aislados todos pueden ser incluídos en la forma-género Rhizoctonia ya que invariablemente presentaban hifas septadas largas que se ramificaban formando segmentos cortos y engrosados típicos de los rhizoctonias de orquidáceas (3, 31). Lo anterior está de acuerdo con trabajos previos en los que se ha encontrado que los hongos más comunmente asociados con las raíces de las orquídeas verdes epífitas pertenecen a la forma-género Rhizoctonia (3, 22, 30, 31)

En la primera especie se obtuvieron dos aislados fúngicos distinguibles entre sí por sus características culturales; mientras que en la segunda especie se obtuvieron cuatro aislados fúngicos diferentes (Ver la Tabla Núm. 2).

Frecuentemente se ha reportado que en el estado adulto las raíces de orquídeas pueden presentar más de un endófito asociado (2, 20, 32), lo anterior está de acuerdo con los resultados del presente trabajo, ya que en ambas especies de orquídeas se encontró más de un hongo asociado con sus raíces. Los aislados obtenidos más frecuentemente en el presente trabajo fueron C3 (13.0%) en C. pendula y E2a (24.0%) en E. meliosma. Ver la Tabla No. 3.

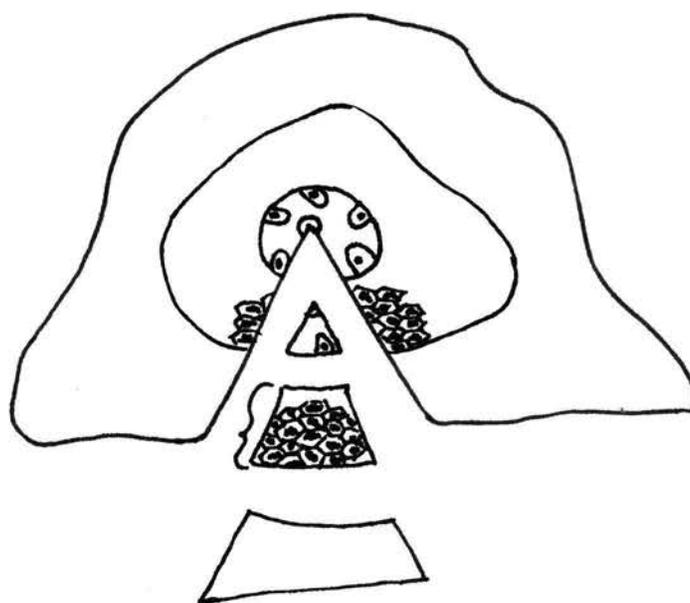


FIGURA NO. 2

Ilustra la disección de los fragmentos de tejido de raíz que contenían pelotones.

TABLA NO. 2

CARACTERISTICAS DE LOS ENDOFITOS DE C.pendula y E.meliosma  
SOBRE EL MEDIO DE CULTIVO DE MERLIN-NORKANS (Ver Anexo 1)

| Aislado | Hospedero  | Características de la Colonia |                       | Características de las Hifas |    |    |
|---------|------------|-------------------------------|-----------------------|------------------------------|----|----|
|         |            | Textura                       | Color                 | a*                           | b* | c* |
| C2      | C.pendula  | Algodonosa                    | Blanco-<br>Café claro | sí                           | no | sí |
| C3      | C.pendula  | Algodonosa                    | Verde Obsc.-<br>Negro | sí                           | no | sí |
| E1      | E.meliosma | Dura                          | Verde Obsc.-<br>Negro | sí                           | no | sí |
| E2a     | E.meliosma | Algodonosa                    | Verde Obsc.-<br>Negro | sí                           | sí | sí |
| E2b     | E.meliosma | Algodonosa                    | Café claro            | sí                           | no | sí |
| E3      | E.meliosma | Dura                          | Rosa Obsc.            | sí                           | no | sí |

a\* Presencia de Septos

b\* Presencia de Fíbulas

c\* Presencia de Remificaciones Cortas y Engrosadas

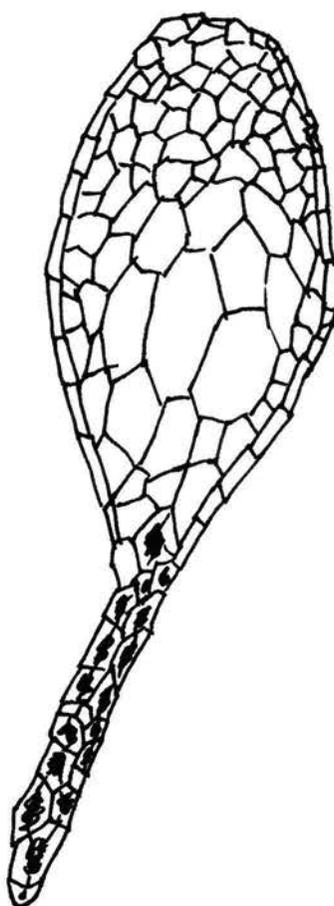


FIGURA NUM. 3

Ilustra los Protocormos de Orquídea Infeccionados con Pelotones.

TABLA NO. 3

---

 CRECIMIENTOS OBTENIDOS A PARTIR DE LOS  
 FRAGMENTOS DE RAICES (Ver pag.11)
 

---

| Crecimientos                    | % Inoculaciones |            |
|---------------------------------|-----------------|------------|
|                                 | C.pendula       | E.meliosma |
| <hr/>                           |                 |            |
| Colonias Fúngicas:              |                 |            |
| C2                              | 4.4             |            |
| C3                              | 13.0            |            |
| E1                              |                 | 4.0        |
| E2a                             |                 | 24.0       |
| E2b                             |                 | 8.0        |
| E3                              |                 | 4.0        |
| Colonias Bacterianas:           | 8.7             | 4.0        |
| Sin Ningún Tipo de<br>Colonias: | 73.9            | 56.0       |
|                                 | <hr/>           | <hr/>      |
|                                 | 100.0           | 100.0      |

---

Nota: Se inocularon 23 fragmentos de  
tejido para C.pendula y 25 para  
E.meliosma

### III. INFLUENCIA DE LA DISPONIBILIDAD DE ALMIDON O SACAROSA EN LA SINTESIS DE MICORRIZAS in vitro DE DOS ESPECIES DE ORQUIDEAS MEXICANAS.

Después de 60 días de crecimiento junto con sus plántulas hospedero en el medio de Thompson modificado para la síntesis de micorrizas (Ver Anexo 1), a los diferentes aislados fúngicos se les dió el nombre de "compatibles" (C3 y E2a) cuando no atacaban a su hospedero permitiendole al menos un crecimiento en diámetro y longitud similar al control; "agresivos" cuando una vez que entraban en contacto con la plántula de su hospedero la parasitaban hasta destruirla por completo (C2, E1, y E2b); y por último se les dió el nombre de "susceptibles" (E3) cuando eran incapaces de crecer lo suficiente y no entraban en contacto con las plántulas de su hospedero, ya que detenían su crecimiento a la semana de haberlos inoculado (1, 27, 28). Ver Tabla No. 4.

TABLA NO. 4

---

COMPATIBILIDAD DE LOS AISLADOS FUNGICOS  
(Ver pag. 26)

---

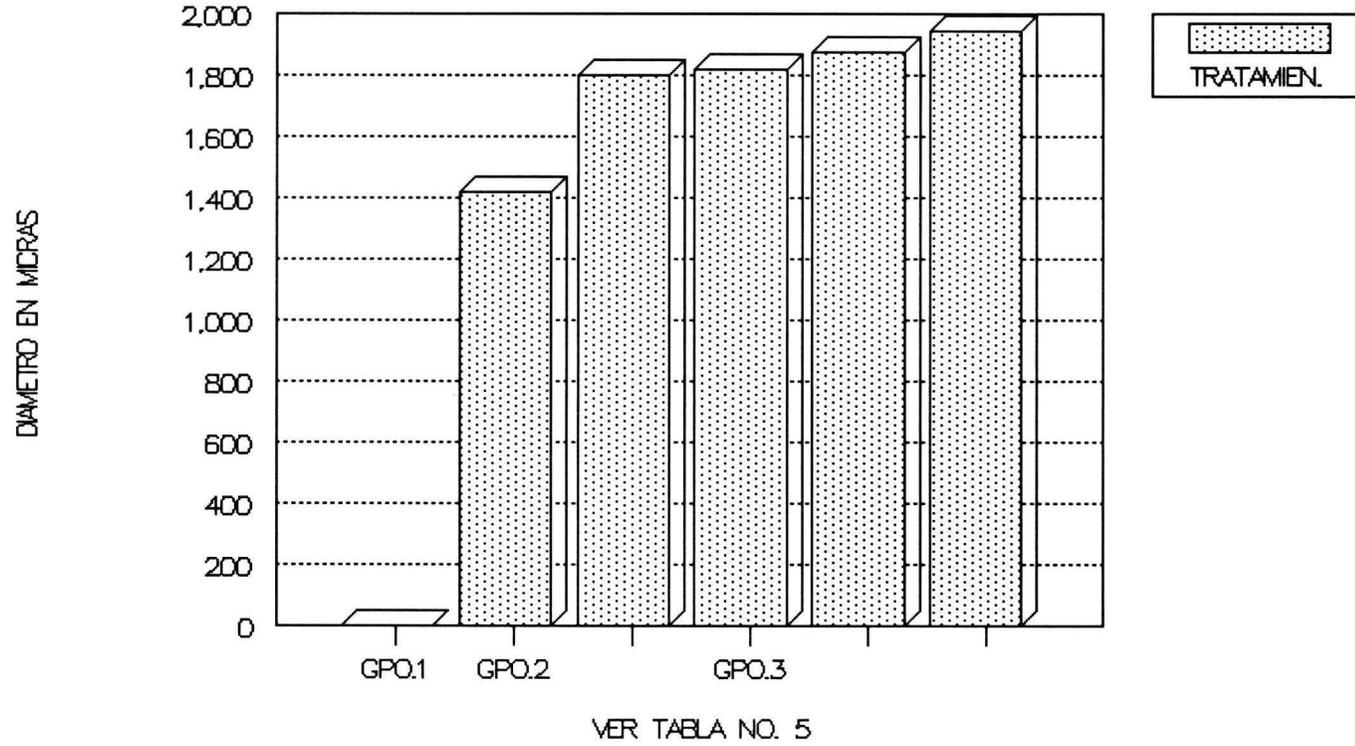
| Aislado | Hospedero   | Compatibilidad |
|---------|-------------|----------------|
| C2      | C. pendula  | 'agresivo'     |
| C3      | C. pendula  | 'compatible'   |
| E1      | E. meliosma | 'agresivo'     |
| E2a     | E. meliosma | 'compatible'   |
| E2b     | E. meliosma | 'agresivo'     |
| E3      | E. meliosma | 'susceptible'  |

---

Bajo las condiciones de cultivo establecidas durante el experimento, ninguno de los aislados fúngicos de las dos especies de orquídeas mexicanas utilizadas en el presente trabajo fué capaz de estimular el crecimiento en diámetro o en longitud de las plántulas de su hospedero correspondiente inoculadas a los 45 días de edad; independientemente de la fuente de carbohidratos (almidón o sacarosa) disponible para ambos simbiontes en el medio de cultivo; ya que el máximo crecimiento en diámetro y longitud observado cuando los aislados fúngicos "compatibles" (C3 y E2a) estaban presentes, no fué significativamente mayor que el crecimiento observado en el tratamiento control con plántulas no inoculadas. Ver Tablas Núms. 5 a 8 y Gráficas Núms. 1 a 4).

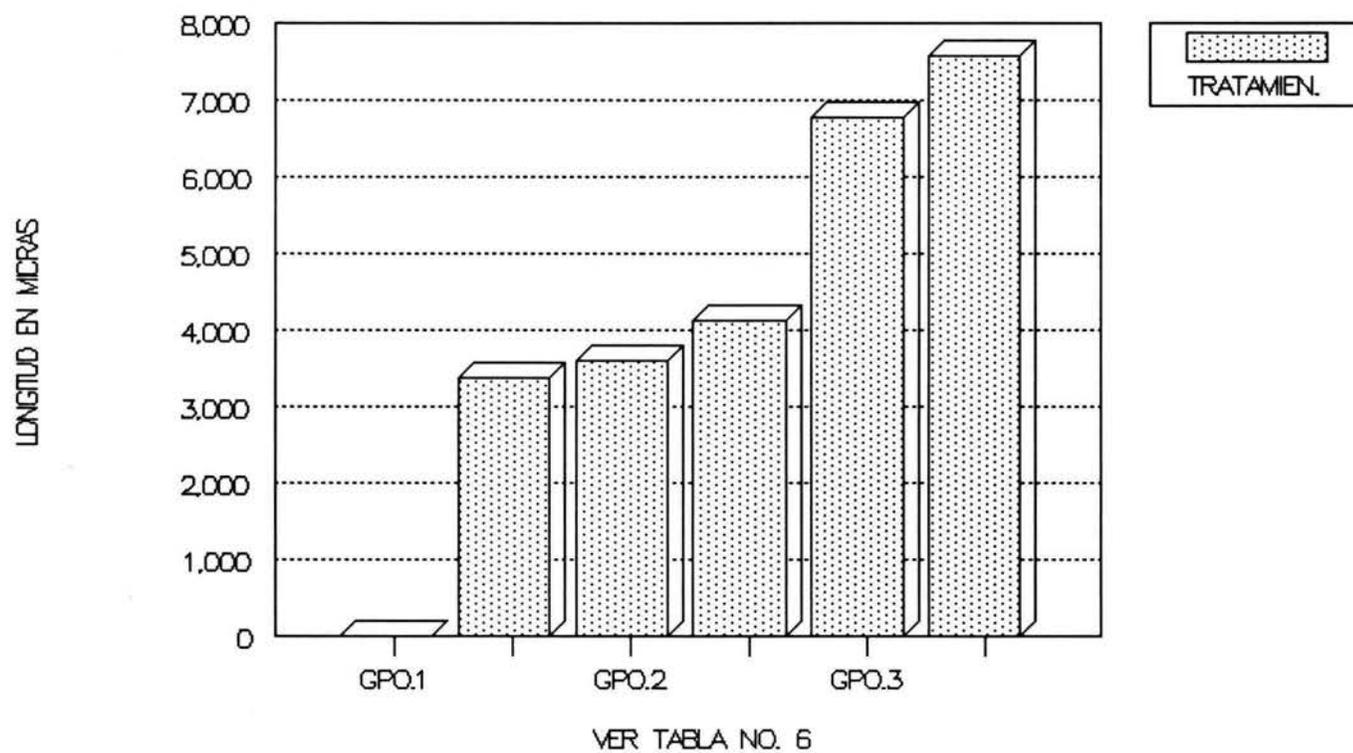
| TABLA NO. 5   |       |            |       |         |       |               |       |            |       |         |       |
|---|-------|------------|-------|---------|-------|---------------|-------|------------|-------|---------|-------|
| DIAMETRO (um) DE LAS PLANTULAS DE <i>C.pendula</i> DESPUES DE 60 DIAS DE CULTIVO CON LOS AISLADOS C2 Y C3 BAJO DOS FUENTES DE CARBOHIDRATOS |       |            |       |         |       |               |       |            |       |         |       |
| S A C A R O S A   |       |            |       |         |       | A L M I D O N |       |            |       |         |       |
| AISLADO C2  |       | AISLADO C3 |       | CONTROL |       | AISLADO C2    |       | AISLADO C3 |       | CONTROL |       |
| DIAM.   | FREC. | DIAM.      | FREC. | DIAM.   | FREC. | DIAM.         | FREC. | DIAM.      | FREC. | DIAM.   | FREC. |
| * 0   | 9     | 1050       | 1     | 1500    | 4     | * 0           | 50    | 1200       | 2     | 1050    | 1     |
| 1050  | 1     | 1350       | 1     | 1650    | 4     |               |       | 1350       | 3     | 1200    | 1     |
| 1200  | 1     | 1500       | 3     | 1710    | 2     |               |       | 1500       | 6     | 1350    | 3     |
| 1350  | 2     | 1590       | 1     | 1800    | 11    |               |       | 1650       | 9     | 1500    | 6     |
| 1410  | 1     | 1650       | 1     | 1860    | 1     |               |       | 1800       | 7     | 1590    | 1     |
| 1440  | 1     | 1800       | 17    | 1890    | 1     |               |       | 1950       | 10    | 1650    | 9     |
| 1500  | 4     | 1890       | 1     | 1950    | 12    |               |       | 2100       | 7     | 1800    | 7     |
| 1590  | 1     | 1950       | 14    | 2040    | 3     |               |       | 2190       | 1     | 1860    | 1     |
| 1650  | 5     | 2100       | 7     | 2100    | 6     |               |       | 2250       | 2     | 1950    | 9     |
| 1680  | 1     | 2250       | 3     | 2250    | 1     |               |       | 2400       | 3     | 2040    | 1     |
| 1710  | 2     | 2400       | 1     | 2400    | 1     |               |       |            |       | 2100    | 7     |
| 1740  | 1     |            |       | 2550    | 1     |               |       |            |       | 2250    | 2     |
| 1800  | 8     |            |       | 2700    | 2     |               |       |            |       | 2400    | 1     |
| 1860  | 1     |            |       | 3000    | 1     |               |       |            |       | 2550    | 1     |
| 1890  | 2     |            |       |         |       |               |       |            |       |         |       |
| 1950  | 5     |            |       |         |       |               |       |            |       |         |       |
| 1980  | 1     |            |       |         |       |               |       |            |       |         |       |
| 2100  | 3     |            |       |         |       |               |       |            |       |         |       |
| 2400  | 1     |            |       |         |       |               |       |            |       |         |       |
| SUMATORIAS  |       |            |       |         |       |               |       |            |       |         |       |
| 70950   | 50    | 93780      | 50    | 97290   | 50    | 0             | 50    | 90990      | 50    | 89940   | 50    |
| MEDIAS  |       |            |       |         |       |               |       |            |       |         |       |
| 1419  |       | 1875.6     |       | 1945.8  |       | 0             |       | 1819.8     |       | 1798.8  |       |
| NOTA: CADA DATO REPRESENTA EL PROMEDIO DE TRES MEDICIONES   |       |            |       |         |       |               |       |            |       |         |       |
| * 0: PLANTULAS DESTRUIDAS POR EL AISLADO A LA SEMANA DE INOCULADAS  |       |            |       |         |       |               |       |            |       |         |       |

# GRAFICA 1



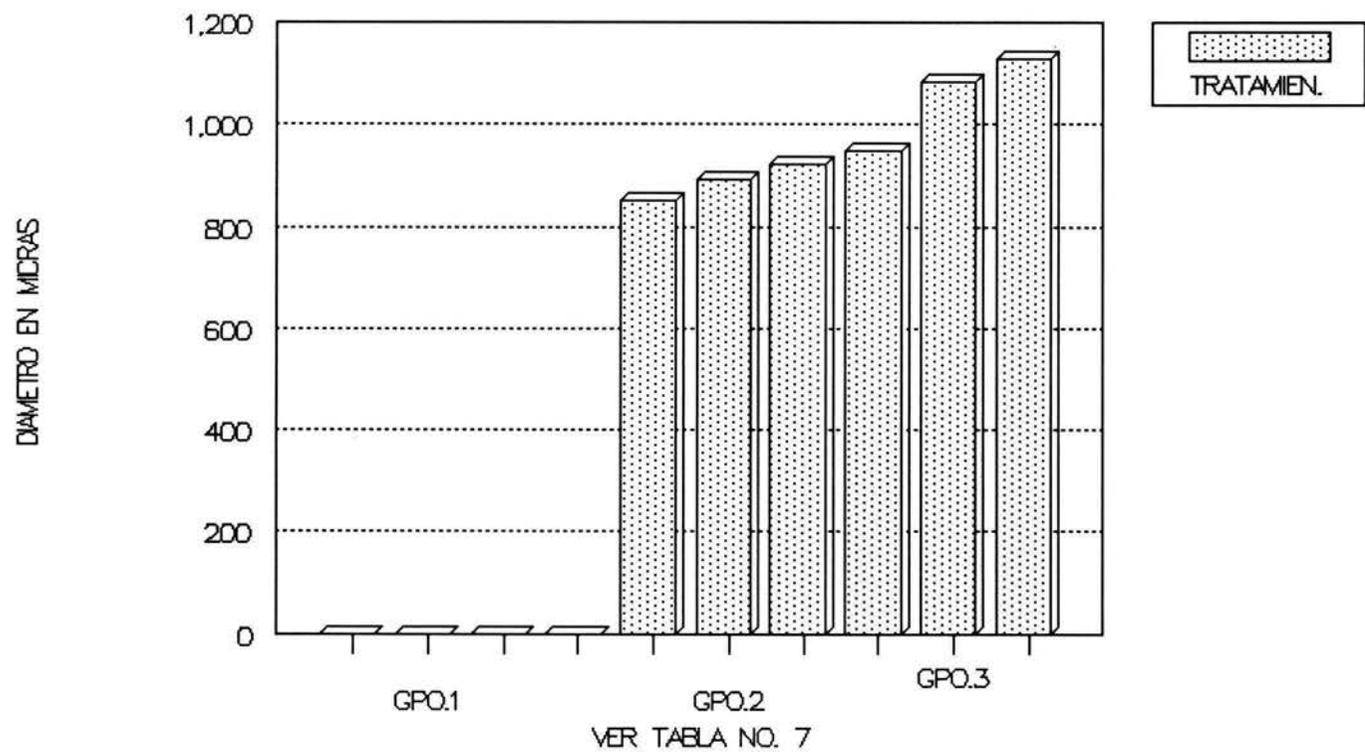
| TABLA NO. 6  |       |            |       |          |       |               |       |            |       |          |       |
|--|-------|------------|-------|----------|-------|---------------|-------|------------|-------|----------|-------|
| LONGITUD (um) DE LAS PLANTULAS DE <i>C. pendula</i> DESPUES DE 60 DIAS DE CULTIVO CON LOS AISLADOS C2 Y C3 BAJO DOS FUENTES DE CARBOHIDRATOS |       |            |       |          |       |               |       |            |       |          |       |
| S A C A R O S A  |       |            |       |          |       | A L M I D O N |       |            |       |          |       |
| AISLADO C2   |       | AISLADO C3 |       | CONTROL  |       | AISLADO C2    |       | AISLADO C3 |       | CONTROL  |       |
| LONGITUD   | FREC. | LONGITUD   | FREC. | LONGITUD | FREC. | LONGITUD      | FREC. | LONGITUD   | FREC. | LONGITUD | FREC. |
| * 0  | 9     | 1650       | 1     | 1050     | 1     | * 0           | 50    | 1200       | 1     | 1050     | 1     |
| 1350   | 1     | 1800       | 2     | 1350     | 1     |               |       | 1350       | 2     | 1350     | 2     |
| 1410   | 1     | 1950       | 3     | 1800     | 3     |               |       | 1500       | 2     | 1500     | 4     |
| 1650   | 1     | 2100       | 1     | 1950     | 3     |               |       | 1650       | 1     | 1650     | 5     |
| 1800   | 1     | 2250       | 1     | 2190     | 1     |               |       | 1800       | 1     | 1800     | 2     |
| 1950   | 5     | 2700       | 1     | 2250     | 1     |               |       | 1950       | 2     | 1950     | 5     |
| 2100   | 3     | 3000       | 1     | 2400     | 1     |               |       | 2100       | 5     | 2100     | 1     |
| 2400   | 2     | 3600       | 2     | 3000     | 1     |               |       | 2250       | 1     | 2250     | 6     |
| 2550   | 1     | 4350       | 1     | 4200     | 1     |               |       | 2400       | 2     | 2550     | 1     |
| 2700   | 1     | 4500       | 1     | 5100     | 1     |               |       | 2700       | 2     | 2700     | 1     |
| 3000   | 4     | 5100       | 2     | 5400     | 1     |               |       | 2850       | 1     | 2850     | 1     |
| 3090   | 1     | 5700       | 3     | 5700     | 1     |               |       | 3000       | 4     | 3000     | 2     |
| 3450   | 1     | 6000       | 1     | 5850     | 1     |               |       | 3300       | 2     | 3900     | 1     |
| 3600   | 1     | 6600       | 2     | 6000     | 1     |               |       | 3600       | 1     | 4350     | 1     |
| 3750   | 1     | 7350       | 1     | 6600     | 2     |               |       | 3900       | 1     | 4500     | 3     |
| 4500   | 1     | 7800       | 2     | 6900     | 5     |               |       | 4500       | 1     | 4800     | 1     |
| 4800   | 2     | 8400       | 3     | 7200     | 1     |               |       | 4800       | 2     | 5500     | 1     |
| 5100   | 1     | 8850       | 1     | 7800     | 2     |               |       | 5100       | 1     | 5700     | 1     |
| 5400   | 1     | 9000       | 1     | 8100     | 1     |               |       | 5400       | 1     | 6000     | 2     |
| 5550   | 1     | 9750       | 1     | 8250     | 1     |               |       | 5700       | 3     | 6450     | 1     |
| 5700   | 2     | 9900       | 1     | 8400     | 1     |               |       | 6000       | 4     | 6900     | 1     |
| 6150   | 1     | 10200      | 1     | 8550     | 1     |               |       | 6300       | 2     | 7200     | 2     |
| 6450   | 1     | 10500      | 5     | 8700     | 1     |               |       | 6900       | 2     | 7500     | 2     |
| 6600   | 1     | 10650      | 1     | 9000     | 5     |               |       | 7200       | 2     | 8100     | 1     |
| 6750   | 1     | 10800      | 2     | 9600     | 4     |               |       | 7500       | 2     | 8700     | 1     |
| 6900   | 1     | 11100      | 2     | 9900     | 2     |               |       | 9000       | 1     | 9000     | 1     |
| 7650   | 1     | 11400      | 2     | 10200    | 2     |               |       | 9600       | 1     |          |       |
| 10350  | 1     | 12450      | 1     | 10500    | 1     |               |       |            |       |          |       |
|  |       | 13500      | 1     | 10800    | 1     |               |       |            |       |          |       |
|  |       | 14100      | 1     | 11700    | 1     |               |       |            |       |          |       |
|  |       | 14550      | 1     | 13500    | 1     |               |       |            |       |          |       |
|  |       | 14700      | 1     |          |       |               |       |            |       |          |       |
| SUMATORIAS:  |       |            |       |          |       |               |       |            |       |          |       |
| 168000   | 50    | 378600     | 50    | 338340   | 50    | 0             | 50    | 206250     | 50    | 179400   | 50    |
| MEDIAS:  |       |            |       |          |       |               |       |            |       |          |       |
| 3360   |       | 7572       |       | 6766.8   |       | 0             |       | 4125.0     |       | 3588.0   |       |
| NOTA: CADA DATO REPRESENTA EL PROMEDIO DE TRES MEDICIONES.   |       |            |       |          |       |               |       |            |       |          |       |
| * 0: PLANTULAS DESTRUIDAS POR EL AISLADO A LA SEMANA DE INOCULADAS   |       |            |       |          |       |               |       |            |       |          |       |

## GRAFICA 2



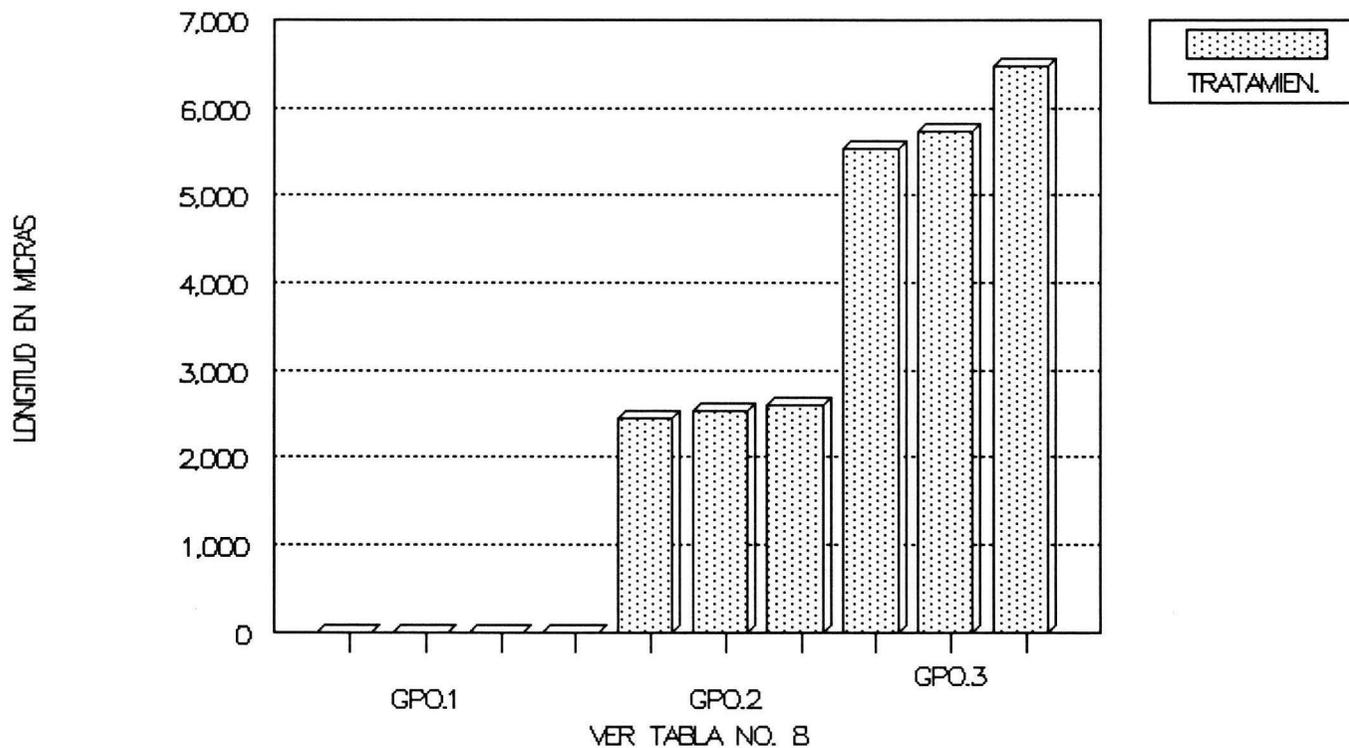
| TABLA NO. 7  |       |             |       |             |       |            |       |         |       |               |       |             |       |             |       |            |       |         |       |
|--|-------|-------------|-------|-------------|-------|------------|-------|---------|-------|---------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|------------|-------|---------|-------|
| DIAMETRO (um) DE LAS PLANTULAS DE E. meliosma DESPUES DE 60 DIAS DE CULTIVO CON LOS AISLADOS E1, E2a, E2b, Y E3 BAJO DOS FUENTES DE CARBOHIDRATOS. |       |             |       |             |       |            |       |         |       |               |       |             |       |             |       |            |       |         |       |
| S A C A R O S A  |       |             |       |             |       |            |       |         |       | A L M I D O N |       |             |       |             |       |            |       |         |       |
| AISLADO E1   |       | AISLADO E2a |       | AISLADO E2b |       | AISLADO E3 |       | CONTROL |       | AISLADO E1    |       | AISLADO E2a |       | AISLADO E2b |       | AISLADO E3 |       | CONTROL |       |
| DIAM.  | FREC. | DIAM.       | FREC. | DIAM.       | FREC. | DIAM.      | FREC. | DIAM.   | FREC. | DIAM.         | FREC. | DIAM.       | FREC. | DIAM.       | FREC. | DIAM.      | FREC. | DIAM.   | FREC. |
| * 0  | 50    | * 0         | 10    | * 0         | 50    | 600        | 2     | 600     | 2     | * 0           | 50    | * 0         | 1     | * 0         | 50    | 450        | 2     | 500     | 1     |
|  |       | 450         | 2     |             |       | 700        | 1     | 750     | 4     |               |       | 600         | 2     |             |       | 600        | 3     | 600     | 1     |
|  |       | 600         | 5     |             |       | 750        | 3     | 890     | 1     |               |       | 750         | 11    |             |       | 750        | 12    | 750     | 7     |
|  |       | 750         | 5     |             |       | 800        | 3     | 900     | 9     |               |       | 900         | 22    |             |       | 900        | 6     | 800     | 3     |
|  |       | 900         | 7     |             |       | 900        | 8     | 950     | 4     |               |       | 1050        | 11    |             |       | 1000       | 11    | 900     | 11    |
|  |       | 960         | 1     |             |       | 950        | 1     | 1050    | 9     |               |       | 1200        | 2     |             |       | 1050       | 11    | 950     | 6     |
|  |       | 1050        | 6     |             |       | 1000       | 5     | 1100    | 1     |               |       | 1350        | 1     |             |       | 1450       | 1     | 1000    | 9     |
|  |       | 1200        | 3     |             |       | 1050       | 5     | 1200    | 8     |               |       |             |       |             |       | 1600       | 4     | 1050    | 7     |
|  |       | 1350        | 3     |             |       | 1100       | 4     | 1300    | 1     |               |       |             |       |             |       |            |       | 1100    | 5     |
|  |       | 1500        | 4     |             |       | 1200       | 5     | 1350    | 4     |               |       |             |       |             |       |            |       |         |       |
|  |       | 1650        | 1     |             |       | 1300       | 1     | 1500    | 2     |               |       |             |       |             |       |            |       |         |       |
|  |       | 1710        | 1     |             |       | 1350       | 5     | 1700    | 2     |               |       |             |       |             |       |            |       |         |       |
|  |       | 1950        | 1     |             |       | 1500       | 5     | 1950    | 1     |               |       |             |       |             |       |            |       |         |       |
|  |       | 2400        | 1     |             |       | 1600       | 1     | 2100    | 2     |               |       |             |       |             |       |            |       |         |       |
|  |       |             |       |             |       | 1710       | 1     |         |       |               |       |             |       |             |       |            |       |         |       |
| SUMATORIAS:  |       |             |       |             |       |            |       |         |       |               |       |             |       |             |       |            |       |         |       |
| 0  | 50    | 42570       | 50    | 0           | 50    | 54210      | 50    | 56390   | 50    | 0             | 50    | 44550       | 50    | 0           | 50    | 47500      | 50    | 46200   | 50    |
| MEDIAS:  |       |             |       |             |       |            |       |         |       |               |       |             |       |             |       |            |       |         |       |
| 0  |       | 851.4       |       | 0           |       | 1084.2     |       | 1127.8  |       | 0             |       | 891.0       |       | 0           |       | 950.0      |       | 924.0   |       |
| NOTA: CADA DATO REPRESENTA EL PROMEDIO DE TRES MEDICIONES.   |       |             |       |             |       |            |       |         |       |               |       |             |       |             |       |            |       |         |       |
| * 0: PLANTULAS DESTRUIDAS POR EL AISLADO A LA SEMANA DE INOCULADAS.  |       |             |       |             |       |            |       |         |       |               |       |             |       |             |       |            |       |         |       |

### GRAFICA 3



| TABLA NO. 8   |             |             |             |             |             |             |               |             |             |             |             |             |             |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| LONGITUD (um) DE LAS PLANTULAS DE E. meliosma DESPUES DE 60 DIAS DE CULTIVO CON LOS AISLADOS E1, E2a, E2b, Y E3 BAJO DOS FUENTES DE CARBOHIDRATOS |             |             |             |             |             |             |               |             |             |             |             |             |             |
| S A C A R O S A   |             |             |             |             |             |             | A L M I D O N |             |             |             |             |             |             |
| AISLADO E1  |             | AISLADO E2b |             |             | CONTROL     |             | AISLADO E2a   |             | AISLADO E3  |             |             | CONTROL     |             |
| LONG. FREC.   |             | LONG. FREC. |             | LONG. FREC. |             | LONG. FREC. |               | LONG. FREC. |             | LONG. FREC. |             | LONG. FREC. |             |
|   | AISLADO E2a |             | AISLADO E3  |             | AISLADO E1  |             | AISLADO E2b   |             | AISLADO E2b |             | CONTROL     |             | CONTROL     |
|   | LONG. FREC. |             | LONG. FREC. |             | LONG. FREC. |             | LONG. FREC.   |             | LONG. FREC. |             | LONG. FREC. |             | LONG. FREC. |
| * 0 50  | * 0 10      | * 0 50      | 1000 1      | 950 1       | * 0 50      | * 0 1       | * 0 50        | 600 3       | 800 1       |             |             |             |             |
|   | 2400 1      |             | 1500 2      | 2150 1      |             | 750 2       |               | 900 2       | 900 1       |             |             |             |             |
|   | 3000 2      |             | 2000 2      | 2700 1      |             | 900 1       |               | 1000 2      | 950 1       |             |             |             |             |
|   | 3900 2      |             | 2100 1      | 2900 1      |             | 1200 1      |               | 1050 2      | 1000 2      |             |             |             |             |
|   | 4050 1      |             | 2900 1      | 3100 1      |             | 1350 3      |               | 1200 1      | 1200 2      |             |             |             |             |
|   | 4500 2      |             | 2950 1      | 3500 1      |             | 1500 2      |               | 1900 2      | 1350 4      |             |             |             |             |
|   | 4800 2      |             | 3000 2      | 3950 2      |             | 1650 3      |               | 2000 2      | 1500 3      |             |             |             |             |
|   | 5100 1      |             | 3100 1      | 4000 3      |             | 1800 2      |               | 2050 4      | 1900 3      |             |             |             |             |
|   | 5400 1      |             | 3800 1      | 4500 2      |             | 1950 6      |               | 2100 3      | 1950 2      |             |             |             |             |
|   | 5700 1      |             | 3900 1      | 4700 1      |             | 2100 6      |               | 2200 1      | 2000 2      |             |             |             |             |
|   | 6000 4      |             | 4050 2      | 4800 2      |             | 2250 2      |               | 2400 2      | 2100 1      |             |             |             |             |
|   | 6300 1      |             | 4200 2      | 4900 1      |             | 2400 4      |               | 2500 1      | 2200 2      |             |             |             |             |
|   | 6600 1      |             | 4800 3      | 5000 2      |             | 2550 1      |               | 2600 1      | 2500 3      |             |             |             |             |
|   | 6900 2      |             | 4900 1      | 5500 1      |             | 2700 4      |               | 2800 3      | 2700 3      |             |             |             |             |
|   | 7200 2      |             | 5000 2      | 5900 2      |             | 2850 2      |               | 2900 2      | 2900 3      |             |             |             |             |
|   | 7500 1      |             | 5100 2      | 6000 3      |             | 3000 2      |               | 3000 2      | 2950 2      |             |             |             |             |
|   | 7800 3      |             | 5500 2      | 6500 3      |             | 3150 1      |               | 3100 5      | 3000 3      |             |             |             |             |
|   | 8100 1      |             | 6000 3      | 6800 2      |             | 3300 1      |               | 3200 2      | 3100 2      |             |             |             |             |
|   | 8700 1      |             | 6100 1      | 7200 3      |             | 4200 1      |               | 3500 2      | 3500 3      |             |             |             |             |
|   | 9000 5      |             | 6500 1      | 7500 3      |             | 4800 1      |               | 3900 2      | 4100 2      |             |             |             |             |
|   | 9600 1      |             | 6800 1      | 8000 2      |             | 5400 1      |               | 4000 3      | 4300 1      |             |             |             |             |
|   | 9900 1      |             | 6900 1      | 8100 2      |             | 6000 2      |               | 4100 1      | 6000 2      |             |             |             |             |
|   | 10200 1     |             | 7100 2      | 9000 2      |             | 6450 1      |               | 4800 1      | 6100 1      |             |             |             |             |
|   | 10500 1     |             | 7200 1      | 9200 1      |             |             |               | 5100 1      | 6200 1      |             |             |             |             |
|   | 11400 1     |             | 7300 1      | 9300 1      |             |             |               |             |             |             |             |             |             |
|   | 12000 1     |             | 7900 2      | 10000 2     |             |             |               |             |             |             |             |             |             |
|   |             |             | 8100 3      | 11100 1     |             |             |               |             |             |             |             |             |             |
|   |             |             | 9000 1      | 12600 1     |             |             |               |             |             |             |             |             |             |
|   |             |             | 9200 1      | 12800 1     |             |             |               |             |             |             |             |             |             |
|   |             |             | 10000 2     | 13100 1     |             |             |               |             |             |             |             |             |             |
|   |             |             | 11500 1     |             |             |             |               |             |             |             |             |             |             |
|   |             |             | 11800 2     |             |             |             |               |             |             |             |             |             |             |
| SUMATORIAS:   |             |             |             |             |             |             |               |             |             |             |             |             |             |
| 0 50  | 276450 50   | 0 50        | 286150 50   | 324200 50   | 0 50        | 121950 50   | 0 50          | 126200 50   | 129750 50   |             |             |             |             |
| MEDIAS:   |             |             |             |             |             |             |               |             |             |             |             |             |             |
| 0   | 5529        | 0           | 5723        | 6484        | 0           | 2439        | 0             | 2524        | 2595        |             |             |             |             |
| NOTA: CADA DATO REPRESENTA EL PROMEDIO DE TRES MEDICIONES.  |             |             |             |             |             |             |               |             |             |             |             |             |             |
| * 0: PLANTULAS DESTRUIDAS POR EL AISLADO A LA SEMANA DE INOCULADAS.   |             |             |             |             |             |             |               |             |             |             |             |             |             |

# GRAFICA 4



Se ha dicho que la verdadera asociación micorrícica en orquídeas sólo puede apreciarse después de seis meses de cultivo (18), por lo que tal vez en el presente trabajo se hubiera requerido de más tiempo para hacer evidente la acción del hongo, ya que si bien los aislados fúngicos "compatibles" formaron enrollamientos intracelulares de hifas o pelotones en los pelos epidérmicos y en las células del suspensor de la mayoría de las plántulas observadas al final del experimento (Ver Figura 3), no estimularon el crecimiento de las plántulas de sus hospederos correspondientes y tampoco las atacaron permitiéndoles un crecimiento similar al control. Sin embargo, los aislados fúngicos "agresivos" sí atacaron y destruyeron totalmente a sus hospederos en el transcurso de una semana. Por otro lado, para asegurar que se ha establecido una micorriza exitosa, es necesario que exista una estimulación del crecimiento de la orquídea (7, 22), lo cual no se encontró en el presente trabajo.

Se ha sugerido que los hongos presentes en las raíces de orquídea pueden variar a lo largo de la vida de la planta (3, 20, 31), por lo que la falta de estimulación del crecimiento de las plántulas observada en el presente trabajo pudiera ser una consecuencia de que no se aislara de las raíces de la planta adulta el endófito más adecuado para asociarse micorrícicamente con las plántulas de su hospedero, o bien que dicho hongo sólo se asocie con los estados juveniles de su hospedero, por lo que no sería posible encontrarlo en las raíces de las plantas adultas. El estado juvenil de las orquídeas verdes epífitas en condiciones naturales depende totalmente de su endófito para el suministro de nutrimentos mientras que el estado adulto al ser autotrófico es capaz de sintetizarlos (7), por lo que no sería difícil que los endófitos que establezcan una relación micorrícica exitosa con la planta adulta no sean los mismos que se encuentran en las plántulas. Sería deseable que en trabajos posteriores sobre la síntesis de micorrizas en orquídeas verdes epífitas *in vitro* se

aislaran los endófitos a partir de plántulas juveniles y no de la planta adulta como se hizo en el presente trabajo.

En el presente trabajo, siempre que el aislado fúngico era compatible, la presencia de sacarosa en el medio de cultivo permitió un crecimiento en longitud significativamente mayor de las plántulas de orquídea (Ver Gráficas Núms. 2 y 4). El crecimiento en diámetro de las plántulas permaneció constante independientemente de la fuente de carbohidratos disponible (Ver Gráficas Núms. 1 y 3). Como se aprecia en las Tablas Núms. 5 a 8 y en las Gráficas 1 a 4, la disponibilidad de almidón o sacarosa en el medio de cultivo por lo general no es tan determinante para el establecimiento de una relación estable entre la orquídea y el endófito como lo es la "compatibilidad" de los simbioses, ya que cuando un aislado fúngico era "compatible" casi siempre permitió un crecimiento similar al control; mientras que cuando el aislado fúngico era "agresivo" casi siempre degradaba por completo a las plántulas de orquídea, independientemente de la fuente de carbohidratos disponibles. Por otro lado, como se observa en las Gráficas Núms. 1 y 2, el tratamiento que fué completamente perjudicial para las plántulas de C. pendula fué el que suministraba almidón en el medio de cultivo cuando el aislado fúngico "agresivo" C2 estaba presente, ya que todas las plántulas fueron atacadas y degradadas por el hongo; mientras que cuando la sacarosa estaba disponible las plántulas no fueron parasitadas por dicho aislado permaneciendo saludables hasta el final del experimento. Estos resultados no confirman los reportes anteriores en los que frecuentemente se ha encontrado que los carbohidratos complejos como el almidón son más propicios para el establecimiento de una simbiosis exitosa in vitro en micorrizas de orquidáceas (1, 11, 20, 22, 27, 28), mejor aún que los carbohidratos simples como la glucosa. Esto puede deberse a que en trabajos anteriores la concentración de carbohidratos más frecuentemente utilizada es del 5%, y la concentración de agar del 10% (22); en el

presente trabajo se utilizó una concentración de carbohidratos del 10%, y la concentración de agar fué del 7% (Ver Anexo Núm. 1), por lo que el suministro de carbohidratos fué del doble de lo que normalmente se ha reportado, y la humedad del medio de cultivo fué mayor al disminuír la concentración de agar, tal vez sea necesario reducir la humedad y la concentración de carbohidratos para lograr un establecimiento exitoso de la micorriza en el que se obtenga una estimulación significativa del crecimiento de las plántulas. Como se ha dicho, la micorriza de orquidáceas es un delicado balance entre los simbioses y su medio, y factores como la disponibilidad de nutrimentos o la humedad pueden afectar el establecimiento de una simbiosis exitosa (31).

Otros factores que deben considerarse son la intensidad luminosa, el fotoperíodo, y la temperatura (21). En el presente trabajo se utilizó una fuente luminosa de 2,500 lux, con un fotoperíodo de 12 horas, y una temperatura mínima de 18°C y máxima de 29°C. Si bien a la fecha no existen trabajos en micorrizas de orquidáceas en los que se haya investigado la forma en que influyen estos factores en el establecimiento de la simbiosis in vitro, en las micorrizas de tipo Vesículo-Arbuscular (VA) se ha encontrado que las bajas temperaturas, los altos niveles de humedad, las bajas intensidades luminosas, las longitudes de día cortos, y el incremento de fósforo y nitrógeno, disminuyen los niveles de infección micorrícica (14). En consecuencia podemos decir que en el presente trabajo la intensidad luminosa, el fotoperíodo y la temperatura eran adecuadas, igualmente se cuidó que las concentraciones de nitrógeno, fósforo, y potasio fueran similares a las usadas para sintetizar in vitro micorrizas (VA). Sin embargo, no se excluye la posibilidad de que las condiciones requeridas para sintetizar micorrizas de orquidáceas sean diferentes de las requeridas por las de tipo Vesículo-Arbuscular (6, 23).

## CONCLUSIONES

1. Las plantas de Cuitlauzinia pendula y Encyclia meliosma son micorrícicas en su estado adulto.
2. En la época de recolección de los especímenes (Diciembre 1986) la localización de la infección micorrícica presenta un patrón similar en las raíces de ambas especies de orquídea.
3. Al menos algunos de los hongos asociados con las raíces de las plantas adultas de C. pendula y E. meliosma pueden ser aislados y cultivados axénicamente.
4. Las plantas adultas de C. pendula y de E. meliosma se asocian con más de una especie de endófito.
5. E. meliosma acepta un mayor número de endófitos que C. pendula, ya que fué posible aislar cuatro endófitos asociados con las raíces de la primera especie, y dos con la segunda especie, aunque también es posible que los endófitos asociados con C. pendula sean más susceptibles, y que requieran de algún factor adicional para crecer en cultivo axénico.
6. Los aislados fúngicos obtenidos de las raíces de las plantas adultas de C. pendula y de E. meliosma pertenecen a la forma-género Rhizoctonia

7. Los endófitos asociados con las raíces de las plantas adultas de C. pendula y E. meliosma no estimulan el crecimiento de las plántulas de 45 días de edad de su hospedero correspondiente de una forma significativa, independientemente de la fuente de carbohidratos presente en el medio de cultivo.
8. La presencia de sacarosa en el medio de cultivo permite un crecimiento significativamente mayor en longitud de las plántulas de orquídea, en comparación con el almidón, siempre y cuando el aislado fúngico sea compatible.
9. El crecimiento en diámetro de las plántulas de orquídea permanece constante, independientemente de la fuente de carbohidratos disponible en el medio de cultivo.

## BIBLIOGRAFIA

1. ALCONERO, R. (1969) Mycorrhizal Synthesis and Pathology of Rhizoctonia solani in Vanilla Orchid Roots. PHYTOPATHOLOGY. 59:426-430
2. ARDITTI, J. (1967b) Factors Affecting the Germination of Orchid Seeds. BOT.REW. 33(1):1-97
3. ARDITTI, J. (1982) Orchid Biology. Reviews and Perspectives, II. Cornell University Press. Ithaca, N.Y.
4. ARDITTI, J. (1984) Orchid Biology. Reviews and Perspectives, III. Cornell University Press. Ithaca, N.Y.
5. BENZING, D.H.; AND D.W. OH (1981) Vegetative Reduction in Epiphytic Bromeliaceas and Orchidaceas. BIOTROPICA. 13(2):131-140
6. BENZING, D.H. (1982) Mycorrhizal Infections of Epiphytic Orchids in Southern Florida. AMER.ORCHID.SOC.BULL. 51(6):618-622
7. BURGEFF, H. Mycorrhiza of Orchids. In. WITHNER, C. (1959). The Orchids. A Scientific Survey. Ed. Ronald Press. Co. N.Y.
8. CLEMENTS, M.A.; AND R.K. ELLYARD (1979) The Symbiotic Germination of Australian Terrestrial Orchids. AMER.ORCHID.SOC.BULL. 48(8):810-816
9. DODMAN, R.L.; K.R. BARKER; AND J.C. WALKER. (1968a) Modes of Penetration by Different Isolates of Rhizoctonia solani. PHYTOPATHOLOGY. 58:31-33
10. DRESSLER, R.L.; AND G.E. POLLARD (1974) The Genus Encyclia in México. ASOC. MEXICANA DE ORQUIDEOLOGIA. México
11. HADLEY, G. (1969) Celulosa as a Carbon Source for Orchid Mycorrhiza. NEW PHYTOL. 68:933-939
12. HADLEY, D. (1970) Nonspecificity of Symbiotic Infection in Orchid Mycorrhiza. NEW PHYTOL. 69:1015-1023
13. HARLEY, J.L. (1971) Mycorrhiza. Oxford University Press. London.
14. HARLEY, J.L.; AND S.E. SMITH (1983) Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press. London
15. HARRISON, CH. R.; Y J. ARDITTI (1970) Cultivo de la Orquídea por Semilla. ORQUIDEA. 3(290):81-90
16. INGRAM, D.S.; AND J.P. HELGESON (1980) Tissue Culture Methods for Plant Pathologists. Blackwell Scientific Publications. Oxford London
17. JACKSON, R.M. AND P.A. MASON (1984) Mycorrhiza. Studies in Biology. No. 159 Edward Arnold. London
18. KINGSLEY, D. (1987) Raising Terrestrial Orchids From Seed. Modern Orchid Growin For Pleasure and Profit. Ed. Orchid Club of South Australia Incorporated. Australia.
19. RAGHAVAN, V.; AND J.G. TORREY (1964) Inorganic Nitrogen Nutrition of the Seedlings of the Orchid Cattleya. AMER. J. OF BOTANY 51(3):264-274
20. RAMSAY, R.R.; K.W. DIXON; AND K. SIVASITHAMPARAM (1986) Patterns of Infection and Endophytes Associated with Western Australian Orchids. LINDLEYANA. 1(3):203-214

21. SCHENCK, N.C. (1982) Methods and Principles of Mycorrhizal Research. THE AMERIC. PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY. U.S.A.
22. SMITH, S.E. (1966) Physiology and Ecology of Orchid Mycorrhizal Fungy with Reference to Seedling Nutririon. NEW PHYTOL 65:488-499
23. STEPHEN, R.C.; AND K.K. FUNG (1971a) Nitrogen Requeriments of the Fungal Endophytes of Arundina chinensis. CAN. JR. BOT. 49:407-410
24. THOMPSON, P.A. (1977) Orchids From Seed. McCorquodale Printers Ltd. London.
25. TU, C.C.; AND J.W. KIMBROUGH (1978) Systematics and Phylogeny of Fungi in the Rhizoctonia Complex. BOT. GAZ. 139(4):454-466
26. WARCUP, J.H. (1971) Specificity of Mycorrhizal Association in Some Australian Terrestrial Orchis. NEW PHYTOL. 70:41-46
27. WEINHOLD, A.; T. BOWMAN; AND R. DODMAN (1969) Virulence of Rhizoctonia solani as Affected by Nutrition of the Pathogen. PHYTOPATHOLOGY. 59:1601-1605
28. WEINHOLD, A.; R. DODMAN; AND T. BOWMAN (1972) Influence of Exogenous Nutrition on Virulence of Rhizoctonia solani. PHYTOPATHOLOGY. 62:278-281
29. WENT, F.W.; AND N. STARK (1968) Mycorrhiza. BIOSCIENCE. 18(11):1035-1039
30. WILLIAMSON, B.; AND G. HADLEY (1970) Penetration and Infection of Orchid Protocorms by Thanatephorus cucumeris and Other Rhizoctonia Isolates. PHYTOPATHOLOGY. 60:1092-1096
31. WITHNER, C.L. (1959) The Orchids. A Scientific Survey. J. Willey and Sons. N.Y.
32. WITHNER, C.L. (1983) The Orchids. Scientific Studies. J. Willey and Sons. N.Y.

## ANEXO 1

## MEDIOS DE CULTIVO

## ANEXO 1.1

MEDIO DE CULTIVO DE MERLIN-NORKANS (MODIFICADO DE HAGEM) PARA CULTIVAR HONGOS MICORRICICOS (16)

| CONCEPTO  | CANTIDAD (g) |
|---|--------------|
| SULFATO DE MAGNESIO ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )      | 0.5          |
| FOSFATO DE POTASIO ( $KH_2PO_4$ )                 | 0.5          |
| CLORURO DE AMONIO ( $NH_4Cl$ )                    | 0.5          |
| CLORURO DE FIERRO SOL.1% ( $FeCl_6 \cdot 6H_2O$ ) | 0.5 cc       |
| SACAROSA  | 5.0          |
| EXTRACTO DE MALTA                                 | 5.0          |
| THIAMINA.HCl                                      | 100.0 ug     |
| AGAR-AGAR   | 10.0         |
| AGUA DESTILADA HASTA                              | 1000.0 cc    |

Nota: Ajustar el pH final a 4.42 con KOH y HCl

## ANEXO 1.2

---

 MEDIO DE CULTIVO DE KNUDSON-C PARA GERMINACION DE ORQUIDEAS  
 (15).
 

---

| CONCEPTO   | CANTIDAD (g) |
|--|--------------|
| NITRATO DE CALCIO $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 1.0          |
| SULFATO DE MAGNESIO $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$          | 0.25         |
| SULFATO DE AMONIO $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$                         | 0.50         |
| SULFATO FERROSO $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$              | 0.025        |
| SULFATO DE MANGANESO $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$         | 0.0075       |
| SACAROSA   | 20.0         |
| AGAR-AGAR  | 10.0         |
| TAPON DE FOSFATO DE POTASIO (1M pH 5.3)                                | 18.0 cc      |
| MICROELEMENTOS EN SOLUCION   | 1.0 cc       |
| AGUA DESTILADA HASTA   | 1000.0 cc    |

Nota: Para preparar el tapon de fosfatos se mezclan 97.5 cc de una solución de fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0.1 M (13.6 g disueltos hasta 1000 cc de agua destilada), con 2.5 cc de una solución 0.1 M de fosfato de potasio dibásico (17.4 g disueltos hasta 1000 cc de agua destilada)

Para preparar la solución de microelementos se disuelven en 1000 cc de agua destilada: 56 mg de ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ); 16 mg de ácido molibdico ( $\text{MoO}_3$ ); 40 mg de sulfato de cobre anhidro ( $\text{CuSO}_4$ ); y 33 mg de sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).

## ANEXO 1.3

---

MEDIO DE CULTIVO DE THOMPSON MODIFICADO PARA LA SINTESIS DE MICORRIZAS *in vitro* (16, 24).

---

| CONCEPTO   | CANTIDAD (mg) |
|--|---------------|
| NITRATO DE POTASIO KNO <sub>3</sub>  | 371.0         |
| ACIDO FOSFORICO H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>   | 0.2 cc        |
| SULFATO DE MAGNESIO MgSO <sub>4</sub>  | 73.0          |
| ACETATO DE CALCIO Ca(CH <sub>3</sub> .COO) <sub>2</sub>  | 79.0          |
| CLORURO DE MANGANESO MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O  | 2.23          |
| SULFATO DE COBRE CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O  | 0.24          |
| SULFATO DE ZINC ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O   | 0.29          |
| ACIDO BORICO H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>  | 1.86          |
| MOLIBDATO DE AMONIO (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O | 0.035         |
| SULFATO DE FIERRO FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O   | 25.0          |
| EDTA DE SODIO  | 37.0          |
| TIAMINA HCl  | 100.0         |
| ALMIDON O SACAROSA   | 10.0 g        |
| CARBON ACTIVADO  | 1.0 g         |
| AGUA DESTILADA HASTA   | 1000.0 cc     |

---

Nota: El pH final del medio se ajusta a 5.0 con KOH y HCl.