



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE GEOLOGÍA

MANEJO INTEGRAL DE ECOSISTEMAS

PROPAGACIÓN SIMBIÓTICA Y ASIMBIÓTICA *IN VITRO* Y ESTABLECIMIENTO DE PLANTAS EN CONDICIONES DE INVERNADERO DE *CUITLAUZINA PENDULA*, ESPECIE AMENAZADA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MENESES OCHOA ITZEL GEORGINA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA
INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA.
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
DR. ELOY SOLANO CAMACHO
FES-ZARAGOZA, UNAM.

MIEMBRO DE COMITÉ TUTOR INVITADO: M. EN. C. RAMIRO RÍOS GÓMEZ.
FES-ZARAGOZA, UNAM

CD. DE MÉXICO, FEBRERO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE GEOLOGÍA

MANEJO INTEGRAL DE ECOSISTEMAS

**PROPAGACIÓN SIMBIÓTICA Y ASIMBIÓTICA *IN VITRO* Y ESTABLECIMIENTO DE
PLANTAS EN CONDICIONES DE INVERNADERO DE *CUITLAUZINA PENDULA*, ESPECIE
AMENAZADA**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

MENESES OCHOA ITZEL GEORGINA

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA
INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA.
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
DR. ELOY SOLANO CAMACHO
FES-ZARAGOZA, UNAM.**

**MIEMBRO DE COMITÉ TUTOR INVITADO: M. EN. C. RAMIRO RÍOS GÓMEZ.
FES-ZARAGOZA, UNAM**

CD. DE MÉXICO, FEBRERO, 2018

Lic. Ivonne Ramirez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 06 de noviembre de 2017, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **MENESES OCHOA ITZEL GEORGINA** con número de cuenta **305103435** con la tesis titulada "**PROPAGACIÓN SIMBIÓTICA Y ASIMBIÓTICA IN VITRO Y ESTABLECIMIENTO DE PLANTAS EN CONDICIONES DE INVERNADERO DE CUITLAUZINA PENDULA, ESPECIE AMENAZADA**", realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA**:

Presidente: DR. EDUARDO ALBERTO PÉREZ GARCÍA
Vocal: DRA. ROSALVA GARCÍA SÁNCHEZ
Secretario: DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA
Suplente: DRA. EDITH GARAY SERRANO
Suplente: M. EN C. RAMIRO RÍOS GÓMEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 18 de enero de 2018.

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



Agradecimientos institucionales

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por ofrecer una de las mejores ofertas educativas y de calidad, por todo el apoyo que me brindó para continuar con mis estudios de posgrado y por tener a los mejores académicos.

Un agradecimiento a CONACYT (CVU/Becario 707849/585332) por la beca otorgada, que gracias a ella pude realizar mis estudios de posgrado.

Agradezco el financiamiento de la tesis por parte del proyecto PAPIME PE108915 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM y al proyecto Mejoramiento genético y manejo integral para el aprovechamiento sustentable de las orquídeas de México, SAGARPA. Esta tesis se desarrolló en las instalaciones de los Laboratorios Microcosmos Bioedáfico, Microscopía e Invernadero del Departamento de Edafología del Instituto de Geología de la UNAM.

Agradezco a mi Tutor Principal, la Dra. María del Pilar Ortega Larrocea del Instituto de Geología de la UNAM por todo el apoyo, las asesorías y las revisiones durante el inicio y la culminación de este trabajo. Gracias por estar siempre en la mejor disposición de brindar todo lo necesario y estar pendiente de que se cumpliera cada objetivo pese a las dificultades, gracias por acogerme en su laboratorio y por todo lo enseñado, gracias infinitas.

Un agradecimiento enorme para los miembros del Comité Tutor, incluyendo al Miembro de Comité Tutor invitado que fue clave para el estudio de la especie en el presente trabajo:

Gracias Dr. Eloy Solano Camacho de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM por todo el apoyo dado al inicio del proyecto, por el financiamiento en la recolecta del material biológico, por todas las sugerencias, aportaciones en el trabajo, por todo el tiempo invertido en la revisión de la tesis, por sus palabras de aliento. Gracias por su hospitalidad en las salidas de campo y en su herbario.

Gracias Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila del Instituto de Biología de la UNAM, por todas las sugerencias a lo largo del proyecto, por la amabilidad y por siempre estar en la mejor disposición de ayudar para la realización de esta tesis, gracias por transmitir ética, respeto y amor por los recursos naturales. Gracias por las plantas donadas *in vitro* de *Cuitlauzina pendula*.

Gracias M. en C. Ramiro Ríos Gómez de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM, por dar desde el inicio su apoyo y aliento para hacer una maestría, muchas gracias por presentarme a *Cuitlauzina pendula*. Gracias por el apoyo en campo y sobre todo por ayudarme en la recolecta de la especie en esas caminatas tan largas, gracias por el financiamiento en campo y por todas las asesorías, recomendaciones, consejos y tiempo dedicado en cada etapa de este proceso.

Agradecimientos a título personal

Un agradecimiento al Dr. Eduardo García Pérez de la Facultad de Ciencias de la UNAM por la donación de la cápsula de *Cuitlauzina pendula* que resultó de gran ayuda para continuar con este proyecto, gracias por la revisión y sugerencias en la tesis, agradezco su tiempo.

Agradezco a la Dra. Rosalva García Sánchez de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM y a la Dra. Edith Garay Serrano del Instituto de Ecología A.C., por sus sugerencias y por su tiempo en la revisión para mejorar esta tesis.

Agradezco el apoyo técnico y la amistad otorgada de la M. en C. Iris Suárez Quijada.

Agradezco todas las aportaciones, recomendaciones, sugerencias, revisión y apoyo en la realización de esta tesis al M. en C. Jorge Eduardo Ríos Carrillo, gracias por todo el tiempo invertido.

Agradezco al M. en C. Israel Muñoz Velasco en la asesoría para la realización del árbol filogenético, gracias por el tiempo invertido, por la disposición y sobre todo gracias por la amistad.

Agradezco el apoyo de la Biól. Abigail Díaz Armendáriz por el uso del microscopio Axio.Imager, Zeiss, además por la amistad y los momentos compartidos.

Agradezco a María Rodríguez del Posgrado en Ciencias Biológicas del Instituto de Geología, UNAM por la ayuda, por el tiempo, por la disposición y por la amistad.

Un agradecimiento sincero a la comunidad San Andrés Chicahuaxtla, Putla Villa de Guerrero, Oaxaca por permitir y facilitar la realización de este estudio.

Agradezco a la comunidad de Mesoncito, San Andrés Chicahuaxtla, Putla Villa de Guerrero, Oaxaca por la ayuda en la recolecta del material biológico, gracias por el apoyo para la realización de esta tesis.

Agradezco a Marco Antonio Santiago González y a Tomas Santiago Rosas de la comunidad Mesoncito, San Andrés Chicahuaxtla, Putla Villa de Guerrero, Oaxaca por ser las guías en campo para la recolecta del material biológico.

Agradezco por acompañarme en la larga y cansada camita en campo a los Biólogos Brenda Arredondo, Leslie Tagle y Christopher García.

Agradezco a Raquel Eugenia Acosta Hernández y a Sofía Jiménez Mendoza por su amistad y por la ayuda en el laboratorio que me brindaron cuando la necesite.

Agradezco a la vida por lo agríndice que puede resultar, pero siempre maravillosa, gracias por permitirme estar y por darme una nueva satisfacción.

Meneses Ochoa Itzel Georgina

Gracias a mi papá José Juan Meneses Morales por ser el principal motivo para estudiar una Maestría, gracias por tu amor, por tu cariño, por tu fuerza. Gracias por acompañarme siempre, nunca me sueltes, llevo tú amor conmigo.

Gracias a mi mamá María Cristina Ochoa Cortes por estar, por ser mi alegría, mi amor, por ser tan fuerte y representar tantas cosas para mí. Gracias por todo lo que me das, por lo que me enseñas, por esa fortaleza y por todo ese amor que me bridas día a día.

Agradezco a mis hermanos David Ricardo Meneses Ochoa, Ana Obdulia Meneses Ochoa y Brenda Jaqueline Meneses Ochoa, porque cada logro también se los debo a ustedes, gracias por estar.

Agradezco a Ringo por todas las alegrías envueltas en travesuras que me das, agradezco a mi Snoopy por llegar a mi vida, por corresponderme y por todo ese amor que me das. Agradezco a mi bella Coco, mi cachito de cielo, tu amor y mi amor siempre estarán juntos.

Un sincero y profundo agradecimiento a la UNAM por existir, por dar tanto a la nación, por los profesores que la integran, investigadores y comunidad en general. Gracias por motivar, por apostar y brindar todo a la educación y cultura, gracias por las instalaciones y equipos que ponen a la disposición de los estudiantes, gracias por sus bellos jardines, gracias por acogerme desde el bachillerato, gracias por ser parte de México.

Agradezco al Instituto de Geología por hacerme sentir en casa, gracias por sus instalaciones, por los espacios, gracias por las salas de estudio en especial a la II, muchas gracias por todo y por la felicidad que me brindo.

Agradezco a la FES-ZARAGOZA por todo lo brindado antes y durante la Maestría, gracias por abrirme sus puertas.

Agradezco a la Facultad de Ciencias, que fue un honor volver a tomar clases en sus recintos, gracias por contribuir en mi formación y por darme tanto.

Agradezco a mis compañeras biólogas del cubículo del Instituto de Geología, por su amistad, por el tiempo compartido, por las risas, las pláticas y reuniones a Esmeralda Cruz Silva, Sonia Juárez Orozco, María Fernanda Téllez y a Ixchel González.

Finalmente agradezco a todas las personas que olvide mencionar, que fueron participe en la realización o estuvieron presentes de alguna manera durante el tiempo de este proyecto. Mil gracias a mis profesores y amigos por todo lo enseñado y por la convivencia.

Dedicatoria

A la vida

A mi papá José Juan Meneses Morales

A mi adorable Coco

A mi mamá María Cristina Ochoa Cortes

A mis hermanos David, Ana y Brenda

A mi corazón Jorge Eduardo Ríos Carrillo

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....i

LISTA DE CUADROS.....ii

RESUMEN.....iii

ABSTRACT.....iv

I INTRODUCCIÓN.....1

II MARCO TEÓRICO.....2

2.1 Micorrizas.....2

2.2 Micorriza orquideoide.....4

2.3 Tipos de colonización micorrízica.....6

2.4 Relación simbiótica de hongos micorrízicos orquideoides.....7

2.5 Orchidaceae8

2.6 Perspectivas de conservación.....11

2.7 Descripción de *Cuitlauzina pendula*.....12

2.7.1 Demografía y reproducción.....14

III ANTECEDENTES.....15

3.1. Estudios previos sobre propagación de *Cuitlauzina pendula*.....15

IV JUSTIFICACIÓN.....17

V OBJETIVOS.....18

5.1. Objetivo general.....18

5.2. Objetivos particulares.....18

VI MATERIAL Y MÉTODOS.....:	19
6.1 Sitio de procedencia del germoplasma.....	19
6.2 Recolecta de raíces.....	20
6.2.1 Caracterización de la colonización micorrízica.....	21
6.2.2 Aislamiento de HMO.....	21
6.2.3 Reconocimiento de HMO y su tasa de crecimiento.....	21
6.2.4 Prueba enzimática.....	22
6.2.5 Tinción de núcleos hifales con DAPI (4,-6- diamino-2 fenilindol)	22
6.2.6 Caracterización molecular.....	23
6.2.7 Almacenamiento en el banco de germoplasma de los HMO.....	24
6.3 Recolecta de cápsulas y prueba de viabilidad con tetrazolio.....	24
6.3.1 Desinfestación de las semillas.....	26
6.3.2 Germinación asimbiótica de semillas.....	27
6.3.3 Germinación simbiótica de semillas.....	27
6.3.4 Cultivo simbiótico de plántulas de <i>Cuitlauzina pendula</i> germinadas asimbióticamente.....	29
6.4 Establecimiento en condiciones de invernadero de plántulas pregerminadas asimbióticamente y cultivadas simbióticamente de <i>Cuitlauzina pendula</i>	32
6.5. Análisis estadísticos.....	32
VII RESULTADOS.....	32
7.1 Caracterización de la colonización de hongos micorrízicos orquideoides en raíces de <i>Cuitlauzina pendula</i> y <i>Prosthechea</i> sp.	33
7.1.1 Hongos micorrízicos orquideoides obtenidos a partir de raíces de <i>Cuitlauzina pendula</i> y <i>Prosthechea</i> sp.	34
7.1.2 Caracterización morfológica de los hongos micorrízicos orquideoides.....	35
7.1.3 Identificación molecular de los aislados.....	38
7.1.4 Eficiencia de los distintos tratamientos de desinfestación de semillas de <i>Cuitlauzina pendula</i>	40
7.2 Prueba de viabilidad de semillas de <i>Cuitlauzina pendula</i>	41
7.2.1 Germinación y desarrollo de <i>Cuitlauzina pendula</i> en cultivos simbióticos y asimbióticos.....	41
7.2.2 Efecto de la inoculación post-germinación de hongos micorrízicos orquideoides en el desarrollo de plántulas de <i>Cuitlauzina pendula</i>	45
7.3 Supervivencia de plántulas en condiciones de invernadero.....	53

VIII DISCUSIÓN.....	54
IX CONCLUSIONES.....	58
X LITERATURA CITADA.....	59
XII ANEXOS.....	71
Anexo 1 Sinopsis taxonómica del género-forma <i>Rhizoctonia</i>	71
Cuadro 7 Sinopsis taxonómica del género-forma <i>Rhizoctonia</i> ; géneros anamorfos y teleomorfos reconocidos actualmente (Tomado de González <i>et al.</i> 2006)	71
Anexo 2 Medios de cultivo.....	71
Cuadro 8 Medio de aislamiento fúngico (MAF) para hongos micorrízicos orquideoides (Clements, 1988, Mitchell, 1989)	71
Cuadro 9 Medio de Papa dextrosa agar (PDA)	72
Cuadro 10 Medio de ácido tánico (MAT) para hongos micorrízicos orquideoides.....	72
Cuadro 11 Caldo de dextrosa papa (PDB)	72
Cuadro 12 Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS, 1962)	72
Cuadro 13 Medio básico de avena (MBA) (Mitchell, 1989)	73
Cuadro 14 Medio Knudson C (Kc) (Knudson, 1946)	73
Anexo 3 Colonización micorrízica.....	74
Cuadro 15 Porcentaje promedio de colonización micorrízica de las raíces de las orquídeas epífitas <i>Cuitlauzina pendula</i> y <i>Prosthechea</i> sp.....	74
Anexo 4 Características merísticas	75
Cuadro 16 Características merísticas (cm) promedio de plántulas de <i>Cuitlauzina</i> <i>pendula</i>	75
Cuadro 17 Características merísticas (cm) promedio de <i>Cuitlauzina pendula</i> para su micorrización <i>in vitro</i> (Segunda categoría)	75
Cuadro 18 Características merísticas promedio de plántulas de <i>Cuitlauzina pendula</i> para su micorrización <i>in vitro</i> (Tercera categoría)	76

Anexo 5. Endófitos no micorrízicos obtenidos a partir de raíces de la orquídea epífita <i>Cuitlauzina pendula</i>	76
Figura 40. Endófitos no micorrízicos obtenidos a partir de raíces de la orquídea epífita <i>Cuitlauzina pendula</i>	76
Anexo 6. Plántulas cultivadas <i>in vitro</i> procedentes de colecciones.....	77
6.1 Efecto del cultivo simbiótico de plántulas cultivadas <i>in vitro</i> de <i>Cuitlauzina pendula</i>	77
Figura 41. Plántulas de <i>Cuitlauzina pendula</i> en diferentes tratamientos. a) aspecto de las plantas inoculadas (aislados A1, A2, A3 y A4) b) plántulas sembradas en medio asimbiótico MS 50% c) plántulas sembradas en MBA 100%.....	77

XI LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

Lista de figuras.....i

Figura 1 Tipos de micorrizas (Tomado de Camargo *et al.*, 2012)3

Figura 2 Raíz de *Cuitlauzina pendula* con micorrización en células corticales (Meneses, 2015)4

Figura 3 Micorriza orquideoide (Tomado de: Institute of Botany, AS CR. Department of Mycorrhizal Symbioses, 2003)4

Figura 4 Tolipofagía (Tomado de Reyes, 1973)6

Figura 5 Ptiófagía (Tomado de Reyes, 1973)6

Figura 6 Tipo de crecimiento y estructuras en orquídeas (Tomado de Pinteres, 2017)9

Figura 7 Morfología floral de una orquídea (tomado de Téllez, 2011)10

Figura 8 Estadios ontogénicos de *Laelia* sp. (Tomado de Duarte, 2014)11

Figura 9 *Cuitlauzina pendula* en su hábitat (R. Ríos Gómez)13

Figura 10 Inflorescencia de *Cuitlauzina pendula* (R. Ríos Gómez)13

Figura 11 Distribución de *Cuitlauzina pendula*14

Figura 12 Ubicación en el área de estudio.....19

Figura 13 Procesamiento de las raíces de *Cuitlauzina pendula*.....20

Figura 14 Material biológico de *Cuitlauzina pendula*.....25

Figura 15 Diseño experimental para la germinación simbiótica de las semillas de *Cuitlauzina pendula in vitro*.....27

Figura 16 Esquema comparativo de propuestas de clasificación de los estadios de desarrollo en las orquídeas epífitas *Laelia eyermaniana* y *Cuitlauzina pendula* con la clasificación propuesta y utilizada en el presente trabajo.....29

Figura 17 Diseño experimental para la inoculación micorrízica de plántulas de *Cuitlauzina pendula in vitro*.....30

Figura 18 Procedencia del material biológico y experimentación en la propagación *in vitro* de *Cuitlauzina pendula*. HMO= hongos micorrízicos orquideoides.....31

Figura 19 Secciones transversales de las raíces de las cuales se obtuvieron los aislados 1-4, teñidos con fucsina ácida, de *Cuitlauzina pendula* (a-c) y *Prosthechea* sp.....33

Figura 20 Porcentaje de colonización micorrízica de *Cuitlauzina pendula*.....33

Figura 21 Porcentaje de colonización total promedio por segmento de *Cuitlauzina*33

Figura 22 Aspecto de las colonias de los aislados micorrízicos seleccionados de *Cuitlauzina pendula* (aislados 1-3) y *Prosthechea* sp. (aislado 4)36

Figura 23 Morfometría de los aislados seleccionados de *Cuitlauzina pendula* (aislados 1-3) y *Prosthechea* sp. (aislado 4)37

Figura 24 Prueba con ácido tánico de los aislados seleccionados.37

Figura 25 Tinción de núcleos con DAPI de los aislados seleccionados.....38

Figura 26 Relaciones filogenéticas de los aislados obtenidos de *Cuitlauzina pendula* (aislados 1-3) y *Prosthechea* sp. (aislado 4)39

Figura 27 Prueba de eficiencia de los tratamientos de desinfestación en semillas de *Cuitlauzina pendula*.40

Figura 28 Porcentaje de viabilidad de semillas de tres cápsulas tratadas con cloruro de tetrazolio antes y después de la desinfestación41

Figura 29 Porcentaje de individuos de *Cuitlauzina pendula* que pasaron al estadio cinco43

Figura 30 Germinación y desarrollo *in vitro* de semillas de *Cuitlauzina pendula*.....44

Figura 31 Plántulas de *Cuitlauzina pendula* en desarrollo, 19 semanas después de la germinación.....45

Figura 32 Altura de las plántulas en tres tamaños (a 0.5, b 1.0 cm y c 3 cm) de *Cuitlauzina pendula* con diferentes tratamientos asimbióticos y simbióticos.....47

Figura 33 Número de pseudobulbos en plántulas de tres tamaños (a 0.5, b 1.0 cm y c 3 cm) asimbióticos y simbióticos.....48

Figura 34 Largo y diámetro de pseudobulbos en plántulas de tres tamaños (ad 0.5, be 1.0 cm y cf 3 cm) de *Cuitlauzina pendula* con diferentes tratamientos asimbióticos y simbióticos.....49

Figura 35 Número y longitud de hojas en plántulas de tres tamaños (ad 0.5, be 1.0 cm y cf 3 cm) de *Cuitlauzina pendula* con diferentes tratamientos asimbióticos y simbióticos50

Figura 36 Número y largo de raíces en plántulas de tres tamaños (ad 0.5, be 1.0 cm y cf 3 cm) de *Cuitlauzina pendula* con diferentes tratamientos asimbióticos y simbióticos.....51

Figura 37 Secciones de raíces micorrizadas de *Cuitlauzina pendula*, después de seis meses de ser inoculadas simbióticamente (a A1, b A2, c A3 y d A4)52

Figura 38 Plántulas de *Cuitlauzina pendula* en los distintos tratamientos, después de dos meses de ser plantadas.....52

Figura 39 Plántulas de *Cuitlauzina pendula*, cultivadas en invernadero provenientes de diferentes tratamientos, después de tres meses de ser trasplantadas53

CUADROS.....iii

Cuadro 1 Protocolos de desinfestación de semillas de *Cuitlauzina pendula*.....26

Cuadro 2 Aislados de hongos micorrízicos orquideoides obtenidos de raíces de *Cuitlauzina pendula* y *Prosthechea* sp.35

Cuadro 3 Morfometría y aspecto de las colonias de HMO de las orquídeas *Cuitlauzina pendula* y *Prosthechea* sp.....36

Cuadro 4 Especie más cercana molecularmente a los aislados de *Cuitlauzina pendula* (aislados 1-3) y *Prosthechea* sp., (aislado 4), comparados con secuencias del Gen Bank.....40

Cuadro 5 Porcentaje de semillas/plántulas de *Cuitlauzina pendula* en los distintos estadios.....44

Cuadro 6 Porcentaje de supervivencia de *Cuitlauzina pendula* en los diferentes tratamientos.....53

RESUMEN

Cuitlauzina pendula es una especie endémica de México y se encuentra en la categoría de amenazada en la NOM-059-SEMARNAT-2010 debido a que sus poblaciones están siendo mermadas por la extracción de sus ejemplares, que tienen uso ornamental y ceremonial, además, sus hábitats están siendo destruidos. Tiene una distribución geográfica restringida a la Sierra Madre del Sur principalmente en bosques de encino, donde su forofito más frecuente es *Quercus*. Se muestrearon nueve individuos de *Cuitlauzina pendula* en tres árboles de *Quercus crassifolia* y un individuo de *Prostecchia* sp., la cual es una orquídea asociada. De cada organismo se recolectaron tres raíces a las que se les caracterizó la colonización micorrízica *in situ* y se aislaron los endófitos micorrízicos *in vitro* obtenidos a partir de las raíces colonizadas. Antes de su dehiscencia se recolectaron sus cápsulas cuyas semillas no se lograron desinfestar adecuadamente para realizar las pruebas de germinación simbiótica, por lo que se recurrió hacer uso de semillas provenientes de invernadero.

La colonización micorrízica de *Cuitlauzina pendula* fue superior al 50 % y se distribuyó de manera homogénea en la zona cortical, desde la base a la región media de las raíces, registrándose en todas las muestras analizadas. La especie asociada *Prostecchia* sp., mostró un patrón similar. Ambas especies, se asociaron con una especie de hongo micorrízico de la familia Ceratobasidiaceae, *Thanatephorus* sp., con un 99% de cercanía molecular, este hongo fue previamente registrado en *Oncidium sphacelatum*.

Después de 29 semanas de evaluación de la germinación, la asimbiótica fue inferior al 20% en el medio más favorable (MS 100%), debido a que la viabilidad del germoplasma fue de 50%. El porcentaje de germinación simbiótica de semillas inoculadas con varios aislados del hongo anteriormente secuenciado fue menor al 3%, sin embargo, su desarrollo fue mayor un menor tiempo en comparación con el asimbiótico. La germinación con inoculación post-germinación con los hongos micorrízicos orquideoides en tres estadios de desarrollo de plántulas pregerminadas asimbióticamente, produjo resultados similares en la altura de las plantas, número de hojas, raíces y pseudobulbos y largo y diámetro de estos últimos en comparación con el medio asimbiótico con azúcares, MS 100% (control positivo). Todas las plantas inoculadas desarrollaron micorrizas *in vitro*. La supervivencia de las plantas en condiciones de invernadero después de tres meses fue arriba de un 80% para todos los tratamientos, excepto para el asimbiótico sin azúcares (control negativo) con un 45%.

Palabras clave: micorriza orquideoide, bosque mesófilo de montaña, orquídea epífita, *Prostecchia* sp.

ABSTRACT

Cuitlauzina pendula is an endemic species of Mexico and is in the category of threatened in the NOM-059-SEMARNAT-2010 because its populations are being depleted by the extraction of their specimens, which have ornamental and ceremonial use, in addition, their habitats are being destroyed. It has a restricted geographic distribution to the Sierra Madre del Sur, mainly in oak forests, where its most frequent phorophyte is *Quercus*. Nine individuals of *Cuitlauzina pendula* were sampled in three trees of *Quercus crassifolia* and one individual of *Prostechea* sp., Which is an associated orchid. Three roots were collected from each organism, which were characterized by in situ mycorrhizal colonization and the in vitro mycorrhizal endophytes obtained from the colonized roots were isolated. Before their dehiscence, their capsules were collected, the seeds of which were not disinfested adequately to carry out the symbiotic germination tests. Therefore, seeds from the greenhouse were used.

The mycorrhizal colonization of *Cuitlauzina pendula* was superior to 50% and was distributed homogeneously in the cortical zone, from the base to the middle region of the roots, registering in all the samples analyzed. The associated species, *Prostechea* sp., Showed a similar pattern. Both species were associated with a mycorrhizal fungus species of the Ceratobasidiaceae family, *Thanatephorus* sp., With 99% molecular proximity, this fungus was previously registered in *Oncidium sphacelatum*.

After 29 weeks of evaluation of the germination, the asimbiotics was lower than 20% in the most favorable medium (100% MS), because the viability of the germplasm was 50%. The percentage of symbiotic germination of seeds inoculated with several isolates of the previously sequenced fungus was less than 3%, however, its development was greater a shorter time compared to the asybiotic. Germination with post-germination inoculation with mycorrhizal fungi at three stages of development of pre-germinated seedlings, produced similar results in the height of the plants, number of leaves, roots and pseudobulbs and length and diameter of the latter in comparison with the half asybiotic with sugars, 100% MS (positive control). All inoculated plants developed mycorrhizae in vitro. The survival of the plants in greenhouse conditions after three months was above 80% for all treatments, except for the asybiotic without sugars (negative control) with 45%.

Key words: orchidoid mycorrhiza, mountain mesophyll, epiphytic orchid, *Prostechea* sp.

INTRODUCCIÓN

México se distingue en el ámbito mundial por ser un país megadiverso, se estima que entre 10 y 12% de las especies del mundo habitan sus ecosistemas (PROMARNAT, 2015). Su gran biodiversidad se debe a su posición biogeográfica, ya que en su territorio se localiza la zona de transición de los reinos Neártico y Neotropical, como también a su variedad climática, relieve e historia geológica complejas (Jiménez-Sierra *et al.*, 2014). En el mundo se calcula que existen más de 250 000 especies de plantas con flores, de las cuales 21 841 se registran en México (Villaseñor y Ortiz, 2014).

Orchidaceae es una de las familias más diversas del reino vegetal dentro de las angiospermas, debido a que han logrado colonizar diferentes nichos ecológicos que pueden ser el terrestre o en las copas de los árboles como epífitas (Leopardi y Cumana, 2008). Además, sus especies tienen distribución cosmopolita, en México las regiones donde se presenta mayor riqueza son los estados de Chiapas, Oaxaca y Veracruz.

Pese a ser una de las familias más diversas, también es una de las más vulnerables debido al impacto humano sobre su hábitat, dentro de estas actividades humanas se encuentra principalmente la extracción masiva de sus ejemplares y la destrucción de su hábitat por cambio de uso de suelo, lo que ha provocado una disminución en sus poblaciones (Cox, 2013). Debido a esto se deben desarrollar estrategias para su conservación a mediano o largo plazo.

Por otra parte, se ha propuesto que la diversidad de la familia se debe a los cambios climáticos, así como a la radiación de los polinizadores que contribuyeron amplia y principalmente en las particularidades morfológicas especializadas a causa de las interacciones complejas que llevan entre ambos (Useche, 2014).

Otra de las asociaciones que establece este grupo de plantas es con algunos hongos basidiomicetos, los cuales les proporcionan carbono y nitrógeno (McCormick *et al.*, 2006). La asociación simbiótica conocida como micorriza es fundamental, debido a que cumple funciones cruciales para la germinación de semillas, desarrollo y supervivencia de la planta, dentro de éstas se encuentran una mejor captación de nutrientes y agua, así como protección contra algunos patógenos. (Brundrett, 2002). Con base en lo anterior es necesario analizar este tipo de simbiosis, sobre todo en especies de orquídeas que tienen problemas de conservación.

Cuitlauzina pendula es una orquídea epífita de inflorescencias vistosas que habita el bosque mesófilo de montaña y tiene problemas de preservación similares a los ejemplares de la misma familia a la que pertenece, a pesar de los esfuerzos que se han realizado para su conservación a través del cultivo *in vitro* que ha dejado de lado, la gran importancia de sus HMO. Uno de los mejores caminos para la preservación de las orquídeas es a través de la conservación y conocimiento de sus HMO, por lo que estos intervienen en la distribución de las poblaciones y

adaptación de las orquídeas en su medio natural (Dearnaley *et al.*, 2012; Otero *et al.*, 2004, 2005; Mosquera *et al.*, 2013). No existe ningún trabajo para la especie que se enfoque en este aspecto, por lo que esta investigación es el primer estudio que genera información preliminar para la conservación de la especie a través de sus simbioses.

II MARCO TEÓRICO

2.1. Micorrizas

La simbiosis que se realiza entre las especies es crucial para la evolución, en el caso de las plantas son claves para la adquisición de nutrimentos. Se ha documentado que los hongos endófitos formadores de micorrizas han evolucionado conjuntamente con las plantas terrestres y esta asociación permitió a estas últimas colonizar nuevos hábitats, proporcionándoles mejores estrategias para la adquisición de agua, nutrimentos y resistencia contra algunos patógenos (Ordoñez *et al.*, 2014).

El término micorriza fue propuesto por A. B. Frank en 1885, deriva de los vocablos griegos *mike* (hongo) y *rrhiza* (raíz), está definida como una asociación simbiótica mutualista entre las raíces de las plantas y los hongos (Honrubia, 2009). Sin embargo, en algunos casos la relación no es obligada (Brundrett, 2004). Otra definición indica que es una asociación entre hifas fúngicas y órganos de plantas superiores que se ocupan de la absorción de sustancias del suelo (Harley y Smith, 1983). Una más la define como un contacto íntimo entre hifas y células vegetales, donde ocurre un intercambio nutricional bi o unidireccional, como es el caso de plantas sin clorofila y el de las orquídeas (Honrubia, 2009). Este proceso de intercambio mantiene un equilibrio dinámico entre ambas partes, los beneficios resultantes pueden cambiar a veces, favoreciendo a uno de los dos simbioses y posteriormente vuelven a la situación equilibrada que mantenían (Brundrett, 2004).

Las micorrizas se encuentran ampliamente distribuidas, están presentes en el 90% de las especies terrestres (Smith y Read, 1997; Olalde y Cerratos, 2004). En relación con las especies vegetales y fúngicas que se asocian y a la estrategia nutricional que se caracteriza por la invaginación intracelular por parte del hongo en las células corticales de la raíz de la planta, existen distintos tipos de micorrizas. Entre ellas, en las ectomicorrizas (Fig. 1), participan los hongos de la clase Basidiomycetes y Ascomycetes, se asocian con las familias botánicas *Cupresaceae*, *Pinaceae*, *Betulaceae*, *Fagaceae* entre otras (Ferrera y Alarcón, 2004). Generalmente no existe penetración intracelular a las plantas asociadas, sus características principales son: manto fúngico, red de Hartig y el micelio externo vegetativo que emerge a partir de las raíces (Olalde y Cerratos, 2004).

Otro tipo son las micorrizas monotrofoide (Fig. 1) presente en la familia botánica *Monotropaceae* que son plantas aclorófilas de los géneros *Sarcodes*, *Pterospora* y *Monotropa*, dependen del hongo asociado de la clase Basidiomycetes y de los géneros *Lactarius*, *Russula*, *Suillus* y *Rhizopogon*,

estos les proveen a las plantas carbohidratos y derivados de otras plantas autótrofas cercanas (Cooke, 1977; Harley y Smith, 1983; Martínez, 2008). Las micorrizas arbusculares (Fig. 1) son encontradas en plantas herbáceas, arbustivas y en plantas de cultivos, los hongos asociados pertenecen al Orden Glomales, éstos no provocan algún cambio sobre la estructura externa de la raíz. Las hifas del hongo penetran en el córtex, formando vesículas y estructuras arbusculares intracelulares muy características (Martínez, 2008). En las micorrizas ericoideas (Fig. 1) se presentan en plantas del Orden Ericales y el simbionte fúngico pertenece principalmente a la división Ascomycota, su diagnóstico principal es la existencia de hifas intracelulares en forma de tirabuzón, son efectivas en la absorción del nitrógeno y aumentan la tolerancia de las plantas a la toxicidad por metales pesados (Raven *et al.*, 1986; Martínez, 2008). Y finalmente la micorriza orquideoide (Fig. 1) que forma asociación entre orquídeas y hongos del género *Rhizoctonia*.

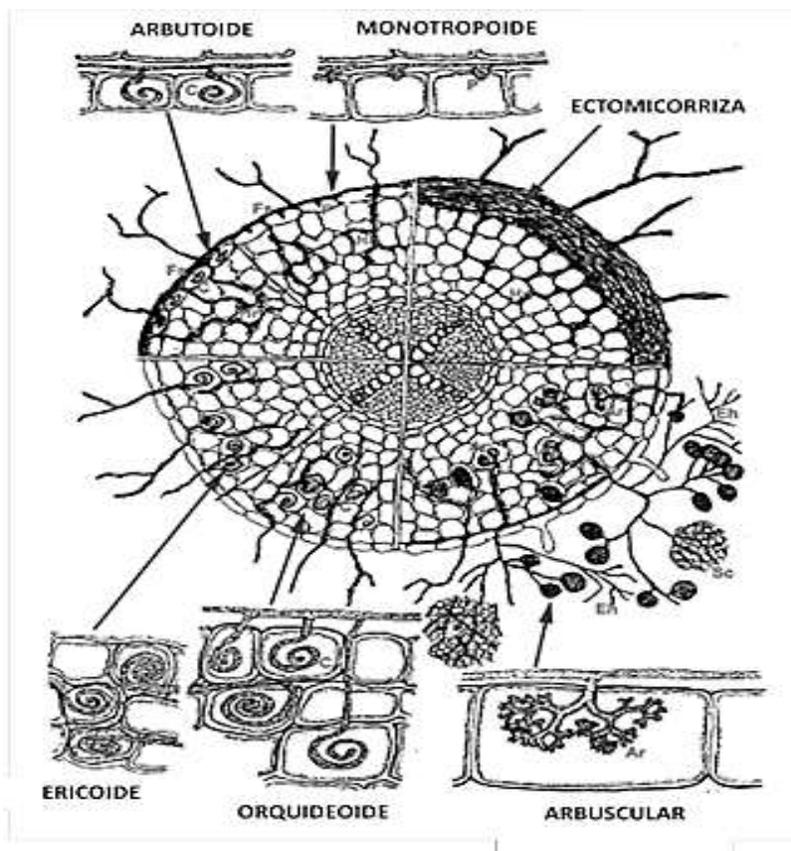


Figura 1. Tipos de micorrizas (tomado de Camargo *et al.*, 2012).

2.2 Micorriza orquideoide

Este tipo de micorriza establece una asociación con hongos del género *Rhizoctonia* y orquídeas. En otras familias de plantas *Rhizoctonia* sp., suele comportarse como un patógeno, ocasionando pérdidas importantes en cultivos. Dentro de las enfermedades más comunes que ocasiona es marchitamiento de las plántulas y el pudrimiento de raíces (Warcup y Talbot, 1967; 1980; Shen *et al.*, 1998; Roberts, 1999), mientras que en otras plantas se comporta como endófito no perjudicial (Warcup, 1981; Rasmussen, 1995; Bayman y Otero, 2006; Otero *et al.*, 2011).

Las semillas de las orquídeas dependen de los nutrimentos que le suministra el micosimbionte para germinar, debido a que tienen una estructura simple, que se caracteriza por un embrión pequeño, sin endospermo, cubierto por una o dos capas de células (Bernard, 1909; Arditti, 1992), por lo que no germinan si no se les provee una fuente de carbono necesario para su desarrollo (Ortega *et al.*, 2009).

En la colonización micorrízica de las semillas de las orquídeas, puede haber especificidad entre ambos interactuantes y el hongo promueve la germinación, en otros casos el hongo parasita a la semilla y causa la muerte del embrión. La colonización de los embriones o en otros estadios de la planta continúa o puede iniciar por otros hongos micorrízicos a través de los pelos radicales o en las raíces, acentuándose en las células corticales (Fig. 2) formando estructuras conocidas como pelotones, conformados por un conjunto de hifas enrolladas (Fig. 3) (Hadley y Williamson, 1972).

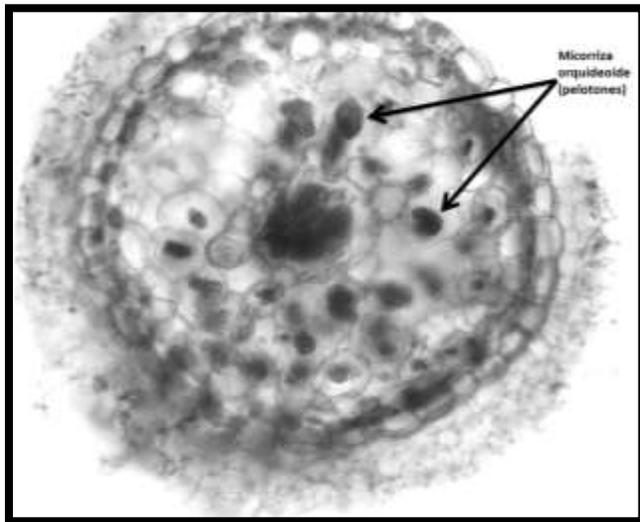


Figura 2. Raíz de *Cuitlauzina pendula* con micorrización en células corticales (Meneses, 2015).

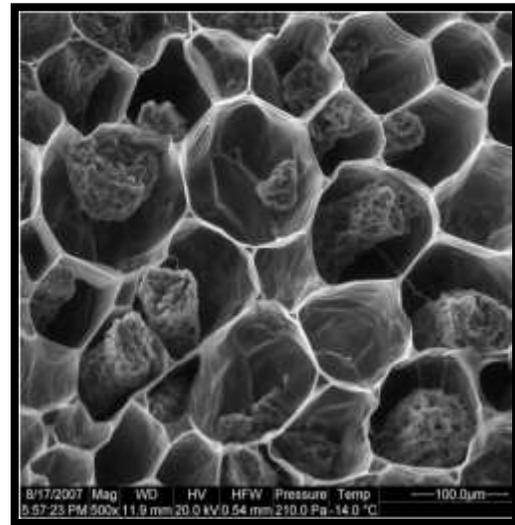


Figura 3. Micorriza orquideoide (tomado de: Institute of Botany, AS CR. Department of Mycorrhizal Symbioses, 2003).

El protocormo no fotosintético corresponde a una masa de células redondeadas o elípticas que se forma después del inicio de la germinación (Flores *et al.*, 2008) y depende de los hongos micorrízicos para su nutrición (Rasmussen y Whigham, 2002) ya que no tienen otro mecanismo

para adquirir el carbono requerido. También en plantas adultas en raíces de orquídeas terrestres y epifitas, se ha registrado esta asociación, que perdura durante todo su ciclo de vida (Rasmussen y Whigham, 2002; Smith y Read, 1997; Batty *et al.*, 2002).

Los hongos micorrízicos orquídeoides (HMO) son saprobios y de vida corta, provocando que algunas orquídeas formen nuevas asociaciones con otros hongos después de la muerte de su huésped fúngico (Rasmussen y Whigham, 2002). No obstante, algunas orquídeas se asocian con el mismo hongo en su etapa juvenil y adulta, por tanto, son específicos (Rasmussen y Whigham, 2002; Zettler *et al.* 2003; McCormick *et al.*, 2004).

Esta asociación se establece con HMO del phylum Basidiomycota, clase Basidiomycetes del complejo *Rhizoctonia* (Rasmussen, 1995), la cual contiene más de 100 especies de hongos anamorfos. Es considerado un grupo heterogéneo de taxones fúngicos, que no producen esporas asexualmente, sus especies tienen rasgos comunes en estado anamórfico, tales como: esclerocios y micelio de coloración parda (González, 2008), hifas gruesas (3-17 μm de diámetro) (Sneh *et al.*, 1991) con puntos de ramificación formando ángulos rectos, constitución de células moniloides y esclerocios en el medio de cultivo, además de una alta tasa de crecimiento y un aparato septal dolíporo complejo (Andersen y Stalpers, 1994; González *et al.*, 2006).

Existe una propuesta de González y col. (2006) que divide a *Rhizoctonia* en siete géneros anamórficos (asexuales) (Cuadro 7 del Anexo 1). Sin embargo, generalmente se clasifican en tres géneros anamórficos: *Ceratorhiza*, *Epulorhiza* y *Moniliopsis* que son fases que corresponden a los géneros teleomórficos (sexuales), *Ceratobasidium*, *Tulasnella* y *Sebacina* respectivamente (Warcup y Talbot, 1996). La fase sexual de este grupo ha sido difícil de obtener a través del cultivo en laboratorio, por lo que se ha tenido que recurrir a las estructuras vegetativas para determinar caracteres informativos útiles en su sistemática, aunque el uso de estos caracteres morfológicos ha mostrado problemas para delimitar las especies dentro de este género para asociarlas con certeza al estado anamórfico (Marchisio y Berta, 1985). Esta especie también se puede identificar por medio de anastomosis, en esta técnica se cultivan dos aislados de *Rhizoctonia*, si corresponden a la misma especie, entonces forman un puente citoplasmático entre sus hifas (Sneh *et al.*, 1991).

Por otra parte, a través de métodos moleculares y filogenéticos se han estudiado los HMO. Mediante el DNA se han identificado cuáles son los hongos asociados, los cuales no se ven afectados por la dependencia del cultivo o la existencia de algún otro microorganismo que crezca más rápido que los hongos micorrízicos (Taylor y McCormick, 2008). Además, es un método eficiente, debido a que se distinguen fácilmente las cepas a identificar y la inducción de la fase teleomórfica no es necesaria siendo una técnica rápida (Sureepor *et al.*, 2010). En esta metodología se usan primers universales, como las secuencias intergénicas de transcripción (ITS) (Otero *et al.*, 2002; 2004; 2007; 2011; Shan *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2005; Bougoure *et al.*, 2005; Porras y Bayman, 2007). El desarrollo de estas técnicas moleculares ha facilitado la identificación de las especies de HMO (Kristiansen *et al.*, 2001; 2004; Otero *et al.*, 2007).

2.3. Tipos de colonización micorrízica

Se han documentado dos formas de colonización en la micorrización orquídeoide. Una es la tolipofagia; en ésta el hongo penetra las células epidérmicas y enseguida las corticales de la raíz de la orquídea, rodeándose la hifa por la membrana celular vegetal que se invagina a medida que la hifa se desarrolla hasta formar una matriz de interfase hongo-planta o pelotón (Ordoñez *et al.*, 2014). Esta forma de colonización está presente en la mayoría de las especies de orquídeas (Fig. 4). Una parte de los nutrimentos obtenidos por la orquídea lo hace a través de la digestión de pelotones, pero al parecer, las plantas no proporcionan nutrimentos al hongo, aunque este proceso aún no es del todo concluyente por falta de estudios (Alexander y Hadley, 1985). Los estudios realizados mediante microscopía electrónica han mostrado que en el periodo de digestión del pelotón (lisis), las hifas comienzan a desorganizarse, conforme sus paredes celulares se adelgazan (Hadley y Williamson, 1972). Sin embargo, las células vegetales no sufren ningún cambio y pueden volver a colonizarse por hifas que sobreviven durante el proceso de digestión o por hifas de células adyacentes (Breddy, 1991). Algunos autores proponen que este proceso de degradación de hifas es un mecanismo de defensa por parte de la orquídea (Dearnaley *et al.*, 2012). Por otra parte, el crecimiento de los hongos micorrízicos se ve limitado por la producción de fitoalexinas producidas por las orquídeas (Beyrle *et al.*, 1995).

La segunda forma es la ptiofagia, en ésta no se forman pelotones o al menos presentan una forma menos densa. El simbionte coloniza algunas células epidérmicas, después el córtex externo y los nutrimentos son proporcionados a la orquídea después de la plasmólisis de las hifas, que provoca que el crecimiento del hongo se detenga (Ordoñez *et al.*, 2014); además las paredes celulares de la orquídea se engruesan alrededor del hongo formando una estructura tubular. En este caso también se puede observar en las células vegetales colonizadas un gran número de mitocondrias asociadas a las hifas del hongo, pero separadas por el plasmalema del huésped (Leake, 1994) (Fig. 5).

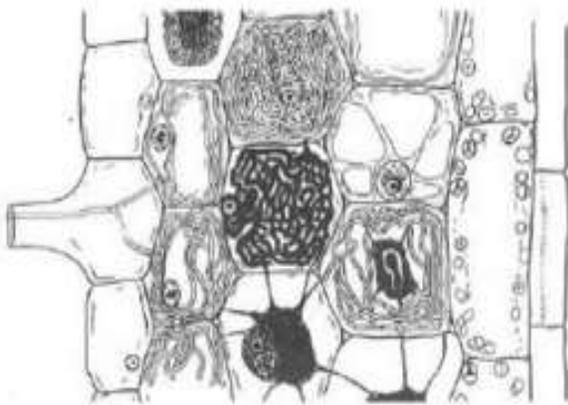


Figura 4. Tolipofagia (tomado de Reyes, 1973).

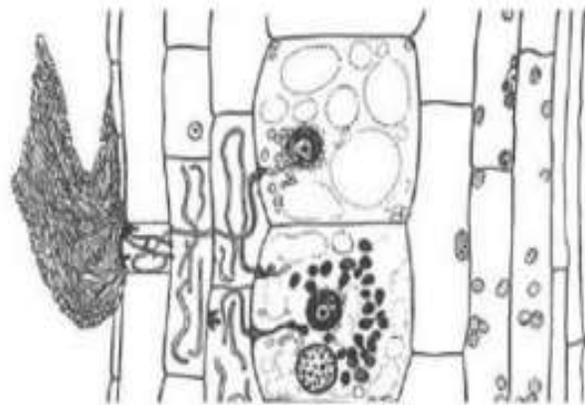


Figura 5. Ptiófagia (tomado de Reyes, 1973).

2.4. Relación simbiótica de hongos micorrízicos orquideoides

Las asociaciones simbióticas entre hongos y orquídeas son difíciles de entender a diferencia de otras especies de plantas con sus hongos micorrízicos, ya que en este caso al parecer el hongo no se beneficia (Ordoñez, 2014; Heijden *et al.*, 2014). Los hongos son capaces de hidrolizar carbohidratos insolubles presentes en el suelo y a través del micelio externo puede transportarlos a la orquídea. Por otra parte, se registró en zonas templadas que el hongo micorrízico orquideoide puede obtener suministro continuo de fotosintatos a partir de la asociación con otras plantas mediante las conexiones con el micelio externo (Smith y Read, 1997; Selosse y Martin, 2013) en plantas aclorofílicas.

Algunas evidencias para referir el papel que tienen las micorrizas en la adsorción y transferencia de C y N, se analizó en la orquídea terrestre *Goodyera repens* (Cameron *et al.*, 2006). Para medir las transferencias de C y N se usó espectrofotometría de masas isotópicas, el cual es un método que se puede emplear para medir la forma de nutrición en las orquídeas (Dearnaley *et al.*, 2012). Se basa en marcar isotópicamente el sustrato con ^{13}C o ^{15}N . Cuando dicho sustrato es metabolizado por el microorganismo, su DNA se enriquece de isótopos pesados, pudiendo entonces ser separado del resto del DNA en un gradiente de densidad y secuenciado para identificar a su portador (Torres *et al.*, 2009). El experimento anterior se basó en la transferencia de $^{14}\text{CO}_2$ a través de la fijación vía fotosintética de *Goodyera repens* a su simbiote *Ceratobasidium cornigerum*. Esta transferencia de C también se evaluó del hongo a la planta a través del suministro de glicina con aminoácidos doblemente marcada (^{13}C y ^{15}N) al micelio externo, se trazó la absorción en los tejidos. Para concluir se observó que la transferencia de C es bidireccional entre las dos especies. Este experimento demostró que la planta puede traslocar fotosintatos al hongo y el N se transfiere del hongo a la planta (Cameron *et al.*, 2006). Con este experimento se demostró por primera vez la relación mutualista en este tipo de micorrizas, sin embargo, no existen evidencias en orquídeas epifitas.

En otro estudio se cuantificó durante ocho días el C transportado entre la orquídea y el hongo, se concluyó que la transferencia neta de C de *Goodyera repens* a *Ceratobasidium cornigerum*, fue cinco veces mayor de la que se transporta del hongo a la planta (Cameron *et al.*, 2008). Este estudio es uno de los primeros que puntualiza cuanto C se transfiere entre dos organismos para cualquier asociación micorrízica (Nicole *et al.*, 2009). Investigaciones previas a las ya mencionadas hipotizaban que la polaridad de transferencia de C del hongo a la orquídea se invertiría cuando estas últimas iniciarán una vida autótrofa, sin embargo, estos estudios previos obtuvieron resultados opuestos a los obtenidos por Cameron y su equipo de trabajo (2006, 2008) años después. Dentro de estos estudios se menciona que después de exponer a la orquídea *Goodyera repens* con su endófito *Rhizoctonia Goodyerae repentis* y al administrar $^{14}\text{CO}_2$ no hay movimiento de C de la planta al hongo (Hadley y Purves, 1974).

Otro estudio presentó un resultado similar al anterior, donde la orquídea *Goodyera repens* fue cultivada junto con su endófito *Ceratobasidium cornigerum* y se les administró ^{14}C al micelio externo, a los protocormos, las plántulas y a plantas adultas, se observó que los protocormos y plántulas obtenían el ^{14}C a través del micelio externo, pero las plantas adultas no, con base en estos resultados se sugirió que *G. repens* en etapa adulta no depende de la asociación micorrízica, por otra parte se administró $^{14}\text{CO}_2$ únicamente a brotes de la orquídea para monitorear el movimiento de C de la planta al hongo, sin embargo, se observó que no hay transferencia en esta dirección, se concluyó que el C se mueve del hongo hacia la orquídea (Alexandery Hadley, 1985).

Otro experimento realizado para ilustrar la transferencia de nutrientes de hongos a las orquídeas, ha sido por medio de un sistema de división de placas marcando la glucosa y administrando esta únicamente al hongo, a través de esto se pudo demostrar el flujo de C del hongo hacia los protocormos (Dearnaley *et al.*, 2012). Además, se registró que las orquídeas adultas continúan recibiendo compuestos orgánicos como inorgánicos (C, N y PO_4^{3-}) a través de sus simbiontes (Dearnaley *et al.*, 2012), y que por medio de esta asociación presentan una mayor eficiencia en la absorción de agua en comparación con las especies no colonizadas (Yoder *et al.*, 2000).

2.5 Orchidaceae

Se estiman alrededor de 30 000 especies de orquídeas en el planeta, de éstas 1400 habitan el territorio mexicano, contenidas en 168 géneros (Soto *et al.*, 2007) de las cuales 444 son endémicas (Monreal y de la Rosa, 2014). Los ecosistemas donde se distribuyen son los bosques de encino, pino, selvas y matorrales (Monreal y de la Rosa, 2014), en áreas montañosas con sequías marcadas son menos diversas y habitualmente se encuentran los taxones terrestres, a diferencia de los ambientes más cálidos y húmedos donde predominan las especies epífitas (Salazar, 2005).

Las orquídeas pertenecen al grupo de las monocotiledóneas, son plantas herbáceas (Monreal y de la Rosa, 2014) y presentan adaptaciones para habitar el suelo (terrestres), los árboles (epífitas) o las rocas (litofíticas). En este grupo de plantas se reconocen dos tipos de crecimiento (Fig. 6) a partir de un tallo: a) simpodial en que el nuevo crecimiento se produce en sentido horizontal, en las que el brote terminal muere. El crecimiento continúa por el desarrollo de nuevos brotes próximos o en uno de años anteriores y b) monopodial con orientación vertical, aquella que se compone de un eje principal en cuya zona apical perdura el crecimiento vegetativo y a cuyos lados crecen ramas secundarias (Hágsater *et al.*, 2005).

Los rizomas pueden ser subterráneos o aéreos, exhiben nudos y entrenudos, la distancia entre ellos hace que los pseudobulbos que se forman a partir del rizoma se encuentren más o menos congestionados (Monreal y de la Rosa, 2014). Estos últimos almacenan agua y nutrientes que la planta consumirá en épocas de sequía. Su tamaño varía en función de la especie, y la forma puede ser fusiforme, elíptica, ovalada o elongada, entre otras. O pueden presentarse comprimidos y de superficie lisa, estriada y rugosa. Los más jóvenes llevan hojas y son portadores de yemas axilares para generar

nuevos puntos de crecimiento. Los pseudobulbos dan origen a raíces adventicias y de su base se desarrollan en muchos casos las flores (Monreal y de la Rosa, 2014).

Las raíces en su mayoría desarrollan velamen, cubierta de células muertas con pared secundaria engrosada, blanquecina o parda. Las raíces presentan una coloración verdosa en el punto de crecimiento recién formado, además pueden tener ramificaciones (Raven *et al.*, 1992). La función principal de estas es absorber agua y nutrientes, además de fijar la planta al suelo o a las ramas de los árboles cuando son epífitas (Hágsater *et al.*, 2005).

Las hojas presentan nervaduras paralelas. Su forma puede ser lanceolada, ovoide, acicular, cordada, obovada, ovada, entre otras. Se disponen de manera alterna u opuesta y su grosor varía de delgada a gruesa y carnosa (Hágsater *et al.*, 2005).

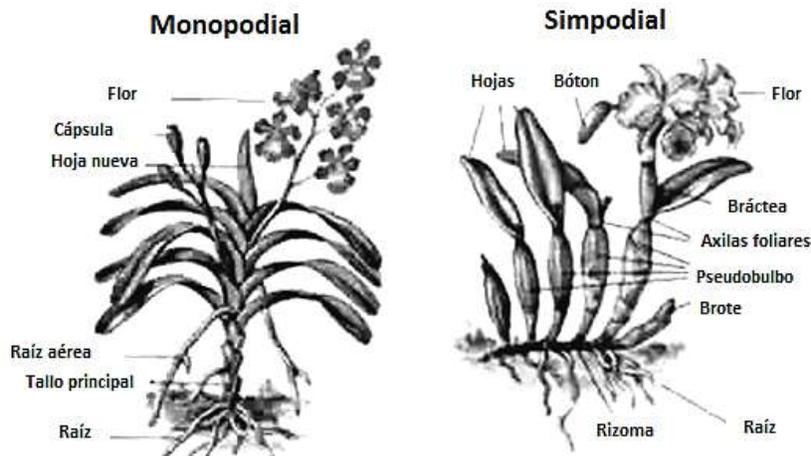


Figura 6. Tipo de crecimiento y estructuras en orquídeas (tomado de Pinteres, 2017).

La mayoría presentan flores perfectas, son zigomorfas, trímeras y con una columna central que sustenta las estructuras reproductivas y el róstelo (Monreal y de la Rosa, 2014) (Fig. 7). Las flores generalmente se agrupan en racimos, aunque existen especies con flores solitarias. Por lo general son hermafroditas el androceo se adna al gineceo para formar una estructura llamada columna o ginostegio (Hágsater *et al.*, 2005). La polinización frecuentemente es entomofila.

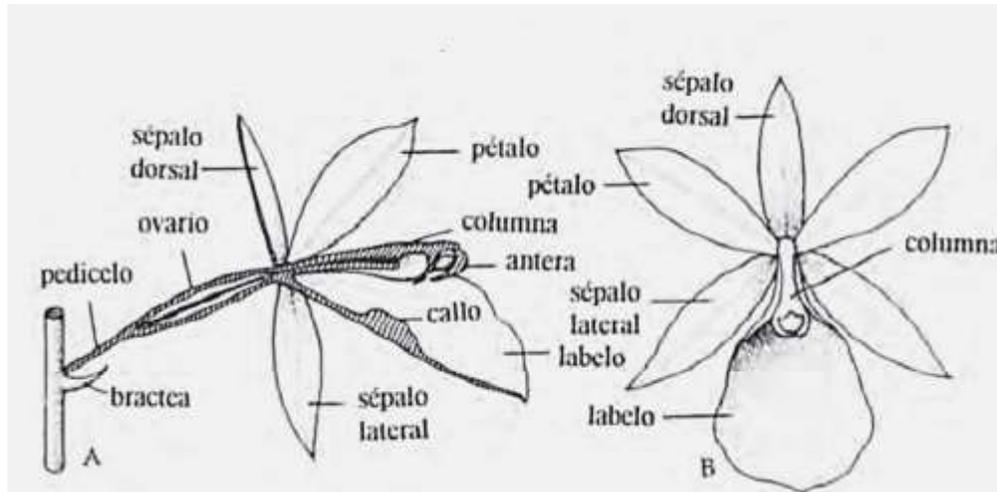


Figura 7. Morfología floral de una orquídea (tomado de Téllez, 2011).

Cuando es llevada a cabo la polinización y fecundación, el ovario inicia su crecimiento hasta formar los frutos, estos son cápsulas que al madurar permiten la liberación de las semillas y presentan una gran variedad de longitudes dependiendo de la especie (Hágsater *et al.*, 2005). Cada cápsula tiene numerosas semillas (4 000 000 aproximadamente), éstas son diminutas, su longitud oscila entre 0.05 y 6.00 mm, con un peso de 0.31 a 24 μg , carecen de reservas nutritivas, por lo que es necesario asociarse con ciertos hongos (micorrizas) para su germinación (Hágsater *et al.*, 2005).

Al inicio de la germinación las semillas de las orquídeas son micoheterótrofas obligadas y los hongos les proveen los nutrimentos tales como carbohidratos y minerales (Arditti, 1992; Hágsater *et al.*, 2005). La germinación de las orquídeas ocurre cuando la semilla encuentra las condiciones ambientales adecuadas, como humedad y temperatura óptimas, además del hongo apropiado para iniciar el proceso. La pre-germinación tiene lugar cuando el embrión absorbe agua y aumenta de tamaño por la acumulación de este líquido. La germinación comienza con la división celular en la región anterior del embrión provocando la ruptura de la cubierta seminal (Flores *et al.*, 2008). Enseguida se forma una estructura cónica llamada protocormo, éste continúa desarrollándose hasta formar el primer primordio foliar, el cual se muestra como una protuberancia. En la parte inferior del protocormo, alrededor de la periferia comienzan a formarse los pelos absorbentes o rizoides, continuando después con la formación de raíces adventicias.

A partir de la formación del primordio foliar comienzan a desarrollarse las hojas, luego la plántula y el organismo adulto (Arditti, 1967; Dressler, 1981; Luna, *et al.*, 2004) (Fig. 8). Se han sugerido tres tipos de nutrición. Las autótrofas, son plantas clorofílicas, que en etapa adulta obtienen el carbono mediante vía fotosintética; las micoheterótrofas adquieren el carbono a través de los hongos micorrízicos a lo largo de su vida; las mixotróficas, obtienen una parte del carbono a través de la vía fotosintética y la otra mediante la asociación micorrízica (Dearnaley *et al.*, 2012).

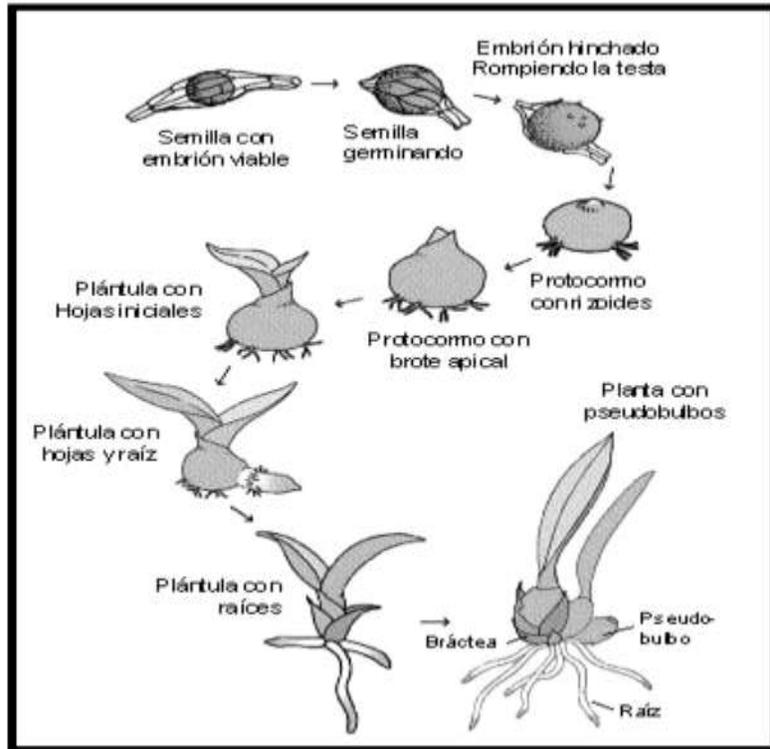


Figura 8. Estadios ontogénicos de *Laelia* sp. (tomado de Duarte, 2014).

2.6 Perspectivas de conservación

Según la NOM-059-SEMARNAT-2010, en la orquideoflora mexicana, se consideran 181 especies en alguna categoría de riesgo, de las cuales 72 son endémicas, 58 están en la categoría de amenazadas, aquí se incluye *Cuitlauzina pendula*, 107 requieren protección especial y 15 se encuentran en peligro de extinción. Por tanto, es necesario desarrollar estrategias para su conservación; como la generación de protocolos de conservación de germoplasma, a través de su propagación simbiótica o asimbiótica. En la propagación simbiótica se aíslan HMO a partir de las raíces de plantas adultas para analizar su efecto en la germinación. Se ha comprobado que este tipo de germinación permite la conservación de especies amenazadas, pues se producen plantas más vigorosas, mejor adaptadas para sobrevivir en condiciones naturales (Ortega y González, 2008) y más resistentes a infecciones que las plantas cultivadas asimbióticamente (McKendrick, 2000).

A pesar de que la germinación en ausencia del HMO se logra de manera eficiente en medios de cultivo con una elevada concentración de azúcares y suplementos orgánicos, la sustitución del HMO *in vitro* es irremplazable, debido a que la simbiosis es la responsable de activar rutas metabólicas en la planta que se expresan solamente en los individuos simbióticos. Además, el uso de suplementos para la elaboración de los medios de cultivo en la propagación asimbiótica resulta

costosa, sobre todo para la propagación a gran escala, que limita la producción de plántulas (Divakaran *et al.*, 2006). Los medios de cultivo más utilizados en este tipo de germinación de las semillas de orquídeas son: Murashige y Skoog (1962) (MS), Knudson C (1946) (KC) Hunter (1953), Dalla y Laneri (Dalla R y Laneri, 1977), VW (Vacin y Went, 1949) y Lidemann (1970). Estos medios se elaboran con sales orgánicas, vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento, que también son costosos.

2.7 Descripción de *Cuitlauzina pendula*

Cuitlauzina pendula fue dedicada al gobernador de Iztapalapa Cuitlahuatzin, recolectada y descrita por primera vez por La Llave y Lexarza (1824) (Meisel *et al.*, 2014). Tiene como sinónimos: *Lichterveldia lindleyi* Lem., *Odontoglossum citrosmum* Lindl., *Odontoglossum citrosmum* var. *rosellum* Lem., *Odontoglossum pendulum* (La Llave y Lex.) Bateman, *Oncidium citrosmum* (Lindl.) Beer y *Oncidium galeottianum* Drapiez (Tropicos, 2015). Según la descripción de Soto y Solano (2007), es una hierba epífita cespitosa, más bien masiva, hasta de 40 cm de alto, sin incluir la inflorescencia. Pseudobulbos algo agregados, ovoides, lateralmente comprimidos, verdes o amarillentos, lisos, arrugados con la edad, brillantes, hasta de 5-10 x 2.5-4.0 cm, con 2-3 vainas cartáceas, de 3-5 cm de largo. Hojas apicales, 2-3, coriáceas, oblongo-elípticas o lanceoladas, de 10-25 x 2.0-4.5 cm. Inflorescencia axilar, péndula o arqueada, del brote nuevo, cuando éste empieza su desarrollo, se aprecian 7- 8 vainas conduplicadas de casi 2-3 cm de largo; un racimo o una panícula con 2- 3 ramas, de 25-120 cm de largo, el pedúnculo delgado, hasta de 70 cm de largo, muy rígido; el raquis con flores densas, algo sinuoso, hasta con 20 flores. Brácteas florales triangulares, agudas, escariosas, de 1.5-3.0 mm de largo. Flores muy vistosas, subcarnosas, de 40-70 mm de diámetro; tépalos y pétalos blanco puro, o frecuentemente esfumados, con máculas rosadas, muy raramente con grandes manchas púrpura magenta, la superficie dorsal frecuentemente rosada, labelo blanco o más frecuentemente rosado, el callo amarillo con puntos púrpura oscuro, fuertemente fragantes, el aroma algo cítrico; sépalos subunguiculados, rígidos, obovados a elípticos, ampliamente redondeados, el dorsal de 15-25 x 10-18 mm; los laterales algo oblicuos, de 22 x 15 mm (Figs. 9 y 10). Pétalos subunguiculados, elípticos, el borde irregular, el ápice retuso, de 15-22 x 12-15 mm. Labelo de 28-30 mm de largo, con una uña muy larga, de 5-10 mm de largo, donde se asienta el callo, la lámina extendida, transversalmente reniforme, bilobada, profundamente emarginada en el ápice, la base truncado-cordiforme, de 10-20 x 20-30 mm. Callo basalmente cóncavo, bífido en el ápice. Columna de 4.5-6 mm de largo, 2.5-3.0 mm de grosor, subtrígona, con 3 grandes alas petaloides, 2 a los lados del estigma y una más angosta en el clinandrio, alas oblongo-flabeladas, erosas, hasta de 3 mm de largo. Estigma excavado, oblongo, rostelo una lámina transversal, gruesa. Antera de 4.5 mm de largo. Polinario de 2.5 mm de largo, con 2 polinios, estípites y viscidio. Cápsula elipsoide, de casi 3.0 x 1.6 cm. Ovario pedicelado, de 15-30 cm de largo (Figs. 9 y 10).



Figura 9. *Cuitlauzina pendula* en su hábitat (R. Ríos Gómez).



Figura 10. Inflorescencia de *Cuitlauzina pendula* (R. Ríos Gómez).

Cuitlauzina. pendula es endémica de México. Se distribuye en el Estado de México, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca y Sinaloa (Figura 11). En las provincias biogeográficas Costa del Pacífico, Eje volcánico, Depresión del Balsas y Sierra Madre del Sur (CONABIO, 2010). A una altitud que oscila entre 1350 a 2228 m. Se ha observado que la floración es sincrónica, esta ocurre de mayo a junio y presenta un periodo de crecimiento activo durante la temporada lluviosa de mayo a octubre (Soto y Solano, 2007). *Cuitlauzina pendula* se encuentra en bosques mesófilos de montaña, se establece principalmente en las ramas de *Quercus* y *Carpinus*. Joaquín (2014) registró para la localidad de Mesoncito, Putla, Oaxaca, su establecimiento y desarrollo en el encino negro (*Quercus crassifolia*). Se le conoce popularmente como cuitlauzina perfumada, espíritu santo, chorritos y pozolitos y flor de nube (Soto y Solano, 2007).

Las cortezas de los forofitos donde se establece *C. pendula* ayuda para el anclaje de las raíces y al depósito de humus (Soto y Solano, 2007), de partículas minerales, de nutrimentos y humedad (Joaquín, 2014). Sus raíces frecuentemente se asocian con helechos del género *Polypodium* (Soto y Solano, 2007).

Joaquín (2014) indicó algunas epifitas asociadas a *Cuitlauzina pendula*, entre ellas, *Oreopanax anderianus* (Araliaceae), *Polypodium fraternum* (Polypodiaceae), *Dryopteris simplicior* (Dryopteridaceae), *Campyloneurum angustifolium* (Polypodiaceae), *Pleopelti sangusta* (Polypodiaceae), *Isochilus bracteatus* (Orchidaceae) y *Rhynchostele maculata* subsp *oestlundiana* (Orchidaceae), además de otros géneros de (Bromeliaceae, licopodios y briofitas del género *Syrrhodon*, que forman un tapete en el cual se desarrolla *C. pendula*.



Figura 11. Distribución de *Cuitlauzina pendula* (puntos oscuros y blancos).

2.7.1 Demografía y reproducción

Cuitlauzina pendula no cuenta con estudios de demografía en donde se especifique el número de individuos que tienen sus poblaciones. Sin embargo, Soto y Solano (2007) mencionaron que en algunos de los recorridos que han realizado se pueden observar densidades de 100-1000 plantas por hectárea. No existen registros que detallen información acerca del reclutamiento, no obstante Soto y Solano (2007), consideraron que el reclutamiento de nuevos individuos puede ser un evento raro en condiciones naturales, dada la baja frecuencia de plántulas y juveniles de esta especie observadas *in situ*.

En cuanto a la biología floral existen pocos datos disponibles, Soto y Solano (2007) mencionaron que *Cuitlauzina pendula* no ofrece recompensa a sus polinizadores y opera por un mecanismo de polinización por engaño. Torres (2006) registró que su propagación sexual depende casi por completo de los polinizadores, también observó que la producción de frutos es baja, por lo que concluyó que la abundancia de polinizadores también lo es. Según Soto y Solano (2007), indicaron que las flores de *C. pendula* son autocompatibles y que es fácil obtener semillas. En cuanto a la propagación asexual, Soto y Solano (2007) mencionaron que sus clones no son extensos.

III ANTECEDENTES

3.1 Estudios previos sobre propagación de *Cuitlauzina pendula*

Uno de los primeros estudios fue realizado por Robbins (1992) donde indicó su clasificación, describió su morfología y las condiciones necesarias para su cultivo. Salazar y Mata en (2003) sembraron semillas de *Cuitlauzina pendula* en medio KC (Knudson 1946), una vez alcanzada la fase de protocormo fueron utilizadas como fuente de explantes.

Estos protocormos fueron cultivados en MS (Murashige y Skoog, 1962) y KC, además se adicionó benciladenina (BA) (0, 0.5, 1, 2 y 3 mg/L) y ácido α -naftalen-acético (ANA) (0.1 y 0.5 mg/L). Después de cuatro meses los explantes se cultivaron en sus respectivos medios de cultivo sin reguladores del crecimiento (medios basales). Cuando las plantas alcanzaron una talla de dos a tres centímetros y las hojas y raíces estuvieron bien desarrolladas se transfirieron al invernadero y se colocaron en diferentes sustratos: 1) tepezil, 2) mezcla de corteza de pino, carbón de encino y tepezil (3:1:1) y 3) maquiue triturado. Los registros se realizaron mensualmente. Este estudio mostró que *C. pendula* formó Plbs (estructuras embriogénicas, estructuras similares a protocormos) (Espinoza *et al.*, 2010), que se cultivaron en MS adicionado únicamente con BA (0.5 mg/L), A los cuatro meses alcanzaron una talla de 2-3 cm. En el medio KC se desarrollaron un número mayor de plántulas por explante, pero la talla alcanzada fue menor (0.9 cm). La mayor supervivencia fue del 76% en la mezcla de corteza de pino, carbón de encino y tepezil (3:1:1) (Salazar y Mata, 2003).

Torres (2006) evaluó la reproducción a través de la producción de frutos, semillas y viabilidad de estas en varios tratamientos (endocruzamiento, exocruzamiento y polinización natural). Observó que en ausencia de polinizadores la fructificación es baja, y que el número de semillas esta correlacionada con su peso. Además, se percató que la especie opera por un sistema reproductivo mixto y que mediante exocruzamiento ocurre un mejor desarrollo de las semillas en comparación con el endocruzamiento. También indicó que la producción de frutos se incrementa aproximadamente cinco veces mediante endogamia y exogamia. Pineda (2008), probó que el medio de cultivo MS es ideal para la germinación de semillas de *Cuitlauzina pendula*, en cambio notó que la formación de pseudobulbos se desarrolla mejor en el medio de cultivo KC, y que al agregar carbón activado disminuyó la longitud de las raíces. Además, señaló que al adicionar 1.0 mg L^{-1} de ácido naftalenacético (ANA) se estimuló la pigmentación verde y la formación de pseudobulbos, y con cantidades de 0.5 mg L^{-1} , las plántulas se alargaron en ausencia de ANA en el medio, aumentando el número de hojas y la longitud de la raíz.

Mata y Salazar (2009) realizaron protocolos de propagación *in vitro* de *Cuitlauzina pendula*, probaron los medios de cultivo MS y KC modificados, donde adicionaron benciladenina y ácido α -naftalenacético en diferentes concentraciones. Determinaron que en 30 días germinan las semillas y en 120 se obtienen plántulas siendo el medio MS es mejor para su propagación.

Enseguida las plántulas obtenidas fueron cultivadas *ex vitro* en diferentes sustratos en una mezcla de suelo compuesta por piedra pómez y fibras de árbol, aumentando el porcentaje de supervivencia.

Banderas y col. (2012) desarrollaron una metodología para el cultivo de *Cuitlauzina pendula* donde utilizaron diferentes sustratos y soluciones nutritivas. Obtuvieron que el mejor sustrato fue la mezcla constituida por corteza de encino, tezontle, aserrín y carbón (1:2:2:1) y la solución nutritiva universal Steiner (SN) a 25 y 50 %, modificada con 80% N-NO₃ - y 20% N-NH₄, donde se produjeron plantas que alcanzaron la floración.

Pérez y Ávila (2014) probaron los medios de cultivo que han resultado más eficientes para la germinación, desarrollo de protocormos, formación de plántulas y la multiplicación de PLBs de *Cuitlauzina pendula*. Los medios que utilizaron fueron MS al 50% y 100%; MS con BA 0.05 mg/L; Phytamax (Phy) al 50 y 100% y fertilizante comercial N-P-K triple 17 al 50 y 100% de la concentración de sus sales basales, con estos tratamientos se obtuvieron los mayores porcentajes de germinación. Estos autores determinaron las siguientes fases en el desarrollo de esta especie: 1. Semillas deformes, con el embrión reducido a un 50% o menos dentro de la testa; 2. Protocormo 1, semillas con el embrión en forma globular completo o más del 50% dentro de la testa. 3. Protocormo 2, semillas que tenían más del 50% o todo el embrión, fuera de la testa. 4. Plántula 1, con una o dos hojas y 5. Plántula 2, con más de dos hojas. Cuando alcanzaron el estadio 2, los protocormos se transfirieron a Phy al 50% con una combinación de ácido naftalenacético y benciladenina en concentraciones de 0, 0.05, 0.1, 0.5 y 1.0 mgL⁻¹ para ambos reguladores de crecimiento. Donde se obtuvo mayor porcentaje de producción y desarrollo de PLBs fue con 0.1/0.5 mgL⁻¹ de ANA/BA (Pérez y Ávila, 2014).

Joaquín (2014) cultivó *Cuitlauzina pendula* en San Andrés Cihicahuaxtla, Putla, Oaxaca, y donde usó abono líquido fermentado elaborado con frutas (mango, melón, sandía, papaya y plátano 1:1:1:1:1), piloncillo y agua, y un testigo irrigado únicamente con agua; las variables evaluadas fueron: número de pseudobulbos, hojas, brotes, pedúnculos, flores y capsulas. Concluyó que la aplicación del abono líquido fermentado por vía foliar ayudó al desarrollo de la especie.

IV JUSTIFICACIÓN

Cuitlauzina pendula es una especie endémica de México, se encuentra en la NOM-059-SEMARNAT-2010 en la categoría de amenazada. Sus poblaciones son vulnerables debido a las actividades antrópicas, como la fragmentación del bosque mesófilo de montaña donde habita, tala inmoderada de sus forofitos, tumba, roza y quema; así como la extracción de sus ejemplares para utilizar sus inflorescencias con fines ornamentales y ceremoniales. Estas actividades han provocado que sus poblaciones disminuyan aceleradamente, además de que no se ha observado en la zona de estudio nuevos reclutamientos a pesar de que hay una alta producción de semillas.

Algunas de las estrategias para su conservación incluyen la protección *in situ*, así como el almacenamiento *ex situ* de semillas o ejemplares, sin embargo, para desarrollar estas estrategias se requiere estudiar la biología micorrízica de la especie en cuestión ya que la germinación de las semillas depende de los HMO que permanecen asociados a estas plantas durante toda su vida, por tanto, las estrategias de conservación deben contemplar el estudio y la conservación de este tipo de hongos.

De aquí la importancia de generar protocolos de conservación de esta especie amenazada a través de la propagación simbiótica, estudiando la asociación micorrízica (HMO). Esto permite la obtención de plantas más vigorosas y mejor adaptadas para supervivir en condiciones naturales.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Desarrollar un protocolo de germinación y desarrollo simbiótico *in vitro* de *Cuitlauzina pendula* inoculándola con hongos micorrízicos aislados de su hábitat natural que pueda ayudar en su conservación.

5.2. Objetivos particulares

Aislar y caracterizar los hongos micorrízicos de *Cuitlauzina pendula* de uno de sus hábitats naturales; un bosque mesófilo de montaña localizado en Putla Villa de Guerrero, Oaxaca.

Analizar la germinación asimbiótica de semillas de diferentes fuentes de la especie en condiciones *in vitro*.

Comparar el efecto de los hongos micorrízicos orquideoides aislados en semillas y en plántulas germinadas asimbióticamente.

En condiciones de invernadero estudiar la supervivencia de las plántulas de *Cuitlauzina pendula* inoculadas con los hongos micorrízicos orquideoides aislados.

VI MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Sitio de procedencia del geromoplasma

Las raíces y algunas cápsulas de *Cuitlauzina pendula* se recolectaron en un bosque mesófilo de montaña en San Andrés Chicahuaxtla, Putla Villa de Guerrero, Oaxaca. Este municipio se encuentra en la Sierra Madre del sur (INEGI, 2008), en los paralelos 16°45' y 16°56' de latitud norte; entre los meridianos y 97°43' y 98°07' de longitud oeste; presenta una altitud que va de los 400 a los 2800 m (Fig. 12).

La temperatura media anual oscila entre 12 a 26 °C, con una precipitación media anual entre 1 000 a 3 000 mm, los climas predominantes son subhúmedo, o semicálido subhúmedo, con lluvias en verano. Los suelos dominantes son: Luvisol, Cambisol, Leptosol, Phaeozem y Umbrisol. La vegetación predominante del sitio de recolecta es bosque mesófilo de montaña (INEGI, 2008), donde predominan *Oreopanax xalapensis*, *Ostrya virginiana* y *Quercus* spp. (Joaquín, 2014).

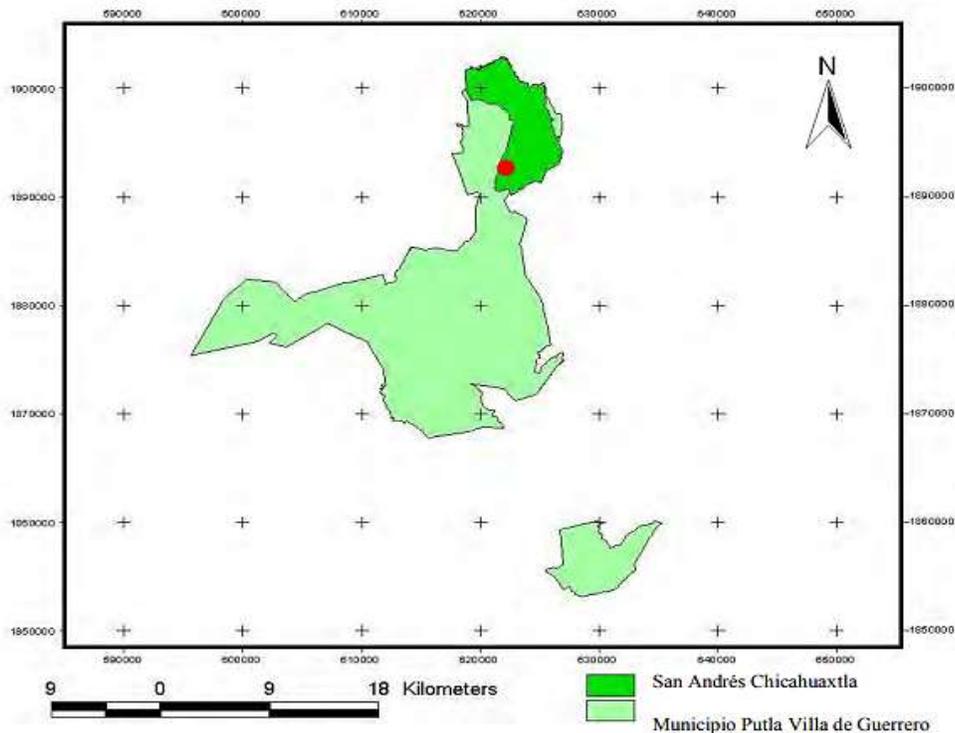


Figura 12. Ubicación en el área de estudio; en verde oscuro la comunidad San Andrés Chicahuaxtla y en rojo, el sitio de muestreo (Joaquín, 2014).

6.2 Recolecta de raíces

Las raíces y el germoplasma se recolectaron en junio y agosto del año 2015 y en junio del 2016. En cada fecha se recolectaron raíces de tres plantas que crecían en tres individuos diferentes de *Quercus crassifolia*. Además, en el último muestreo se cosecharon las raíces de *Prosthechea* sp., especie de orquídea asociada a *Cuitlauzina pendula*.

Se seleccionó un conjunto de raíces adheridas al forofito que se extrajeron completas desde la base del pseudobulbo hasta su ápice causando el menor daño posible a las plantas; las raíces se conservaron en papel aluminio con la materia orgánica acompañante para mantener la humedad y facilitar reconocer la polaridad (Figura 13 a y b). Las raíces recolectadas se mantuvieron en un recipiente con hielo durante su traslado al laboratorio para su procesamiento (Ortega, 2008).

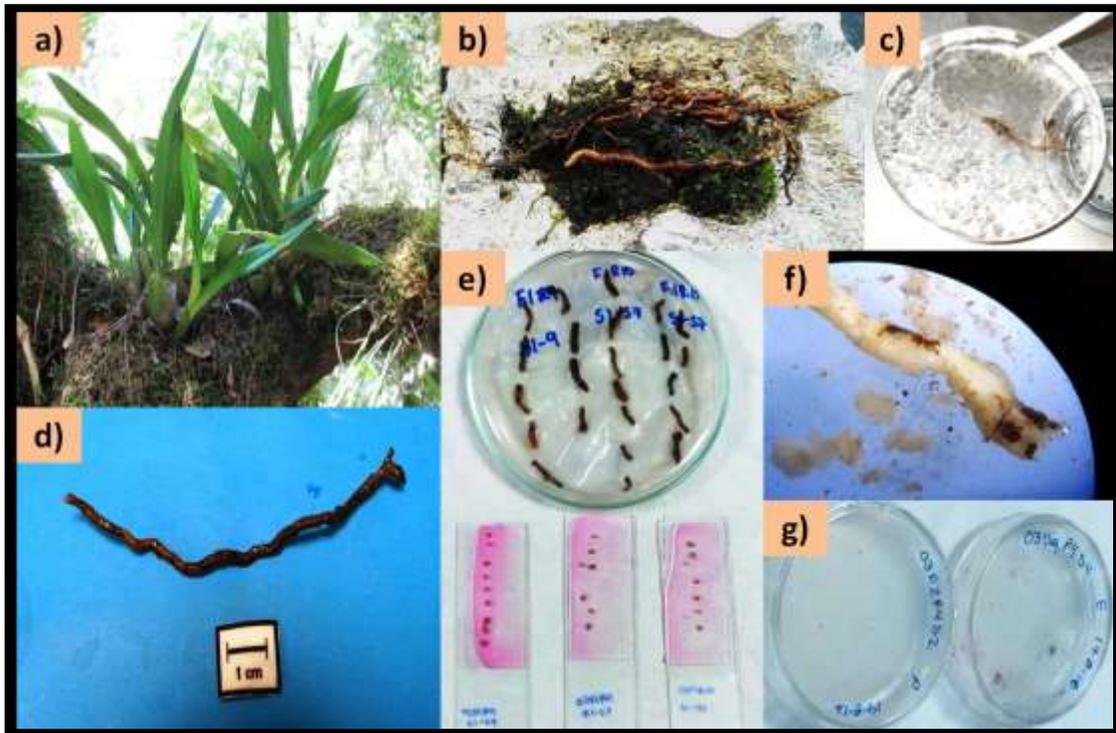


Figura 13. Procesamiento de las raíces de *Cuitlauzina pendula*; a) Planta en su hábitat natural, b) raíces recolectadas y materia orgánica asociada, c) retiro de materia orgánica adherida a la raíz, d) medición de raíz, e) secciones transversales de raíces y preparaciones semipermanentes, f) retiro del velamen para iniciar la técnica de aislamiento y g) cajas de Petri sembradas con explantes y pelotones.

6.2.1 Caracterización de la colonización micorrízica

Una vez en laboratorio, las raíces se lavaron con agua corriente y se seleccionaron tres de ellas con aspecto turgente. Éstas se cepillaron suavemente para retirar la materia orgánica adherida y se registró su longitud (Fig. 13 c y d). Cada raíz se dividió en segmentos de 0.5 cm a los que se seccionó transversalmente, los cortes fueron montados en preparaciones semipermanentes teñidas con fucsina ácida (0.1% en ácido láctico y glicerol) y alcohol polivinílico (PVLG) (Ortega, 2008) (Fig. 13e). Los cortes fueron observados en un microscopio óptico (VELAB MICROSCOPES, VE B-15) bajo un aumento de $40\times$ para seleccionar los segmentos con pelotones, indicativo de la colonización micorrízica orquideoide, para posteriormente aislar los HMO (Fig. 13 g).

Para evaluar el porcentaje de colonización micorrízica se usó el software ImageJ, éste permitió seleccionar áreas concretas de la raíz para obtener únicamente las áreas micorrizadas. El porcentaje de colonización se evaluó en 30 raíces y en aproximadamente 210 fragmentos. El método utilizado se adaptó al propuesto por Rasmussen y Whigham (2002) y Goh *et al.* (1992).

6.2.2 Aislamiento de HMO

Se seleccionaron algunos segmentos micorrizados a los cuales se les retiró el velamen con ayuda de una hoja de afeitar (Fig. 12 f). Bajo campana de flujo laminar y en condiciones estériles se inició con la desinfestación. Los segmentos fueron sumergidos en una solución al 10% de NaClO (marca Clorox®), ésta se agitó con un vórtex durante 10 min y enseguida los segmentos se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Con ayuda de agujas de disección estériles, bajo un microscopio estereoscópico (Olympus PL 1.5 \times 4), los pelotones fueron separados de los segmentos. Una vez desprendidos fueron tomados con ayuda de una pipeta y depositados en una caja de Petri con Medio de Aislamiento Fúngico (MAF) (Mitchell, 1989) (, Cuadro 8 del Anexo 2). En otra caja con la misma condición fueron colocados algunos explantes de raíces micorrizadas. Al término de la siembra se etiquetaron las cajas y se depositaron en una cámara de incubación a 24 ± 2 °C y una iluminación de $50 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con un fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad (Ortega, 2008).

En los días siguientes se observó si había crecimiento de hifas provenientes de pelotones o explantes, si esto sucedía se cultivaban las porciones terminales de las hifas en un medio de Papa-Dextrosa-Agar (PDA) 39 g/L (Cuadro 9 del Anexo 2) y se incubaron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

6.2.3 Reconocimiento de HMO y su tasa de crecimiento

Para la caracterización de los aislados sembrados en PDA se elaboraron laminillas para verificar que éstos presentaran las características del anamorfo *Rhizoctonia*. Bajo campana de flujo laminar se tomó una muestra del micelio y se montó en un portaobjetos dispersando las hifas a través de la laminilla, después se tiñó con fucsina ácida (0.1% en ácido láctico y glicerol) y se montaron en

resina PVLG, enseguida se observó en un microscopio óptico (VELAB MICROSCOPES VE B-15) para su identificación.

A los aislados que presentaron caracteres afines a *Rhizoctonia*, se les registró con el software Image-Pro.Plus.6 el ancho y largo de las hifas del septo basal en un mínimo de veinte campos distintos.

La tasa de crecimiento de la colonia se evaluó diariamente en mm/día en cuatro puntos equidistantes de la caja. Se cortó una circunferencia de 1 cm aproximadamente del aislado con ayuda de un sacabocados y se colocó en el centro de la caja de Petri que contenía un diámetro de 9 cm con el medio PDA. Las cajas se incubaron en las condiciones descritas anteriormente. Para la determinación del color de la colonia cuando las hifas alcanzaron el borde de la caja de Petri, se utilizaron las cartas de color de Munsell (Munsell, 1994).

6.2.4 Prueba enzimática

Para distinguir los aislados de *Epulorhiza* y *Ceratorhiza*, se sembraron los aislados de las mismas características que las descritas en el inciso anterior en un medio con ácido tánico (MAT) (Cuadro 10 del Anexo 2) y se depositaron en una cámara de incubación con las mismas condiciones descritas anteriormente. Se esperó a observar el crecimiento de la colonia sobre el medio para identificar a que género correspondía el aislado. Se documentó la presencia de un halo oscuro correspondiente a la degradación de los fenoles del medio de la parte posterior de la caja, si el halo estaba presente, el aislado corresponde al anomorfo *Cerathoriza*, si no, entonces se identificó como *Epulorhiza*. El medio con ácido tánico permite evidenciar la acción oxidativa de las enzimas celulosas y polifenol oxidasas (Davidson *et al.*, 1938; Zelmer *et al.*, 1996).

6.2.5 Tinción de núcleos hifales con DAPI (4'-6- diamino-2 fenilindol)

Con el fin de identificar el número de núcleos entre cada septo de una porción de hifa determinada se tiñeron con DAPI (4',-6- diamino-2 fenilindol). Se tomó una muestra de micelio de cada aislado, por separado cada una fue depositada y distribuida en una membrana de nitrocelulosa de 1.2 µm (Millipore®) sobre un filtro de vacío (Manifold Millipore®), luego se añadieron 200 µL de una solución de formaldehído a la muestra y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo se agregaron otros 200 µL de solución DAPI dejándola actuar en oscuridad completa durante una hora aproximadamente. Enseguida se realizaron tres lavados con agua destilada y fueron montadas las membranas con el micelio teñido en un portaobjetos adicionando 100 µL de glicerina-agua (1:1 v:v), se cubrieron con un cubreobjetos, para su posterior observación en un microscopio Olympus BX51 con módulo de fluorescencia.

6.2.6 Caracterización molecular

Algunos aislados que presentaron características correspondientes a los HMO, fueron seleccionados para corroborar su identidad molecular. Para la extracción de DNA se procedió a cultivar los aislados en medio líquido Caldo Papa Dextrosa Broth (PDB) (Cuadro 11 del Anexo 2), en tubos de 11 mL, siendo agitados a 120 rpm e incubados a 25 ± 1 °C con una iluminación de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 16/8 h luz-oscuridad por tres semanas. En condiciones estériles dentro de una cámara de flujo laminar, se tomó de cada aislado una parte del micelio de aproximadamente 3 μL que fueron colocados por separado en tubos Eppendorf de 0.2 mL con agua destilada estéril. Se realizaron tres lavados para cada aislado con ayuda de un agitador vórtex. Enseguida las muestras fueron colocadas en tubos Eppendorf estériles de 0.2 mL, a cada muestra se añadieron 10 μL de solución de extracción de ADN de plantas (Kit Red Extrac-N-Amp[™]Plant PCR QIAGEN ®). Estos tubos fueron colocados en un termociclador Axygen® Maxygene 2, durante 10 min a 65 °C y 19 min a 95 °C; al finalizar el proceso se adicionaron 30 μL de dilución buffer, dejándolos a temperatura ambiente una hora. Luego fueron colocadas las muestras a -20 °C para realizar posteriormente la amplificación.

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizaron para cada aislado 25 μL de la siguiente mezcla: 5 μL GoTaq® DNA Polymerase, 0.25 μL de ITS 1F, 0.25 μL de ITS 4, 3 μL de DNA en una dilución 1 a 3 (v:v) y 16.5 μL de agua libre de nucleasas, la mezcla se homogenizó en un vórtex. La amplificación del DNA se realizó en un termociclador Axygen® Maxygene 2. El inicio de la desnaturalización se llevó a cabo a 95 °C durante 2 minutos, seguidos de una serie de 35 ciclos que comprendieron la desnaturalización a 95 °C por un minuto, enseguida se hizo la adhesión de los primers a 55 °C durante un minuto y con la extensión a 72 °C por un minuto. Al término de los 35 ciclos continuo la elongación a 72 °C por ocho minutos.

El gel para la electroforesis se preparó disolviendo agarosa al 1% en 100 mL de solución Tris-Borato-EDTA (TBE), enseguida se adicionaron 2 μL de colorante Midori Green® y se dejó solidificar, después se mezclaron 5 μL del producto de PCR y 2 μL de Loading Dye, 6X (PROMEGA®) y fueron depositados en cada pozo de la cámara de electroforesis, a la corrida se añadió una muestra control negativa (blanco sin DNA amplificado) y un control positivo, amplificando el ADN en las mismas condiciones ya mencionadas de un HMO previamente secuenciado. Para finalizar se colocó la placa dentro de la cámara de electroforesis y se corrió con TBE 1x a 86 voltios alrededor de 40 min. La placa se reveló bajo luz UV. Los productos que amplificaron adecuadamente fueron enviados al laboratorio Macrogen para su secuenciación.

Se hizo una secuencia consenso en formato FASTA, éstas se alinearon con el programa Muscle V3.8.31 cortando las colas correspondientes a los primers que no integraban información de la región amplificada de interés con ayuda del programa trimAL. A cada secuencia se le realizó un Blast (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) a través de la página National Center for Biotechnology Information (NCBI), con el fin de compararlas con la base de datos del GenBank del NCBI, se

estableció una comparación con 100 secuencias, con un nivel de significancia de 70% de similitud con la secuencia de consulta. Con las secuencias alineadas se generó un árbol filogenético con el método de máxima verosimilitud a través del programa IQtree utilizando secuencias de mayor similitud a la secuencia consenso. Se utilizó un soporte estadístico de 1000 bootstrap's.

6.2.7 Almacenamiento en el banco de germoplasma de los HMO

Los aislados pertenecientes a HMO fueron cultivados bajo condiciones estériles en tubos Pyrex® de 11 mL sobre un medio PDA inclinado, enseguida se introdujeron en la cámara de incubación descrita anteriormente bajo condiciones de oscuridad completa hasta su recrecimiento completo, finalmente se cubrió con aceite mineral estéril para su almacenamiento a largo plazo. Los aislados quedaron bajo el resguardo del Banco de Germoplasma de Hongos Micorrízicos Orquideoides del Laboratorio Microcosmos Bioedáfico del Departamento de Edafología del Instituto de Geología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Registrados en los códigos mostrados en la figura 15.

6.3 Recolecta de cápsulas y prueba de viabilidad con tetrazolio

En el mes de agosto 2015 y julio 2016 en el sitio de estudio antes descrito se recolectaron 17 cápsulas de tres individuos diferentes desde el escapo floral (ocho en agosto y siete en junio) todas antes de la apertura (Fig. 14, a-e). Otra cápsula en estado maduro y dehiscente de un cultivo en invernadero de *Cuitlauzina pendula* fue donada por el Dr. Eduardo Alberto Pérez García del Departamento de Ecología y Recursos Naturales de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Se desconoce el sitio de recolecta y el método de almacenamiento (Fig. 14, f). Todas las cápsulas se secaron en bolsas de papel estraza para que perdieran humedad y se depositaron en un deshumificador PROCAN® con 20% de H.R., a una temperatura de 4 °C. Una vez secas y en dehiscencia las semillas fueron extraídas y almacenadas en viales Cry® de 1.2 mL y permanecieron almacenadas en el deshumificador hasta su siembra.

El proceso de desinfestación de las semillas puede reducir la viabilidad razón por la cual, se decidió evaluarla antes de este procedimiento. Se utilizó la prueba de tetrazolio (2, 3, 5 cloruro de tetrazolio) que se basa en que la solución incolora de 2,3,5-trifenil cloruro de tetrazolio al entrar en contacto con los tejidos vivos de las semillas pasa por una reacción de óxido-reducción donde las enzimas deshidrogenasas reducen la solución tornándola en un color rojo/rosa (Gallo *et al.*, 2015). Para esto se pesó 1 mg de semillas de *C. pendula* que se transfirieron a un microtubo de 1.5 mL y se añadieron 1.3 mL de solución de sacarosa al 10 %, se dejó reposar en el microtubo a 25 °C por 24 h. Después de este tiempo se retiró la solución usando una micropipeta, enseguida se colocó 1

mL de solución de tetrazolio al 1% y se dejó en baño maría a 40 °C durante 24 h. Al término del reposo se reemplazó la solución de tetrazolio con 1 mL de agua destilada (Machado *et al.*, 2009). Para la evaluación de la viabilidad se colocó la solución con las semillas en un porta objetos y se revistió con el cubre objetos, el conteo se realizó inmediatamente después de terminar la técnica en un microscopio estereoscópico (LEICA MZ 12₅).

Se utilizó una hoja milimétrica y por cuadrantes se tomaron microfotografías a un aumento de 1.6× para posteriormente utilizar el programa ImageJ Launcher para agilizar su conteo. Las semillas fueron clasificadas de acuerdo con su coloración para determinar su viabilidad. Las que presentaron colores de rojo-vino a rojo-naranja fueron consideradas viables; aquellas pálidas sin embrión y manchadas o sin coloración se consideraron no viables.

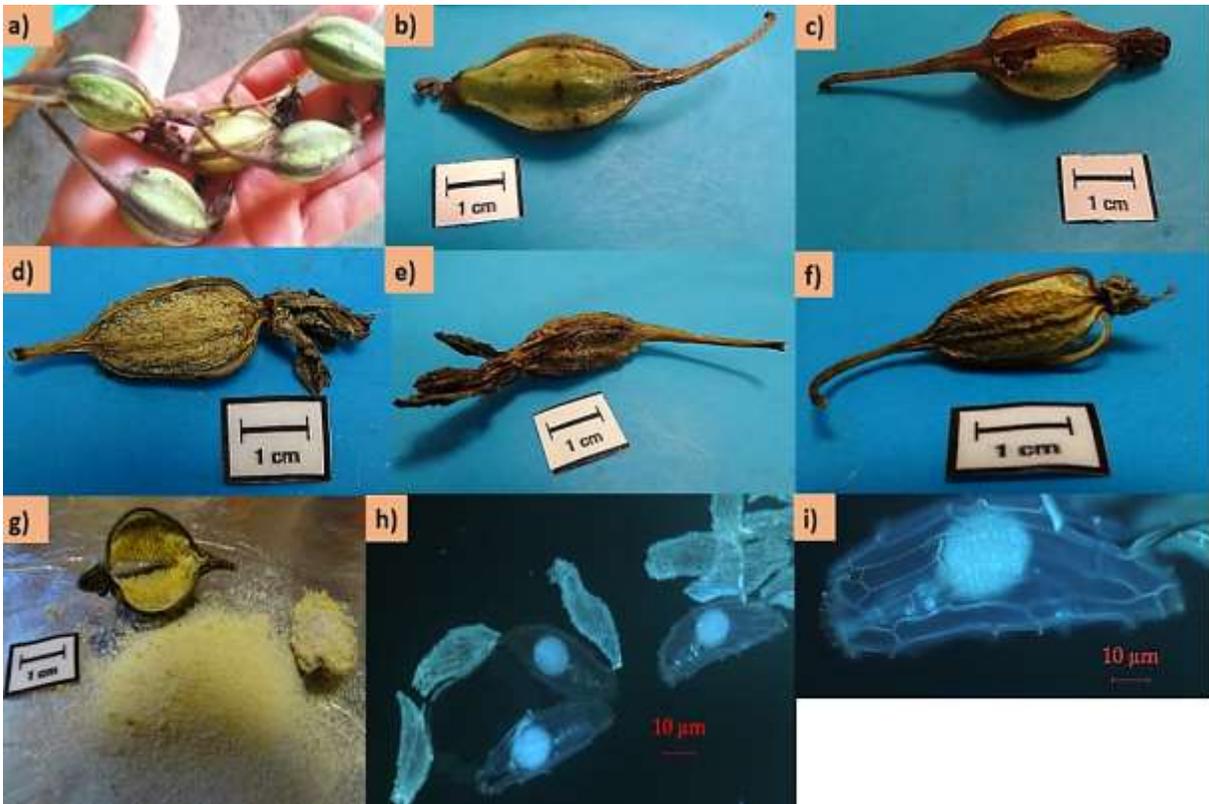


Figura 14. Material biológico de *Cuitlauzina pendula*. a-e) cápsulas procedentes de campo, f) cápsula proveniente de invernadero, g) semillas, h-i) semillas con embrión.

6.3.1 Desinfestación de las semillas

En la desinfestación de las semillas se probaron distintos protocolos (Cuadro 1), todos se realizaron bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar con una muestra de 0.02 g de semillas para todas las cápsulas. Al finalizar cada protocolo se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril y en seguida se hicieron las pruebas de viabilidad bajo las condiciones antes descritas.

Cuadro 1. Protocolos de desinfestación de semillas de *Cuitlauzina pendula*.

No. Protocolo	Depósito	NaClO	H ₂ O ₂	Ca(ClO) ₂	C ₂ H ₆ O	Tween 20	Número de planta (P) y cápsula (C)
0		10 min [10 %]					P 6, C 1 P 6, C 3 P 7, C 9 P 8, C15
1		10 min [15 %]					P 7, C 9
2		10 min [30 %]				1 gota	P 7, C 9
3	Sobre	20 min [20 %]					P 7, C 9
4			10 min [10 %]			1 gota	P 7, C 9
5				10 min [30 %]			P 7, C 9
6				30 min [10 %]			P 7, C 9
7		30 min [20 %]			10 min [10 %]	1 gota	P 7, C 9
8	Jeringa	30 min [20 %]			2 min [15 %]		P7, C 9 P 9, C 14 P 7, C 15 P 10, C 22
9		10 min [10 %]					P7, C 9 P 8, C15 P 10, C 22

6.3.2 Germinación asimbiótica de semillas

Los protocolos de desinfección descritos, se probaron con tres réplicas para los medios de cultivo MS y KC (Cuadro 12 y 14 del Anexo 2). La siembra de 0.02 g de semillas se realizó en cajas de Petri desechables de 9 cm de acuerdo con el método de la jeringa o sobre. Al término de la siembra se depositaron en una cámara de incubación de cultivo a 24 ± 2 °C y una iluminación de 50 micromoles $m^{-2} s^{-1}$, con un fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad.

Después de evaluar los protocolos de desinfección, la viabilidad de las semillas y los medios de cultivo, se decidió utilizar el protocolo nueve (Cuadro 1) y el medio de cultivo MS para llevar a cabo la germinación asimbiótica (Fig. 15) y las pruebas de inoculación post-germinación (Fig. 17). Se observó que los mayores porcentajes de germinación se registraron en la cápsula procedente del cultivo en invernadero. Por tanto, se decidió cultivar estas semillas en el medio mencionado, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, con seis réplicas. Por otra parte, para los tratamientos sin fuente de carbono se usó el Medio Básico de Avena (MBA) (Cuadro 13 del Anexo 2) al 50 % (Fig. 15) con el mismo número de repeticiones y condiciones antes descritas del experimento previo, las plántulas obtenidas del medio KC se decidió inocularlas con HMO (Fig. 18) con el propósito de utilizar el material generado.

El conteo de las semillas, los protocormos y las plántulas obtenidas se realizó el segundo día de la siembra que se consideró como tiempo cero (T0), posteriormente se evaluó la germinación y el desarrollo de las plántulas cada dos semanas por un periodo de 29 semanas.

6.3.3 Germinación simbiótica de semillas

Con una anticipación de cuatro días se pusieron a crecer los HMO obtenidos y seleccionados previamente en MBA. Se depositaron en el centro de la caja de Petri, se incubaron en oscuridad a una temperatura de 24 ± 2 °C; al término de este tiempo se sembraron 0.02 g de semillas de *Cuitlauzina pendula* previamente desinfectadas con el protocolo 9, Cuadro 1 alrededor del centro de la caja. Las cajas se sellaron con Egapack y se etiquetaron incubándose bajo las mismas condiciones antes descritas. El conteo de semillas, protocormos y plántulas fue el mismo que el asimbiótico.

Las variables de respuesta fueron los estadios de germinación y el desarrollo de las plántulas adaptados y modificados a partir de Nava y col. (2011), quienes los propusieron para *Laelia eyermaniana* y el descrito por Pérez (2014) para *Cuitlauzina pendula* (Fig. 16). En este estudio, se consideró que la germinación había ocurrido a partir del estadio tres, cuando el protocormo era fotosintético, donde la síntesis de clorofila para esta especie indicaba multiplicación celular.

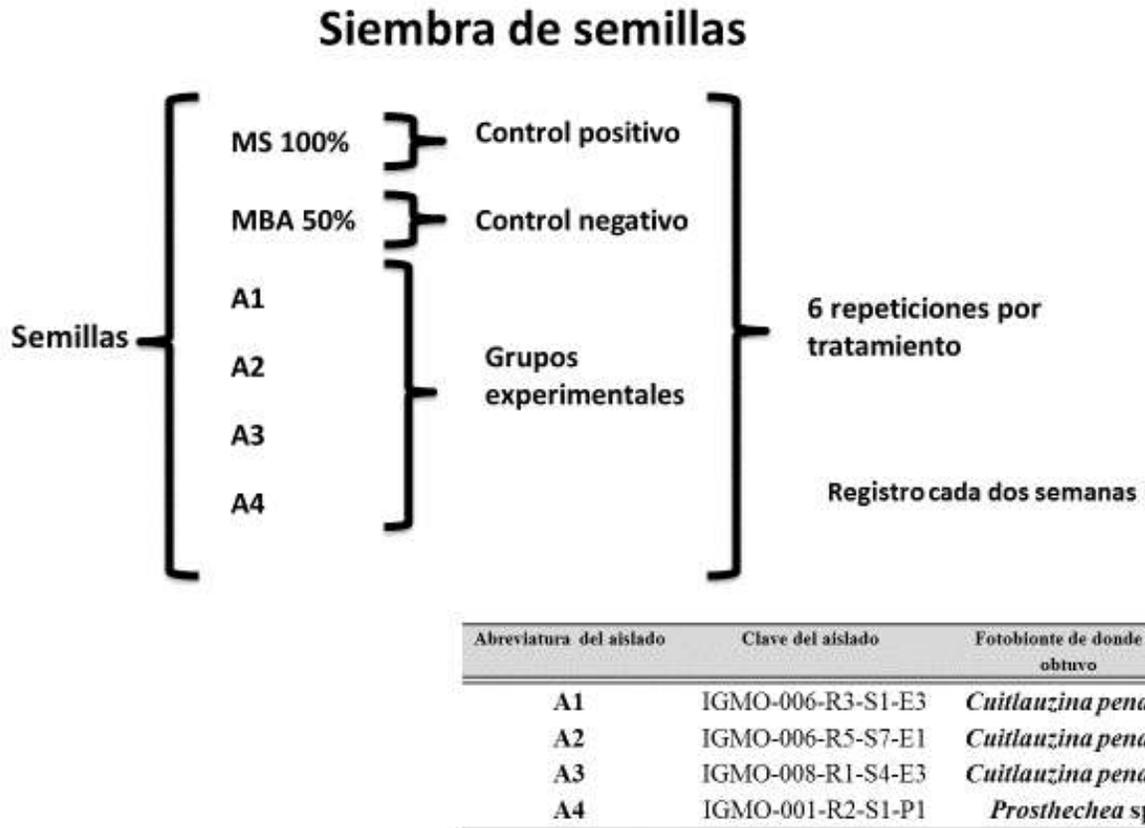


Figura 15. Diseño experimental para la germinación simbiótica de las semillas de *Cuitlauzina pendula in vitro*.

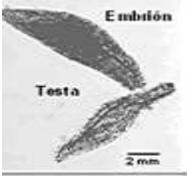
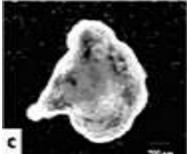
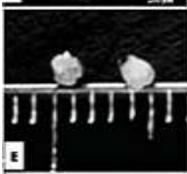
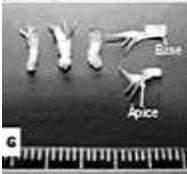
<p>Nava et al., (2011) <i>Laelia Eyermaniana</i></p>	<p>Pérez et al., (2014) <i>Cuitlauzina pendula</i></p>	<p>Propuesto por Meneses (2015) <i>Cuitlauzina pendula</i></p>
 <p>Estadio 0 Semilla no germinada</p>		 <p>Estadio 0 Semilla no germinada con embrión</p>
 <p>Estadio 1 Protocormo no fotosintético</p>	<p>Estadio 1 Semillas con el embrión reducido a un 50% o menos dentro de la testa</p>	 <p>Estadio 1 Hincharse del embrión con o sin rompimiento de la testa (imbibición)</p>
 <p>Estadio 2 Protocormo fotosintético</p>	<p>Estadio 2 Protocormo 1. Semillas con embrión en forma globular completo o más del 50% dentro de la testa</p>	 <p>Estadio 2 Protocormo fotosintético</p>
 <p>Estadio 3 Protocormo en diferenciación</p>	<p>Estadio 3 Protocormo 2. Semillas con más del 50% o todo el embrión, fuera de la testa</p>	 <p>Estadio 3 Protocormo con ápice foliar</p>
 <p>Estadio 4 Plántula con dos hojas</p>	<p>Estadio 4 Plántula 1. Con una o dos hojas</p>	 <p>Estadio 4 Desarrollo de hojas (Dos hojas)</p>
 <p>Estadio 5 Plántula con hojas y raíz</p>	<p>Estadio 5 Plántula 2. Con más de dos hojas</p>	 <p>Estadio 5 Plántula con hojas más de dos hojas y raíz</p>

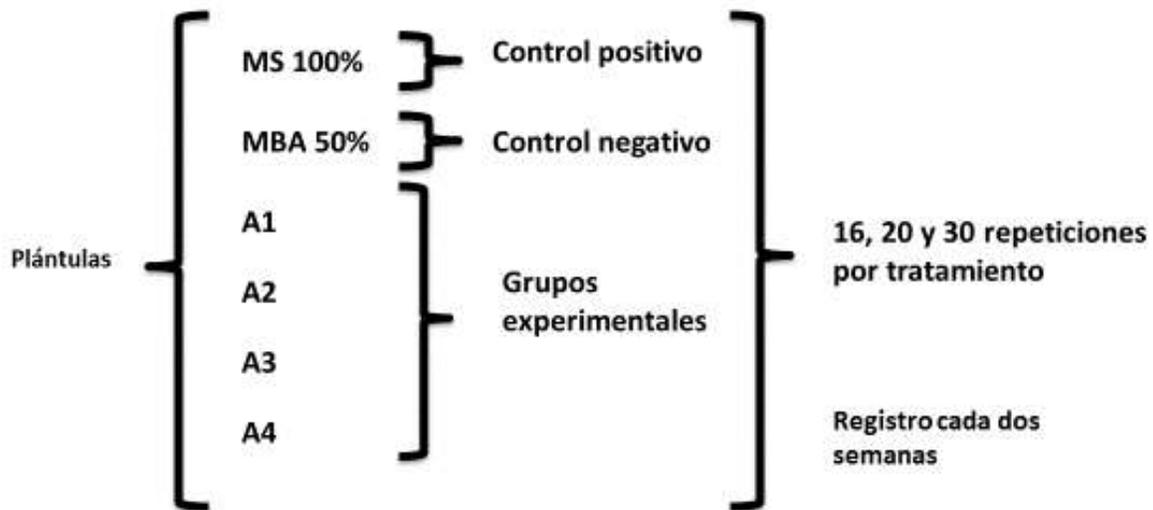
Figura 16. Esquema comparativo de propuestas de clasificación de los estadios de desarrollo en las orquídeas epífitas *Laelia eyermaniana* y *Cuitlauzina pendula* con la clasificación propuesta y utilizada en el presente trabajo.

6.3.4 Cultivo simbiótico de plántulas de *Cuitlauzina pendula* germinadas asimbióticamente

Se realizó un cultivo simbiótico post-germinación de las plantas de *Cuitlauzina pendula* que se desarrollaron asimbióticamente en los medios MS y KC. Se emplearon tres tamaños diferentes de plántulas, dos provenientes del medio MS (1 y 3 cm de altura promedio) y uno del medio KC (0.50 cm de altura promedio). Consultar las merísticas iniciales promedio en Anexo 4, cuadros 16, 17 y 18.

A partir de estos tamaños, se realizó la inoculación postgerminación con los tratamientos que a continuación se describen: como control negativo se utilizó el medio MBA 50%, como control positivo MS 100% y los grupos experimentales de inoculación con los mismo aislados utilizados para la germinación simbiótica (A 1, A 2, A 3, A 4) (Fig. 17). En los grupos experimentales con los aislados, éstos fueron puestos a crecer en MBA en la parte central de los frascos cuatro días antes sembrar las plantas. Se emplearon frascos con una capacidad de 250 mL. Las condiciones de incubación fueron las antes descritas y se realizó un registro merístico cada dos meses durante seis meses, de las siguientes variables: altura total, número, largo y diámetro del pseudobulbos, número y largo de la hoja más desarrollada y número y largo de la raíz de mayor longitud.

Inoculación general de plántulas



Abreviatura del aislado	Clave del aislado	Fotobionte de donde se obtuvo
A1	IGMO-006-R3-S1-E3	<i>Cuitlauzina pendula</i>
A2	IGMO-006-R5-S7-E1	<i>Cuitlauzina pendula</i>
A3	IGMO-008-R1-S4-E3	<i>Cuitlauzina pendula</i>
A4	IGMO-001-R2-S1-P1	<i>Prosthechea sp.</i>

Figura 17. Diseño experimental para la inoculación micorrízica de plántulas de *Cuitlauzina pendula in vitro*; 16, 20 y 30 repeticiones por tratamiento en los tamaños 1, 3 y 0.5 cm respectivamente.

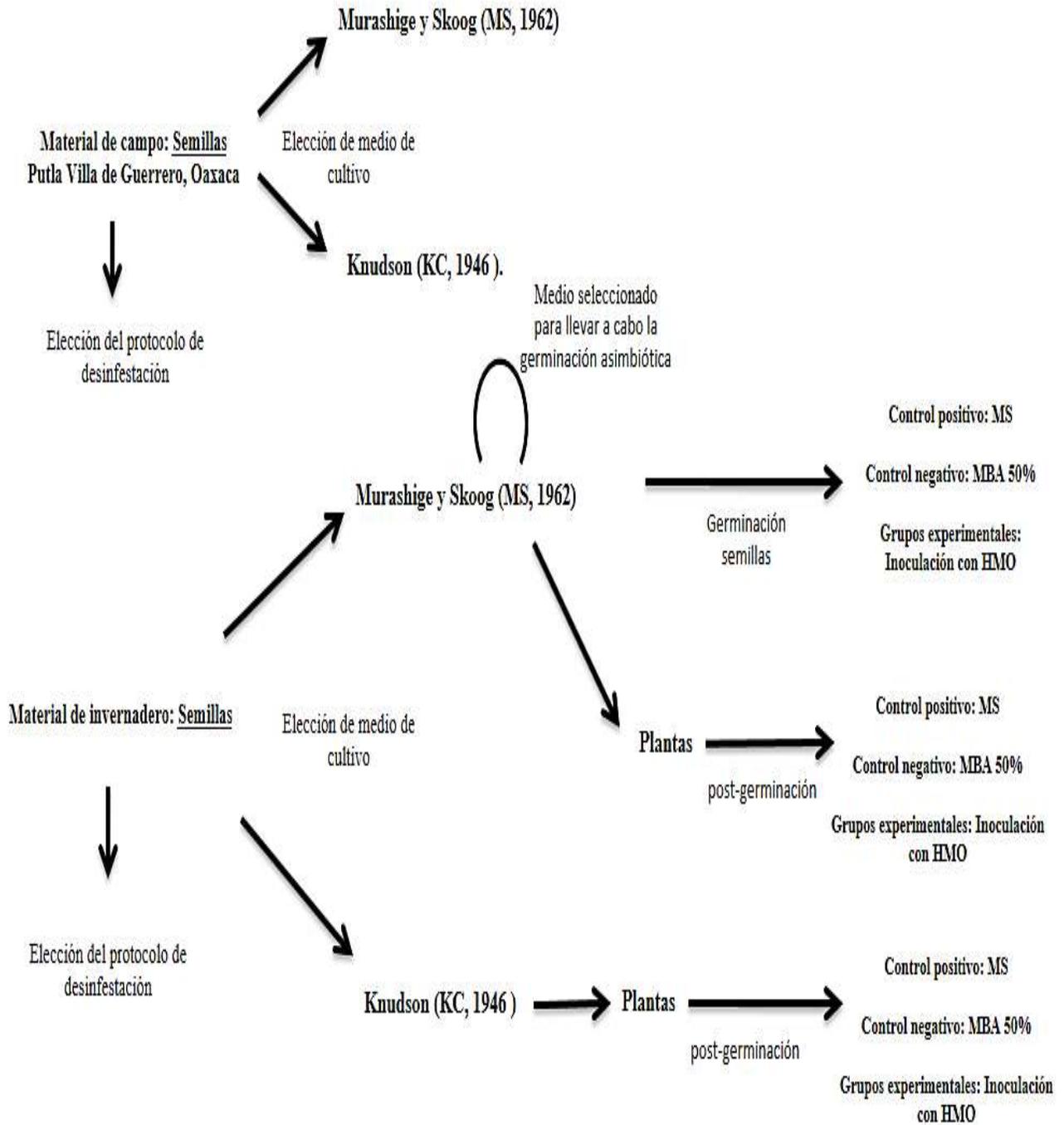


Figura 18. Procedencia del material biológico y experimentación en la propagación *in vitro* de *Cuitlauzina pendula*. HMO= hongos micorrízicos orquideoides.

6.4. Establecimiento en condiciones de invernadero de plántulas pregerminadas asimbióticamente y cultivadas simbióticamente de *Cuitlauzina pendula*.

Después de seis meses de cultivo de plántulas de *Cuitlauzina pendula* en los tratamientos MS (control positivo), MBA (control negativo) y con la inoculación de los aislados: A1, A2, A3 y A4 (controles experimentales) de los tres tamaños distintos; éstas se establecieron en condiciones de invernadero a 21 °C. Las raíces de las plántulas se lavaron con agua corriente para eliminar el agar adherido y evitar la proliferación de hongos o bacterias, posteriormente se plantaron en un sustrato compuesto por corteza de encino, peat moss y agrolita 2:1:1 v:v, mezclado de manera uniforme. Las charolas tenían tapas perforadas y un buen drenaje. Después de tres meses de estar en invernadero se evaluó la supervivencia contabilizando el número de plántulas que sobrevivieron.

6.5. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el software GraphPad Prism, versión 6 ®. La colonización micorrízica por planta y de segmentos y los análisis morfométricos de los aislados donde se evaluaron el largo, ancho y la distancia del septo basal de las hifas, fueron analizados mediante un ANOVA de una vía, siguiendo con una prueba de Tukey-Kramer para determinar si se encontraban diferencias significativas ($p \leq 0.05$). La viabilidad de las semillas, así como la germinación fue analizada de la misma forma.

Las pruebas de inoculación post-germinación se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA), siguiendo con un test de Dunnett's, para este análisis se eligió comparar con el control negativo (MBA) respecto a los demás tratamientos con intervalos de confianza de ($p \leq 0.05$).

VII RESULTADOS

7.1 Caracterización de la colonización de hongos micorrízicos orquideoides en raíces de *Cuitlauzina pendula* y *Prosthechea* sp.

La colonización de HMO en las raíces recolectadas de *Cuitlauzina pendula* varió de 39 a 68 % en promedio registrándose diferencias significativas entre algunas de las plantas ($p \leq 0.05$) (Fig. 20). También se encontraron diferencias en el porcentaje de colonización a lo largo de la raíz, disminuyendo de la parte proximal a la distal ($p \leq 0.05$) (Fig. 21, Cuadro 15 del Anexo 3), de hecho, sólo en una se observó colonización en la porción distal. Además, los HMO se distribuyeron en el córtex de forma homogénea en todas las raíces. *Prosthechea* sp., presentó un patrón similar de colonización al de *C. pendula* (Fig. 19).

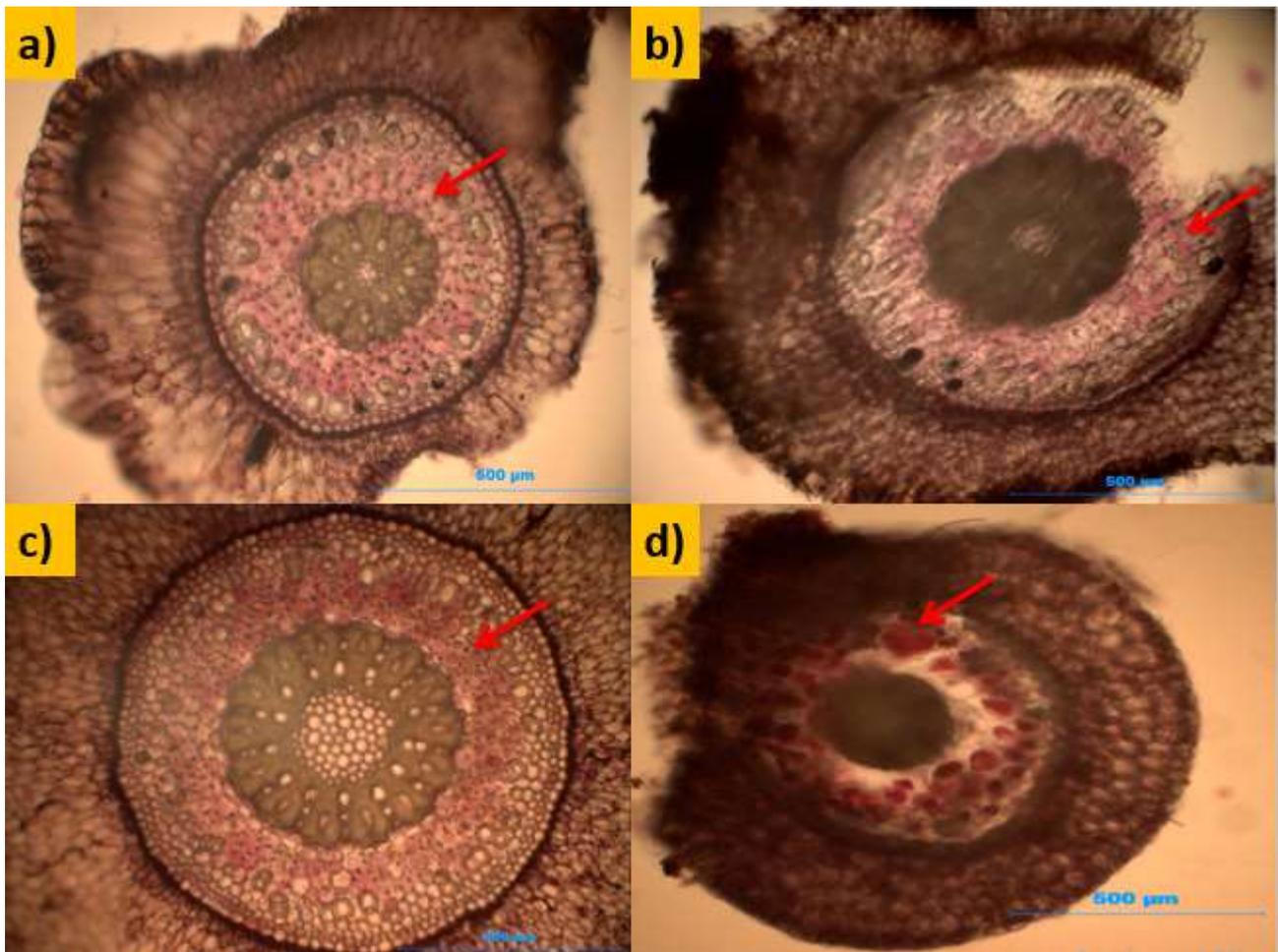


Figura 19. Secciones transversales de las raíces teñidas con fucsina ácida de *Cuitlauzina pendula* (a-c) y *Prosthechea* sp. (d) de las cuales se obtuvieron los aislados 1-4. Las flechas indican la zona de colonización por HMO. Fotos: Meneses, 2017.

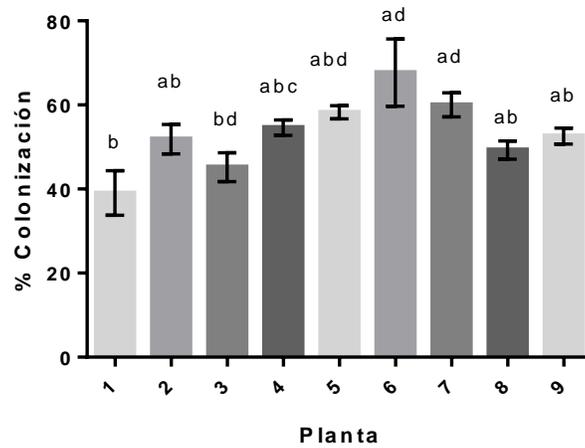


Figura 20. Porcentaje de colonización micorrízica de distintos ejemplares de *Cuitlauzina pendula* (letras distintas indican diferencias significativas $p \leq 0.05$).

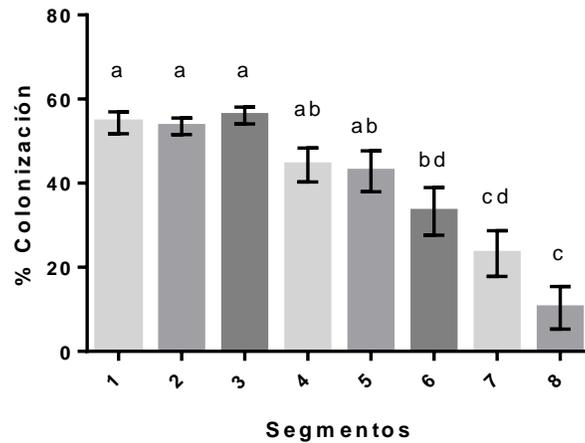


Figura 21. Porcentaje de colonización total promedio por segmento de *Cuitlauzina pendula* (letras distintas indican diferencias significativas $p \leq 0.05$).

7.1.2 Hongos micorrízicos orquideoides obtenidos a partir de raíces de *Cuitlauzina pendula* y *Prosthechea* sp.

De las 10 plantas y 30 raíces procesadas se obtuvieron diez aislados que tenían características afines a *Rhizoctonia*, siete provenientes de *Cuitlauzina pendula* y tres de *Prosthechea* sp. (Cuadro 2). De acuerdo con las características morfológicas, se escogieron los cultivos de HMO que difirieron

morfológicamente, seleccionándose cuatro aislados, tres de *C. pendula* y uno de *Prosthechea* sp. mismos que fueron utilizados para el resto de los experimentos.

Cuadro 2. Aislados de hongos micorrízicos orquideoides obtenidos de raíces de *Cuitlauzina pendula* y *Prosthechea* sp. En negritas los aislados seleccionados en el trabajo experimental.

Aislado	Clave del aislado	Fotobionte de donde se obtuvo	Fecha de recolecta
A1	006-R3-S1-E3	<i>Cuitlauzina pendula</i>	23/05/2015
A2	006-R5-S7-E1	<i>C. pendula</i>	23/05/2015
A3	008-R1-S4-E3	<i>C.pendula</i>	23/05/2015
A4	001-R2-S1-P1	<i>Prosthechea</i> sp.	23/05/2015
A5	008-R1-S4-E1	<i>C. pendula</i>	23/05/2015
A6	008-R1-S4-E4	<i>C. pendula</i>	23/08/2015
A7	008-R1-S4-E5	<i>C. pendula</i>	23/08/2015
A8	008-R1-S4-E6	<i>C. pendula</i>	19/06/2016
A9	001-R2-S1-P2	<i>Prosthechea</i> sp.	19/06/2016
A10	001-R2-S1-E2	<i>Prosthechea</i> sp.	19/06/2016

Clave del aislado: No. de planta seguido de la raíz (R) y del segmento (S), el método de obtención se marca como E= Explante y P= Pelotón.

7.1.3 Caracterización morfológica de los hongos micorrízicos orquideoides

El diámetro de las hifas de los aislados seleccionados varió de 4.02 a 4.85 μm , y la distancia del septo basal de 3.25 a 4.23 μm , encontrándose diferencias significativas en estos parámetros en el aislado 3 en comparación con los otros ($p \leq 0.05$), no se registraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento entre los cuatro aislados ($p \leq 0.05$) (Cuadro 3). Además, no se observó desarrollo de células monilioides en ninguno de los aislados y todos presentaron células binucleadas en sus hifas (Figura 23). Se observaron diferencias en el aspecto de los aislados, mostrando variación en los anillos de crecimiento y en su aspecto algodonoso (Fig. 22). Por sus características morfológicas los cuatro aislados correspondieron al anamorfo *Ceratorhiza*, esto se corroboró con la prueba enzimática utilizando ácido tánico la cual fue positiva (Fig. 24).

Cuadro 3. Morfometría y aspecto de las colonias de HMO de las orquídeas *Cuitlauzina pendula* y *Prosthechea* sp. (letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$)).

Aislado	Color	Aspecto de la colonia	Diámetro de la hifa (μm)	Distancia septo basal (μm)	Tasa de crecimiento (mm/día)	Reacción a la polifenoloxidasa
A1	5y 8/2 pálido/amarillo	ligeramente algodonosa, anillos laxos	4.70 ± 0.14^a	3.94 ± 0.17^a	1.40 ± 0.27^a	Positiva
A2	5y 8/2 pálido/amarillo	ligeramente algodonosa, anillos bien marcados	4.67 ± 0.15^a	3.96 ± 0.11^a	1.60 ± 0.25^a	Positiva
A3	5y 8/3 pálido/amarillo	ligeramente algodonosa, anillos laxos	4.02 ± 0.10^b	3.25 ± 0.07^b	1.45 ± 0.25^a	Positiva
A4	5y 8/1 pálido/amarillo	ligeramente algodonosa, anillos bien marcados	4.85 ± 0.13^a	4.23 ± 0.12^a	1.70 ± 0.30^a	Positiva

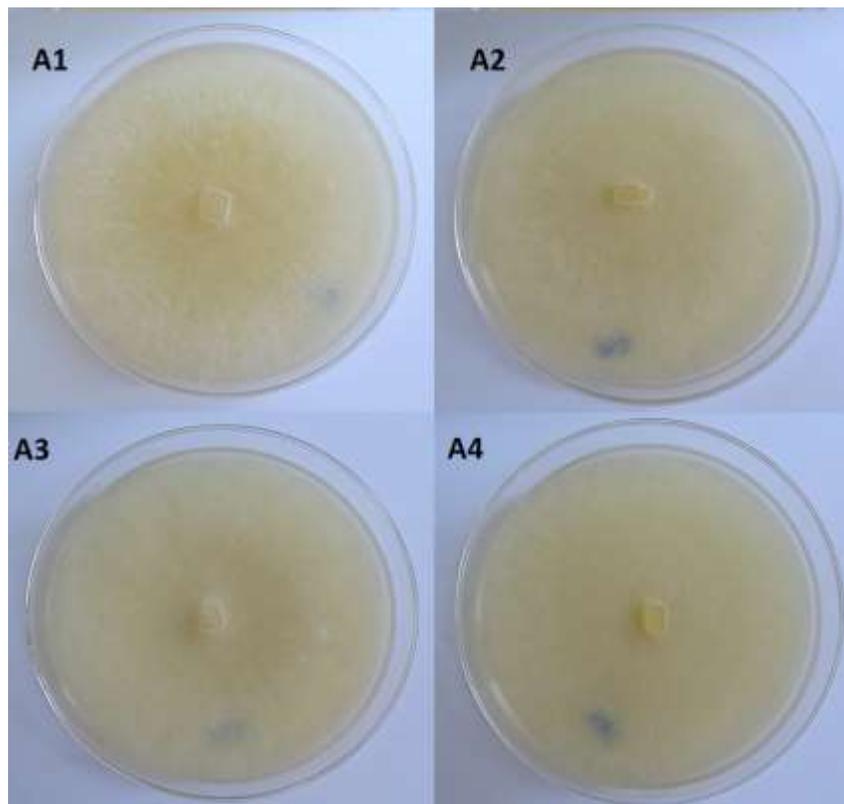


Figura 22. Aspecto de las colonias de los aislados micorrízicos seleccionados de *Cuitlauzina pendula* (aislados 1-3) y *Prosthechea* sp. (aislado 4). Fotos: Meneses, 2017.

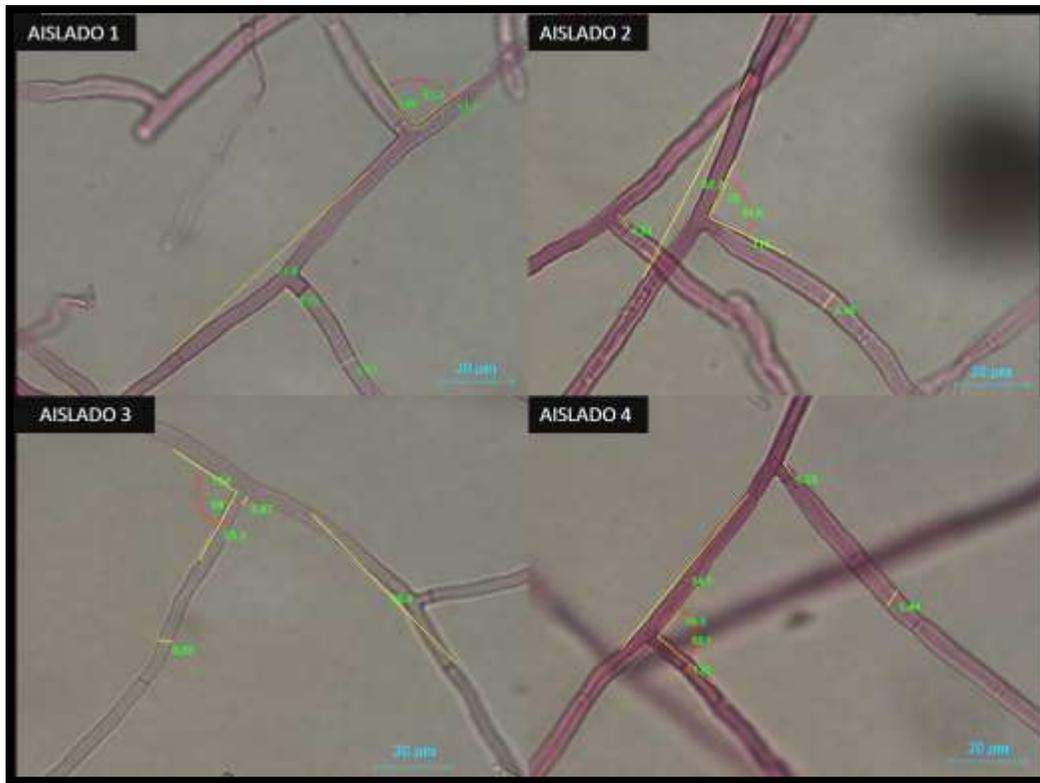


Figura 23. Morfometría de los aislados seleccionados de *Cuitleuzina pendula* (aislados 1-3) y *Prosthechea* sp. (aislado 4). Fotos: Meneses, 2017.

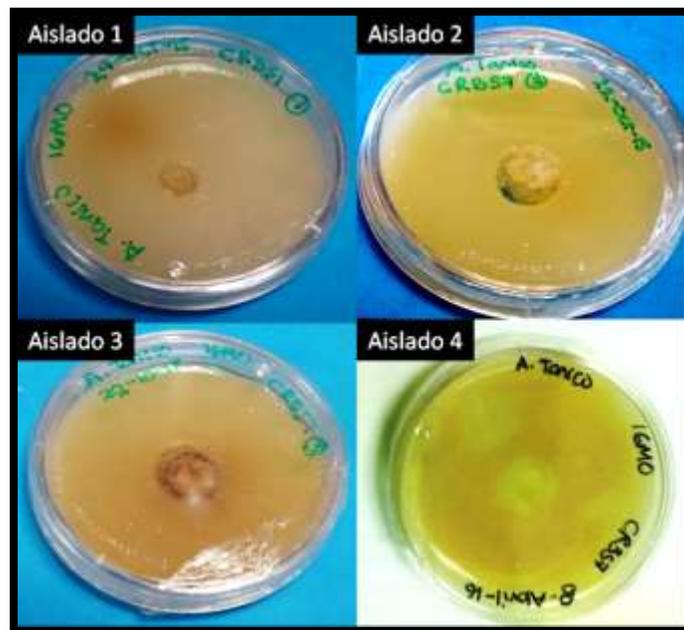


Figura 24. Prueba con ácido tánico de los aislados seleccionados. La prueba fue positiva en todos los aislados por lo que corresponden al anamorfo *Ceratorhiza*. Fotos: Meneses, 2017.

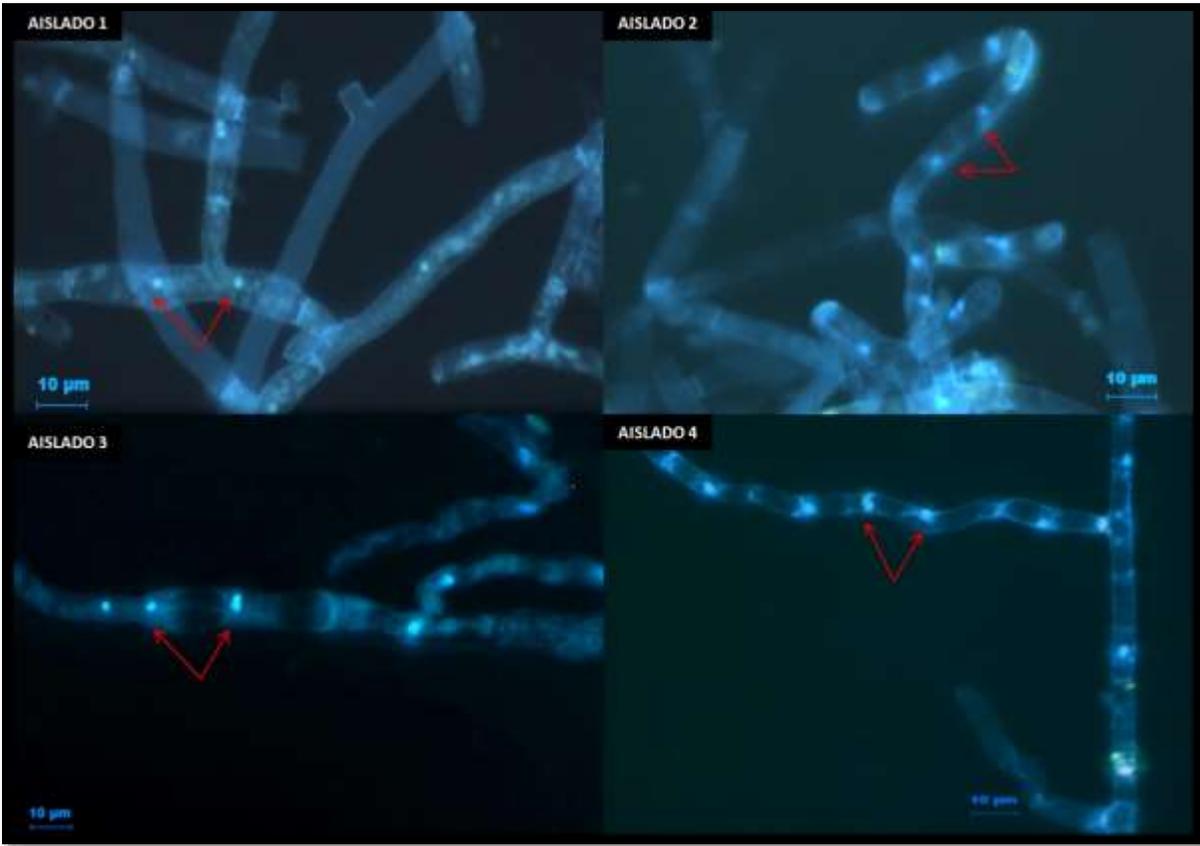


Figura 25. Tinción de núcleos con DAPI de los aislados seleccionados. Las flechas señalan los núcleos presentes en una sola célula de la hifa. Fotos: Meneses, 2017.

7.1.4 Identificación molecular de los aislados

Las secuencias obtenidas de los aislados de *Cuitlauzina pendula* y *Prosthechea* sp. (aislados 1-4) presentaron aproximadamente 830 pb. La figura 26 muestra las relaciones filogenéticas que tienen los aislados en comparación con las secuencias más similares obtenidas del Gen Bank. Se usó como grupo externo a *Paecilomyces anatarcticus*, un hongo perteneciente al Phylum Ascomycota. Los números entre las ramas indican el valor bootstrap.

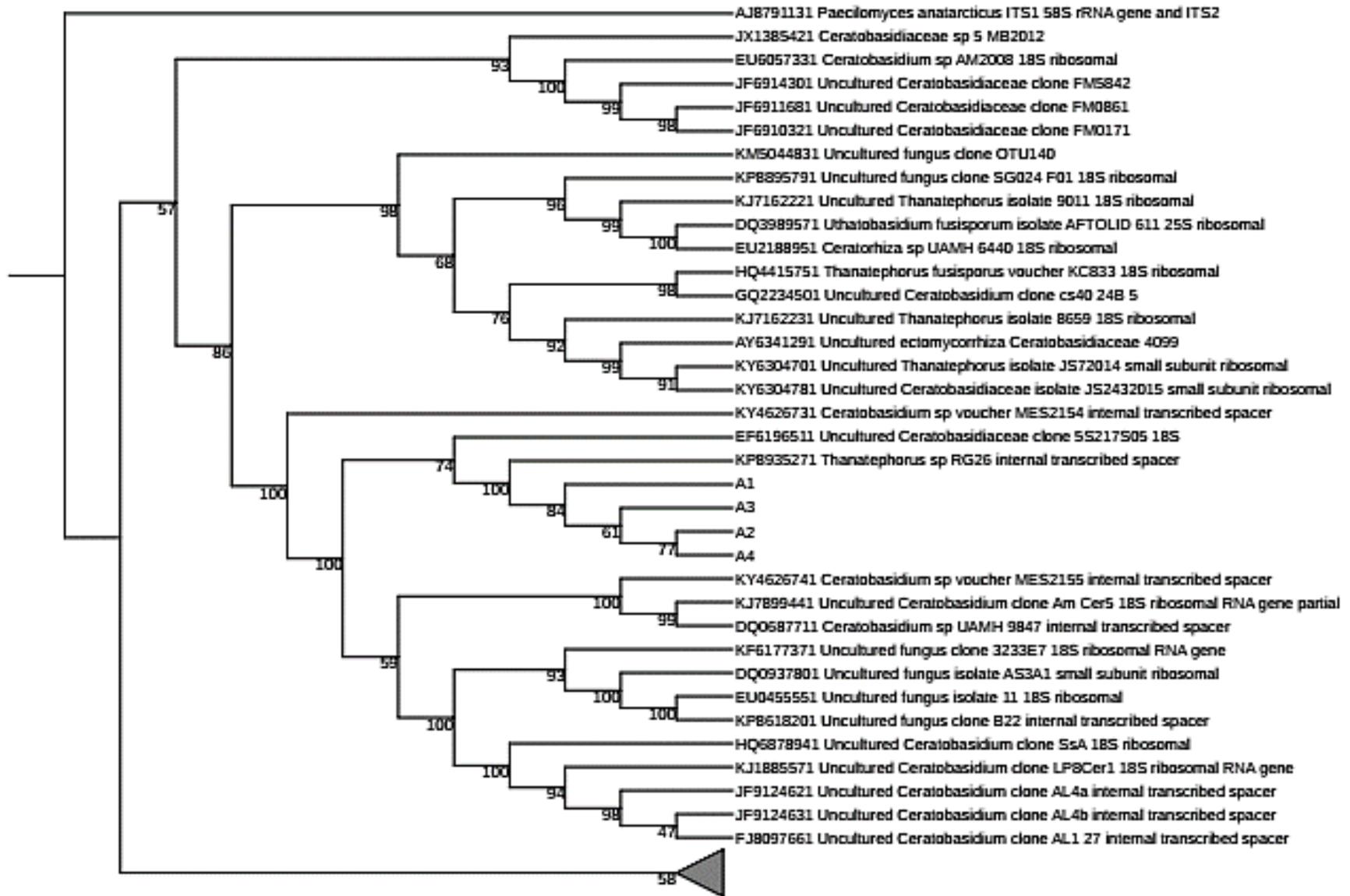


Figura 26. Relaciones filogenéticas de los aislados obtenidos de *Cuitlauzina pendula* (aislados 1-3) y *Prosthechea* sp. (aislado 4).

Cuadro 4. Especie más cercana molecularmente a los aislados de *Cuitlauzina pendula* (aislados 1-3) y *Prosthechea* sp. (aislado 4), comparados con secuencias del Gen Bank.

Aislado	Largo de secuencia (pb)	Taxón de referencia más cercano en Gen Bank	Especie hospedera	Número de acceso	Cobertura (%)	Identidad de la secuencia (%)	
A 1	789				A1 76	99	
A2	818	<i>Thanatephorus</i> sp. (López <i>et al.</i> , 2016)	<i>Oncidium sphacelatum</i> Lindl. (Orchidaceae) de Chiapas, México	KP893527.1	A2	81	99
A 3	816				A3	93	98
A 4	896				A4	79	99

7.1.5 Eficiencia de los tratamientos de desinfestación en semillas de *Cuitlauzina pendula*

De los protocolos evaluados (Cuadro 1) el único que funcionó fue el nueve, que consistió en 10 % de NaClO por 10 min que eliminó por completo la proliferación de hongos y bacterias (Fig. 27, No. 9) por lo que fue el protocolo utilizado en las pruebas de germinación posteriores.

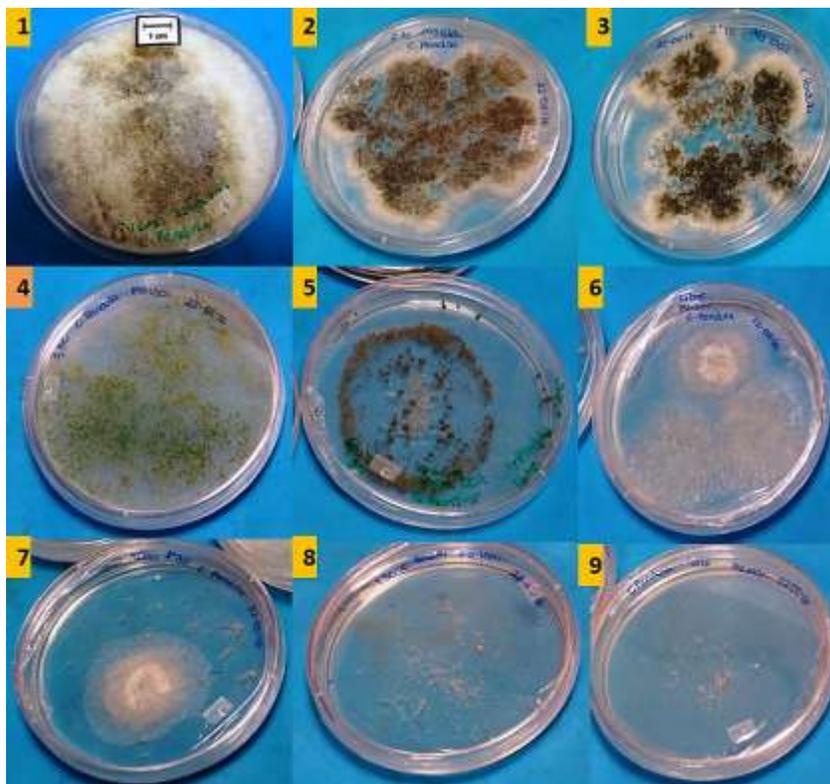


Figura 27. Prueba de eficiencia de los tratamientos de desinfestación en semillas de *Cuitlauzina pendula*. El número corresponde a la numeración del cuadro 1. Fotos: Meneses, 2017.

7.2 Prueba de viabilidad de semillas de *Cuitlauzina pendula* con cloruro de tetrazolio antes y después de aplicar el protocolo nuevo

Se registró que el porcentaje de viabilidad de las semillas fue del 62 al 73 %, similar entre las cápsulas provenientes del campo y de la planta cultivada en invernadero ($p \leq 0.05$). Esta viabilidad disminuyó drásticamente después de la desinfestación con NaClO al 1 0%, entre un 23 y 33% (Fig. 28).

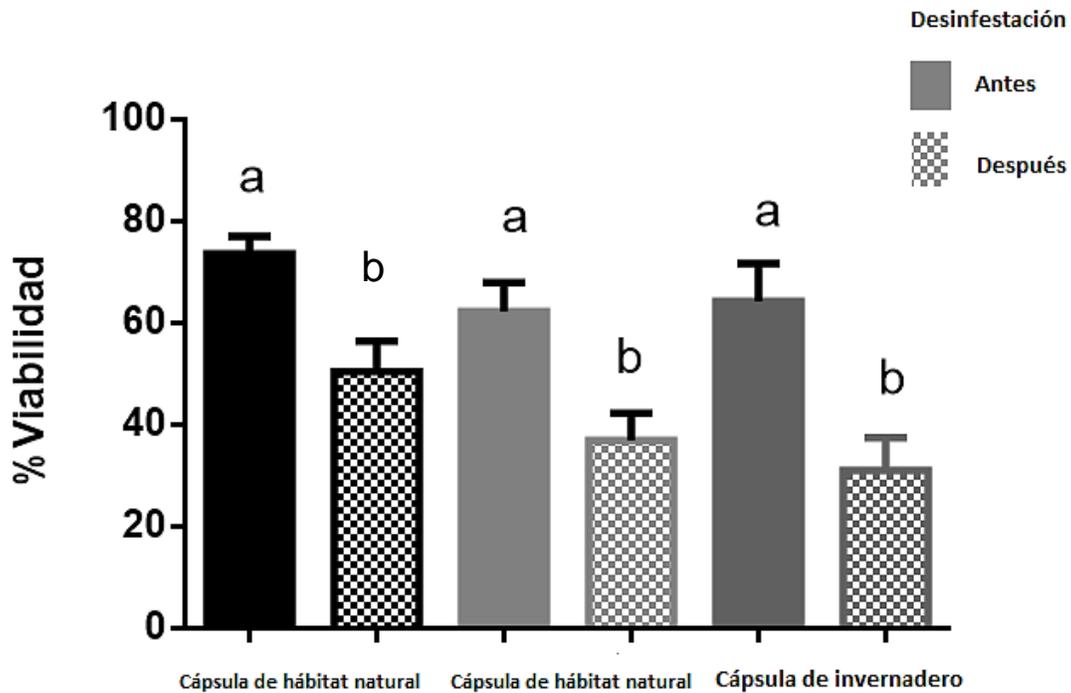


Figura 28. Porcentaje de viabilidad de semillas de tres cápsulas tratadas con cloruro de tetrazolio antes y después de la desinfestación (letras distintas indican diferencias significativas $p \leq 0.05$).

7.2.1 Germinación y desarrollo de *Cuitlauzina pendula* en cultivos simbióticos y asimbióticos

Para esta prueba se utilizaron dos cápsulas recolectadas en campo y una proveniente de invernadero. De las semillas recolectadas en campo sólo se obtuvieron diez plántulas en los cultivos asimbióticos, por tanto, ya no se cultivaron simbióticamente. Mientras que las semillas provenientes de invernadero germinaron. En estas últimas, los primeros efectos se observaron en la tercera semana después de su cultivo, donde casi el 50% de las semillas en los distintos tratamientos pasaron del estadio cero al uno (imbibición del embrión, fig. 29a), ya que este es un

proceso físico, sin que existieran diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0.05$). Durante la transición de semillas imbibidas a la formación de protocormos fotosintéticos (estadio 1 a 2), las semillas cultivadas en el medio asimbiótico (control positivo MS) mostraron una diferencia significativa a partir de la novena semana con respecto a los otros tratamientos ($p \leq 0.05$), sin embargo, sólo el 10% pasó a esta etapa, mientras que menos del 1% alcanzó la misma con los tratamientos A1 y A2 (Fig. 29b, c). En el cambio de protocormo fotosintético a protocormo con ápice foliar (estadio 2 a 3) y en el siguiente paso desarrollo de dos hojas (del 3 al 4), el tratamiento con el medio MS continuó presentando diferencia significativa ($p \leq 0.05$) a partir de la semana 13 y la 21 respectivamente. En el cambio de dos hojas a más de dos y desarrollo de la raíz (estadio 4 al 5), se registraron diferencias significativas a partir de la semana 25 ($p \leq 0.05$). Es importante mencionar que el porcentaje de semillas/plántulas con el tratamiento MS, casi no se redujo después de haber pasado a la primera etapa (del 9 pasó a 6 %), lo mismo sucedió con los tratamientos A1 y A2, pero con un porcentaje bajo de germinación. Cabe destacar que las pocas plántulas obtenidas de los medios simbióticos alcanzaron mayor talla en comparación de las obtenidas asimbióticamente, siendo dos a tres veces de mayor tamaño en el mismo periodo (Figs. 30, 31).

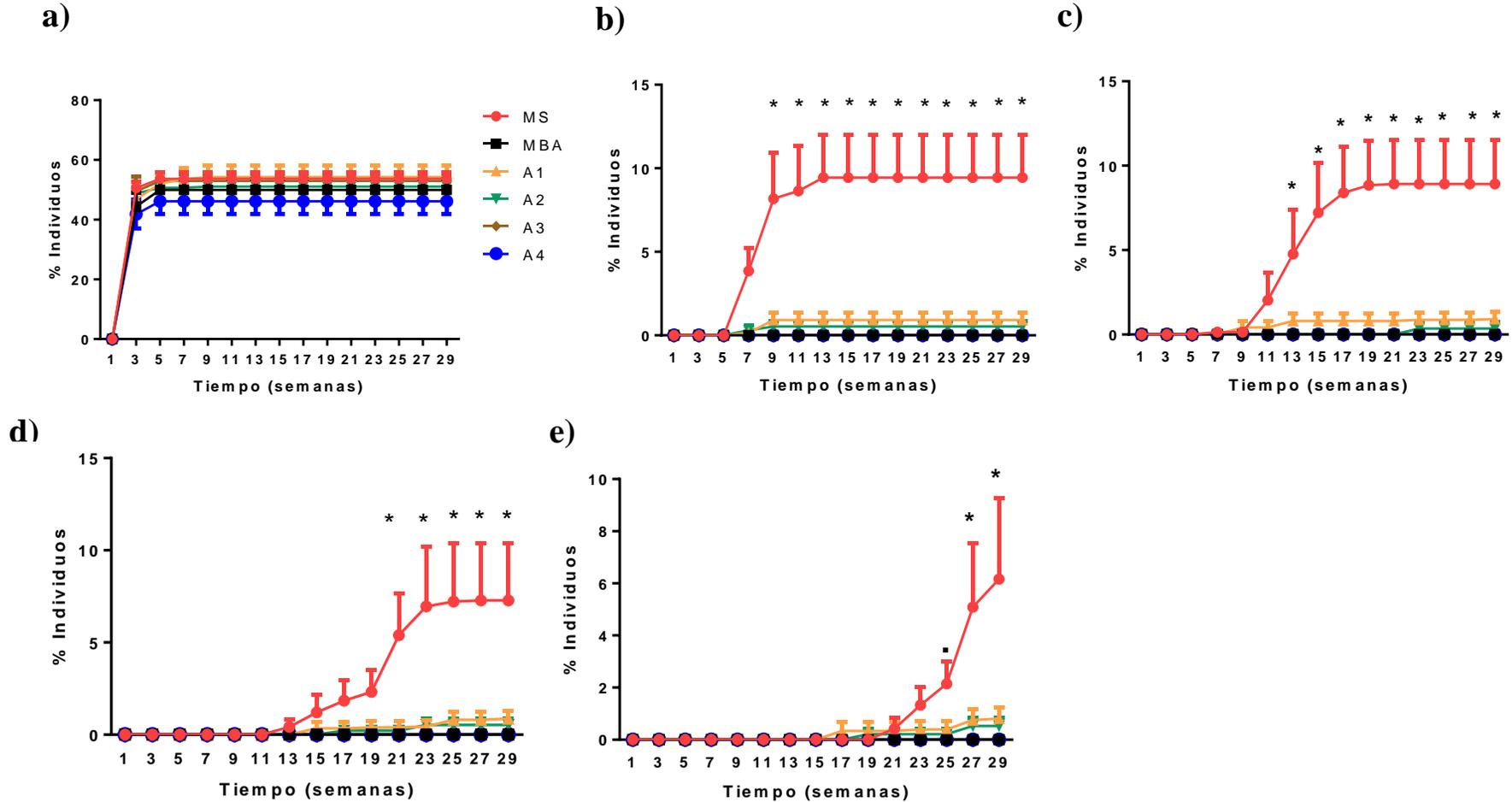


Figura 29. Porcentaje de individuos de *Cuitlauzina pendula* que pasaron de los estadios: a) cero al uno, b) uno al dos, c) dos al tres, d) tres al cuatro y e) cuatro al cinco (*diferencias significativas respecto a MS con los demás tratamientos $p \leq 0.05$, $n = 6$).

Cuadro 5. Porcentaje de semillas/plántulas de *Cuitlauzina pendula* en los distintos estadios (letras distintas indican diferencias significativas $p \leq 0.05$, $n=6$).

Tratamientos	Estadio				
	1	2 (Germinación)	3	4	5
MS	53.73 ± 2.21 ^a	9.44 ± 2.55 ^a	8.91 ± 2.60 ^a	7.27 ± 3.13 ^a	6.15 ± 3.10 ^a
MBA	49.96 ± 3.71 ^{ab}	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b
A1	54.30 ± 3.79 ^a	0.91 ± 0.42 ^b	0.70 ± 0.44 ^b	0.86 ± 0.42 ^{ab}	0.81 ± 0.42 ^b
A2	51.11 ± 2.16 ^{ab}	0.52 ± 0.33 ^b	0.36 ± 0.36 ^b	0.52 ± 0.33 ^{ab}	0.52 ± 0.33 ^b
A3	52.95 ± 2.27 ^{ab}	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b
A4	46.13 ± 1.10 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b

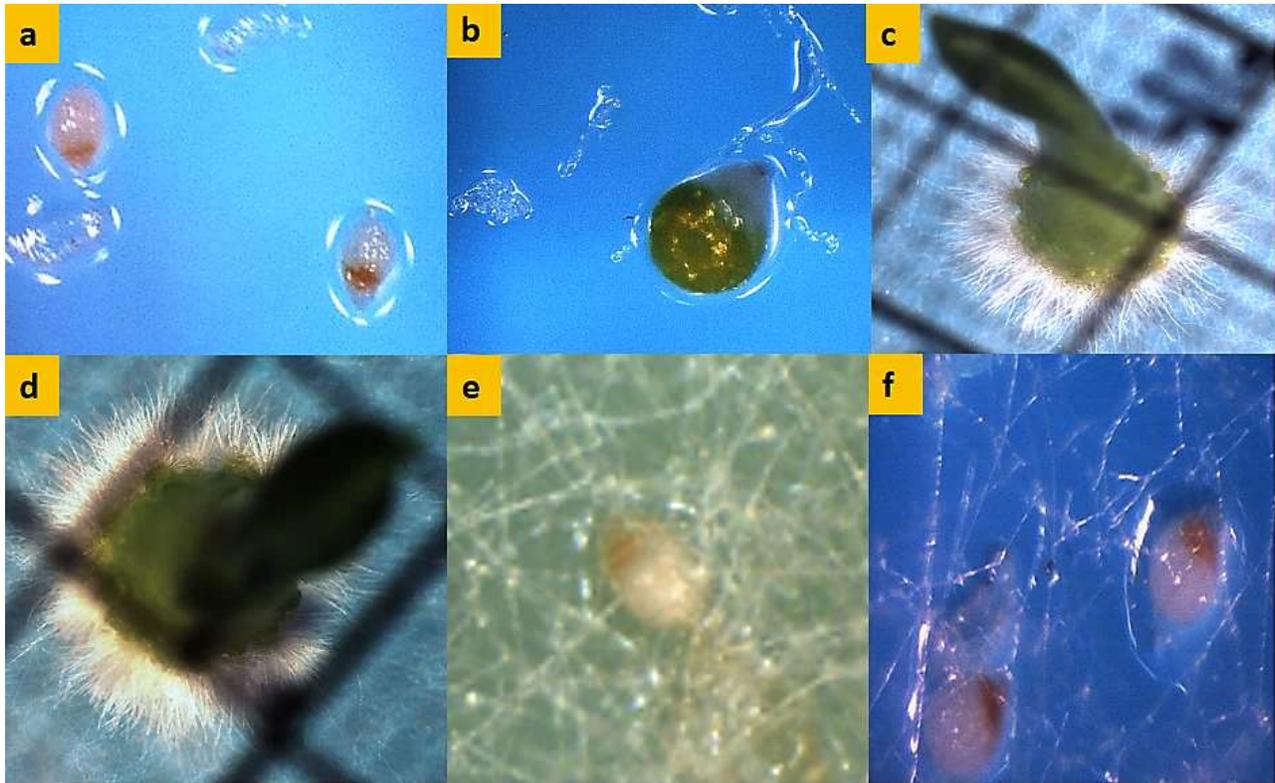


Figura 30. Germinación y desarrollo *in vitro* de semillas de *Cuitlauzina pendula* en medio asimbiótico MBA (a) y MS (b) y en medio simbiótico con los aislados A1 (c), A2 (d), A3 (e) y A4 (f), después de nueve semanas de cultivo. Fotos: Meneses, 2017.

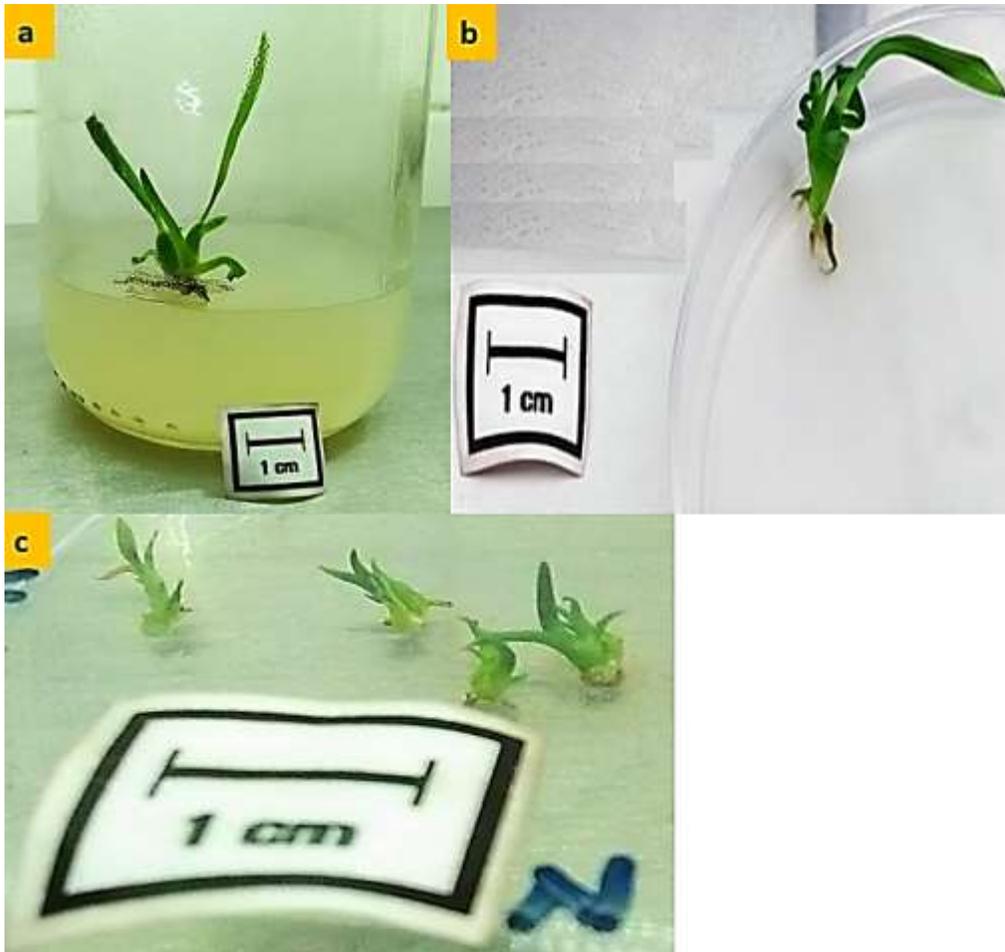


Figura 31. Plántulas de *Cuitlauzina pendula* en desarrollo, 19 semanas después de la germinación en los medios simbióticos con los aislados A1 (a), A2 (b) y en el medio asimbiótico MS (c). Fotos: Meneses, 2017.

7.2.2 Efecto de la inoculación post-germinación de hongos micorrízicos orquideoides en el desarrollo de plántulas de *Cuitlauzina pendula*

En los tres tamaños de plántulas (0.5, 1 y 3 cm) en las que se evaluó el efecto de la inoculación de los HMO, se observó que la altura de éstas después de seis meses fue mayor en las cultivadas asimbióticamente con medio MS y la menor con el control negativo sin azúcares ni micorrizas; sin embargo, en algunos aislados como A1 y A2 con plántulas de 0.5 cm y A1 y A3 con 1 cm de alto, no se registraron diferencias significativas con el medio MS (Fig. 32). En cuanto al número de pseudobulbos aumentaron el doble para los tamaños 0.5 y 1 cm en algunos tratamientos simbióticos, donde el medio MS tuvo poco o ningún efecto, en las plántulas de 3 cm llegó a aumentar el número de pseudobulbos hasta tres veces en los tratamientos simbióticos, excepto el A1 y el control negativo que aumentaron al doble (Fig. 33). En general, el efecto sobre la longitud

y diámetro de los pseudobulbos fue similar entre el control positivo y algunos de los aislados, excepto en el largo del pseudobulbo en las plántulas de 1 cm, donde produjo el mayor efecto, mientras que, en el control negativo se registró el menor efecto sobre estas variables (Fig. 34).

En las plántulas con 0.5 y 1 cm de longitud, el número de hojas aumentó, pero no hubo diferencias significativas (Fig. 35 a y b), en las de mayor tamaño (3 cm) (Fig. 35c), esta variable disminuyó ligeramente, porque algunas entraron en senescencia. En el tratamiento asimbiótico con azúcares (MS), el largo de las hojas aumentó independientemente del tamaño y durante el tiempo que duró el experimento. Las hojas de menor tamaño se registraron en las plantas cultivadas asimbióticamente, en un medio sin azúcares. En relación con el número de raíces, éste se incrementó hasta tres veces después de seis meses en plántulas de 1 y 3 cm, con diferencias significativas en MBA, A2 y A3 en plántulas de 3 cm con respecto al MS. Las raíces de las plántulas de 0.5 cm aumentaron al doble con diferencias significativas en todos los tratamientos respecto a MS. En plántulas de 0.5 cm, la longitud de las raíces se incrementó hasta 1.5 cm, con diferencias significativas en todos los tratamientos, excepto en A1, con respecto a MS. Seis meses después de la inoculación, en los tres tamaños de plántulas y en todos los tratamientos, el número de raíces aumentó hasta cinco veces, con diferencias significativas en A1 y A4 en el medio asimbiótico sin azúcares (MBA). En plántulas de 3 cm, las raíces no aumentaron su longitud en todos los tratamientos, excepto en MS.

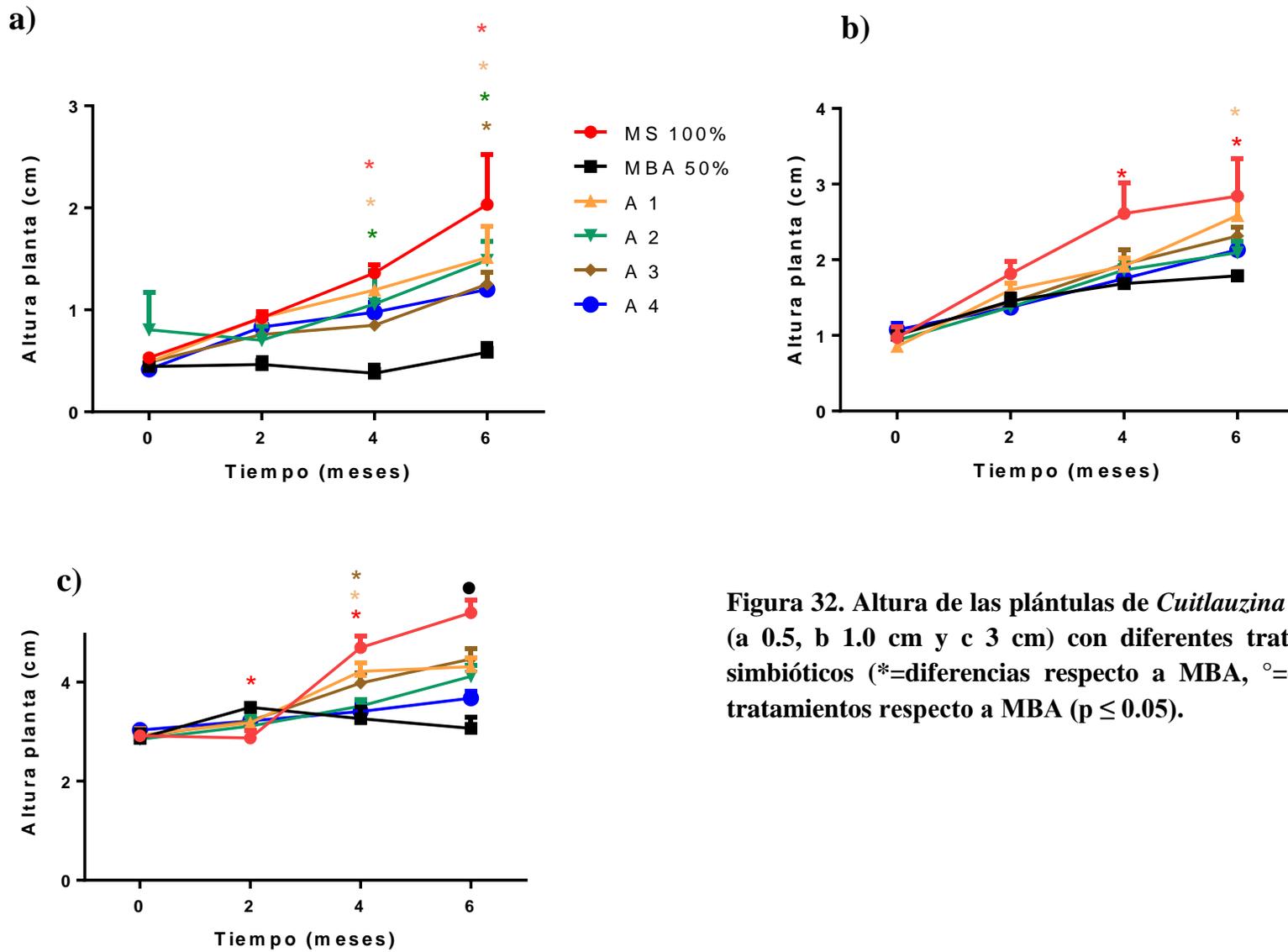


Figura 32. Altura de las plántulas de *Cuatrecasaya pendula* en tres tamaños (a 0.5, b 1.0 cm y c 3 cm) con diferentes tratamientos asimbióticos y simbióticos (*=diferencias respecto a MBA, °=diferencias en todos los tratamientos respecto a MBA ($p \leq 0.05$)).

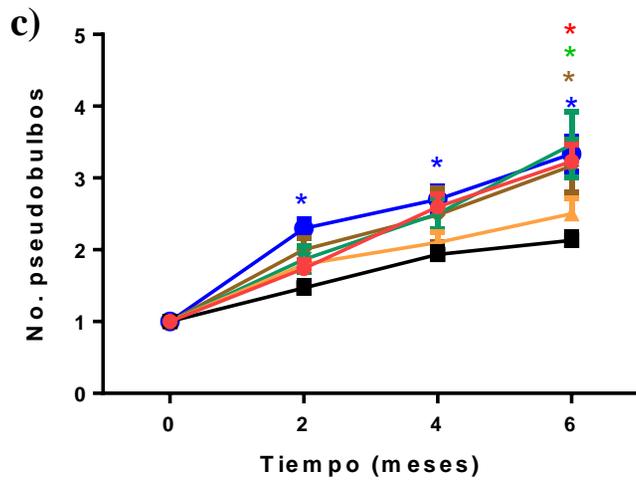
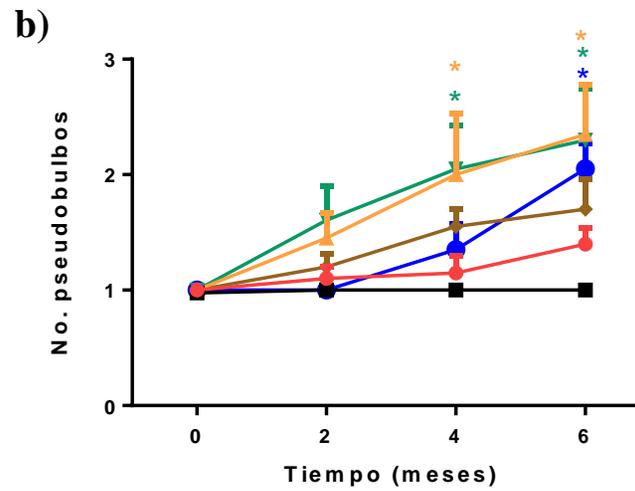
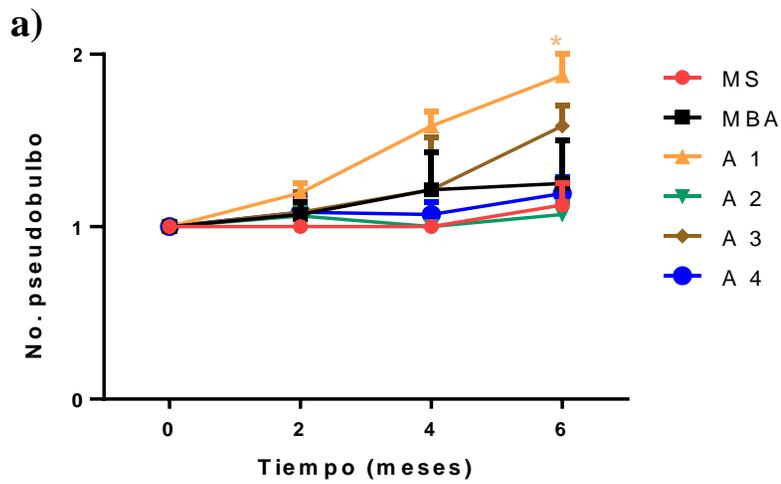


Figura 33. Número de pseudobulbos en plántulas de *Cuitlauzina pendula* de tres tamaños (a 0.5, b 1.0 cm y c 3 cm) con diferentes tratamientos asimbióticos y simbióticos (* =diferencias respecto a MBA, ° =diferencias en todos los tratamientos respecto a MBA ($p \leq 0.05$)).

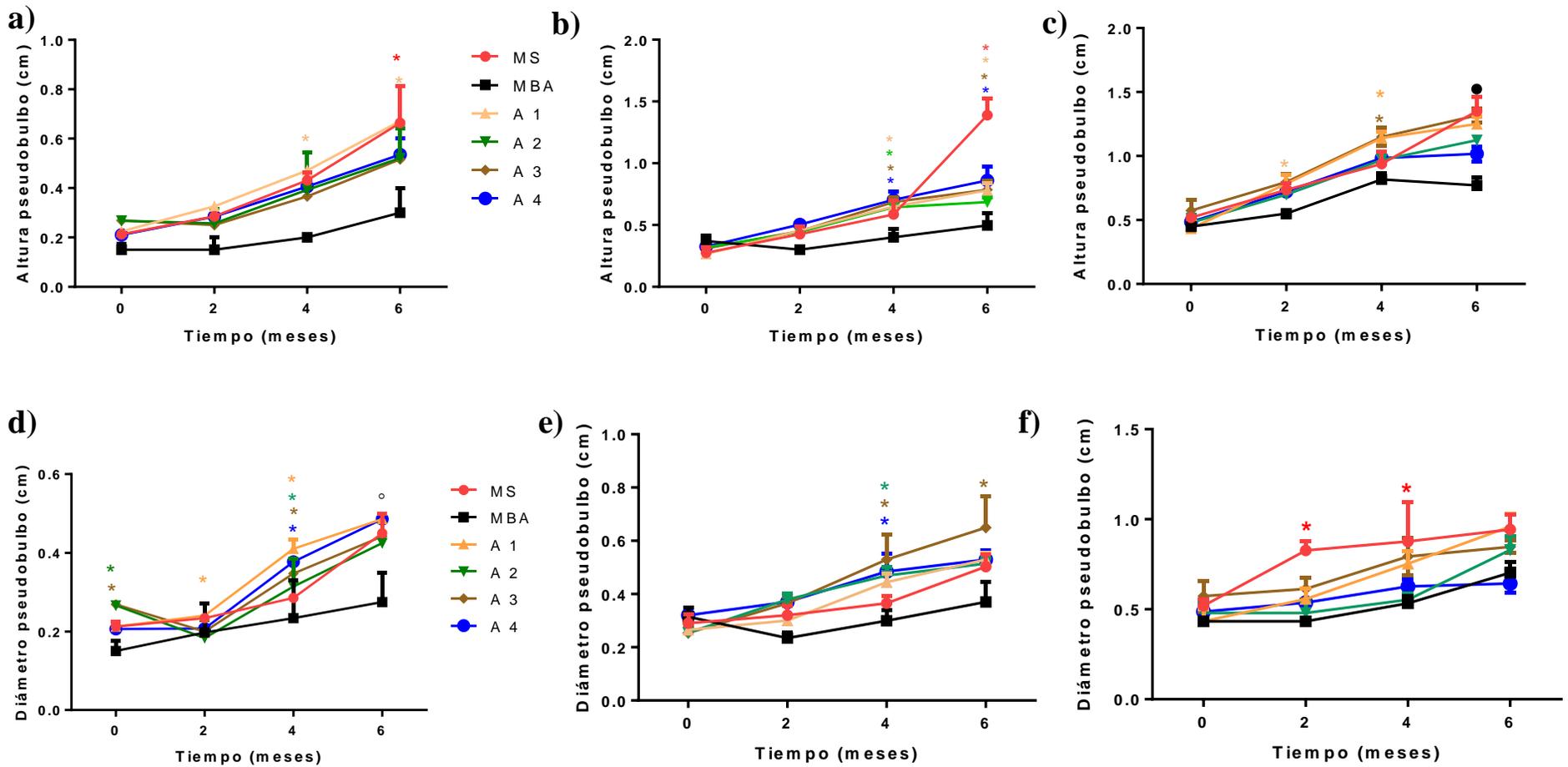


Figura 34. Largo y diámetro de pseudobulbos de *Cuitlauzina pendula* en plántulas de tres tamaños (ad 0.5, be 1.0 cm y cf 3 cm) con diferentes tratamientos asimbióticos y simbióticos (*=diferencias respecto a MBA, ° =diferencias en todos los tratamientos respecto a MBA ($p \leq 0.05$)).

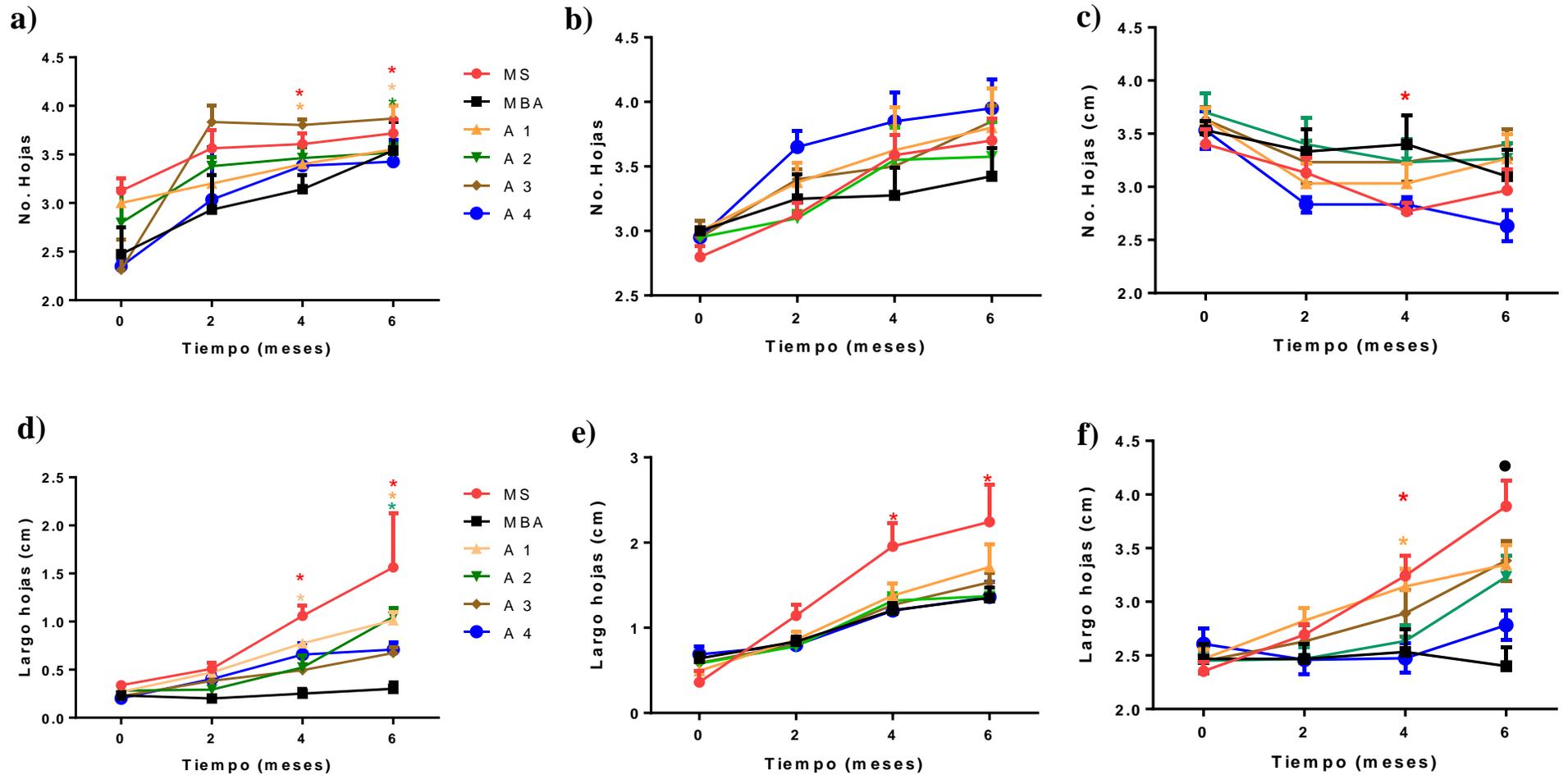


Figura 35. Número y longitud de hojas en plántulas de *Cuatrecasaya pendula* de tres tamaños (ad 0.5, be 1.0 cm y cf 3 cm) con diferentes tratamientos asimbióticos y simbióticos (* = diferencias respecto a MBA, ° = diferencias en todos los tratamientos respecto a MBA (p ≤ 0.05)).

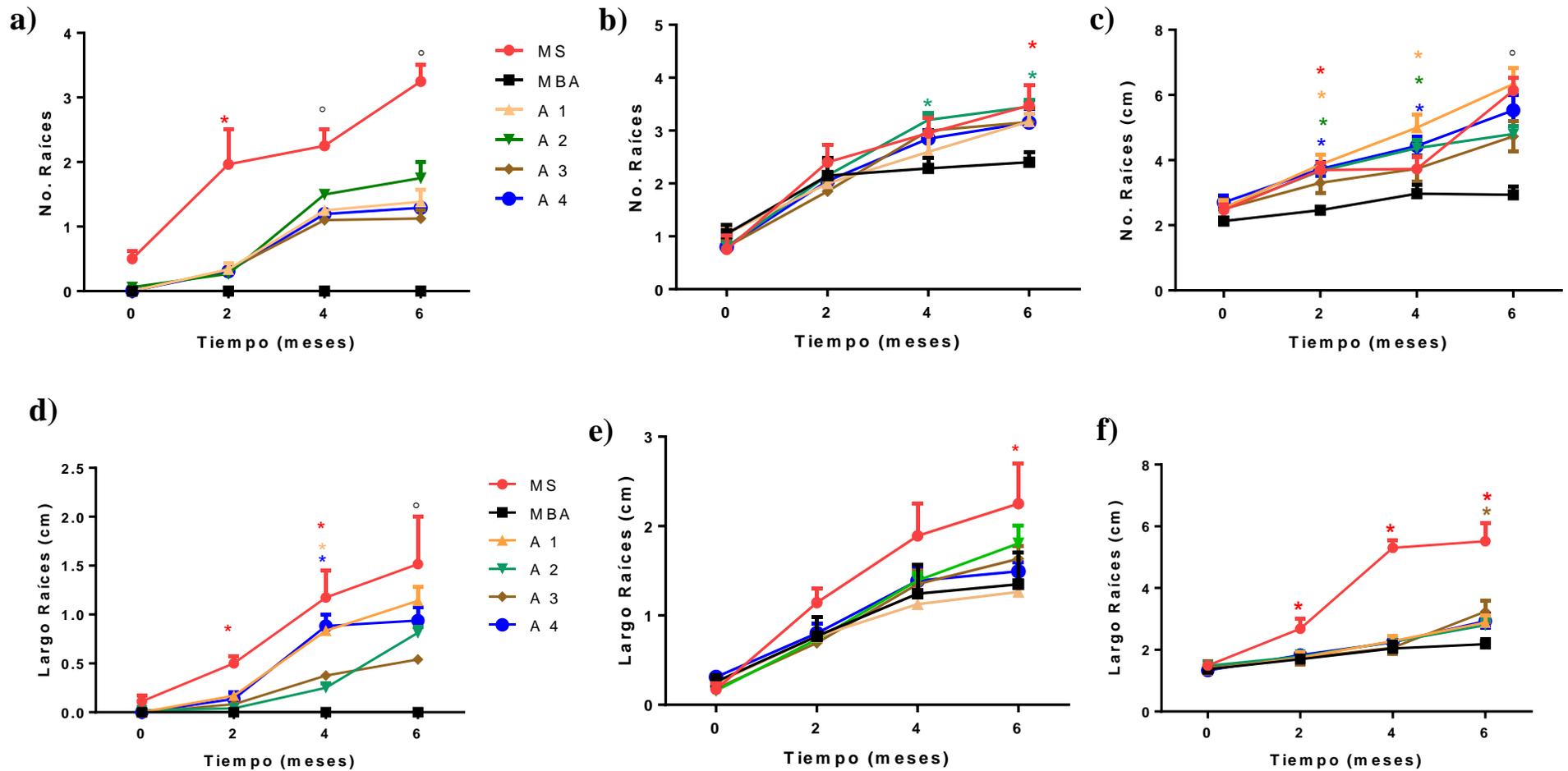


Figura 36. Número y largo de raíces en plántulas de *Cuitlauzina pendula* de tres tamaños (ad 0.5, be 1.0 cm y cf 3 cm) con diferentes tratamientos asimbióticos y simbióticos (* = diferencias respecto a MBA, ° = diferencias en todos los tratamientos respecto a MBA ($p \leq 0.05$)).

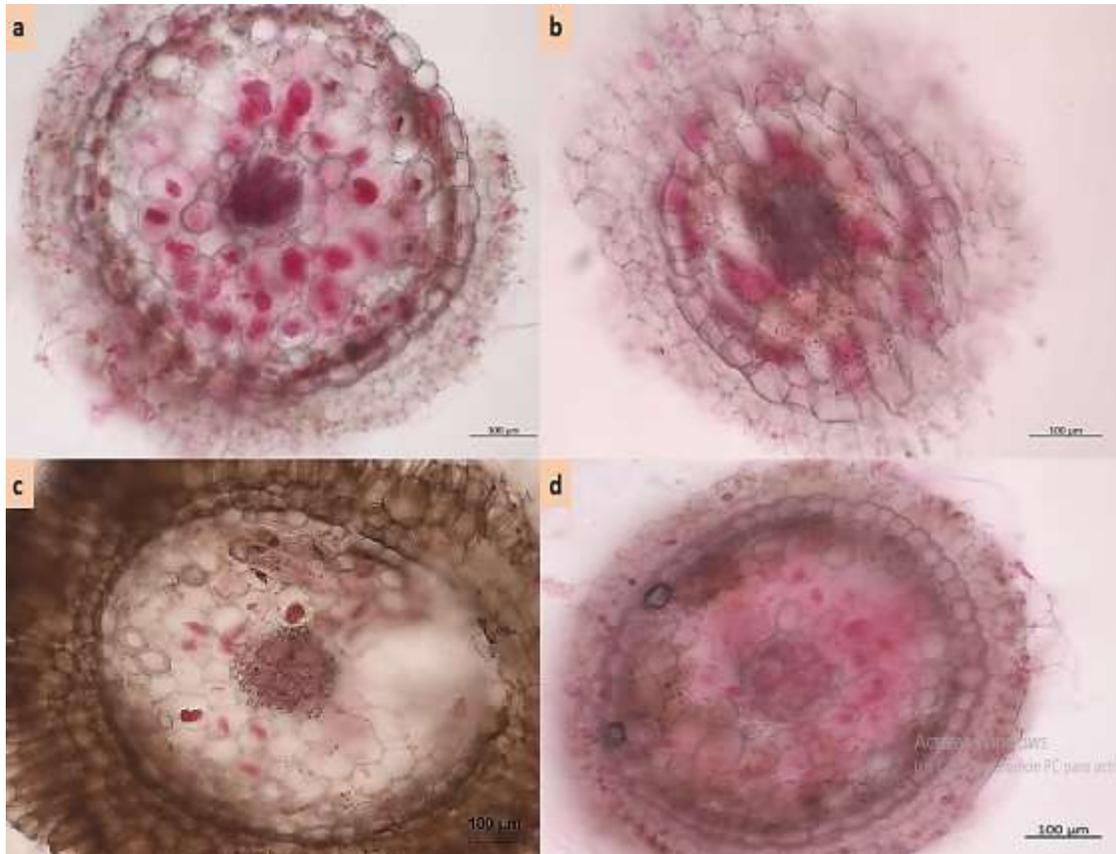


Figura 37. Secciones de raíces micorrizadas de *Cuitlauzina pendula*, después de seis meses de ser inoculadas simbióticamente (a A1, b A2, c A3 y d A4). Fotos: Meneses, 2017.

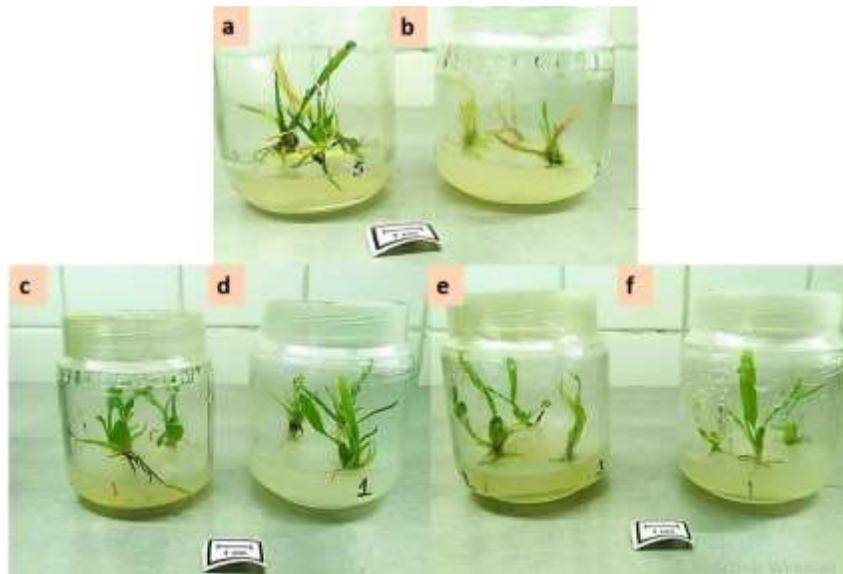


Figura 38. Plántulas de *Cuitlauzina pendula* en los distintos tratamientos, después de dos meses de ser sembradas (a MS, b MBA, c A1, d A2, e A3 y f A4). Fotos: Meneses, 2017.

7.3 Supervivencia de plántulas en condiciones de invernadero

Las plantas de *Cuitlauzina pendula* propagadas simbióticamente inoculadas con los HMO aislados A1 y A3 y las del medio asimbiótico MS, supervivieron después de tres meses de aclimatización (Cuadro 6). Se registró menos del 15 % de mortalidad en las plántulas de aislados A2 (*C. pendula*) y A4 (*Prostechea* sp.).

Cuadro 6. Porcentaje de supervivencia de *Cuitlauzina pendula* en los diferentes tratamientos (MS, MBA, A1, A2, A3 y A4) después tres meses de ser establecidas en condiciones de invernadero (letras distintas indican diferencias significativas de $p \leq 0.05$).

	MS	MBA	A1	A2	A3	A4
Noviembre	100 ± 0.00 ^a	45 ± 7.4 ^b	100 ± 0.0 ^a	87 ± 5.4 ^a	100 ± 0.0 ^a	83 ± 7.4 ^a



Figura 39. Plántulas de *Cuitlauzina pendula* cultivadas en invernadero provenientes de diferentes tratamientos, después de tres meses de ser trasplantadas (a MS, b MBA, c A1, d A2, e A3 y f A4). Fotos: Meneses, 2017.

VIII DISCUSIÓN

Las orquídeas epífitas superan en cantidad a las terrestres en todo el mundo (Jones, 2006), sin embargo, pocas investigaciones han estudiado la relación de las primeras con los HMO. Algunos autores consideran que las terrestres son más dependientes de esta asociación, por tanto, presentan una mayor colonización, en comparación con las orquídeas epífitas (Boddington y Dearnaley, 2008). Otros investigadores señalaron que en las epífitas esta colonización es esporádica o nula, en las etapas adultas (Hadley y Williamson, 1972), mientras que otros indican que la colonización se presenta con la misma frecuencia en ambos grupos de orquídeas (Goh *et al.*, 1992; Rivas *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 2005b). En este estudio se observó que las raíces de *Cuitlauzina pendula* establecen este tipo de asociación.

En la presente investigación se modificó la forma de evaluar la colonización propuesta por Rasmussen y Whigham (2002) y Goh *et al.* (1992) y se procedió hacer uso de un software ImageJ, que permitió seleccionar áreas concretas de la raíz para obtener de manera objetiva las áreas micorrízidas. Los porcentajes de colonización en *Cuitlauzina pendula* siempre fueron cercanos al 50% o más, este resultado demuestra que la interacción perdura aún en estado adulto. Los porcentajes de colonización registrados en este estudio son un poco más bajos en comparación a los reportados en otras especies epífitas (Lesica y Antibus, 1990; Benzing, 1982; Bermudes y Benzing, 1989; Suárez *et al.*, 2006), en algunas de ellas se registró hasta un 90 % en relación con el área del córtex (Cruz, 2007; Lesica y Antibus, 1990; Benzing, 1982; Bermudes y Benzing, 1989; Suárez *et al.*, 2006), en otras especies como *Dendrobium crumenatum*, *Maxillaria marginata*, *Ocidium flexuosum*, *O. varicosum*, *Erycina crista-galli*, *Speacklinia marginata*, *Leochilus labiatus*, *Notylia barkeri*, *Stelis quadrifida*, *Trichocentrum ascendens* y *Epidendrum stamfordianum* el grado de colonización varió de 10 a 55 % (Cruz, 2007). Un factor importante en el grado de colonización se ha atribuido al diámetro de la raíz, se ha registrado que en raíces de menor grosor, como las de *C. pendula* hay una mayor colonización (Bertoloni *et al.*, 2014).

Los segmentos de las raíces de *Cuitlauzina pendula* estudiados, no mostraron colonización de HMO en sus ápices, el mismo resultado obtuvieron Benzing (1982) y Cruz (2007) en otras especies de orquídeas epífitas, la ausencia de HMO en esta zona de las raíces, puede deberse a la producción de fitoalexinas que inhiben el desarrollo de estos hongos (Gehlert y Kindl, 1991; Reinecke y Kindl, 1994), cuando la asociación no es compatible se activan ciertos genes que codifican para la síntesis de enzimas que producen fitoalexinas (Reinecke y Kindl, 1994). La colonización en *Prosthechea* sp., fue similar a *C. pendula*, el hecho se puede deber a que ambas especies requieren de esta interacción, aún en estado adulto. Algunos autores mencionan que la edad de la raíz y su buen desarrollo influye en el grado de colonización de los HMO (Benzin, 1982; Rasmussen y Whigham, 2002; Cruz, 2007). Como las raíces de ambas especies fueron recolectadas en la época de lluvia, no se registraron variaciones importantes en el grado de colonización, debido a que la humedad ambiental tampoco varió, esta observación también fue indicada por Rasmussen y Whithamm

(2002) en otras especies de orquídeas epífitas. Los HMO de *C. pendula* se distribuyeron homogéneamente en todo el córtex, como en otras orquídeas epífitas, cuyas raíces están contenidas completamente en un sustrato orgánico. En otras especies la colonización ocurre en ciertas zonas, sobre todo en las áreas que están en contacto con el sustrato referido (Cruz, 2007).

En relación con los HMO obtenidos en este trabajo, la eficiencia del aislamiento se favorece con el dominio de la técnica, donde la velocidad de procesamiento de los segmentos y de los cultivos de los hongos son fundamentales. Se ha registrado que el aislamiento de los HMO en orquídeas epífitas es mucho más complicado que en las terrestres, debido a que en el velamen de las epífitas se desarrollan una gran cantidad de hongos saprobios y otros endófitos que interfieren en el aislamiento de los simbiontes micorrízicos (Ortega, 2008). A pesar de las limitaciones para aislar los HMO, las características de todos los aislados obtenidos se relacionaron con el anamorfo *Ceratorhiza*. En relación con el análisis molecular los aislados A2 y A4 mostraron mayor similitud entre ambos pese a que fueron obtenidos de diferentes plantas, el aislado A3 y el A1 se más distantes, sin embargo, mantuvieron la misma cercanía entre los otros mencionados.

Todas las secuencias de los aislados se relacionan en un 99 % con el teleomorfo *Thanathephorus* sp., aislado de las raíces de *Oncidium sphacelatum*, una orquídea epífita recolectada en Chiapas y analizada por López y col. (2016). Si bien, los hongos micorrízicos orquideoides pertenecen a los grupos más ampliamente distribuidos en el mundo y de aquí la posibilidad de encontrar secuencias de estos hongos en muchos ecosistemas diferentes; en este estudio, tres de los cuatro aislados se asociaron con este hongo que establece relación simbiótica con una especie de orquídea endémica de México, esto permite suponer que probablemente está ampliamente distribuido en forofitos que sustentan el crecimiento de varias especies de orquídeas epífitas. Cabe destacar, que se deben aislar los HMO de otras especies diferentes a *C. pendula*, para probar la especificidad de *Thanathephorus* sp., ya que otros estudios realizados en *Laelia* y *Epidendrum* spp., demuestran especificidad con hongos de la familia Tulasnellaceae (Vera, com. pers., Moreno-Martínez, 2012; Zettler *et al.*, 1998; Zettler *et al.*, 2008). Es posible que *C. pendula* presente especificidad con otras especies de hongos pertenecientes a Ceratobasidiaceae, sin embargo, no se puede concluir con las evidencias de este trabajo dado que los aislados obtenidos y secuenciados, solo provinieron de dos individuos.

Preservar la variabilidad genética de esta especie para su conservación a través de la propagación simbiótica con hongos micorrízicos aislados de su propio hábitat, fue el objetivo principal de este estudio. Sin embargo, se recurrió a establecer el protocolo simbiótico con semillas obtenidas de un germoplasma de una planta cultivada en condiciones de invernadero, debido a que las semillas recolectadas en campo no germinaron, quizá por el almacenamiento y los tratamientos agresivos utilizados durante la desinfestación. Desde luego que aun cuando los resultados obtenidos sobre la germinación simbiótica en este estudio pudieron haber sido distintos utilizando el mismo germoplasma de donde provinieron los aislados, en otros estudios se ha demostrado que la germinación simbiótica en orquídeas epífitas no se logra *in vitro* (Moreno-Martínez, 2012; Rendón-

Lara, 2014). La viabilidad de las semillas no rebasó el 70%, la desinfestación con NaOCl, provocó disminución en la misma, sin embargo, fue inevitable no hacer uso de ese método de desinfestación, ya que de otra manera proliferaban muchos organismos adheridos a la testa de las semillas. Aun cuando existen trabajos previos sobre la germinación asimbiótica de *Cuitlauzina pendula* (Pineda, 2008; Mata y Salazar (2009); Espinoza *et al.*, 2010; Salazar y Mata, 2013; Pérez-Decelis *et al.*, 2014; V. M. Chávez com. pers.), los protocolos ya establecidos para la desinfestación de las semillas no fueron exitosos, posiblemente porque las semillas utilizadas provenían de cápsulas indehiscentes con señales de herbivoría, que probablemente infestaron las misma.

Cuando se realizó la prueba de germinación para elegir el medio de cultivo, se comprobó que MS 100 % resultó el más efectivo en comparación con KC, por tanto, el primero se utilizó como control positivo. En relación con los porcentajes de germinación y desarrollo de semillas de *Cuitlauzina pendula*, Pérez-Decelis y col. (2014) obtuvieron menos del 30 %, ocho semanas después de la siembra en Phytamax y menor al 70% a las 12 semanas; en contraste, en este trabajo donde se utilizó MS100%, en tiempos similares de evaluación, se obtuvo entre 8 y 9% de germinación a las 13 semanas. Este bajo porcentaje, probablemente se relaciona con el tiempo y las condiciones de almacenamiento del germoplasma, ya que la siembra de las semillas se realizó aproximadamente cuatro meses después de su cosecha, y estas condiciones pudieron haber afectado la viabilidad y por ende el porcentaje de germinación. Los estadios de germinación y desarrollo se propusieron con base en Nava *et al.* (2011), quienes estudiaron estos procesos en *Laelia eyermaniana*, los estadios referidos de esta especie fueron similares a los registrados en *C. pendula*. En otros trabajos de propagación asimbiótica sólo mencionan el material obtenido de plántulas con un máximo desarrollo en medios con reguladores de crecimiento sin especificar el tamaño de las plantas. Mata-Rosas y Salazar (2003) evaluando germoplasma de *C. pendula* para obtener embriones somáticos, solamente indicaron que en medio con reguladores de crecimiento, 12 semanas después de la siembra, se desarrollan plántulas de 2 a 3 cm de alto. En la mayoría de los estudios realizados sobre germinación y desarrollo de orquídeas epífitas, no se establecen de manera objetiva las etapas de germinación y desarrollo que contribuyan a plantear una estrategia de conservación para esta especie.

La germinación simbiótica con los aislados A1 y el A2 fue muy baja en comparación con el medio asimbiótico MS donde se obtuvo un 10 %, lo que pudo deberse como se mencionó anteriormente al tiempo y condiciones de almacenamiento de las semillas, por lo que se sugiere utilizar las semillas inmediatamente después de su cosecha. Cabe destacar que todas las semillas que germinaron simbióticamente, alcanzaron el estadio de plántulas en un menor tiempo, comparadas con las asimbióticas y presentaban una talla mucho mayor.

La inoculación post-germinación de las plántulas, no influyó significativamente en su desarrollo, comparado con el medio asimbiótico MS en presencia de azúcares. Las plántulas inoculadas con HMO y cultivadas en MBA, se desarrollaron mejor que las asimbióticas sin azúcares. Además, en

todas las secciones transversales de las raíces de plántulas inoculadas, se observaron pelotones, esto demuestra que todas las plantas estuvieron micorrizadas.

En cuanto a la supervivencia de las plántulas cuyas semillas fueron germinadas asimbióticamente e inoculadas posteriormente y cultivadas en condiciones de invernadero para todos los tratamientos (MS, MBA, A1, A2, A3 y A4), después de tres meses todas registraron una supervivencia por arriba del 80%, este resultado demuestra que los aislados favorecen el desarrollo.

Por tanto, con base en los resultados obtenidos, se requiere comprender la biología micorrízica de las orquídeas con sus simbioses, ya que las estrategias de conservación de estas plantas también permiten conservar a los hongos, que pueden intervenir en la distribución de sus poblaciones y en su adaptación en su al medio natural, además de permitir su germinación *in situ*, e influir en su desarrollo y supervivencia (Dearnaley *et al.*, 2012; Otero *et al.*, 2004; 2005; Mosquera *et al.*, 2013).

Las orquídeas en México como en diversas partes del mundo son apreciadas por su belleza y utilizadas con diversos fines, entre ellos, ornamental, ceremonial y medicinal, esto las coloca en alguna categoría de riesgo. Por tanto, es necesario crear y ejercer políticas adecuadas para su protección y desarrollar estrategias para un manejo sustentable. Esta problemática también la enfrenta *Cuitlauzina pendula* en la zona de estudio de este trabajo, que durante las actividades religiosas de semana santa, se extraen sus inflorescencias y su poblaciones se han ido reduciendo considerablemente, por estas razones es necesario estudiarla y aportar conocimiento para su conservación.

IX CONCLUSIONES

- *Cuitlauzina pendula* asociada a *Quercus crasifolia* en Putla Villa de Guerrero, Oaxaca, se asocia con los hongos micorrízicos de la familia Ceratobasidiaceae (*Thanatephorus* sp.).
- La colonización micorrízica de esta especie se encontró en todas las raíces analizadas, la distribución micorrízica fue homogénea en la zona cortical, no se presentó HMO en ápices de las raíces. La especie asociada *Prostechea* sp. mostró un patrón similar.
- La desinfección con NaOCl, provocó una significativa disminución de la viabilidad de las semillas de *Cuitlauzina pendula*.
- El medio de cultivo más efectivo para la germinación asimbiótica fue Murashige y Skoog (MS 100%).
- La germinación simbiótica fue baja en comparación con el medio asimbiótico (MS) en *Cuitlauzina pendula*.
- Todas las plántulas inoculadas con HMO desarrollaron micorrizas *in vitro*. La inoculación post-germinación con HMO en plántulas de *Cuitlauzina pendula* no influyó significativamente en su desarrollo, comparado con el medio asimbiótico (MS).
- Las plántulas simbióticas y asimbióticas (MS) cultivadas en condiciones de invernadero después de tres meses registraron una supervivencia similar.

X LITERATURA CITADA

Alexander C y Hadley G (1985) Carbon movement between host and mycorrhizal endophyte during the development of the orchid *Goodyera repens* Br. *New Phytologist* 101:657-665.

Andersen TF, y Stalpers JA (1994) A checklist of *Rhizoctonia* epithets. *Mycotaxon*. 51:437-457

Arditti J (1967) Factors affecting the germination of orchid seeds. *Botanical Garden* 33 (1): 1-97.

Arditti J (1992) *Fundamentals of Orchid Biology*. John Wiley y Sons. U.S.A. ():691.

Banderas E, Pedraza S, Tapia V, Gutiérrez R, Sandoval V y Ordaz C (2012) Nutrición mineral, sustratos y contenedores para el cultivo de la orquídea epífita *Cuitlauzina pendula*. Simposio de Edafología y nutrición de plantas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Batty A, Dixon K, Brundrett MC, y Sivasithamparam K (2002) Orchid conservation and mycorrhizal associations. En: Sivasithamparam K, Dixon K and Barrett RL. *Microorganisms in plant conservation and biodiversity*. pp. 195-226, Kluwer Academic Publisher.

Bayman P y Otero JT (2006) Microbial endophytes of orchid roots: diversity and effects on plants. En: Schulz B, Boyle C, Sieber T. (eds). *Microbial Root Endophytes*. *Soil Biology* 9. Berlin, Springer-Verlag, Berlín Heidelberg. pp. 153-178.

Benzing DH (1982) Mycorrhizal infection of epiphytic orchids in southern Florida. *American Orchid Society Bulletin* 51: 618-622.

Bernard N (1909) L'evolution dans la symbiose des Orchidées et leur champignons commensaux. *Anales de Ciencias Naturales París*, 9:(9): 1-196.

Bermudes D y Benzing DH (1989) Fungi in neotropical epiphyte roots. *Biosystems* 23:65-73.

Bertolini V, Cruz J, Damon A, y Mora J (2014) Seasonality and mycorrhizal colonization in three species of epiphytic orchids in southeast Mexico. *Acta Botanica Brasilica* 28(4):512-518.

Beyrle HF, Smith SE, Peterson RL y Franco CM (1995) Colonization of *Orchis morio* protocorms by a mycorrhizal fungus: Effects of nitrogen nutrition and glyphosate in modifying the responses. *Canadian Journal of Botany* 73:1128-1140.

Boddington M y Dearnaley JDW (2008) Morphological and molecular identification of fungal endophytes from roots of *Dendrobium speciosum*. *Proceedings of the Royal Society Queens land* 114:13-17.

Bonfil H y Madrid L (2006) El pago por servicios ambientales en la cuenca de Amanalco-Valle de Bravo. *Gaceta Ecológica* 80:63-79.

Bougoure JJ, Bougoure DS, Cairney JWG y Dearnaley JDW (2005) ITS-RFLP and sequence analysis of endophytes from *Acianthus*, *Caladenia* and *Pterostylis* (Orchidaceae) in southeastern Queensland. *Mycological Research* 109: 452-460.

Breddy N (1991) Orchid mycorrhiza and symbiotic raising techniques. *American Orchid Society Bulletin*. 60: 556-569.

Brundrett MC (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*, 154(2): 275-304.

Brundrett, MC (2004) Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews* 79: 473-495.

Camargo S, Montaña N, Rosa S y Montaña A (2012) Micorrizas: una gran unión debajo del suelo. *Revista Digital Universitaria* [en línea]. 13(7). Disponible en: [<http://www.revista.unam.mx/vol.13/num7/art72/index.html>] Fecha de consulta: Junio 2016.

Cameron DD, Leake JR y Read, DJ (2006). Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfer in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytologist* 171: 405-416.

Cameron DD, Johnson I, Leer DJ y Leake JR (2008a). Giving and receiving: measuring the cost of mycorrhiza carbon in the green orchid, *Goodyera repens*. *New Phytologist* 180: 176 - 184.

Chase MW, Cameron KM, Barret RL y Freudenstein JV (2003) DNA data and *Orchidaceae* systematics: a new phylogenetic classification. 69-89. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL y Cribb PJ (eds.). *Orchid Conservation*. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah.

Clements MA (1988). Orchid mycorrhizal associations. *Lindleyana* 3:73-86.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) (2010). *Cuitlauzina pendula* (Cuitlauzina perfumada). Distribución conocida. Disponible en: (http://www.conabio.gob.mx/informacion/metadatos/gis/cuipen_dcgw.xml?_httpcache=yesy_xsl=/db/metadatos/xsl/fgdc_html.xsl_indent=no) Fecha de consulta: Agosto 2015.

Cooke R (1977). The biology of symbiotic fungi. In: John Wiley y Sons, London. Margulis L (1981). *Symbiosis in Cell Evolution*. San Francisco: W. H. Freeman.

Cox T (2013). Orquídeas: importancia y uso en México. *Bioagrociencias* 6(2): 4-7.

Cruz 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 en Ciencias. Colegio de Postgraduados.

Dalla R y Laneri U (1977) Modification of nutrient solutions for germination and growth “*in vitro*” of some cultivated orchids and for the vegetative propagation of *Cymbidium* cultivars. American Orchid Society Bulletin 46: 813- 820.

Davison WR, Campbell AW y Blaisdell JD (1938) Differentiation of wood-decaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. Journal of Agricultural Research 57(9):683-695.

Dearnaley J, Martos F y Seolose M (2012) Orchid Mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation Aspects. In: Hock, B. The Mycota. Berlín: Springer. pp. 208-230.

Divakaran, M.; Nirmal BK. y Peter KV (2006) Conservation of Vanilla species *in vitro*. Scientia Horticulturae 110: 175-180.

Dressler R.L (1981) The Orchids: natural history and classification. Cambridge, MA, USA: Harvad University Press. p. 332.

Dressler RL, (2005) How many orchid species? Selbyana 26(1,2): 155-158.

Duarte, SJ (2014) Germinación *in vitro* de *Barkeria uniflora* Lex. Dressler y Halbinger, una orquídea endémica de México. Tesis de licenciatura en Biología. FES-Zaragoza. pp.88.

Estrada JA (1996) Imágenes en caña de maíz. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México. pp. 11-28.

Ferrera R y Alarcón A (2004) Biotecnología de los hongos micorrízicos Arbusculares. Microbiología de Suelos. Especialidad de Edafología. Instituto de Recursos Naturales. Colegio de Postgraduados. INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias).

Flores G, Legaria J, Gil I y Colinas MT (2008) Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl., una orquídea amenazada y endémica de México. Revista Chapingo. Serie horticultura. 14(3): 347-353.

Gallo C, França J, Arango M, González S, Francomano V, Carracedo C, Costa O, Alves R y Craviotto R (2015) Validación de la Prueba de Tetrázolío como Método de Vigor para semillas de *Glycine max*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria Oliveros, Oliveros, Argentina.

Gehlert R y Kindl H (1991) Reactions of chemical defence by orchids. Comptes Rendus. 250: 1944-1947.

George EF. y Sherrington P (1984) Plant propagation by tissue culture. Exegetics. ITD. Basingstoke. p. 709.

Goh CJ, Sim AA, Lim G (1992) Mycorrhizal associations in some tropical orchids. Scientific Journal of the American Orchid Society 7: 13-17.

González GM (2008). Aspectos de sistemática y biología del complejo *Rhizoctonia*. Fitosanidad 12(3): 147-159.

González V, Porta MA y Rubio S (2006) Review. Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia*. Spanish Journal of Agricultural Research. 4:33-79.

Gual M y Rendón A (comps.) (2014) Bosques mesófilos de montaña de México: diversidad, ecología y manejo. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. p. 352.

Hágsater E, Soto MA, Salazar G, Jiménez R, López MA y Dressler, RL (2005) Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México, D.F. p. 304.

Hadley G y Williamson B (1972) Features of mycorrhizal infection in some Malayan orchids. New Phytologist. 71: 1111-1118.

Harley JL y Smith SE (1983). Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, Londres.

Heijden A, Martin M, Selosse M y Sanders R (2014). Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. New Phytologist (205): 1406–1423.

Honrubia M (2009) Las micorrizas: Una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. 66(1): 133-144.

Hutner SH (1953) Comparative physiology of heterotrophic growth in plants. In: Growth and differentiation in plants. LOOMIS WE. (ed). Iowa State College Press. Ames, USA. p. 458.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) (2008) Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Putla Villa de Guerrero, Oaxaca. México: Prontuario de información geográfica municipal. Disponible en: http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/20/20073.pdf Fecha de consulta: junio 2016.

Institute of Botany, AS CR. Department of Mycorrhizal Symbioses (2003) Orchid mycorrhiza. Disponible en: http://www.ibot.cas.cz/mykosym/en_orch.html Fecha de consulta: abril 2015.

Jiménez C, Sosa R, Cortés P, Solís A, Íñiguez L y Ortega A (2014). México país megadiverso y la relevancia de las áreas naturales protegidas. Investigación y Ciencia. (60): 16-22.

Joaquín AL (2014) Dinámica nutrimental y cultivo de *Cuitlauzina pendula* en el bosque mesófilo de montaña de las sierras triqui-mixteca. Tesis de Licenciatura en Biología, FES-Zaragoza, UNAM. p 87.

Jones DL (2006) A complete guide to native orchids of Australia Including the Island Territories. Reed New Holland, Sydney.

Knudson C (1946) A new nutrient solution for the germination of orchid seed. American Orchid Society Bulletin 15: 214-217.

Kristiansen KA, Taylor DL, Kjølner R, Rasmussen HN y Rosendahl S (2001) Identification of mycorrhizal fungi from single pellets of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) using single-strand conformation polymorphism and mitochondrial ribosomal large subunit DNA sequences. Molecular Ecology 10:2089-2093.

Kristiansen KA, Freudenstein JV, Rasmussen FN, Rasmussen HN (2004) Molecular identification of mycorrhizal fungi in *Neuwiedia veratrifolia* (Orchidaceae). Molecular Phylogenetics and Evolution 33:251-258.

Lee H, Laguna A, Murguía J, Iglesias L, García B, Escobedo D, Martínez Y, Barredo F y Santana N (2010) Un protocolo de embriogénesis somática para la regeneración y caracterización *in vitro* de *Laelia anceps* sp. *dawsonii*. Revista Fitotecnia Mexicana 33(4): 323-332.

Leake JR (1994) The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. New Phytologist 127: 171-216.

Leopardi C y Cumana, L (2008) Listado de especies de la familia *Orchidaceae* para el estado Sucre, Venezuela. Lankesteriana International Journal on Orchidology 8(1): 93-103.

Leisca P, Antibus RK (1990) The occurrence of mycorrhizae in vascular epiphytes of two Costa Rican rain forests. Biotropica. 22: 250-258.

Lindemann EGP, Guncke JE, Davidson WO (1970) Meristem culture of *Cattleya*. American Orchid Society Bulletin 39: 1002- 1004.

López ML, Guillén K, Bertolini V, Encarnación S, Hernández M, Sánchez I y Damon A (2016) Estudio proteómico y morfométrico de la interacción *in vitro* entre *Oncidium sphacelatum* Lindl. (Orchidaceae) y *Thanatephorus* sp. RG26 (Ceratobasidiaceae). Mycorrhiza. 26 (5): 353-65.

López Y, Tejero D, Torres A y Luna I (2011) Flora del bosque mesófilo de montaña y vegetación adyacente en Avándaro, Valle de Bravo, Estado de México, México. Boletín de la sociedad Botánica de México 88: 35-53.

Luna RS, Barba AA. y Romero AJ (2004) Orquídeas: germinación de semillas. Unidad de investigación en Biología Vegetal (UIBV). FES- Zaragoza, UNAM. p. 17.

Machado NB, Custódio CC, Hosomi ST, Seaton PT y Marks TR (2009) Protocol for Tetrazolium Testing in Orchid Seeds. Orchid Seed Stores for Sustainable Use (OSSSU).

Mayo M, Cázares C, Cruz L y Flores H (2010) Germinación *in vitro* de semillas y desarrollo de plántulas de orquídeas silvestres de Tabasco. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco p. 32.

Marchisio FV y Berta G (1985) Endophytes of wild orchids native to Italy: their morphology, caryology, ultrastructure and cytochemical characterization. *New Phytologist* 100:623-641.

Martínez F (2008) Producción de capoforos de Macromicetes epigeos en masas ordenadas de *Pinus sylvestris* L. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica superior de Ingenieros de Montes. España.

Martos F, Munoz F, Pailler T, Kottke I, Gonneau C y Selosse MA (2011) The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. *Molecular Ecology*. (20):5098-109.

Mata M y Salazar V (2009) Propagation and establishment of three endangered mexican orchids from protocorms *Horticultural Science* 44(5): 1395-1399.

McCormick M, Whigham D y O'Neill J (2004). Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist* 163:425-438.

McCormick M, Whigham D, Sloan D, O'Malley K. y Hodkinson B (2006). Orchid-Fungus Fidelity: A marriage meant to last? *Ecology* 87(4): 903-911.

Mckendrick S (2000) Manual for *in vitro* germination of orchids. Ceiba Foundation for Tropical Conservation. Disponible en: www.ceiba.org/documents/CFTCpropman (SP).doc Fecha de consulta: octubre 2016.

Meisel JE, Kaufmann S, Pupullin F (2014) Orchids of Tropical America (An introduction and guide). Comstock Publishing Associates. pp. 259.

Menchaca R y Moreno D (2011) Conservación de orquídeas, una tarea de todos. Universidad Autónoma de Chapingo. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/168839/Conservaci_n_de_Orqu_deas__Una_Tarea_de_Todos.pdf Fecha de consulta: octubre 2016.

Menkis A, Vasiliauskas R, Taylor AFS, Stenstrom E, Stenlid J y Finlay R (2006) Fungi in decayed roots of conifer seedlings in forest nurseries, afforested clear-cuts and abandoned farmland. *Plant Pathology*. 55 (1):117-129.

Mitchell R (1989) Growing Hardy Orchids from seed at Kew. *The Plants man* 3(2): 73-86.

Monreal V y De la Rosa M (2014). Situación de las orquídeas en México. *Universitarios Potosinos. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.* (2): 4-9.

Montaño-Samaniego M (2011) Evaluación del efecto de hongos micorrízicos en el proceso de aclimatación de la orquídea *Oncidium sphacelatum* producida *in vitro* en la UTHH. Tesis de Técnico Superior Universitario en Agrobiotecnología, Universidad Tecnológica de la Huasteca Hidalguense.

Moreno D (2012) Estudios de germinación *in vitro* e *in situ* de *Epidendrum parkinsonianum* Hook. y *Acineta barkeri* (Bateman) Lindl. (Orchidaceae). Tesis de Maestría en Ecología tropical. Universidad Veracruzana. pp. 112.

Mosquera AT, Bayman P, Prado AG, Gomez A y Otero JT (2013) The double life of *Ceratobasidium*: orchid mycorrhizal fungi and their potential for biocontrol of *Rhizoctonia solani* sheath blight of rice. *Mycologia* 105:141-150.

Munsell Color, Macbeth Division of Kollmorgen Instruments Corporation (1994) rev. ed.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 5:473-497.

Nava F, Jiménez A, Sánchez, Arenas L, Ventura E, y Evangelista S (2011) Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laelia eyermaniana* Rchb. F. generadas *in vitro*. *Polibotánica* 32:107-117.

Nicole A, Katja P, Gerhard G (2009) Is it better to give than to receive? A stable isotope perspective on orchid-fungal carbon transport in the green orchid species *Goodyera repens* and *Goodyera oblongifolia* 182 (1): 8-11.

Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT) (2010). Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestre. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. Disponible en: http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT_2010.pdf Fecha de consulta: agosto 2015.

Olalde V y Serratos R (2004) Biofertilizantes: Micorrizas y bacterias promotoras de crecimiento. Unidad Irapuato. Memoria. INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias).

Ordóñez F, Otero JT. y Díez G (2012) Orchid endophytes and their effect on growth in *Vanilla planifolia* Andrews. *Acta Agronómica*. 61(3): 282-290.

Ordóñez F, Otero JT y Díaz A (2014) Interacciones micorrízicas de *Masdevallia coccínea* Linden ex Lindl. *Orquideología*, 31(2): 123-135.

Ortega MP y González D (2008) Los hongos asociados a las orquídeas terrestres en la restauración. pp 219-227. In: Heredia AG (Ed), Tópicos sobre diversidad ecológica y usos de los hongos microscópicos en Iberoamérica. Instituto de Ecología, A.C., Xalapa, México.

Ortega MP (2008) Propagación simbiótica de orquídeas terrestres con fines de restauración edafocológica. pp. 85-96. In: Comp. Álvarez J y Monroy A. Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración, Facultad de Ciencias, UNAM. México D. F.

Ortega MP, Martínez A y Chávez V (2009) Conservación y propagación de orquídeas. En: Lot A y Cano Z(Eds.) Biodiversidad del Pedregal de San Ángel. UNAM, Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y Coordinación de la Investigación Científica, D.F. México. pp. 483-495.

Otero JT, Ackerman JD y Bayman P (2002) Diversity and host specificity of mycorrhizal fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany* 89: 1852–1858.

Otero JT, Ackerman JD y Bayman P (2004) Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology* 13: 2393-2404.

Otero JT, Flanagan NS, Herre EA, Ackerman JD y Bayman P (2007) Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid, *Ionopsis utricularioides*. *American Journal of Botany* 94: 1944-1950.

Otero JT, Bayman P y Ackerman JD (2005) Variation in mycorrhizal performance in the epiphytic orchid *Tolumnia variegata* in vitro: The potential for natural selection. *Evolutionary Ecology* 19: 29–43. 58.

Otero JT, Thrall PH, Clements M, Burdon JJ y Mille JT (2011). Codiversification of orchids (*Pterostylidinae*) and their associated mycorrhizal fungi. *Australian Journal of Botany* 59(5): 480-497.

Pantoja J., Pedraza M, López A y Apáez P (2016) Distribución y caracterización morfológica de genotipos silvestres de *Cuitlauzina pendula* Lex (*Orchidaceae*). *Interciencia* 4(12): 819-825.

Parrent JL, Vilgalys R (2007) Respuesta de la biomasa y la composición de las hifas fúngicas ectomicorrízicas al aumento de CO₂ y la fertilización con nitrógeno. *New Phytologist*. 176 (1): 164-74.

Pereira O, Megumi M, Borges A, y Araújo F (2005b) Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. *Canadian Journal of Botany* 83: 54–65.

Pereira O, Kasuya M C, Rollemberg C y Borges AC (2005) *In vitro* seed Germination of *Oncidium flexosum* (Orchidaceae) by Rhizoctonia-like Mycorrhizal fungi. *R. Bras. Ci. Solo* 29: 199-206.

Pérez V, Gómez A y Ávila I (2013) Distribution patterns of *Cuitlauzina pendula* La Llave y Lex (*Orchidaceae*) over its phorophytes at the ‘Barranca de Cupatitzio’ National Park, in Uruapan, Michoacán, México. *Lankesteriana*. 13(1-29):145.

Pérez V y Ávila I (2013) Mating system and reproductive success of *Cuitlauzina pendula* La Llave y Lex (*Orchidaceae*) at the National Park ‘Barranca del Cupatitzio’ of Uruapan, Michoacán, México. 13(1-29):146.

Pérez V, Ávila y Salgado R (2014) Propagación *in vitro* de *Cuitlauzina pendula* La llave y lex. (Orchidaceae) como una alternativa para su conservación. En: Biotecnología y Agricultura Sustentable III (Simposio Nacional) pp. 209-2014.

Pineda U (2008) Multiplicación *in vitro* de la orquídea *Cuitlauzina pendula* Lex. Tesis de licenciatura en Ingeniería Agrónoma. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Uruapan Michoacán.

Pinteres (2017). Orquídeas. Disponible en: <https://es.pinterest.com/solerno/orqu%C3%ADdeas/>
Fecha de consulta: octubre 2017.

Porras A y Bayman P (2007) Mycorrhizal fungi of Vanilla: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *Micología* 99: 510- 525.

Programa Sectorial de Medio Ambiente y Recursos Naturales (PROMARNAT) (2015). Plan Nacional de Desarrollo 2013-2018. Gobierno de la República Mexicana. Disponible en: <http://www.semarnat.gob.mx/archivosanteriores/Documents/PROMARNAT%202013-2018.pdf>
Fecha de consulta: marzo 2016.

Rasmussen HN (1995) *Terrestrial orchids: From seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 443.

Rasmussen HN y Whigham DF (2002) Phenology of roots and mycorrhiza in orchids species differing in phototrophic strategy. *New phytologist* 154: 797-807.

Raven R, Evert R y Eichhorn S (1986) *Biology of plants*. Worth Publishers Inc., Nueva York, p. 775.

Reinecke T y Kindl H (1994) Characterization of bibenzyl synthase catalysing the biosynthesis of phytoalexins of orchids. *Phytochemistry* 35: 63-66.

Rendón Lara Cuauhtémoc Edgar (2014). Germinación asimbiótica y simbiótica de *Chysis bractescens* y aislamiento de hongos micorrízicos de *Cycnoches ventricosum*. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Agrónoma. Universidad Veracruzana.

Reyes TC (1973) El fenómeno de la micorriza. *Orquídea (México)* 3(9): 280-290.

Roberts P (1999) *Rhizoctonia* forming fungi: A Taxonomic guide. Royal Botanical Garden Kew, Londres. p. 246.

Robbins S (1992) Towards a of the popular mexican understanding of the popular Mexican orchid, *Cuitlauzina pendula*. *The Orchid Review*. 100(1180): 55-56.

Ryszka P (Unpublished) Uncultured fungus clone B2.2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8 S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. Submitted.

Salazar V y Mata M (2003) Micropropagación y conservación de orquídeas mexicanas en el Jardín Botánico Clavijero. *Lankesteriana* 7:151-153.

Salazar G (2005) Orquídeas. Diversidad Biológica e inventarios. Departamento de botánica del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México. Disponible en: http://www.ibiologia.unam.mx/pdf/directorio/s/salazar/orquideas_pedregal.pdf Fecha de consulta: octubre 2016.

Sandoval E, Terrazas T y y Villaseñor J (2010) Diversidad de inclusiones minerales en la subtribu *Oncidiinae* (Orchidaceae). *Revista de Biología Tropical* 58 (2):733-755.

Selosse M y Martin F (2013) Mycorrhizas and New Phytologist: une vraie histoire d'amour. *New Phytologist*. 200(3): 587-589.

Shan XC, Liew EC, Weatherhead MA, y Hodkiss IJ (2002) Characterization and taxonomic placement of *Rhizoctonia*-like endophytes from orchid roots. *Mycologia* 94: 230-239.

Shen B, Burpee Ly Ogoshi, A (1998) Identification of *Rhizoctonia* species. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.

Sneh B, Burpee, L y Ogoshi, A (1991) Identification of *Rhizoctonia* species. American Phytopathological Society. p. 133.

Smith S y Read D (1997) Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, San Diego.

Sommer J, Pausch J, Brundrett MC, Dixon KW, Bidartondo MI y Gebauer G (2012) Limited carbon and mineral nutrient gain from mycorrhizal fungi by adult Australian orchids. *Am J Bot* 99(7):1133-45.

Soto MA. y Solano RA (2007) Ficha técnica de *Cuitlauzina pendula*. En: Soto MA. (compilador). Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000. Instituto Chinoin A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029. México. D.F.

Soto MA Hágater E, Jiménez R, Salazar G, Solano R y Flores R (2007). Las Orquídeas de México: Catálogo digital. Instituto Chinoin, A.C., México, D.F.

Suárez JP, Weib M, Abele A, Garnica S, Oberwinkler F y Kottke I (2006) Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycology*. Res 110:1257-1270.

Sureepor N, Sawitree S y Leka M (2010) Isolation and identification of *Rhizoctonia*-like fungi from roots of three orchid genera, *Paphiopedilum*, *Dendrobium*, and *Cymbidium*, collected in Chiang Rai and Chiang Mai provinces of Thailand. *Mycorrhiza* 20:459-471

Swartz ND y Dixon KW (2009) Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Ann Bot* 104:543–556

Taylor DL y McCormick M (2008) Internal Transcribed Spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetes orchid mycorrhizas. *New Phytologist*. 177(4):1020-1033.

Taylor DL y McFarland JW (Unpublished) A first comprehensive census of fungi in soil reveals both hyperdiversity and fine-scale niche partitioning. *Ecology*.

Téllez A (2011) Diagnóstico de la familia *Orchidaceae* en México. Universidad Autónoma de Chapingo. Disponible en: <http://snics.mx/sinarefi/biblioteca/Diagnostico%20de%20la%20familia%20Orchidaceae%20en%20Mexico.pdf> Fecha de consulta: marzo 2017.

Torres, GI (2006) Sistema y éxito reproductivo de *Cuitlauzina pendula* La Llave y Lex. (Orchidaceae) en San Andrés Coru Michoacán. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Uruapan Michoacán.

Torres P, Hinojosa MB, García R, Daniell T. y Carreira JA (2009). Relación entre variabilidad biogeoquímica y rasgos estructurales de la comunidad microbiana en suelos forestales: Bosques de *Abies pinsapo* como caso de estudio. *Ecosistemas* 18 (2): 91-102.

Tropicos.org. Missouri Botanical (2015). Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/23519296> Fecha de consulta: octubre 2016.

Trudell S, Rygiewicz P y Edmonds R (2003) Nitro-gen and carbon stable isotope abundances support the mycoheterotrophic nature and host specificity of certain achlorophyllous plants. *New Phytologist* 160: 391-401.

Truong C, Mujic AB, Healy R, Kuhar F, Furci G, Torres D, Niskanen T, Sandoval PA., Fernandez N., Escobar JM, Moretto A, Palfner G, Pfister D, Nouhra E, Swenie R, Sanchez M, Matheny PB. y Smith ME (Unpublished) *Ceratobasidium* sp. voucher MES-2154 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence.

Useche D (2014) Inventario taxonómico de especies de la familia Orchidaceae en un área de bosque andino del predio La sierra, santuario de fauna y flora guanentá alto río Fonce. Tesis de Técnico Agroforestal. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD). pp. 103.

Vacin F y Went FW (1949) Some pH changes in nutrient solutions. *Bot. Gaz.* 110: 605-613.

Villaseñor JL (2003) Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. *Interciencia* 28: 160-167.

Villaseñor JL y Ortiz R (2014) Biodiversidad de las plantas con flores (División Magoliophyta) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, Supl. 85(1): 134-142.

Warcup JH y Talbot PHB (1967) Perfect estates of *Rhizoctonia* associated with orchids. *New Phytologist* 66: 631-641.

Warcup JH y Talbot PHB (1980) Perfect states of *Rhizoctonia* associated with orchids III. *New Phytologist* 86: 267-272.

Warcup JH (1981) The mycorrhizal relationship of Australian orchids. *New Phytologist*. 87:371-381.

Warcup JH y Talbot PHB (1996) Perfect satates of *Rhizoctonia*. *Transactions British Mycological Society* 49(3): 427-435.

Yoder JA, Zettler LW y Stewart SL (2000) Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. *Plant Science* 156:145–150.

Zelmer DC, Cuthbertson L y Currah RS (1996) Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. *Mycoscience* 37:439-448.

Zettler LW, TW Delaney y Sunley SL (1998). Seed propagation of the epiphytic greenfly orchid *Epidendrum conopseum* R. Brown, using its endophitic fungus. *Selby Botanical Gardens* 19 (2): 249-253.

Zettler LW, Sharma J y Rasmussen FN (2003) Mycorrhizal diversity. pp. 205–226 in Dixon KW, Kell SP y Cribb PJ, editors. *Orchid conservation*. Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu, Sabah.

Zettler LW, Poulter SB, McDonald KI y Steward. SL (2007) Conservation-driven propagation of an piphytic Orchid (*Epidendrum nocturnum*) with a mycorrhizal fungus. *Hortscience* 42(1): 135–139.

XI ANEXOS

Anexo 1 Sinopsis taxonómica del género-forma *Rhizoctonia*

Cuadro 7. Sinopsis taxonómica del género-forma *Rhizoctonia*; géneros anamorfos y teleomorfos reconocidos actualmente (Tomado de González *et al.* 2006).

Anamorfo	Especie tipo	Basónimo	Teleomorfo	Especie tipo	Basónimo
<i>Ascorhizoctonia</i> Yang y Korf	<i>Agapanthus. praecox</i> Yang y Korf	<i>Agapanthus</i> Yang y Korf	<i>Tricharina</i> Eckblad	<i>T. gilva</i> Eckblad	<i>T. gilva</i> Eckblad
<i>Ceratorhiza</i> R.T. Moore	<i>C. goodyerae repentis</i> (Constantin) R.T. Moore	<i>Rhizoctonia goodyera erepentis</i> Constantin	Ceratobasidium D.P. Rogers	<i>C. calosporum</i> D.P. Rogers	<i>C. calosporum</i> D.P. Rogers.
<i>Chrysorhiza</i> Andersen y Stalpers	<i>C. zaeae</i> (Voorhees) Andersen y Stalpers	<i>R. zaeae</i> Voorhees	<i>Waitea</i> Warcup y Talbot	<i>Waitea. circinata</i> Warcup y Talbot	<i>Waitea. circinata</i> Warcup y Talbot.
<i>Epulorhiza</i> R.T. Moore y Andersen	<i>E. repens</i> (Bernard)R.T. Moore	<i>R. repens</i> Bernard	<i>Tulasnella</i> Shoröeter	<i>T. violeta</i> (Quél) Bourd y Galzin	<i>T. violea</i> (Quél) Bourd y Galzin
<i>Opadorhiza</i> Andersen y R.T. Moore	<i>O. globularis</i> (Saksena y Vartaja) Andersen y R.T. Moore	<i>R. globularis</i> Saksena y Vartaja	<i>Sebacina</i>	<i>Sebacina vermifera</i> Oberwinkler	<i>Sebacina vermifera</i> Oberwinkler.
<i>Moniliopsis</i> Ruhland (Sin.= <i>Rhizoctonia</i> D.C)	<i>M. aderholdii</i> Ruhland	<i>Rhizoctonia. solani</i> J.G. Kühn	<i>Thanatephorus</i> Donk	<i>Thanatephorus. cucumeris</i> (Frank) Donk.	<i>Hypochnus cucumeris</i> Frank.
Tanatophyllum Nees	<i>T. croccorum</i> (Pers. Fr.) R.T. Moore	Sclerotium croccorum Pers.	Helicobasidium Pat.	H.purpureum Pat	H. purpureum Pat.

Anexo 2. Medios de cultivo.

Cuadro 8. Medio de aislamiento fúngico (MAF) para hongos micorrízicos orquideoides (Clements, 1988, Mitchell, 1989).

Reactivo	g/ L ⁻¹
Nitrato de calcio Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	0.5
Fosfato de potasio KH ₂ PO ₄	0.2
Cloruro de potasio KCl	0.1
Sulfato de magnesio MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1
Extracto de levadura	0.1
Agar bacteriológico	8.5
Agua destilada	1 000 mL
	pH: 5.5-6

Cuadro 9. Medio de Papa dextrosa agar (PDA)

Reactivo	g/ L ⁻¹
Papa Dextrosa Agar (PDA)	39
Agua destilada	1 000 mL pH: 6.8

Cuadro 10. Medio de ácido tánico (MAT) para hongos micorrízicos orquideoides

Reactivo	g/ L ⁻¹
Extracto de malta	2.5
Ácido tánico	2.5
Agar bacteriológico	10
Agua destilada	1 000 mL pH: 5.5-6

Cuadro 11. Caldo de dextrosa papa (PDB)

Reactivo	g/ L ⁻¹
Caldo de dextrosa papa (PDB)	24
Agua destilada	1 000 mL pH: 6.8

Cuadro 12. Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS, 1962)

	Reactivo	g/ 10L
Macronutrientes I	Nitrato de amonio (NH ₄)NO ₃	16.5
	Nitrato de potasio KNO ₃	19.0
	Sulfato de magnesio MgSO ₄ 7H ₂ O	3.7
	Fosfato de potasio KH ₂ PO ₄	1.7
Cloruro de calcio II	Cloruro de calcio CaCl ₂	4.4
	Sulfato de magnesio MnSO ₄ H ₂ O	0.1689
	Sulfato de zinc ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.086
	Ácido bórico H ₃ BO ₃	0.062
Micronutrientes III	Yoduro de potasio KI	0.0083
	Molibdato de sodio Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.0025
	Sulfato cúprico CuSO ₅ 5H ₂ O	0.00025
	Cloruro de cobalto CoCl ₆ H ₂ O	0.00025

Fe-EDTA IV	Sulfato ferroso $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.278
	EDTA sódico Na_2EDTA	0.373
Vitaminas	Tiamina-HCl $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS}$	0.001
	Ácido Nicotínico $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	0.005
	Piridoxina $\text{HCl} \cdot \text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3$	0.005
	Inositol $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	1.0
	Glicina $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	0.02
	Sacarosa $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	300
	Agar bacteriológico	8.5
		pH: 5.5-5.75

Cuadro 13. Medio básico de avena (MBA) (Mitchell, 1989).

Reactivo	g/ L ⁻¹
Avena en polvo	3.5
Extracto de levadura	0.1
Agar bacteriológico	6.0
Agua destilada	1000 mL
	pH: 5.5-6

Cuadro 14. Medio Knudson C (Kc) (Knudson, 1946).

	Reactivo	g/10 L
Macronutrientes	Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$	5.0
	Nitrato de calcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10.0
	Fosfato de potasio KH_2PO_4	2.5
	Sulfato de magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.5
Hierro	Sulfato de hierro III $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.5
Micronutrientes	Sulfato de magnesio $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.075
	Ácido bórico H_3BO_3	0.000560
	Sulfato de cobre II $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.000624
	Trióxido de molibdeno MoO_3	0.00016
	Sulfato de zinc $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.00331
	Sacarosa	200
	Agar bacteriológico	100
		pH: 5.6

Anexo 3. Porcentaje promedio de colonización micorrízica de las raíces de las orquídeas epífitas *Cuitlauzina pendula* y *Prosthechea* sp.

Cuadro 15 Porcentaje promedio de colonización micorrízica de las raíces de las orquídeas epífitas *Cuitlauzina pendula* y *Prosthechea* sp. El superíndice indica el segmento donde se obtuvo cada uno de los aislados que se usaron para los experimentos y su fotografía correspondiente en la figura 12.

Especie	No. Planta (P) y raíz (R)	Porcentaje de colonización de cada segmento %									Promedio total Colonización (%)
		Base 1	2	3	4	5	6	7	Ápice 8	9	
<i>Cuitlauzina pendula</i>	P 1, R 1	25.0	35.0	40.0	15.0	----	----	----	----	----	28
	P 1, R 3	45.3	35.2	30.1	49.1	46.0	55.3	61.0	----	----	42
	P 1, R 5	45.0	55.0	63.2	56.3	58.1	-----	-----	-----	-----	46
	P 2, R 1	63.0	55.3	54.2	56.2	49.2	55.7	-----	-----	-----	55
	P 2, R 2	48.0	43.8	57.5	61.2	58.7	69.7	46.7	-----	-----	55
	P 2, R 3	35.5	49.0	50.3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	44
	P 3, R 1	42.4	39.4	49.5	38.3	48.4	56.7	56.4	-----	-----	47
	P 3, R 2	56.2	41.2	60.1	62.6	45.0	46.6	48.8	44.3	43.5	50
	P 3, R13	43.5	45.2	44.5	44.3	47.5	44	43.1	-----	-----	38
	P 4, R 1	46.3	48.2	51.0	53.3	55.0	54.7	----	-----	-----	51
	P 4, R 2	63.2	58.5	54.3	55.2	-----	----	----	-----	-----	58
	P 4, R 4	54.9	55	58.3	54.0	57.0	48.8	54.6	-----	-----	55
	P 5, R 1	43.5	52.4	62.3	45.2	48.7	51.4	-----	-----	-----	56
	P 5, R 4	58.2	54.8	59.5	57.6	59.8	58.7	-----	-----	-----	58
	P 5, R 5	55.2	61.7	64.3	58.7	68.0	58.8	-----	-----	-----	61
	P 6, R 1	58.6	68.7	69.7	-----	-----	----	-----	-----	-----	66
	P 6, R 3	85.0	70.0	85.0 ^a	60.0	90.0	90.0	90.0	90.0	-----	83
	P 6, R 5	90.0	70.0	65.0	55.0	45.0 ^b	10.0	25.0	80.0	-----	55
	P 7, R 1	73.5	71.3	68.2	58.4	65.4	-----	-----	-----	-----	66
	P 7, R 3	54.5	62.2	52.2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	56
	P 7, R 4	63.0	54.2	57.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	58
P 8, R 1	50.0	50.0	55.0	55.0 ^c	40.0	25.0	45.0	-----	----	45	
P 8, R 2	48.2	44.3	54.1	55	54.1	65.2	42.0	----	-----	52	
P 8, R 3	52.2	57.1	48.2	45.9	44.3	47.1	58.4	55.3	-----	51	
P 9, R 3	55.3	54.2	55.2	48.3	58.3	55.2	57.3	----	----	54	
P 9, R 5	54.2	58.2	48.3	53.3	57.2	----	-----	-----	-----	54	
P 9, R 6	58.3	55.3	57.3	59.2	61.3	60.8	-----	----	----	48	
<i>Prosthechea</i> sp.	P 1, R2	45.0 ^d	70.0	20.0	55.0	10.0	-----	-----	-----	-----	40
	P 1, R 6	43.2	51.3	48.3	57.3	46.3	49.2	----	-----	-----	49
	P 1, R 7	54.1	52.2	55	53.1	50.1	-----	-----	-----	-----	52

Anexo 4. Características merísticas (cm) promedio de plántulas de *Cuitlauzina pendula* de tres tamaños (0.5, 1.0 y 3.0 cm) para su micorrización *in vitro*.

Cuadro 16 Características merísticas (cm) promedio de plántulas de *Cuitlauzina pendula* para su micorrización *in vitro* (Primera categoría) con los aislados A1, A2 A3 y A4. Tratamientos asimbióticos: A=Aislado, MBA=Medio básico de avena y MS=Murashige y Skoog. N= 16.

Tratamiento	Planta		Pseudobulbos		Hojas		Raíz	
	Altura total (cm)	No.	Altura (cm)	Ancho (cm)	No.	Largo (cm)	No.	Largo (cm)
MBA	0.44±0.13	1	0.15±0.03	0.15±0.03	2.47±0.38	0.23±0.06	0	0
MS	0.53±0.06	1	0.21±0.01	0.21±0.01	3.121±0.17	0.33±0.05	0.50±0.17	0.11±0.8
A1	0.48±0.01	1	0.22±0.01	0.21±0.01	3.00±0.00	0.26±0.02	0	0
A2	0.80±0.51	1	0.26±0.02	0.26±0.01	2.80±0.48	0.28±0.00	0.06±0.08	0.01±0.02
A3	0.48±0.07	1	0.26±0.01	0.26±0.01	2.31±0.44	0.22±0.01	0	0
A4	0.41±0.02	1	0.21±0.04	0.20±0.00	2.35±0.07	0.20±0.02	0.01±0.01	0.00±0.00

Cuadro 17. Características merísticas (cm) promedio de *Cuitlauzina pendula* para su micorrización *in vitro* (Segunda categoría) con aislados, A2 A3 y A4. Tratamientos asimbióticos: A=Aislado, MBA=Medio básico de avena y MS=Murashige y Skoog. N = 20.

Tratamiento	Planta		Pseudobulbos		Hojas		Raíces	
	Altura total (cm)	No.	Altura (cm)	Ancho (cm)	No.	Largo (cm)	No.	Largo (cm)
MBA	1.00±0.18	1	0.37±0.10	0.31±0.06	3.00±0.00	0.64±0.12	10.5±0.34	0.26±0.14
MS	0.97±0.29	1	0.32±0.23	0.29±0.06	2.80±0.16	0.36±0.27	0.75±0.52	0.17±0.13
A1	0.85±0.11	1	0.26±0.05	0.26±0.05	3.00±0.00	0.49±0.10	10.5±0.25	0.24±0.11
A2	0.93±0.19	1	0.32±0.02	0.25±0.19	0.25±0.10	0.58±0.05	0.80±0.16	0.16±0.50
A3	1.00±0.08	1	0.31±0.09	0.25±0.05	2.95±0.25	0.59±0.06	0.80±0.23	0.18±0.07
A4	1.07±0.17	1	0.32±0.03	0.32±0.04	2.95±1.00	0.69±0.18	0.80±0.28	0.31±0.11

Cuadro 18. Características merísticas promedio de plántulas de *Cuitlauzina pendula* para su micorrización *in vitro* (Tercera categoría) con los aislados A1, A2 A3 y A4. Tratamientos asimbióticos: A=Aislado, MBA=Medio básico de avena y MS=Murashige y Skoog. N = 30.

Tratamiento	Planta		Pseudobulbos		Hojas		Raíces	
	Altura total (cm)	No.	Largo (cm)	Ancho (cm)	No.	Largo (cm)	No.	Largo (cm)
MBA	2.86±0.57	1	0.45±0.06	0.43±0.07	3.53±0.28	2.47±0.43	2.13±0.39	1.37±0.40
MS	2.91±0.32	1	0.52±0.10	0.52±0.10	3.40±0.43	2.35±0.26	2.47±0.54	1.49±0.26
A1	2.93±0.37	1	0.43±0.20	0.43±0.20	3.63±0.33	2.47±0.26	2.53±0.75	1.37±0.51
A2	2.85±0.38	1	0.48±0.19	0.48±0.19	3.70±0.57	2.45±0.31	2.50±0.50	1.49±0.40
A3	2.90±0.23	1	0.57±0.26	0.57±0.26	3.63±0.36	2.45±0.35	2.50±0.90	1.43±0.62
A4	3.03±0.34	1	0.49±0.13	0.49±0.13	3.53±0.54	2.61±0.46	2.70±0.69	1.33±0.34

Anexo 5. Endófitos no micorrízicos obtenidos a partir de raíces de *Cuitlauzina pendula*.



Figura 40. Endófitos no micorrízicos obtenidos a partir de raíces de *Cuitlauzina pendula*.

Anexo 6. Plántulas cultivadas *in vitro* procedentes de colecciones.

6.1. Efecto del cultivo simbiótico de plántulas cultivadas *in vitro* de *Cuitlauzina pendula*

Fueron recibidos dos frascos con plantas de *Cuitlauzina pendula* cultivadas *in vitro* donadas por el Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Jardín Botánico, UNAM. Se desconoce la procedencia del material biológico, así como la edad de éstas.

Se les cortó parte de las raíces, no lograron sobrevivir a causa del estrés en que fueron sometidas, además el medio que se utilizó en esa ocasión fue MBA 100 % el cual favoreció en el crecimiento de los aislados (A1, A2, A3 y A4) y estos invadieron a la plántula evitando que tuviera acceso a la luz. En la parte asimbiótica (MS 50 %) solamente el 50 % logró sobrevivir debido al estrés en que fueron sometidas y en el tratamiento MBA 100 % ninguna logró sobrevivir por la falta de azúcares (Fig. 1).



Figura 41. Plántulas de *Cuitlauzina pendula* en diferentes tratamientos. a) aspecto de las plantas inoculadas (aislados A1, A2, A3 y A4); b) plántulas sembradas en medio asimbiótico MS 50%; c) plántulas sembradas en MBA 100%.