



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Desarrollo de una trampa *in situ* para el Aislamiento Micorrízico de Una Orquídea Epífita del Parque Nacional el Tepozteco.

TESIS PROFESIONAL
para obtener el título de
BIOLOGO
Área
Investigación en Biología Vegetal

PRESENTA:

JESUS BERNARDO CRUZ HIGAREDA

Director de Tesis

M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales

PAPIME PE204612





UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.**

Comunico a usted que el alumno **CRUZ HIGAREDA JESÚS BERNARDO**, con número de cuenta **304134483**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **8** del mes de **abril** de 2014 a las **12:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE	BIÓL. ELVIA GARCÍA SANTOS	
VOCAL	M. en C. BÁRBARA SUSANA LUNA ROSALES	
SECRETARIO	BIÓL. JUAN ROMERO ARREDONDO	
SUPLENTE	BIÓL. MARCO ANTONIO HERNÁNDEZ MUÑOZ	
SUPLENTE	DRA. HORTENSIA ROSAS ACEVEDO	

El título de la tesis que presenta es: **Desarrollo de una trampa *in situ* para el Aislamiento Micorrízico de Una Orquídea Epífita del Parque Nacional “El Tepozteco”.**

Opción de titulación: tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
México, D. F., a 24 de febrero de 2014

Dr. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR
DIRECCION

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

“Su padre es el Sol, su madre la Luna,
El Viento lo llevó en su vientre,
La Tierra fue su nodriza.”

TABULA SMARAGDINA

Hermes Trismegistus



Dedicatoria.

A mi madre por haberme dado la vida, por su apoyo incondicional, comprensión, amor y ayuda en los momentos más difíciles; quien ha sido el impulso durante toda mi carrera, quien me ha dado todo lo que soy como persona: mis valores, mis principios, mi empeño y perseverancia para conseguir mis objetivos.





Agradecimientos.

Mi más profundo agradecimiento a los Maestros Bárbara Susana Luna Rosales y Amadeo Barba Álvarez [†] por haberme brindado la oportunidad de desarrollar mi tesis profesional, por todo el apoyo, disponibilidad y confianza, que me han dado la oportunidad de crecer profesionalmente desde el día en que nos conocimos.

A mis amigos Ángelo, Goretti, Toño, y Cesar por todos los momentos que pasamos juntos, por las tareas que juntos realizamos y por la confianza que en mi depositaron.

A mis compañeros de laboratorio Oscar, Denisse, Chris, Belem, Héctor, Alejandra, Ramiro e Irving por haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de vivencias que nunca olvidare.

A Paola por los momentos de comprensión, apoyo y sobre todo amistad.

Agradezco a Biol. Elvia García Santos, Biol. Juan Romero Arredondo, Biol. Marco Antonio Hernández Muñoz y Dra. Hortencia Rosas Acevedo por el apoyo brindado, por su tiempo, conocimientos, y sobre todo su amistad.

Agradezco al programa de apoyo a proyectos para la innovación y mejoramiento de la enseñanza PAPIME y al proyecto del saber tradicional a las nuevas tecnologías. Una opción para la naturación de zonas urbanas mediante el manejo de biofertilizantes (PE204612).

ÍNDICE

RESUMEN

1.0 INTRODUCCIÓN.....	1
-----------------------	---

2.0 ANTECEDENTES

2.1 INTERACCIONES MICORRÍZICAS.....	3
2.2 IMPORTANCIA BIOLOGIA DE LAS MICORRIZAS.....	7
2.3 CLASIFICACION MORFOLÓGICA DE LAS MICORRIZAS.....	8
2.4 MICORRIZA ORQUIDEOIDE.....	11
2.5 LAS SEMILLAS DE ORQUÍDEA.....	19
2.6 GERMINACIÓN SIMBIÓTICA.....	20
2.7 RESERVAS DE NUTRIENTES DURANTE LA GERMINACIÓN.....	24
2.8 FITOALEXINAS "CONTROL DE INFECCIÓN".....	26
2.9 MICOTRÓFIA.....	27
2.10 BALANCE MICOTRÓFIA / FOTOTRÓFIA.....	32
2.11 AISLAMIENTO MICORRÍZICO.....	34
2.12 RHIZOCTONIA.....	36
2.13 TRAMPEO MICORRÍZICO.....	40
2.14 ESPECIFICIDAD FÚNGICA.....	50
2.15 FACTORES ABIÓTICOS EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO.....	54
2.16 EPIFITOSIS.....	57
2.17 PARQUES NACIONALES.....	59
3.0 PARQUE NACIONAL "EL TEPOZTECO".....	61
4.0 DESCRIPCION BOTANICA DE LA ESPECIE.....	65

5.0 METODOLOGÍA

5.1 AREA DE ESTUDIO.....	69
5.2 ELABORACIÓN DE TRAMPAS CON SEMILLAS.....	71
5.3 INSTALACIÓN DE TRAMPAS PARA SU INOCULACIÓN EN CAMPO.....	73
5.4 RECOLECTA DE TRAMPAS.....	74
5.5 AISLAMIENTO FÚNGICO A PARTIR DE LAS TRAMPAS.....	75
5.6 AISLAMIENTO FUNGICO A PARTIR DE PLÁNTULAS Y PROTOCORMOS.....	75
5.7 PURIFICACIÓN DE MICORRIZAS Y OBTENCIÓN DE CEPAS.....	77
5.8 ALMACENAMIENTO MICORRÍZICO.....	77
5.9 GERMINACIÓN SIMBIOTICA <i>IN VITRO</i>	77
5.10 GERMINACION ASIMBIOTICA <i>IN VITRO</i>	77
5.11 EVALUACIÓN DE LA COMPATIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD FÚNGICA SOBRE LA GERMINACIÓN SIMBIÓTICA <i>IN VITRO</i>	78

6.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 TRAMPEO <i>IN SITU</i>	79
6.2 AISLAMIENTO MICORRÍZICO.....	98
6.3 AISLAMIENTO FÚNGICO A PARTIR DE PLÁNTULAS Y PROTOCORMOS.....	99
6.4 GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA.....	102
6.5 GERMINACIÓN SIMBIÓTICA.....	104
6.6 ESPECIFICIDAD FÚNGICA.....	111

7.0 CONCLUSIONES.....116

8.0 ANEXOS

9.0 BIBLIOGRAFIA

Resumen

La Orchidaceae requiere de una micorriza de vida libre para completar su ciclo de vida. A pesar de que la mayoría de sus miembros son epífitas tropicales y subtropicales, la presencia de micorrizas ha sido poco investigada. El grupo mejor estudiado ha sido el de las orquídeas terrestres, durante décadas había sido difícil evaluar la participación del hongo durante la germinación hasta que en 1993 Rasmussen y Whigham proponen un método de siembra y recuperación *in situ* de semillas de orquídeas, esclareciendo el tiempo de germinación, asociación, y establecimiento en el suelo. El objetivo del presente estudio fue desarrollar una trampa que permitiera la siembra de semillas maduras de la orquídea epífita *Rhynchostele cervantesii* para su posterior recuperación *in situ* con la consecuente micorrización. Se elaboraron 22 trampas con tela de nylon de 65 μm y a cada una se les colocó una esponja sintética con una muestra de semillas esparcidas sobre ella, Las trampas fueron colocadas sobre forófitos donde *R. cervantesii* habita naturalmente dentro de un área del Parque Nacional el Tepozteco. Del total, ocho trampas contenían semillas con hongos simbioses, en una de las trampas se encontraron cuatro protocormos aparentemente no inoculados, en dos trampas se observaron semillas en distintitos estadios de micorrización desde que el endófito pasaba a través del suspensor, ruptura de la testa y protocormo; en una trampa se encontró un protocormo necrosado y con la presencia de hongos, en cuatro trampas se los hongos estaban asociados a la superficie de la testa de las semillas. Las principales ventajas que demostró, esta nueva técnica, es que puede copiar ciertas características de su entorno; así como mantener un mayor contacto con la superficie irregular del forófito, es importante mencionar que no hay reportes sobre la micorrización *in situ* de esta especie endémica y amenazada. Por otro lado, este estudio es uno de los pioneros a nivel mundial que realiza el trampeo de una orquídea epífita. Se aislaron y purificaron hongos a partir de las trampas así como de plántulas recolectadas de la zona, de los nueve inóculos que se probaron bajo condiciones *in vitro* con semillas y protocormos solo dos resultaron ser micorrízicos, uno de los cuales estimula la ruptura de la testa pero es patógeno con los protocormos, mientras que la otra cepa no inocula a las semillas pero es un endófito de protocormos, concluyendo que la especificidad no es la misma bajo condiciones *in vitro* que *in situ* y que *Rhynchostele cervatensisii* emplea una micorriza específica para su germinación así como de cierta flora fúngica estacional para su supervivencia en campo.

Palabras clave: Orquídea, Epífita, Semillas, Micorriza, Trampeo.

1.0 ∞ INTRODUCCIÓN ∞

En la naturaleza las orquídeas requieren de una micorriza de vida libre para compensar la carencia de reservas de nutrientes (endospermo), estimular la germinación de las diminutas semillas parecidas a polvo y el desarrollo de plántulas (Clements, 1988). Después de haberse liberado de la cápsula las millones de semillas son dispersadas por el viento cubriendo considerables distancias (Fig. 1.) (Rasmussen, 1995) hasta que eventualmente se instalan en un sustrato adecuado (como la hojarasca, materia orgánica en descomposición presente en el suelo, o bien las ramas y troncos de los árboles) que alberga una micoflora diversa donde las hifas de ciertos grupos de hongos, especialmente basidiomicetos del grupo de las Rhizoctonias (Zelmer & Currah, 1995) que entran en contacto con la semilla de la orquídea y colonizan (ó infectan) al embrión formando ovillos intracelulares conocidos como pelotones (Peterson et al., 2004); más tarde estos pelotones



Figura 1. Fotografía de fruto dehiscente de Orquídea donde se aprecia la dispersión de las semillas.

son digeridos de manera controlada por el embrión liberando agua, carbohidratos, vitaminas, minerales y hormonas que promueven su desarrollo. Durante la vida de la orquídea hasta la talla adulta la digestión del hongo puede permanecer activa o inactiva (Rasmussen, 2002) suplementando o reemplazando la fotosíntesis (Hadley & Pegg, 1989; Rasmussen, 1995; Zettler, 2005). Por otra parte las orquídeas pueden utilizar diferentes grupos taxonómicos de hongos que son diferentes a los que inicialmente promueven el desarrollo del protocormo en una especie de sucesión fúngica (Dijk *et al.*, 1997). Este proceso de “alimentarse” de hongos (Micotrofia) es aparentemente único en la Orchidaceae y ha contribuido al éxito evolucionario de la familia (Rasmussen, 1995, 2002; Taylor *et al.*, 2003). No obstante esta dependencia a la micotrofia hace a la Orchidaceae muy vulnerable comparada con otros grupos de angiospermas, esto debido a que sin el hongo las orquídeas no pueden completar su ciclo de vida. La introducción de un método de siembra y recuperación *in situ* de semillas de orquídeas propuesto por Rasmussen y Whigham (1993), ha contribuido a entender los requerimientos de las orquídeas de



Figura 2 .Vendedora informal de orquídeas; muchos de los especímenes en estos establecimientos, pueden ser especies en peligro de extinción o incluso ser desconocidas para la ciencia. Tomado de Facebook AMO.

hábitos terrestres, esto a pesar de que la mayoría de los miembros de la familia son epífitas tropicales y subtropicales, siendo sus interacciones micorrízicas poco investigadas (Otero *et al* 2002; Nontachaiyapoom *et al*, 2011). Una gran proporción de especies de orquídeas son “raras” (endémicas) y se encuentran en peligro de extinción como resultado directo ó indirecto de las actividades humanas incluidas la recolección (Fig.2), destrucción y degradación del hábitat, pérdida del polinizador y compañeros fúngicos (Batty *et al.*, 2002; Cribb

et al., 2003; Zettler *et al.*, 2003). El gran potencial de pérdida de especies de orquídeas ocurre en los

tropicos, donde la diversidad de especies de orquídeas es elevada, mientras que su estudio es mínimo (Batty *et al.*, 2002; Cribb *et al.*, 2003). *Rhynchostele cervantesii* (La Llave & Lex.) es una orquídea pequeña epífita de hasta 30 cm de alto, incluyendo la inflorescencia, es endémica del eje Neovolcánico Transversal (México) y una porción de la Sierra Madre del Sur, en Michoacán, México, Morelos y Guerrero. Actualmente se le considera amenazada en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. El objetivo del presente trabajo de tesis fue utilizar una trampa *in situ* para obtener micorrizas que inoculan semillas de *Rhynchostele cervantesii*, dentro de un área del Parque Nacional el Tepozteco en el estado de Morelos, y posteriormente aislarlo y purificarlo *in vitro*.

2.0 ANTECEDENTES.

2.1 ∞ INTERACCIONES MICORRÍZICAS ∞

Uno de los fenómenos más interesantes en biología es aquel conocido como la simbiosis, el término simbiosis (del griego: σύν, syn, 'con'; y βίωσις, biosis, 'vivir') comúnmente describe interacciones estrechas y a largo plazo entre diferentes especies biológicas. El término fue acuñado por primera vez en 1879 por el micólogo alemán, Heinrich Anton de Bary, quien lo definía como "la convivencia de diferentes organismos". Algunos científicos restringen el término simbiosis sólo a las interacciones de beneficio mutuo (mutualismo) (Lewis 1985; Paracer & Ahmadjian, 2000), sin embargo esta engloba otras interacciones biológicas como el comensalismo, parasitismo, etc. (Parniske, 2004; Douglas, 2010).

La definición más amplia y universal de simbiosis, se aplica a las micorrizas como: "la convivencia de dos o más organismos" (Lewis, 1985; Smith & Read, 1997). El término micorriza, que literalmente significa Hongo-Raíz fue usado por primera vez por el patólogo forestal alemán Frank en 1885, quien aseguraba que la interacción entre planta y hongo era un requisito necesario para la nutrición de ambos socios (Trappe, 2005).

Recientemente las micorrizas se han definido como asociaciones entre hifas fúngicas y los órganos de absorción presentes en el suelo de las plantas superiores (Harley & Smith, 1983).

Por otra parte las micorrizas se han categorizado y definido solo como asociaciones mutualistas; este tipo de definiciones tienen poco valor debido a que excluyen otros tipos de asociaciones, incluyendo las patógenas.

Brundrett (2004) propone una nueva definición, más amplia que abarca toda la diversidad de micorrizas, sin excluir otro tipo de asociaciones entre las plantas y los hongos. "la Micorriza es una asociación simbiótica esencial para uno o ambos socios, entre un hongo (de vida especializada en el suelo y la planta) y una raíz (u otro órgano de contacto con el

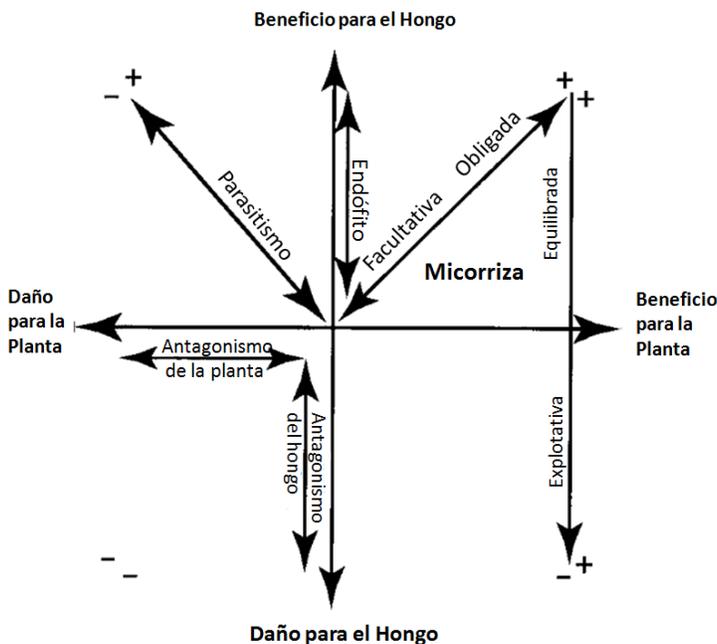


Figura 3 Relaciones simbióticas entre plantas y hongos extraído de Brundrett (2004)

sustrato) de una planta viva, de la cual es principalmente responsable para la transferencia de nutrientes. La micorriza ocurre en un órgano especializado de la planta donde el más íntimo contacto da como resultado una sincronización entre el desarrollo de la planta y el hongo.

Para evitar los problemas derivados del uso inconsistente entre simbiosis y mutualismo Brundrett (2004) propone el siguiente diagrama que explica las interacciones entre los hongos y las plantas de acuerdo a un modelo de costo-beneficio (Fig.3).

El eje vertical representa el beneficio (+) y el daño para el hongo (-), mientras que el eje horizontal representa el beneficio (+) y daño para la planta (-) (Fig. 4).

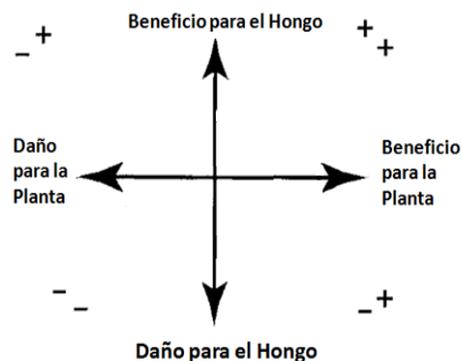


Figura 4

1) Micorrizas equilibradas

El término se ha propuesto a una simbiosis de tipo mutualista (+,+) o reciproca en donde el flujo bidireccional de nutrientes se produce para ambos organismos dando como resultado un equilibrio dinámico. Así, el equilibrio de los costos versus los beneficios pueden cambiar para favorecer más a uno de los socios, sin embargo a largo plazo tenderán a ser más equitativos; en este tipo de micorriza se observa que las plantas y los hongos se asocian de manera selectiva (Brundrett, 2002).

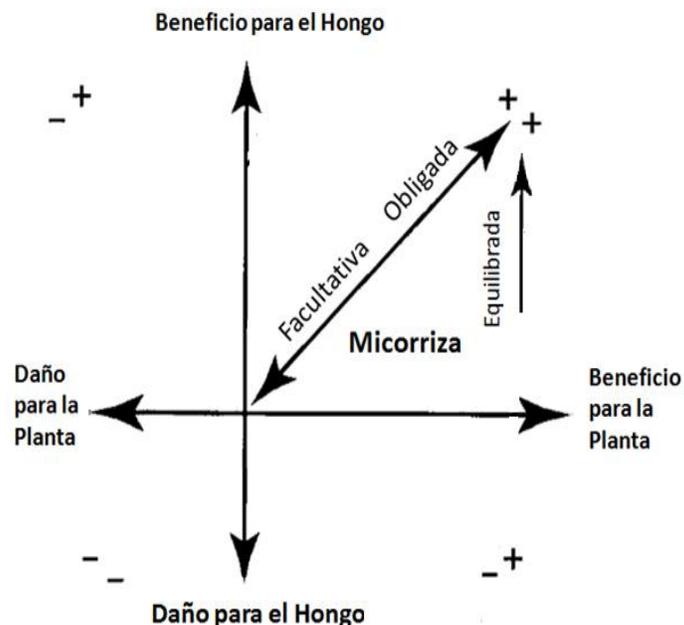


Figura 5

2) Micorriza Obligada

Las asociaciones simbióticas incluyen organismos que se ven obligados necesariamente a ser simbiosiontes de ciertos hospederos ya que de lo contrario no llevarían a cabo sus funciones biológicas. Existen especies de plantas que se benefician obligatoriamente de las micorrizas para su nutrición a través de la amplia gama de los niveles de fertilidad en el suelo, en algunos casos el

beneficio de la micorriza disminuye a medida que la fertilidad del suelo aumenta o viceversa (Clapperton & Read, 1992; Gange, 1999).

3) Micorriza Facultativa

Por otro lado existe la simbiosis facultativa en la cual el simbiote es capaz de llevar a cabo una vida independiente de su hospedero (Starr, 1975; Cook, 1977), sin embargo depende de las condiciones externas (Brundrett, 1991).

Experimentos muestran que cuando los niveles de fósforo del suelo son relativamente bajos, las plantas suelen desarrollar raíces largas y estrechas y altamente ramificadas con lo cual aumentan o reducen la capacidad de que el hongo proporcione ciertos beneficios (Koide & Schreiner, 1992). Por otro lado los niveles de humedad, aireación y textura del suelo pueden regular la colonización de las micorrizas en estas plantas (Cantelmo & Ehrenferd, 1999; Beck-Nielsen & Madsen, 2001) (Fig. 5).

4) Parasitismo

La contraparte de estas asociación son las asociaciones de tipo patógenas en donde el hongo no transfiere ningún nutrimento, el desarrollo no es coordinado y se utiliza al hospedero como fuente de energía ocasionándole una enfermedad (Cook, 1977) (Fig. 6).

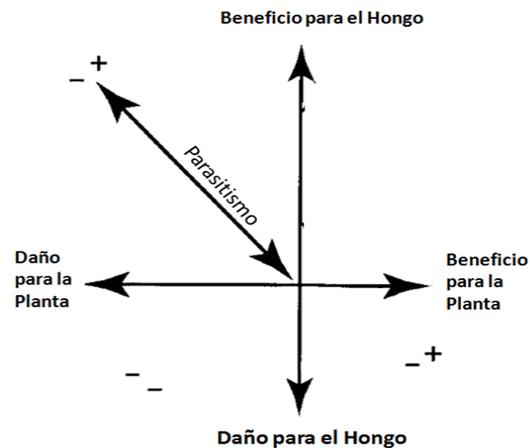


Figura 6

5) Actividad endófitica

El endofitismo puede ser definido como las asociaciones asintomáticas de organismos vivos que crecen dentro de los tejidos vivos de la planta (Wilson, 1995; Stone, 2000;). Muchos hongos pueden colonizar rápidamente el tejido cortical sin causar enfermedades, esto incluye hongos patógenos o necrotróficos con fases

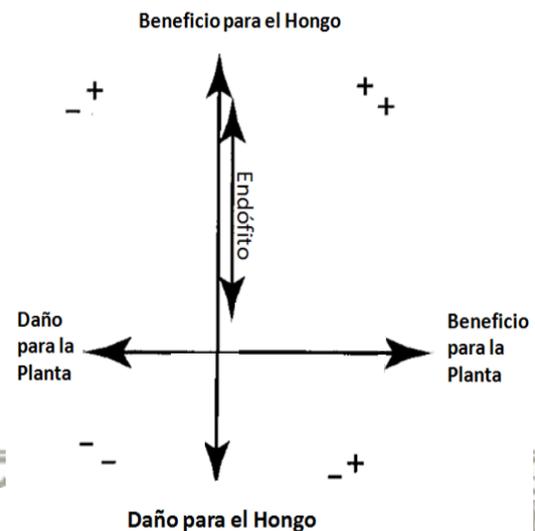


Figura 7

latentes, así como hongos beneficiosos que ofrecen protección contra patógenos. Existe desincronización entre el desarrollo de la planta y el hongo, así como una ausencia en la transferencia de nutrientes por lo que las plantas se benefician indirectamente de los endófitos o bien pueden ser perjudicadas por ellos (Saikkonen *et al.*, 1998)(Fig. 7).

6) Micorrizas Explotativas

Son consideradas como la cumbre de la evolución de las micorrizas, en donde las plantas tienen la tendencia de tomar el control del hongo micorrízico, en esta asociación la planta carece de clorofila, su relación con el hongo es altamente específica y dependiente, lo que se denomina como micoheterotrofia (Leake, 1994; Bidartondo & Bruns, 2001; Brundrett, 2002; McKendrick *et al.*, 2002). El intercambio de nutrientes en esta asociación es unidireccional debido a

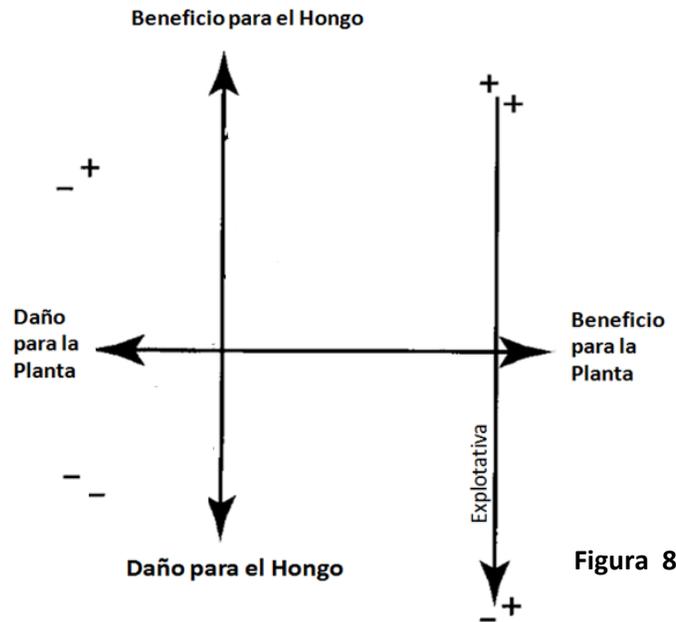


Figura 8

que la planta toma todo lo que necesita del hongo sin proporcionar una contribución significativa, por lo que esta relación es vista como la inversa entre las plantas superiores y los hongos parásitos (planta explotadora y hongo explotado ó aprovechado) también es conocida por el nombre de epiparasítica (Furman & Trappe, 1971; Leake, 1994; Taylor & Bruns, 1999) (Fig.8)

7) Plantas no micorrizables

Las plantas sin micorrizas tienen raíces altamente resistentes a la colonización de los hongos, por lo que no forman asociaciones funcionales (Brundrett, 2002).

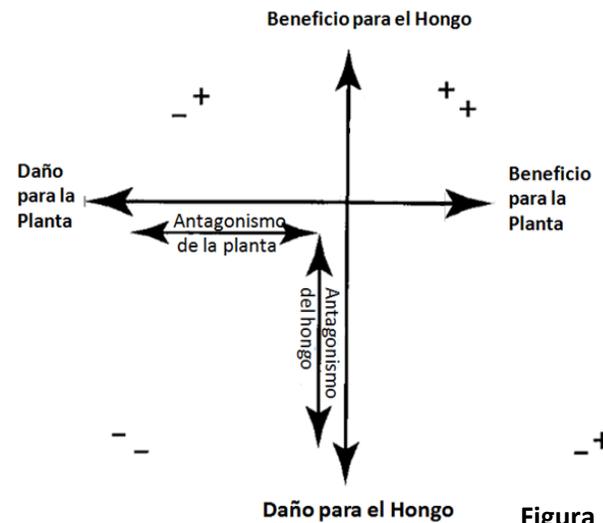


Figura 9

8) Alelopatías (Antagonismos)

Son asociaciones oportunistas entre hongos y plantas no hospedadas, o bien entre plantas que no requieren dicha micorriza. Y que es interpretado como un antagonismo en el cual se causa daño a algún organismo sin ganar un beneficio (Brundrett, 2004) (Fig. 9).

2.2 ∞ IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LAS MICORRIZAS ∞

La simbiosis entre un hongo y una planta es tan antigua que supone el éxito de las plantas para colonizar ecosistemas terrestres (Selosse & Le Tacon, 1998), la evidencia fósil apunta a que los hongos colonizaron los ecosistemas terrestres en el proterozoico hace aproximadamente 1.500 millones de años (Wang *et al.* 1999), mucho antes que los primeros organismos fotosintéticos lo hicieran (Gehrig *et al.* 1996, Evans & Johansen, 1999; Schübler & Kluge, 2000). Cuando las primeras plantas terrestres aparecieron fueron colonizadas por hongos parásitos, saprofitos ó superficiales del suelo. Los hongos saprofitos son los mejores candidatos debido a que poseen las enzimas requeridas para penetrar en la pared celular de las plantas (Taylor & Osborne, 1996). Eventualmente, la primera etapa de la evolución sugiere que estas primeras micorrizas eran de hábitos endófitos, ya que con esta especialización los hongos evadían la competición, depredación y parasitismo de otros organismos del suelo. Las primeras plantas crecían a plena luz del sol, con lo cual eventualmente se producían compuestos de carbono que se acumulaban como exudados en el suelo. Por otra parte estas plantas se encontraban a una atmosfera mucho más rica en concentraciones de CO₂ que hoy día y los tejidos de estas plantas eran altamente permeables al agua y nutrientes lo que las hacía más atractivas para los hongos. Probablemente la primera micorriza endófitica proporcionó o no un pequeño beneficio a su hospedero. Eventualmente la selección natural favoreció a plantas y hongos que eran más eficientes y especializados en la obtención de energía (Mora *et al.*, 1996, Raven & Edwards, 2001). Las asociaciones micorrízicas son cosmopolitas por su presencia en la mayoría de los hábitats naturales, se ha reportado que la mayoría de las plantas terrestres tienen asociaciones con hongos, cerca del 80% de las especies terrestres y el 92% de las familias de plantas muestran tener asociaciones micorrízicas (Wang & Qiu, 2006).

El hongo además de mejorar la nutrición comprende otras interacciones específicas. Se ha reportado que las micorrizas contrarrestan los patógenos provenientes del suelo, lo anterior está demostrado al comparar plantas micorrizadas contra no micorrizadas (Marx 1972). Además están involucradas en la protección contra el estrés causado por la pérdida de agua ocasionada por la sequía (Auge 2001), ya que los niveles de fitohormonas

(Brundrett 1991, Smith & Read 1997), pueden causar crecimiento y cambios en la arquitectura de la raíz, tejido vascular, etc. (Miller *et al.* 1997).

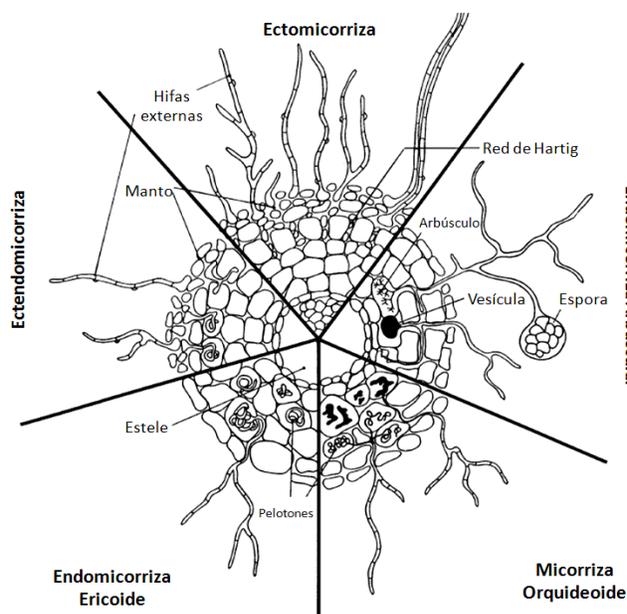
Ayudan al crecimiento y establecimiento de plántulas, por lo que la diversidad fúngica es un bio-indicador de la calidad del medio ambiente (Hogberg *et al.* 1999, Horton *et al.* 1999).

Tienen un papel importante en la transferencia y ciclo de nutrientes, ayudando a prevenir pérdidas en el sistema (Lussenhop & Fogel, 1999). Contribuyen al almacenamiento de carbono en el suelo mediante la alteración de la calidad y cantidad de materia orgánica (Ryglewicz & Andersen 1994).

Las micorrizas influyen en las poblaciones microbianas del suelo mediante exudados en la micorrizosfera (Bansal & Mukerji 1994, Olsson *et al.* 1996, Andrade *et al.*, 1998). Las hifas micorrízicas son una fuente importante de alimento para invertebrados en el suelo (Setälä 1995).

Por ende, relaciones simbióticas son importantes para entender la evolución y la conservación de la mayoría, si no es que de todos los organismos (Jordano, 1993; Pellmyr *et al.* 1996; Kawakita & Kato, 2004).

2.3 ∞ CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS MICORRIZAS ∞



Frank (1885) reconoció dos tipos de asociaciones micorrízicas, empleó el término Micorriza endotrófica, cuando el hongo se alojaba en el tejido interno del hospedero y Micorriza ectotrófica, cuando la hifa del hongo formaba una envoltura que rodeaba a la raíz. Estas primeras clasificaciones separaban a las micorrizas de acuerdo a su morfología y localización en las raíces de las plantas; posteriormente, llamadas endomicorrizas, ectomicorrizas y

Figura 10. Esquema de los diferentes tipos de colonización producidos por los hongos Micorrízicos (Selosse & Le Tacon 1998)

ectendomicorrizas (Peyronel *et al.*, 1969). Estos tres tipos de clasificación son insuficientes para describir la diversidad de las asociaciones micorrízicas. Harley & Smith (1983) reconocieron siete tipos que, en su mayor parte, todavía comprende la clasificación generalmente aceptada; principalmente, por describir los procesos anatómicos involucrados en las plantas hospederas. Estos incluyen Ectomicorrizas, Endomicorrizas, Ectendomicorrizas, Micorriza Arbutoiode, Micorriza Ericoide, Micorriza Monotropoide y Micorriza Orquideoide.

- 1) **Ectomicorrizas (ECM):** La función de diagnóstico de las ectomicorrizas es la presencia de hifas entre las células corticales de la raíz que producen una estructura reticular llamada red de Hartig (Scheidegger & Brunner, 1993). Las hifas de la red de Hartig envuelven por completo a las células hospederas brindándole el máximo contacto entre el huésped y el hongo. La red de Hartig exhibe un modelo de crecimiento laberintico complejo con estructuras parecidas a dedos denominadas palmetas e hifas raramente septadas (Blasius *et al.*, 1986).

Los hongos que forman ectomicorrizas incluyen alrededor de unas 6,000 especies de basidiomicetos que incluyen a las Amanitaceae, Boletaceae y Rusulaceae, además incluye a algunos Ascomicetos y Zigomicetos lo que los hace un grupo polifilético; se asocian a Gimnospermas y Angiospermas. (Hibbert *et al.*, 2000; Moncalvo *et al.*, 2000).

- 2) **Endomicorrizas:** Crecen dentro de las células corticales y no forman un manto alrededor de la raíz, si no que las hifas fúngicas se establecen entre las células del córtex y con frecuencia entran en ellas.

Micorrizas Arbusculares (MA): Es un miembro de las endomicorrizas. El criterio para definir una MA es el desarrollo de arbusculos altamente ramificados dentro de las células corticales. El hongo inicialmente crece en las células corticales, pero pronto penetra en la pared de la célula huésped y se desarrolla dentro de la célula. A medida que el hongo se desarrolla, la membrana de la célula huésped invagina y envuelve al hongo, creando un nuevo compartimento donde se deposita el material de complejidad molecular elevado. Este compartimento apoplástico evita el contacto directo entre el citoplasma de la planta y el hongo y permite la transferencia eficiente entre los simbiosistas. Los hongos que forman MA se clasificaron como miembros del orden Glomales (Morton, 1988), que se subdividió en subórdenes basados en la presencia o ausencia de vesículas, sin embargo, puesto que una porción importante de estos hongos carece de la capacidad de

formar vesículas en las raíces MA es ahora el acrónimo preferido (Cavagnaro *et al.*, 2001).

Los Glomales son considerados como un antiguo linaje que divergió mucho antes que las micorrizas existieran como tal (Redecker *et al.*, 2000, Shübler *et al.*, 2001), es un grupo monofilético, colocados en los Zigomicetos, orden Glomales con los géneros *Glomus*, *Acaulospora*, *Scutellospora*, *Gigaspora*, *Paraglomus* y *Archeospora*. Estos hongos no se asocian con especies vegetales específicas, pero tienen una efectividad diferencial (Morton & Redecker, 2001).

- 3) **Ectendomicorrizas:** Las ectendomicorrizas forman estructuras típicas de las ECM, excepto que el manto es delgado o no existe, y las hifas de la red de Hartig pueden penetrar en las células de las corticales de las raíces. La ectendomicorriza es reemplazada por ECM cuando la plántula madura.

Micorriza Ericacea. El término Ericacea se aplica a las asociaciones micorrízicas que se encuentran en los Ericales. Las hifas muestran hábito endomicorrícico, sin embargo no se forman arbusculos. Se han descrito tres formas principales de micorrizas Ericaceas:

- 4) Micorriza Ericoide (MER): Las células de la corteza interna se compactan con hifas. Una vesícula de hifas crece en la superficie de la raíz, por lo que un manto verdadero no se forma. Por lo general este tipo de micorrizas se asocian a plantas como Empetraceae y Empacridaceae que cuentan con sistemas radiculares muy finos que crecen en suelos ácidos y turbosos. Se incluyen en un grupo de Ascomicetos que no forman micorrizas con otras plantas vasculares (Smith & Read, 1997).
- 5) Micorriza Arbutoide: En este tipo de asociación se muestran características de ECM y endomicorrizas. La penetración intracelular ocurre, se forma un manto y la red de Hartig está presente. Las plantas hospederas son los géneros *Arbutus*, *Pyrola* y *Arctostaphylos*, la mayoría de estos hongos son Ascomicetos y Basidiomicetos.
- 6) Micorriza Monotropoide: En esta asociación, los hongos involucrados son Ascomicetos y Basidiomicetos como *Pterospora*, *Sarcodes*, etc. que colonizan plantas aclorofilas de la Monotropaceae, se produce la de la red de Hartig y el manto. Estos mismos hongos forman asociaciones de tipo ECM con árboles cercanos, formando así un enlace a través del cual los nutrientes de carbono y otros pueden desviarse de la planta autotrófica a la micoheterotrófica (Robertson & Robertson 1982, Castellano & Trappe 1985, Bidartondo *et al.* 2001).

2.4 ∞ MICORRIZA ORQUIDEOIDE ∞

En esta categoría se incluyen las asociaciones entre las orquídeas y sus micorrizas. Estos hongos se caracterizan por entrar en las células vegetales por invaginación de la membrana celular y formar estructuras muy elaboradas conocidas como pelotones dentro de las células del protocormo y la raíz. Estos pelotones están activos solo por unos pocos días, después de lo cual pierden turgencia y degeneran, liberando un contenido de nutrientes que es absorbido por el desarrollo de la orquídea (Rasmussen, 1995; Brundrett, 2002; Peterson & Massicotte, 2004).

La micorriza de las orquídeas apareció hace aproximadamente 100 millones de años atrás, evolucionaron a partir de un ancestro versículo arbuscular con una asociación parcial y explotada. La evolución de las micorrizas de orquídea está ligada a una especialización extrema debido a que las pequeñas y abundantes semillas son dispersadas en ambientes especializados y fragmentados (Benzing & Atwood, 1984; Rasmussen, 2000). Sus semillas, tipo polvo, se consideran plenamente dependientes de la micorriza (micoheterótrofas, en una asociación totalmente explotativa) aunque algunas al llegar a la etapa adulta pueden ser autótrofas (Hadley, 1982; Rasmussen, 1995). Molvray y colaboradores (2000) demostraron que la micoheterotrofia en la Orchidaceae evolucionó aproximadamente veinte veces más como grupo vegetal que todo el resto de familias de plantas combinadas. Lo cual sugiere que las orquídeas tienen una gran tendencia a la coevolución y que han evolucionado más rápido y desarrollado novedosas estrategias que otras familias de plantas (Molvray *et al.*, 2000).

A principios del siglo XIX comenzaron a realizarse los primeros estudios acerca de las orquídeas y las micorrizas. Link, en 1824, observó las asociaciones de estos hongos con las orquídeas, en 1840 examinó un protocormo de *Goodyera procera* en el cual pudo vislumbrar que las células contenían cierto material fúngico (Fig. 11).

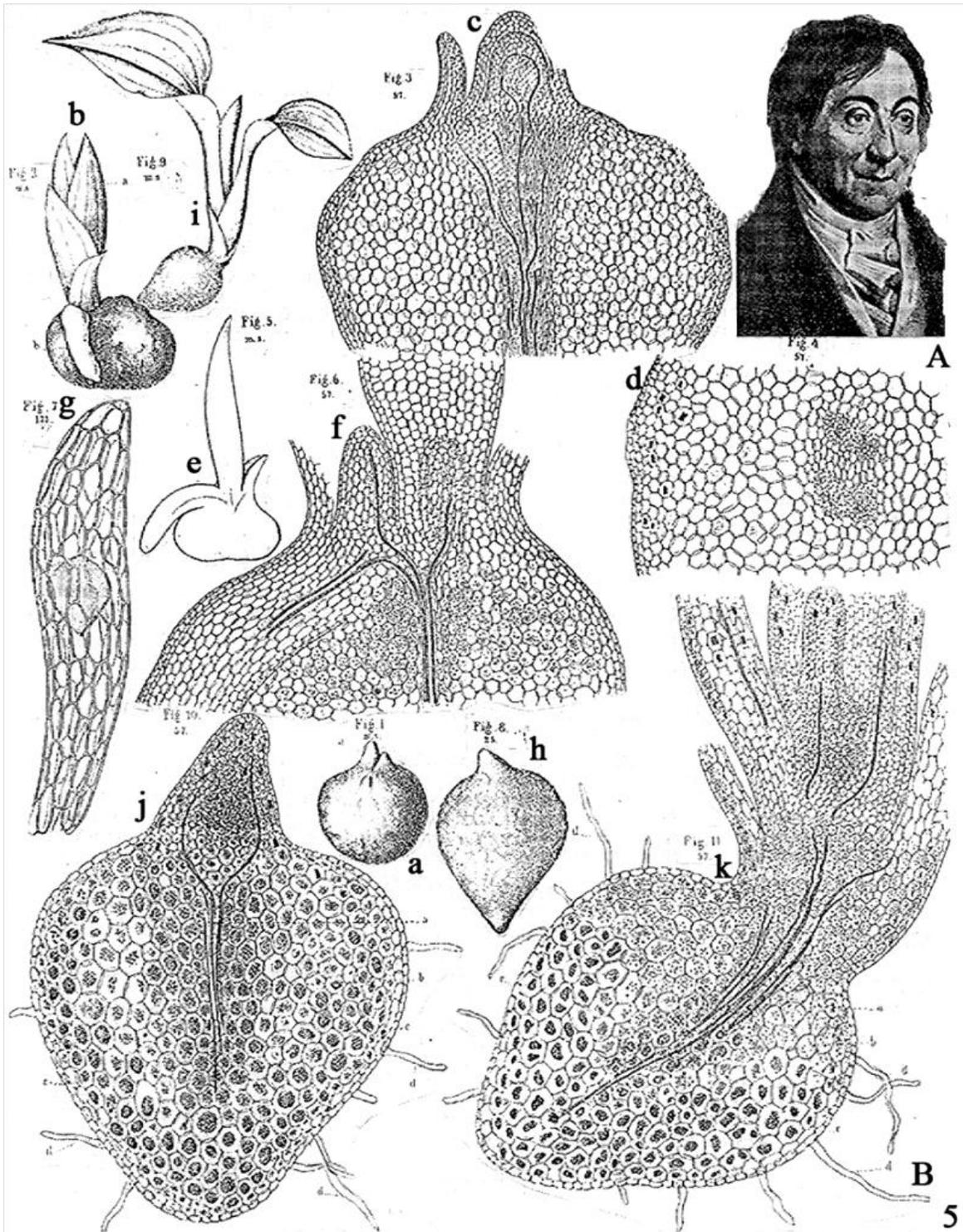


Figura 11. Primeros dibujos de las orquídeas y sus micorrizas hechos por Heirich Friedrich Link (A). Plántulas y semillas de *Oeceoclades maculata* germinando (B). (La secuencia es g,a,c,h,j,b,e,f,i, k; d corresponde a la sección transversal de una raíz). (Yam & Arditti, 2009.)

Reissek, en 1847, estudió numerosas plantas llegando a la conclusión de que los hongos presentes internamente en las células corticales de las raíces de la mayoría de las plantas con flores era un fenómeno muy común en la naturaleza, este estudio incluyó a orquídeas, tanto nativas como exóticas; por ejemplo, descubrió que en *Orchis morio* el hongo se encontraba presente en casi todas las células corticales, mientras que en las especies tropicales las masas fúngicas se arreglaban de manera simple en la periferia. Llegando a la conclusión de que la presencia de los hongos es más abundante cuando las raíces se encuentran bajo tierra, menos usual en aquellas arregladas de manera superficial y muy raras en raíces aéreas expuestas a la luz.

Reissek intentó extraer el hongo de las raíces; pero en aquel tiempo las técnicas eran imperfectas y solo pudo obtener un hongo llamado *Fusisporium endorhizum*, probablemente una de las especies saprofitas más comunes de *Fusarium* en el suelo; sin embargo, logró describir el proceso de infección del hongo con las raíces de las orquídeas., observando que el hongo usualmente entra a la raíz a través de los pelos radicales, o en alguna porción de la capa pilífera. La hifa pasa atravesando las capas más externas a las menos externas llegando a una zona definitiva en donde alcanza su máximo desarrollo, rápidamente se difunde y rellena a las células. Sin embargo el hongo nunca infecta el cilindro central ni tampoco el punto de crecimiento o meristemo de la raíz.

Desde sus primeros trabajos Reissek observó que el hongo cambiaba de su forma original a una masa amorfa amarilla al estar en contacto con ciertas células (Fig.12), Wahrlich en 1886 constató el mismo fenómeno tras examinar 500 especies de orquídeas tanto exóticas como nativas de Moscú, en aquella época Magnus (1800) quien trabajó con *Neottia* dio una clara descripción de la metamorfosis, distinguió dos tipos de células infectadas las cuales

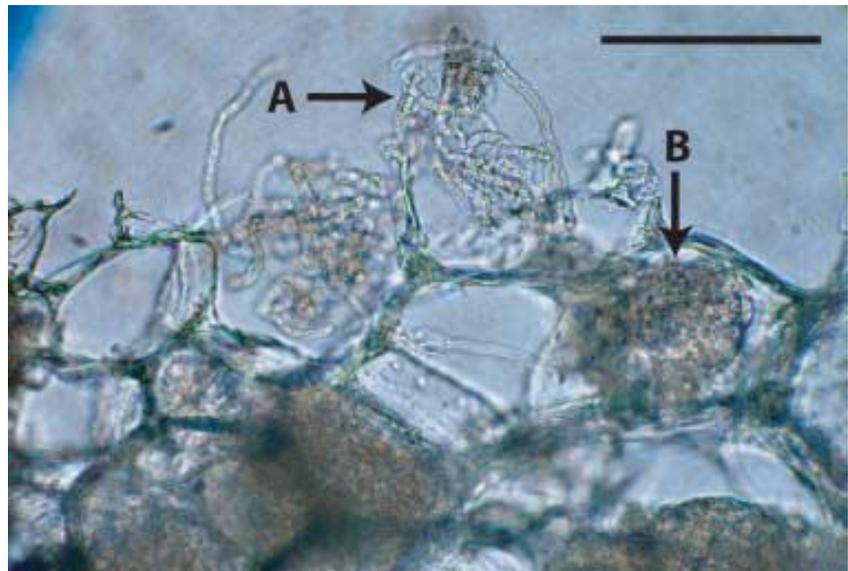


Figura 12. Corte transversal de raíz de *Cypripedium guttatum* en donde se puede apreciar la hifa fúngica (A) del pelotón intacto (B). (Richard *et al.*, 2005).

sostuvo que no eran estados de transición.

El primer tipo lo llamo “Verdauungszellen” ó células de digestión en la cual el hongo degeneraba; mientras que a las otras las llamo “Pilzwirhszellen” en las cuales el hongo se alojaba en el interior de la célula a modo de hibernación.

Antes de que una hifa entre a una célula huésped el núcleo de esta última aumenta de tamaño, aparentemente el almidón desaparece de las células, los núcleos vecinos de la hifa se hipertrofian, convirtiéndose en una forma modificada, donde la influencia del micelio es mayor, el núcleo se torna ameboideo y en algunos casos se desintegra (esto puede ser interpretado como una acción parasitaria por parte del hongo). Mientras que las células de digestión son claramente reconocibles por tener una masa degenerada que ocupa más de la mitad que llena a la célula donde posteriormente el núcleo se torna ameboideo con pseudópodos externos que atacan a las hifas, Las hifas solo se obscurecen ligeramente y aumentan de diámetro hasta aproximadamente el doble y también de longitud, gradualmente van perdiendo su contorno hasta que no pueden distinguirse. El victorioso núcleo asume su forma redonda, volumen normal y se reconstituye mientras el endófito se reduce a un grupo amorfo de color amarillo con un contorno impreciso y esta absolutamente desprovisto de vida (rodeado por una membrana de celulosa). Parece que a medida que la edad de la raíz aumenta van desapareciendo las células de digestión y cuando aparecen nuevas células de digestión en las raíces jóvenes el hongo vuelve a colonizarlas un fenómeno muy similar que se puede apreciar en los estadios de plántula.

En algunos estudios (Dangeard & Armand , 1898), se observa una clara distinción entre las zonas más externas del córtex donde usualmente se encuentran las células hospederas y el córtex mas interno donde las hifas pueden sobrevivir, proliferar y digerir o ser disueltas; sin embargo, esta distinción no siempre es clara, es posible que la zona de colonización dependa de factores estacionales, de crecimiento o bien ciertas especies tengan tejidos especializados que prolonguen su función micoheterotrófica (Fuchs & Ziegenspeck, 1927). Cuando el meristemo radical se elonga deja detrás un gradiente de maduración en el tejido, podemos encontrar células que inicialmente contenían una reserva muy rica en almidón, posteriormente las células van degradando el almidón y queda una zona con células muy vacuoladas y sin almidón, estas células son ocupadas por pelotones vivientes y finalmente la lisis tiene lugar (Burgueff, 1936; Dangeard & Armand, 1898). Burgueff, en 1936, observó que el hongo podía pasar de tejido maduro a tejido joven muy probablemente el hongo tiene la capacidad de mover el almidón a su antojo; sin embargo, la hifa pasa a través de las paredes celulares sin fracturarlas este mismo fenómeno fue observado por Peterson y Currah (1990). El hongo en un cultivo puro es

capaz de sintetizar varias enzimas, lo cual sugiere que el hongo es capaz de usar dichas enzimas para penetrar en las células hospederas.

Tradicionalmente se han reconocido dos tipos histológicos de micorrizas en orquídeas: “*tolypophagica*”, encontrada en la mayoría de las orquídeas (la cual ha sido la mejor estudiada bajo microscopia electrónica), y “*ptyophagica*” encontrada en orquídeas micoheterotróficas tropicales. De acuerdo con Burgeff (1936) la *ptyophagia* se caracteriza por la deformación y la lisis intracelular ocasionada por las puntas de las hifas y el material fúngico es vertido en la interface entre el plasmalema hospedero y la pared celular del endófito, es un proceso continuo en el cual las hifas que se escapan del tejido elaboran nuevos materiales accesibles para su hospedero. En la *tolypophagia* el endófito forma unos ovillos bien definidos conocidos como pelotones, principalmente en las células inoculadas y antes de que la lisis tenga lugar. La *tolypophagia* se caracteriza por la sucesiva formación de pelotones, lisis y reinoculación. La evidencia disponible de la micrografía de electrones sugiere que la descripción de Burgeff de 1936 debería de ser modificada, no obstante todavía hay dudas si existen diferencias marcadas entre los patrones de la *ptyophagica* y *tolypophagica* a nivel histológico (como la formación de canales de pasaje) y los procesos ultra estructurales de digestión (tubos endocíticos, pinocitosis de fragmentos de pared de la hifa). Algunas de estas diferencias podrían ser propiedades del micobionte en cuestión, por lo que la *ptyophagia* incrementa la diversidad de las interacciones entre los hongos y la plantas, de una manera excepcional que merece estudios posteriores (Rasmussen, 2002).

Se ha demostrado que las hifas están confinadas a ciertos tipos celulares con cierto contenido de ADN, aparentemente son incapaces de extenderse a células mitóticas, células que contengan taninos, rafidios, cristales o mucus; pueden encontrarse en el córtex de raíces, rizomas, tubérculos, cormos y protocormos (Williamson, 1970). Las células que no son inoculadas contienen más dictiosomas y etioplastos más largos que aquellas células inoculadas (Borris *et al.*, 1971). Las células inoculadas tienen un desarrollo pobre de plástidos pero contienen un gran número de mitocondrias, ribosomas y un abundante desarrollo de retículo endoplasmático (Dörr & Kollmann, 1969; Barroso *et al.*, 1986b). Parece que la hifa invasora establece un estrecho contacto con el núcleo en cada una de las células que atraviesa. Poco antes de la invasión, el núcleo de la planta se mueve hacia las células adyacentes inoculadas (Burgeff, 1909; Rasmussen, 1990).

Hadley y colaboradores (1971) observaron bajo microscopia electrónica la pared fúngica de un cultivo puro notaron una capa interna densa de electrones y una capa externa delgada y transparente, pero cuando el hongo se encuentra dentro de la orquídea la capa interna es claramente visible, mientras la capa externa algunas veces parece compacta y

en otras ocasiones la estructura se pierde (Strullu & Gourret, 1974). Algunos investigadores sugieren que esta capa gruesa se convierte en la matriz de interface en etapas posteriores de la infección (Nieuwdorp, 1972; Barroso *et al.*, 1986^a). El punto de vista predominante es que el material de interface es producido por la planta en lo más interno del protoplasto y exportado en vesículas que liberan sus contenidos fusionándose con el plasmalema (Barroso *et al.*, 1988). La matriz de interface, se produce en otras plantas con micorrizas y es un elemento extremadamente importante en la transferencia de nutrientes, particularmente desde que la pared del endófito está constituida de precursores de carbohidratos que están disponibles para la demanda de carbón del compañero (Duddridge, 1985).

La invasión de la hifa está acompañada por una mayor actividad de polifenol oxidasa (Pais & Barroso, 1983; Barroso *et al.*, 1986^a). Se ha demostrado que la polifenol oxidasa se encuentra primero en el citoplasma del hongo y después en el espacio interfacial (Barroso, 1988). Blakeman y colaboradores (1976) encontraron que la polifenol oxidasa, ácido ascórbico oxidasa y catalasas se quintuplicaban una hora después de que las plántulas son inoculadas, pero este análisis no explica si las enzimas provienen de la planta o del endófito.

En las infecciones *tolypophagicas*, el plasmalema del hospedero se aleja frontalmente de la hifa invasora, formando una enorme membrana de secuestro, en donde la hifa se ramifica y enrolla para formar un denso pelotón que atraviesa el citoplasma y la vacuola central, ocupando casi todo el lumen celular (Dörr & Kollman, 1969; Hadley *et al.*, 1971; Nieuwdorp, 1972). Cada hifa se ramifica por un tubo de plasmalema del hospedero, el cual está revestido por una capa de citoplasma vegetal, donde los entrelazados de hifas atraviesan la vacuola, las hifas se ramifican en una extensión del tonoplasto, marcando una distancia lo más corto posible entre la pared de la hifa y el lumen de la vacuola alguna vez se da la impresión de que la vacuola se divide en porciones más pequeñas (Hofsten, 1973) que forman un sistema de laberintos, aunque algunas de estas porciones derivan del retículo endoplasmático (Borris *et al.*, 1971).

El plasmalema vivo de la hifa del pelotón indica que se secretan sustancias por medio de vesículas que se fusionan con la membrana, desde que el plasmalema es extremadamente irregular y ondulado, los excesos de membrana son aparentemente guiados a la vacuola (Hadley *et al.*, 1971).

Evidentemente la formación de un nuevo pelotón está asociado a un alto rango de crecimiento de la hifa sobre el sistema de membranas del hospedero, sin embargo esta etapa de transición no ha podido ser observada en algunos de los estudios de microscopía electrónica (Rasmussen, 1995). El plasmalema vegetal con un pelotón maduro aparece de

una forma ondulada e irregular lo cual indica que un gran número de vesículas se fusionaron con la membrana (Borris *et al.*, 1971; Nieuwdorp, 1972; Strullu & Gourret, 1974).

El citoplasma de la hifa se recarga con glicógeno, tanto en el cultivo puro como cuando crece dentro de la planta (Hofsten, 1973; Strullu & Gourret 1974; Barroso *et al.*, 1986^a) la acumulación de glicógeno es particularmente notable en células dilatadas parecidas a células molinoides formadas en el cultivo puro (Rasmussen, 1990).

Los núcleos de las células de digestión están sometidos a cambios dramáticos, considerados principalmente como una alta actividad metabólica. Poco antes de que la célula sea inoculada el núcleo se hipertrofia con un contorno irregular y se eleva el nivel de ploidía (Williamson & Hadley, 1969). Antes de la infección la célula normalmente contiene un núcleo (raras veces dos nucléolos) sin cuerpos nucleares; después de la inoculación se pueden apreciar más de cuatro nucléolos a menudo vacuolados y se producen cuerpos nucleares adyacentes a cualquier nucléolo ó membrana nuclear. El núcleo comienza a producir considerables cantidades de enzimas para la síntesis de RNA, por lo que es posible que estos cuerpos nucleares funcionen temporalmente como RNA mensajeros, acumulándose antes de que se exporten al citoplasma (Barroso & Pais, 1990).

El retículo endoplasmático está asociado a una alta producción de enzimas hidrolíticas (en especial ácido fosfatasas) que se incrementan durante la inoculación (Williamson, 1973; Barroso 1988). Los ácidos fosfatos se producen en el lumen del retículo endoplasmático rugoso, a medida que su concentración aumenta son expulsados del plasmalema, en la interface, donde se encuentra viva la hifa, estas enzimas son detectadas por las paredes del hongo y a medida que las concentraciones en el lumen disminuyen, es el momento en el cual la hifa se autolisa; sin embargo, no se descarta el hecho de que algunas enzimas exógenas participen en la degradación de la membrana de la hifa en una etapa avanzada (Hadley & Pegg, 1989). El contenido de enzimas digestivas es mucho más elevado en los tejidos inoculados que aquellos no inoculados, y su localización histoquímica implica peroxidasas, glutamato deshidrogenasas, esterases, así como malato deshidrogenasas en la lisis de los pelotones (Senthikumar *et al.*, 2000).

La pared interna del endófito puede desarrollar protuberancias que son bastante gruesas y abultadas (Hadley *et al.*, 1971); muchas de las micrografías publicadas muestran que la pared del endófito tiende a convertirse en capas de escamas (u hojuelas) (Borris *et al.*, 1971; Barroso, 1988). Tanto la hinchazón como la fractura son indicadores del comienzo de la ruptura de la pared hifal. En las primeras etapas de la lisis las células se vacuolizan, y los septos doliporos se comienzan a desintegrar (Richardson *et al.*, 1992). Durante la digestión los contenidos intracelulares se comienzan a agotar; algunos sistemas de

membranas persisten cuando muchos de otros elementos del citoplasma desaparecen y las paredes celulares de la hifa comienzan a colapsar (las micrografías electrónicas muestran que en esta etapa se liberan compuestos fosfóricos de la hifa). Cuando los grupos de hifas colapsan, se pueden encontrar adyacentes al citoplasma de la planta, conteniendo numerosos cuerpos lipídicos, y también microcuerpos con cristales de proteínas (Richardson *et al.*, 1992). Los canales periplasmáticos, en los cuales la hifa se encuentra, probablemente se fusionan desde que los restos aplanados de las hifas se observan alineados en un denso patrón de capas paralelas. El espacio entre ellos disminuye progresivamente mientras que los materiales restantes de la pared comienzan a reducirse ó a condensarse. Eventualmente la hifa comienza a desaparecer por completo.

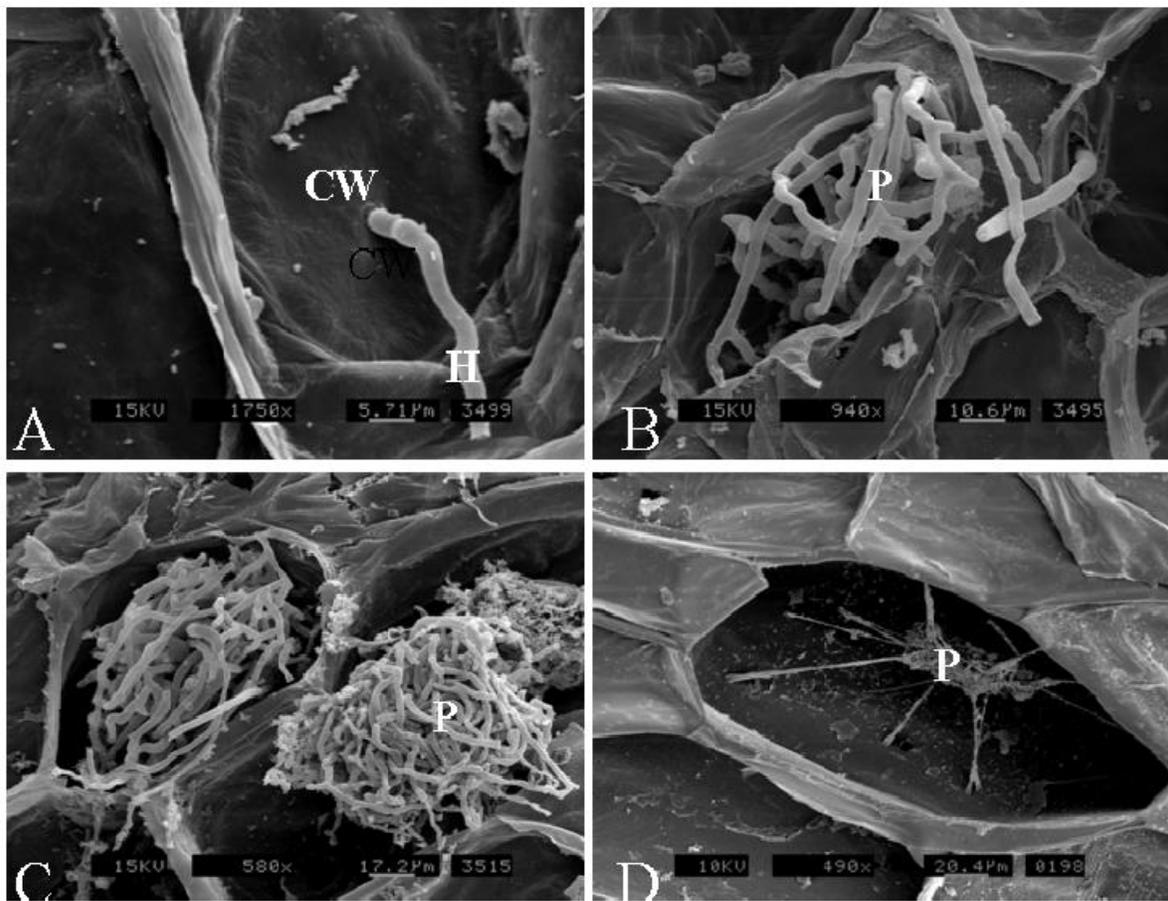


Figura 13 Micrografías electrónicas de la inoculación simbiótica de *Anoectochilus formosanus*. A Se nota a la Hifa (H) pasando a través de la pared celular (CW). B-C se aprecia la formación de pelotones (P). D se aprecia al pelotón (P) digerido. (Chang & Chou, 2007).

El transporte de nutrientes desde el hongo podría ocurrir después de la muerte de la hifa (necrotrófia) o al principio, cuando la hifa intracelular permanece con vida (biotrófia), aunque no hay una evidencia certera de la transferencia biotrófica; no obstante, Hadley & Williamson (1970) y Mollison (1943) tuvieron éxito al mostrar algunos estímulos en plántulas de *Dactylorhiza purpurella* aparentemente antes de que comenzara la ruptura de los pelotones, ha sido técnicamente difícil confirmar estos resultados bajo otras condiciones, debido a que la lisis comienza antes de 48 horas después de la inoculación del tejido (Purves & Hadley, 1976).

Los sistemas biotróficos parecen ser dominantes en los sistemas de micorrizas de otros grupos de plantas; sin embargo, las micorrizas de orquídeas han demostrado que el intercambio puede suceder en ambos sentidos (Harley, 1984).

2.5 ∞ LAS SEMILLAS DE ORQUÍDEA ∞

Las semillas de las orquídeas son extremadamente pequeñas, también son llamadas semillas tipo polvo, miden alrededor de 1-2 mm de largo y 0.05 - 1 mm de ancho, su peso varía de 0.31 -24 μg , algunas especies producen desde 1,300 semillas mientras que otras llegan a tener 4,000,000 por cápsula. Estructuralmente los embriones de orquídea carecen de endospermo, el embrión está integrado por una masa de células, que son muy similares unas con otras y no es evidente un tejido especializado. Los embriones maduros están diferenciados funcionalmente en dos zonas celulares: la región apical o anterior, que consiste de células pequeñas y densas, esta región dará origen al meristemo apical de la plántula joven; y la región basal o posterior, formada por células grandes a veces vacuoladas. Las células epidérmicas del embrión no están lignificadas y carecen de cutícula.

Las principales reservas alimenticias de la semilla están almacenadas en el propio embrión, como lípidos, presentes en cuerpos lipídicos; también contienen cuerpos proteicos principalmente en las células de la región apical del embrión; además, hay pequeños granos de almidón en proplástidios. Sin embargo parece que las semillas carecen de un mecanismo



Figura 14 Semilla de *Prosthechea varicosa* vista al microscopio 100x donde se puede apreciar el suspensor(S), embrión (E) y testa (T)

metabólico apropiado para utilizar sus propias reservas durante la germinación (Arditti & Ghani, 2000).

Las regiones polares pueden diferir en cuanto a su contenido de reservas de nutrientes, y puede haber una diferencia estructural entre las células epidérmicas y las células internas (Harrison, 1977; Manning & Van Staden, 1987; Rasmussen, 1990). Si bien o no hay un gradiente visible de tejido en el embrión, fisiológicamente esta polarizado (Rasmussen, 1995), en algunas especies las células del polo del suspensor difieren significativamente en tamaño hasta el polo chalazal (Ramsbottom, 1929).

El suspensor es una estructura encontrada en los embriones de muchas plantas vasculares. Se encuentra en la parte terminal del embrión y sirve como un conducto por el cual la semilla en desarrollo se alimenta del fruto. En las orquídeas la carencia de esta estructura en la semilla madura es considerada como un carácter primitivo. El suspensor en las semillas consiste en células probablemente muertas, muy alargadas, unidas a la región posterior del embrión que contienen pequeñas gotas de aceite y granos de almidón (Arditti & Ghani, 2000). Invariablemente el polo del suspensor esta diferenciado en un tejido micotrófico y el polo chalazal forma un tejido meristemático (Burgueff, 1936).

2.6 ∞ GERMINACIÓN SIMBIÓTICA ∞

La dificultad para la germinación de las semillas de orquídeas se ha conocido desde hace un número considerable de años. De hecho las primeras descripciones de plántulas y etapas de desarrollo de orquídeas se realizaron hasta 1804 por R. A. Salisbury con las especies *Orchis morio* y *Limodorum verecudum*. El método tradicional para la propagación de orquídeas a partir de semillas consistía en sembrar las semillas cerca de la planta madre y fue de esta manera o con algunas modificaciones que se pudieron obtener algunos híbridos. Noël Bernard fue quien estableció el conocimiento general y los hechos involucrados en la germinación de las orquídeas. Comenzó sus estudios sobre micorrizas en 1899, y se extendió hasta su muerte en 1911. Su primera investigación fue sobre la germinación de *Neottia*. En 1902 en su tesis "*Étude sur la tubérisation*" menciona que las semillas de orquídea pueden germinar solo en presencia del hongo de la raíz y que la plántula se infecta a partir de sus etapas más tempranas. Consciente de la importancia de este hecho investigó a fondo y años después publicó su gran obra "*L' évolution dans la symbiose. Les Orchidees et leurs Champignons comensaux*" en 1909, mismo año en el que Burgueff publicó "*Wurzepilze der Orchideen*". Ambos investigadores aislaron hongos de las raíces de las orquídeas y las germinaron con éxito.



Fig. 15

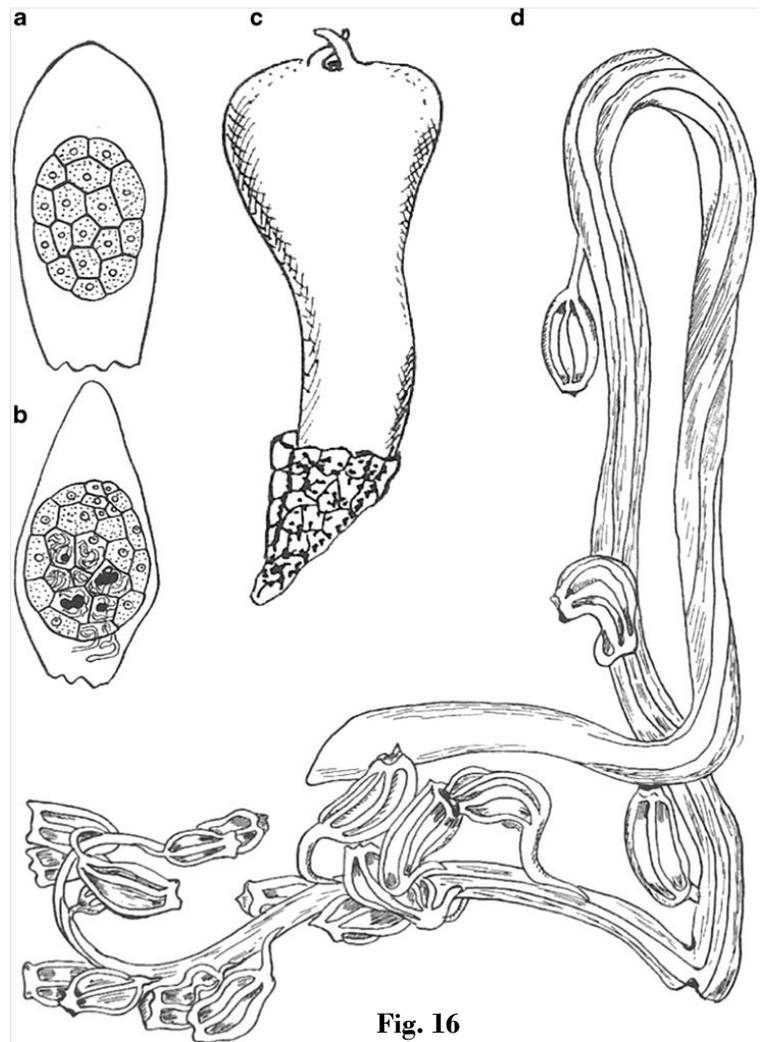


Fig. 16

Nöel Leon Bernard (Fig. 15) nació en París el 13 de Marzo de 1887 y murió el 26 de enero de de 1911 a causa de tuberculosis a finales de 1898 comenzó su tesis sobre orquídeas en el departamento de botánica de la "Ecole Normale Supérieure". De manera paralela en 1899-1900 tomó cursos de microbiología en el Instituto Pasteur; fue el 3 de Marzo de 1899 mientras realizaba su servicio militar en el bosque de Fontainebleau cerca de Melun (París) que descubrió la inflorescencia rota de la orquídea aclorófila *Neottia nidus-avis* (Fig. 16), llegando a la conclusión de que las semillas en primavera continúan dentro del fruto y hasta que son liberadas la germinación comienza a causa de un hongo del suelo que coloniza a las semillas; además logró observar algunos protocormos. En 1904 Bernard aisló hongos de varias orquídeas adultas a partir de segmentos de raíces, logrando la germinación simbiótica *ex situ*, él llamó a esto "una síntesis experimental del tipo de los líquenes que se presenta de manera natural en las orquídeas" inspirado en los trabajos de líquenes de su profesor Bonnier. Bernard (1905) como pasteuriano definió a la simbiosis como "un estado de enfermedad pronunciada y prolongada, entre un estado intermedio en el cual las plantas sufren una rápida y fatal enfermedad y un estado permanentemente inmune" siendo la simbiosis la frontera de la enfermedad; además introdujo los términos "*Phagocytose*" (la lisis final de los pelotones en las células de las orquídeas), "*Virulence*", "*Spécificite*" y "*Lyse*" para las relaciones entre los hongos y las orquídeas. Muchos de los trabajos de Bernard se enfocaban a la formación de tubérculos (Tuberización) y el tejido hipertrófico, investigó a la papa (*Solanum tuberosum*) como un modelo en el cual la tuberización y la infección coinciden en el desarrollo, después de estudiar variedades silvestres de *Solanum* spp. en Perú y Chile, llegó a la conclusión de que la domesticación y los métodos modernos de cultivo redujeron la fase de tuberización; su trabajo doctoral culminó con la idea de que la formación de tubérculos es una consecuencia excepcional para la simbiosis fungica de las plantas, el hecho es que Bernard consideraba al protocormo de las orquídeas como una tuberización. A pesar de que nunca conoció personalmente a Hans Burgueff se sabe que intercambiaban cartas. Tomado de Selosse *et al.*, 2011

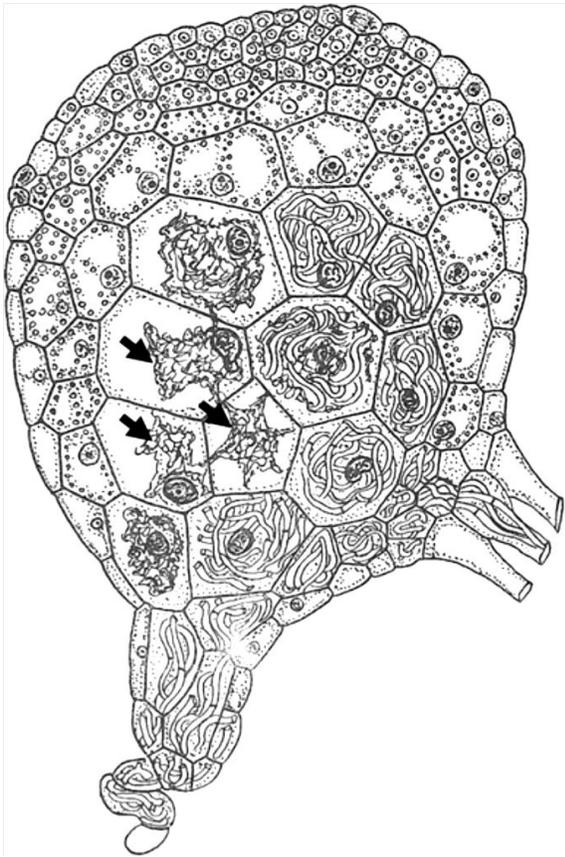


Figura 17 Protocormo de *Odontoglossum cripum X andrae* inoculado con la hifa fúngica donde se aprecian pelotones, algunos de los cuales están digeridos (señalados con flechas negras). Imagen reproducida de Bernard 1902 Tomado de Seloisse *et al.*, 2011

Bernard (1902) observó que el hongo entra a la semilla por el suspensor en unos pocos días; posteriormente, las paredes celulares generalmente se tornan más gruesas y es entonces cuando el hongo degrada a las células vecinas para formar los pelotones. De inmediato las células más pequeñas en el extremo opuesto de la semilla se someten a una división constante; sin embargo, el hongo no inocula estas células meristemáticas que darán origen al primordio foliar. Finalmente, la plántula en desarrollo adquiere una forma hinchada, Bernard utilizó el término protocormo para describir este tubérculo hinchado, ya que simula los protocormos y los prótalos subterráneos incoloros de los Licopodios basado en los estudios de Treub (1890); por otro lado, es interesante hacer énfasis que esas estructuras similares están asociadas con hongos ya que está demostrado por el registro fósil de *Hornea* en el Devónico.

Todas las partes “subterráneas” de las orquídeas pueden hospedar al endófito ya sea manteniéndolo activo o rechazándolo. Sin embargo, la micotrofia del protocormo es

obligada, y muchas de las raíces también lo son pero varían en algún grado. Los órganos de almacenamiento como los cormos y tubérculos por lo general no se infectan, el protocormo difiere de otras plántulas de angiospermas al carecer de radícula, es un tejido micotrófico altamente especializado que permanece estacionario en el suelo (Fabre, 1856; Stojanow, 1916; Rasmussen 1995).

La carencia de un meristemo radicular y la transformación en un tejido micotrófico es una característica distintiva de la Orchidaceae (Vermeulen, 1966). Esta modificación debió haber sido un paso decisivo en la evolución de las orquídeas que incremento la dependencia a la micotrofia, lo cual implicó la reducción y perdida de ciertas características como la radícula y reducción del embrión. Es bien conocido que todas las plántulas de orquídea (Protocormos) tienen un tejido micotrófico en la parte basal. Existe

un tejido altamente diferenciado en la parte basal de embriones de *Bletilla*. El extremo opuesto o chalazal, termina en un meristemo funcional que es el único responsable del aumento de talla de la plántula; a partir de aquí se desarrollará un denso o elongado mico-rizoma, el cual permitirá el desarrollo del primordio foliar en el suelo (Bernard, 1904). En un sentido estricto, el protocormo comprende el eje más basal de las plántulas, desarrollándose como un apéndice inferior de la hoja, lo cual correspondería a la radícula e hipocótilo en otros grupos de plantas. La etapa de protocormo puede ser definida como la etapa desde la germinación hasta que la plántula desarrolla primordios foliares sin raíces, mientras que el mico-rizoma inicia cuando el meristemo apical se elonga y las primeras raíces se desarrollan. La superficie del protocormo usualmente está cubierta con rizoides simples, algunos protocormos tienen escasos rizoides o bien pueden ser glabros. En el extremo superior del protocormo y el mico-rizoma los rizoides suelen agruparse en un arreglo en forma de cojín sobre la superficie del protocormo. Por otro lado los rizoides simples son característicos de las raíces y de los sistemas de raíces de los protocormos, muchos rizoides se producen en los mico-rizomas y entrenudos (Rasmussen 1995).

La germinación *in vitro* muestra que existen ciertas variaciones en cuanto a la morfología de las plántulas, sin embargo algunas características particulares suelen ser compartidas por varios grupos de especies y géneros. Mitchell (1989) notó que los protocormos de especies de *Orchis* y *Ophrys* eran usualmente redondeados e isodiamétricos (parecidos a cebollas); mientras, que los protocormos de *Dactylorhiza spp.* suelen ser más elongados y cónicos (parecidos a nabos). Estas diferencias morfológicas son adaptaciones que los protocormos han desarrollado para adaptarse a su hábito. En su hábitat natural los protocormos de *Tipularia discolor* son excepcionalmente más anchos que largos y más o menos lobulados, debido a la división del meristemo que se encuentra ubicado por debajo de lo más

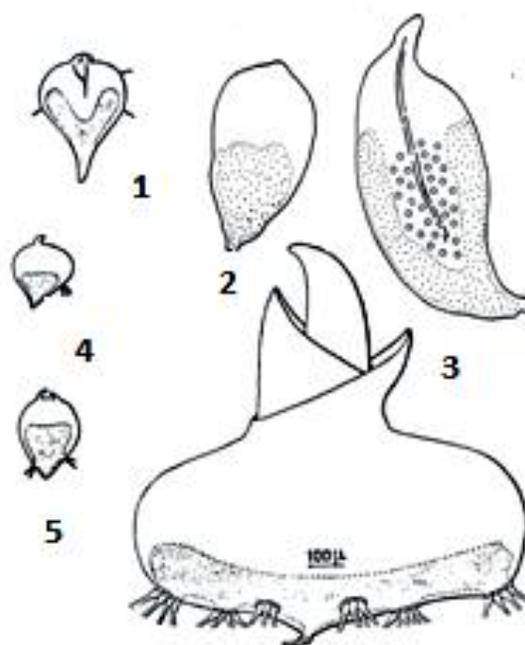


Figura 18. Morfología de distintos protocormos donde la zona sombreada indica el área de inoculación de los endófitos.

(1)Protocormo perteneciente *Angraecum maculatum* (2) Protocormo de *Dactylorhiza purpurella* 21 días después de la inoculación. (3)Protocormo después de un mes después de la germinación. (4-5) Protocormos jóvenes de *Cymbidium* (6) Protocormo de *Cattleya*. Tomado de Arditti, 1992.

inferior de las hojas. El resultado es una estructura micotrónica bastante alargada y más amplia, con varios meristemas de los cuales emergerá el primordio foliar con una o más raíces en la base. Hábitos similares de protocormo pudieran presentarse en *Aplectrum hyemale* y *Calypso bulbosa* (Gillman, 1876; MacDougal, 1899). En medios asimbióticos *in vitro* esas especies se desarrollan solo en estructuras lobuladas, sin embargo *Tipularia* crece en las mismas condiciones (Stoutamire, 1983) de acuerdo con Rasmussen (1995) la apariencia típica del protocormo, de algunas especies *in situ* no coinciden con lo observado *in vitro*. Existe un reporte similar en México en el que las plántulas de *Govenia liliaceae* son muy similares a las de *Aplectrum hyemale* (Dressler, 1965). Bernard (1909) señaló que las plántulas del género *Vanda* inoculadas con *Rhizoctonia lanuginosa* desarrollaban una forma lobulada, Prillieux & Riviere (1856) observaron el mismo fenómeno en *Eulophidium maculatum*.

2.7 RESERVAS DE NUTRIENTES DURANTE LA GERMINACIÓN

Bernard (1902) empleó semillas de cápsulas de diversas orquídeas, en condiciones estériles, y las sembró en un sustrato común libre de hongos. En general, obtuvo diversas repuestas., las semillas de *Odontoglossum* solo se hincharon y adquirieron coloración verde, en las semillas de *Epidendrum* no ocurrió ningún cambio y en las de *Cattleya* se desarrollaron pelos radiculares rudimentarios. El único caso conocido bajo estas condiciones fue el de *Bletilla hyacinthina* cuyas semillas, que contenían una reserva de almidón, se desarrollaron en esbeltas plántulas con hojas muy distintas a las de las plantas adultas y posteriormente murieron a los tres meses. Las reservas de nutrientes en las semillas maduras están concentradas en las células basales del embrión y consisten principalmente en proteínas y lípidos, aunque se pueden encontrar pequeñas cantidades de azúcares solubles como sacarosa, manosa, entre otros. (Manning & Van Staden, 1987). Aunque el almidón se encuentra ausente es muy común para especies holoárticas (Carlson, 1940; Harvais, 1974; Rasmussen, 1990; Richardson *et al*; 1992). Sin embargo, suele haber excepciones, *Calypso bulbosa* contiene prominentes depósitos de almidón en las células del embrión maduro (Yeung & Law, 1992). La distribución de las reservas de nutrientes en el embrión suele ser bastante uniforme, aunque las células epidérmicas suelen diferir ligeramente de las células centrales (Rasmussen, 1990). En algunas especies, como *Guarianthe aurantiaca* e híbridos de *Laeliocattleya*, los nutrientes en el embrión tienen una distribución polarizada, los cuerpos de proteína se encuentran en la porción chalazal al final del embrión, la cual es la última porción en hidratarse (Burgueff, 1936; Harrison, 1977).

El primer cambio que se observa durante la imbibición es la hidrólisis de los cuerpos de proteína (Harrison, 1977; Manning & Van Staden, 1987; Rasmussen, 1990). Mientras que la movilización de proteínas es un proceso dependiente del agua, la ruptura de las reservas de lípidos parece estar implicada a un alto nivel de actividad de las células del embrión, por lo que la lipólisis es considerada como un paso crucial en la germinación de las semillas (Harrison, 1977; Manning & Van Staden, 1987), en las investigaciones de Manning y Van Staden (1987) muestran que para que la lipólisis tenga lugar, el embrión necesita energía externa en forma de sacarosa, ya que los glioxisomas aparecen alrededor de los cuatro días después que el azúcar es provisto, y en ausencia de una fuente externa de azúcar las gotículas de lípidos simplemente se unen, las proteínas se disuelven con mayor lentitud con una pequeña vacuolización y pocos granos de almidón aparecen. En contraste con la germinación asimbiótica de *Guarianthe aurantiaca*, donde la lipólisis tiene lugar con o sin sacarosa en el medio de cultivo; sin embargo, cuando hay ausencia de azúcares la lipólisis ocurre en menor intensidad (Harrison, 1977), los glioxisomas nunca se observan y las reservas de lípidos comienzan a agotarse en un lapso de 27 días, no obstante cuando el medio no contiene azúcares la reserva de lípidos se extienden hasta por 65 días.

La ruptura aparentemente está relacionada con mitocondrias con forma de copa, las cuales parcialmente engloban los cuerpos lipídicos, lo cual sugiere que los productos liberados durante la lipólisis han sido respirados de manera instantánea en una síntesis de carbohidratos (Harrison, 1977). Las especies que muestran una dependencia extrema a la micotrofia, necesitan una fuente externa de energía antes de que puedan movilizar sus propias reservas de nutrientes, de lo contrario el proceso de germinación no se lleva a cabo. Especies menos especializadas pueden germinar asimbióticamente sin la ayuda de una fuente externa de sacarosa, ya que gradualmente van usando su propias reservas de nutrientes (algunas veces lípidos), y producen pequeñas cantidades de almidón durante su germinación (Burgueff, 1936). Pero el estado nutricional de las plántulas de orquídea después de su germinación difiere según las especies.

Las reservas de alimento comienzan a agotarse cuando las semillas pasan al estadio de protocormo, durante los siguientes tres ó cuatro meses el protocormo obtendrá los nutrimentos del sustrato, a menos que carezca de rizoides. Si la infección por parte del hongo no tiene lugar, la plántula morirá (*Ramsbottom*, 1929). Vermeulen (1947) uso la expresión “Tiempo de espera” para el periodo después de la germinación durante el cual la semilla sobrevive con sus propias reservas mientras espera el hongo compatible.

2.8 ∞ FITOALEXINAS “CONTROL DE INFECCIÓN” ∞

Bernard en 1911, mostró que los trozos de tejido cortado del tubérculo de *Himantoglossum hircinum* contenía ciertas sustancias fungicidas que se difundían sobre la placa de agar, Magrou (1924) confirmó las observaciones de Bernard y las profundizó, notó que la hifa crecía hasta cierta distancia del tejido del tubérculo y que en ocasiones la hifa comenzaba a degenerarse hasta la muerte del micelio. Nobecourt (1923) a base de experimentos en los cuales mataba las células con cloroformo, congelándolas o ambos métodos, llegó a la conclusión de que el fungicida solo se produce en el tejido vivo cuando el hongo está presente. Esta misma conclusión fue confirmada por Boller y colaboradores (1957). La producción de orchinol comienza cuando el tejido del tubérculo entra en contacto con el hongo, en un lapso de tiempo de cerca de 36 horas y alcanza su máximo de producción a los ocho días. La reacción se extiende a la totalidad del tubérculo pero no puede protegerlo de las nuevas infecciones. Sin embargo en la vecindad de las células atacadas hay una zona de gran actividad de orchinol (Gäumann & Hohl, 1960).

Los primeros aislados de orchinol se obtuvieron de *Orchis militaris* (Gäumann & Kern, 1959); sustancias químicas relacionadas son el loroglossol e hircinol (Urech *et al.*, 1963). Químicamente esos compuestos son fenantrenos, y tienen la virtud de tener propiedades antifúngicas por lo que son un grupo variado de compuestos conocido como fitoalexinas (Stoessl & Arditti, 1984).

Tradicionalmente la producción de fitoalexinas era atribuida a tubérculos, raíces, rizomas y meristemas de orquídeas (Rasmussen, 1995), Beyrle y colaboradores (1995) demostraron que el orchinol también se produce en protocormos.

Se ha puesto poca atención a los mecanismos por los cuales el tejido regula la infección. Algunos trabajos describen a la *tolypophagia* como una alternancia rítmica entre la proliferación fúngica y la lisis; es posible que haya una fluctuación convincente entre dos procesos fúngicos antagónicos, el primero conduce al crecimiento fúngico, el otro promueve la ruptura de la hifa. Los cambios estacionales en algunas especies sugieren que el balance entre la formación del pelotón y la digestión es influenciada por factores externos como la temperatura y la humedad y que quizás estas condiciones son las que prevalecen para el crecimiento externo del micelio (Rasmussen, 1995).

2.9 ∞ MICOTRÓFIA ∞

Bernard (1904) llegó a la conclusión de que el endófito puede actuar a distancia, es decir, llevar a cabo cambios en las células a las que no tiene acceso y que puede modificar las propiedades fisicoquímicas de la savia llegando a todos los tejidos. Él experimentó el efecto de soluciones de salep con sacarosa a distintas concentraciones sobre semillas de *Bletilla*, *Cattleya* y *Laelia*. En *Bletilla* encontró que a altas concentraciones obtenía protocormos más engrosados y entrenudos más cortos comparados con individuos infectados con hongos. Las semillas de *Cattleya* y *Laelia*, se hinchaban y se tornaban verdes a bajas concentraciones; sin embargo, a concentraciones mayores se pueden obtener plantas de apariencia normal pero es mucho más lento e irregular que con los hongos. Pérez y colaboradores (2002) evaluaron el efecto de un biopreparado elaborado a base de *Rhizoctonia solani*, sobre cinco especies de orquídeas epifitas ya establecidas, notaron un aumento de vigor de las plantas, ésto fue determinado por la recuperación de hojas con clorosis, aumentó en número de raíces, brotes, frutos, florecimiento fuera de época y flores cuyo color era más característico. En la naturaleza, las orquídeas utilizan naturalmente hongos micorrízicos endofíticos como fuentes de carbohidratos, nutrientes, agua y compuestos orgánicos a través de la acción de micotrofia. La digestión que efectúan estos hongos simbiotes y la posterior absorción de nutrientes por parte del embrión inmaduro de orquídeas estimula la germinación, el desarrollo de protocormo y crecimiento de las plántulas (Burgueff, 1936; Clements *et al.*, 1986; Arditti, 1992; Rasmussen, 1995). Está claro que las plántulas de orquídea aun presentando clorofila son heterotróficas, eventualmente el aparato fotosintético se establecerá logrando realizar la fotosíntesis. La absorción de los compuestos del suelo o la ruptura de la hifa endotrófica, son las únicas dos vías conocidas por las cuales las plantas en la naturaleza pueden obtener nutrientes externos y en ningún caso el contenido del suelo o la actividad de microorganismos pueden mantener el desarrollo de las plántulas (Rasmussen, 1995), las bacterias asociadas a *Pterostylis vittata* Lindl. estimulan la germinación, probablemente al producir ácido indol acético (AIA) o inducían a la planta a la producción de auxinas (Wilkinson *et al.*, 1994). Tampoco se ha observado en la naturaleza que las plántulas se puedan establecer sin infección por lo que el hongo es la fuente nutricional en los estadios más tempranos de la plántula (Rasmussen, 1995).

Los suplementos primarios de la fotosíntesis y las sales minerales no siempre son los suficientes para sostener el cultivo asimbiótico *in vitro* (Harvais & Hadley, 1967b) muchas especies muestran un requerimiento continuo a ciertos aminoácidos, aun siendo plántulas

verdes (Harvais & Raitsakas, 1975). Cuando las plántulas son suplementadas con ácido glutámico, arginina u ornitina son capaces de producir independientemente el resto de sus aminoácidos. Se requieren cierto número de vitaminas como el ácido pantoténico, Tiamina y Piridoxina cuando la plántula se torna clorofílica y se someten a iluminación (Burgueff, 1932; Harvais, 1973). Hadley (1982) interpretó este hecho al establecer que no hay una evidencia rotunda en que tan sustituible pueda ser el estímulo simbiótico contra de la sales proporcionadas por los métodos asimbióticos.

Cuando los pelotones de la hifa se han establecido en las células de la planta, las hifas externas forman un entramado y efectivo sistema de absorción. Beyrle y colaboradores (1985) encontraron que las semillas inoculadas, sembradas en una placa de agua con agar y conectadas a otra placa de agar con nutrientes mediante el micelio se desarrollaban a la misma tasa que aquellas plantadas directamente en el agar con nutrientes, lo cual muestra que la absorción por parte de la plántula es despreciable comparado con la absorción a través de la hifa. Los mismos resultados fueron obtenidos en cajas de Petri con divisiones y con otras especies de orquídeas (Tsutsui & Tomita, 1990).

Burgueff (1936) notó que un gran número de comunicaciones de hifas emanaban de las partes de la raíz donde los pelotones se alojaban y estimó que una planta adulta de *Platanthera chlorantha* tenía aproximadamente 11 000 rizoides, cada uno provisto de tres conexiones de hifas con el suelo. Cuando la hifa se comienza a lisar el número de conexiones de la hifa con el suelo disminuye, ya que algunas de las conexiones mueren. Esto podría estar ligado a la época de floración o fructificación que es cuando la lisis se extiende y solo unas cuantas conexiones permanecen. No solo el micelio tiene una gran área por la cual los nutrientes pueden ser absorbidos del medio, si no que los pelotones internos también forman una interface extensa con el plasmalema de las células de la orquídea. La superficie de absorción en plántulas simbióticas debe de ser de una magnitud mucho mayor que las asimbióticas.

Además de las principales vías simplásticas conducidas por el citoplasma de la hifa a través de la interface y dentro del citoplasma del hospedero, la ruta apoplástica a lo largo de la hifa y las paredes celulares podría ser tomada en cuenta, el transporte apoplástico de agua y de iones a lo largo de la hifa son de crucial importancia en las raíces viejas donde las paredes exodérmicas se encuentran más suberizadas. Los pasajes de la hifa existían antes que la suberización tuviera lugar, y la hifa penetra en las células de pasaje. Permaneciendo como una ruta potencialmente funcional (Smith *et al.*, 1990).

Agua

El agua se distribuye internamente en el micelio por el citoplasma, en algunas ocasiones el líquido es exudado de las puntas de las hifas (Burgueff, 1936; Vöth, 1980), la transmisión es mantenida por la ayuda del estrés local del agua en el micelio o bien es obtenida a partir de la transpiración del hospedero como ocurre en la mayoría de los hongos micorrízicos (Lucas, 1977). Previamente se sugirió que el almidón contenido en el tejido de la orquídea se disuelve después de la infección, dando como resultado un potencial osmótico negativo, lo cual aumenta la absorción de agua en el entorno (Bernard, 1904). En 1908 y 1909 Bernard logró germinar semillas hasta protocormo empleando un medio con una elevada presión osmótica. Esto podría suceder ya sea directamente o a través de una promoción de la captación de las hifas dentro de la planta. La hidrólisis del glicógeno en los pelotones podría funcionar de una manera similar en relación con el micelio externo (Rasmussen 1995).

Cuando Beau (1920) cultivó plántulas en una placa de vidrio conectadas a agar con nutrientes únicamente por medio del micelio, tuvo la necesidad de agregar agua a las plántulas, ya que aparentemente la humedad obtenida a través de la hifa es insuficiente para remplazar el agua que se pierde a través de la transpiración, lo que demuestra este experimento es que el agua que se pierde de las plántulas es mucho mayor que la que se pierde del suelo (Rasmussen 1995). Si bien es cierto que la imbibición es el punto crucial que desencadena la germinación (Fenner, 1985), cada orquídea se desarrolla en un entorno en particular; por lo que sus relaciones hídricas, requerimientos de humedad y las estrategias para mantener un balance hídrico puede diferir según el hábito de crecimiento que presenten (Hadley, 1994). Yoder y colaboradores (2000) compararon el impacto de la presencia del hongo micorrízico sobre el balance hídrico en una orquídea terrestre (*Platanthera integrilabia*) de climas templados y una epífita (*Epidendrum conopseum*) proveniente de regiones subtropicales; encontraron, que las plántulas inoculadas tenían un mayor contenido de agua que aquellas que no lo estaban, esto debido a que las masas de hifas de digestión (pelotones) son ricas en agua, por lo que el hongo por sí mismo es una fuente de agua de acceso inmediato. El escenario más probable es que la hifa invasora promueve la captación de agua por infiltración de la testa o tal vez abra los microporos para el agua durante el proceso de infección, dando por resultado plántulas con altos contenidos de agua, teniendo un efecto más pronunciado para la especie terrestre, debido a que la retención de agua de la semilla de la orquídea epífita era dos veces menor y que en su mayoría la pérdida de agua ocurría a través de la naturaleza hidrofílica de la testa, ya que la epífita es capaz de ganar más agua con la humedad relativa, llegando hasta el punto de saturación, dicha capacidad sugiere que

estas semillas son capaces de adquirir el agua de lluvia en un sustrato muy poroso y que la lluvia es la clave para coordinar la germinación. Esto podría explicar el hecho de que la semilla con inóculo germinó en dos o tres semanas y sin inóculo en un mes, mientras que a la especie terrestre le tomo cerca de un mes con el inóculo y tres meses sin inóculo. Por lo que las epifitas son más propensas a estaciones secas y el hongo es esencial para la supervivencia bajo el dosel de los arboles. Mientras que en las orquídeas terrestres la hifa sirve como un conducto por el cual la plántula toma el agua del suelo (Yoder *et al.*, 2000).

Iones

El transporte de sales minerales en el micelio está acompañado por los movimientos de agua, se ha demostrado que el Fósforo (^{32}P) es transportado dentro del tejido de plántulas infectadas. Las plántulas de *Goodyera repens* tenían 100 veces más de fósforo que los controles asimbióticos (Smith, 1966; Alexander *et al.*, 1984). Holänder (1932) encontró una alta concentración de nitrógeno en plántulas de *Cymbidium* cultivadas simbióticamente (el 5 % en peso seco comparadas con las asimbióticas que fue del 1.66%). Recientemente los experimentos de marcado radioactivo confirmaron la transferencia de P y N (como glicina) (Cameron *et al.*, 2006ab). Lo anterior indica que hay un importe activo de nitrógeno dentro del tejido infectado, alcanzando concentraciones que usualmente exceden las concentraciones encontradas en plantas cultivadas (Salisbury & Ross, 1985). Esta toma tan efectiva de iones es una ventaja competitiva en los hábitats naturales de las poblaciones de orquídeas donde los suelos son típicamente pobres en minerales (Rasmussen, 1995). Dijk (1990) reportó efectos positivos en la infección cuando se presentaban bajas concentraciones de nitrógeno, aparentemente el nitrógeno es el factor limitante para el crecimiento asimbiótico (Rasmussen, 1995).

Compuestos orgánicos.

Las hifas maduras que crecen en el sustrato secretan enzimas capaces de romper sustancias complejas en compuestos solubles de fácil absorción. Esto podría explicar la manera en la cual la hifa invasora es capaz de penetrar la pared celular del hospedero sin dañar el tejido. Se desconoce si las hifas intracelulares en los pelotones secretan enzimas en la interface; sin embargo, se han observado ácido fosfatasas secretadas en un cultivo puro (Dexheimer & Serrigny, 1983). En las etapas más juveniles de la formación intracelular del pelotón, la hifa crece vigorosamente y por lo tanto constituye un sumidero de nutrientes y agua desde la parte más externa del micelio establecido en el sustrato hasta la planta. Ya que, en última instancia la ganancia neta para la planta proviene del micelio externo que contribuye a la construcción de pelotones, incluyendo depósitos de glicógeno. El almidón que desaparece de la célula hospedera podría ser metabolizado

localmente, durante la extensión de membrana del hospedero, la producción de fitoalexinas y enzimas hidrolíticas (Rasmussen, 1995).

Purves y Hadley (1976) enfatizaron el tiempo de correlación que existe entre la formación de pelotón, movilización de almidón, lisis del pelotón y el crecimiento acelerado de las plántulas. Las plántulas asimbióticas se encuentran en un sustrato que contiene carbohidratos solubles y crecen lento mientras van acumulando almidón; dichos depósitos pueden ser movilizados tanto por la plántula al carecer de carbohidratos disponibles o bien podrían ser infectados, lo cual indicaría que la infección implica un cambio fisiológico que estimula el consumo de reservas de almidón.

Burges (1936) detectó algunos carbohidratos solubles en el suelo esterilizado después de haberlo inoculado tres semanas atrás con el endófito de *Dactylorhiza incarnata*, de acuerdo con Hadley (1984) la mayor concentración de glucosa se observó en las plántulas inoculadas de *Dactylorhiza purpurella* y *Goodyera repens* que las asimbióticas. La glucosa, manosa, arabinosa, galactosa y xilosa son fuentes adecuadas de carbohidratos para el hongo de las orquídeas (Holländer, 1932) de acuerdo con Whigham y colaboradores (no publicado) se ha recreado la germinación del hábitat natural en medios de cultivo a base de suelo o madera magra. Por ejemplo agua con agar y 0.5% de corteza de madera o agua con agar y virutas de madera pueden sustentar algunos simbiosomas de orquídeas y producir plántulas pequeñas a partir de semillas (Whigham *et al.*, MS, Citado en Rasmussen, 2002).

La producción de enzimas pécticas fue demostrada por Perombelon y Hadley (1965), Tsutsui y Tomita (1990) generaron un desarrollo exitoso de plántulas en un cultivo puro de *Rhizoctonia* creciendo en un sustrato péctico.

Los simbiosomas de orquídeas micoheterotróficas como *Galeola* y *Gastrodia* que no son *Rhizoctonia* producen enzimas que degradan la lignina (Holländer, 1932). De acuerdo con Burgueff (1936) aquellos hongos asociados a orquídeas clorofílicas no descomponen la madera. El hecho es que las plántulas de *Tipularia discolor* se establecen en escombros leñosos lo cual indica que algunas especies están asociadas a degradadores de madera (Rasmussen, 1992). Se ha encontrado que la *Rhizoctonia* de *Ophrys lutea* produce polifenol oxidasas (Pais & Barroso, 1983). Wolf (1933) tuvo éxito al lograr crecer el endófito de *Corallorhiza trifida* en un sustrato con 1-2% de taninos. Los taninos y ácidos fenólicos son típicos de suelos con altas concentraciones de humus y es posible que estos complejos constituyan una fuente externa importante de Nitrógeno orgánico para la micorriza. Aparentemente los hongos de las orquídeas micoheterotróficas son menos capaces de usar el nitrógeno inorgánico que las orquídeas clorofílicas y tienen cierta preferencia por el nitrógeno en forma de albumina, peptonas o ácidos nucleicos

(Holländer, 1932). Harvais & Raitsakas (1975) apreciaron que la hifa tenía una acumulación rica en aminoácidos que no eran secretados en el medio de cultivo. Burgueff (1934, 1936) incrementó la producción de clorofila, tasa de crecimiento y desarrollo de plántulas de *Vanda* sp añadiendo un extracto alcohólico del hongo en el medio de cultivo asimbiótico, y sugirió que el resultado se debió a la presencia de vitaminas, dicha reacción no es específica ya que los extractos de cepas compatibles e incompatibles de *Rhizoctonia* estimulan a las plántulas. Burgueff (1936) intentó identificar la sustancia, pero no tuvo éxito, encontró que la actividad se preservaba en extractos acuosos del hongo y era bastante resistente al calor. Downie (1949) también observó micelios acuosos homogéneos con cierto efecto estimulador; sin embargo, el calor destruía este efecto y solo se mostraba en el hongo vivo. Las vitaminas como tiamina y ácido nicotínico son secretadas por una cepa de *Moniliopsis solani* aislada de *Dactylorhiza purpurella* cuando crecía en un cultivo puro (Harvais & Pekkala, 1975), la producción se incrementó cuando la aireación fue restringida (como ocurriría en el tejido de la planta) y cuando el sustrato contenía una considerable producción de NH_4^+ en relación con NO_3^- . La producción de ácido nicotínico fue observada por Hijner & Arditti (1973) en un aislado de *Rhizoctonia* obtenido de especies de *Cymbidium*. Muchos endófitos de orquídeas son capaces de producir AIA (Ek *et al.*, 1983). Barroso y col. (1986) observaron que después de aislar la *Rhizoctonia* de *Ophrys lutea* detectaron AIA tanto en la hifa como en el medio de cultivo. Los protocormos simbióticos de *Dactylorhiza incarnata* contienen 10 veces más auxinas y citocininas después de 10 días de cultivo que los testigos asimbióticos (Beyre *et al.*, 1991).

2.10 ∞BALANCE MICOTRÓFIA/FOTOTRÓFIA ∞

Cuando Alexander y Hadley (1984) colocaron plántulas con hojas de *Gooyera repens* y su respectiva micorriza en un medio adicionado con fungicida, se notó que el micelio externo dejó de crecer, así como la plántula, el contenido de N y P fueron reducidos y el radio de crecimiento de las raíces aumentó. Además no observaron una transferencia de carbono desde la planta hacia el micelio y viceversa. Salmia (1989) trabajó con mutantes carentes de clorofila de la orquídea *Epipactis helleborine* constatando que los patrones de infección eran muy similares a los testigos.

Evidencia reciente indica que el N, P, y agua continúan siendo abastecidos por el compañero fúngico en orquídeas fotosintéticas adultas y que los productos de la fotosíntesis son provistos al hongo como un incentivo para continuar con la colonización fúngica (Dearnaley, 2007)

La mayoría de las orquídeas son fotosintéticas en su etapa adulta, pero un número pequeño (alrededor de 100 especies) son micoheterotróficas (Leake, 2005), la evidencia reciente muestra un tercer modo nutricional llamado mixotrófia (Joloul *et al.*, 2005) donde la orquídea adulta fotosintética aumenta sus requerimientos de carbono vía micorriza (Gebauer & Meyer, 2003; Bidartondo *et al.*, 2004; Selosse *et al.*, 2004; Joloul *et al.*, 2005). Las orquídeas mixotróficas son un paso en la evolución entre la fotosíntesis y la micoheterotrófia (Joloul *et al.*, 2005), la evidencia acumulada indica que las orquídeas verdes y aclorofilas reciben indirectamente carbón de los árboles vecinos (McKendrick *et al.*, 2000); en primer lugar las secuencias de identificación fúngicas en las raíces de las orquídeas y las ectomicorrizas de los árboles circundantes indicaban una interacción epiparasítica (Taylor & Bruns, 1997; Selosse *et al.*, 2002 a,b; Bidartondo *et al.*, 2004; Girlanda *et al.*, 2006; Abadie *et al.*, 2006). Por otro lado se demostró que los isótopos de Carbono y Nitrógeno en las ectomicorrizas locales eran los mismos en el interior de las orquídeas locales (Gebauer & Meyer, 2003; Trudell *et al.*, 2003; Bidartondo *et al.*, 2004; Whitridge & Southworth 2005; Joloul *et al.*, 2005; Abadie *et al.*, 2006). Curiosamente, algunos miembros de la Tulasnellaceae y Ceratobasidiaceae se han mostrado como hongos ectomicorrizicos (Warcup 1985; 1991; Bidartondo *et al.*, 2003). Esta evidencia indica que existe un micelio que entrelaza a las orquídeas y los árboles (Selosse *et al.*, 2006) por lo que requiere mayores implicaciones de conservación (Girlanda *et al.*, 2006). Por lo que la protección de las orquídeas amenazadas requerirá una protección complementaria de los árboles asociados (Whitridge & Southworth, 2005).

2.11 ∞ AISLAMIENTO MICORRÍZICO ∞

Los endófitos de las orquídeas pueden aislarse de manera natural de los protocormos, raíces y en ocasiones de los rizomas o cormos. La ventaja de extraer un hongo del tejido del protocormo es que se tiene la garantía de que la cepa inducirá el desarrollo de las plántulas; por otro lado, el tejido de las plantas maduras alberga una cierta variedad de hongos (Harvais & Hadley, 1967 a; Hadley, 1970). Asimismo, las células ubicadas en la parte basal del protocormo son bastante grandes y la infección por parte del hongo es muy extensa, en contraste con las células corticales de la raíz que a menudo son largas y estrechas y la infección tiende a concentrarse de manera irregular. Las áreas más prometedoras para buscar la infección en las raíces, son áreas debajo de los pelos radicales cercanos al meristemo. Bernard (1909) observó que las partes infectadas de las raíces tendían a tener una coloración más opaca o amarillenta y que esto era ocasionado a que los pelotones activos se encontraban cerca de la superficie del órgano.

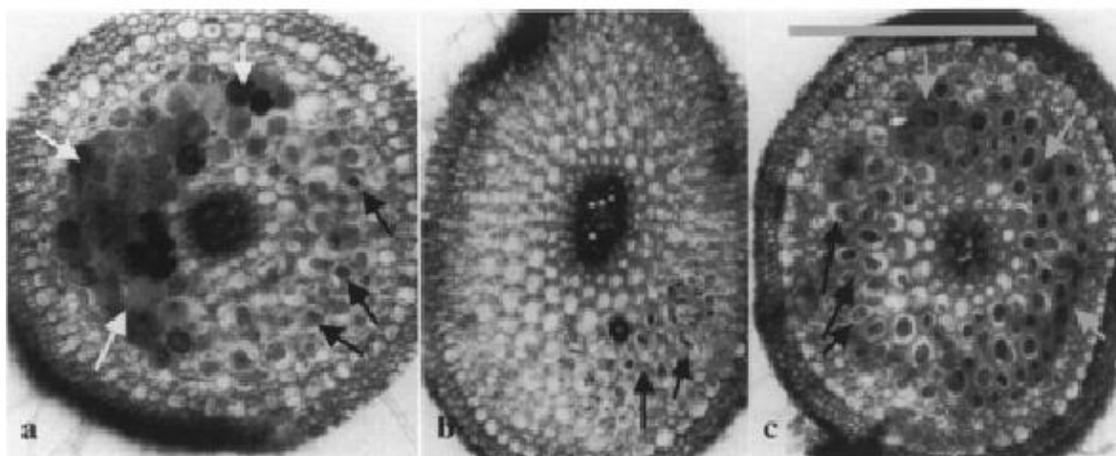


Figura 19 Corte transversal de raíces de *Tipularia discolor* mostrando varias intensidades de infección. (a) raíz joven (Diciembre) con una infección ocupando el 50% del cortex, las flechas blancas indican pelotones vivos mientras que las negras muestran a los pelotones digeridos. (b) Raíz de un año (Julio) de edad donde la infección ocupa menos del 25% y la mayoría son pelotones digeridos. (C) raíz vieja (abril) con pelotones digeridos ocupando casi el 100% del cortex y donde cerca del 75% aun presentan pelotones vivos (flechas grises). Imagen tomada de Rasmussen & Whigham. 2002.

Las técnicas empleadas para el aislamiento micorrízico de orquídeas consisten en lavar el tejido minuciosamente para remover el sustrato adherido, desinfectar externamente las raíces para eliminar posibles contaminantes y colocar los segmentos de raíz en agar con nutrientes, (Bernard, 1904; Currah *et al.*, 1987, 1988, 1990; Zettler, 1997; Zettler *et al.*, 2005; Sharma, 2003b; Stewart & Zettler, 2002; Stewart & Kane, 2006, 2007) con las debidas incisiones y con ayuda de agujas de disección, escalpelos o micropipetas se pueden liberar los pelotones y sembrarlos de manera individual en agar con nutrientes (Bernard, 1909; Constantin & Dufour, 1920; Warcup & Talbot, 1967; Rasmussen, 1990; Taylor & Bruns 1997; Rasmussen, 1995; Zelmer & Currah, 1995; Otero *et al.*, 2002; Bayman *et al.*, 2002; Shan *et al.*, 2002; Dearnaley, 2005) no obstante existen ciertos problemas asociados con estos métodos como:

- 1) Debido a que la raíz es una estructura de absorción se corre el riesgo de matar el endófito. Existen pelotones extirpados que no crecen en el agar (Burgues, 1939) este problema fue documentado por primera vez por Frank (1891) quien lo interpretó como un signo de degeneración y predijo que esta modificación del endófito hacía imposible la obtención de pelotones en un cultivo puro. Afortunadamente este fenómeno solo ocurre en pocas especies de orquídeas particularmente de *Cypripedium*. Bernard (1909) recomendaba que aquellos pelotones que mostraran signos de haber sido digeridos debieran de ser descartados para asegurar un aislamiento exitoso.
- 2) Problemas con la contaminación de bacterias. Algunos investigadores utilizan antibióticos como estreptomycin o novobiocina para impedir el desarrollo de bacterias, sin embargo, la hifa tiene un cambio en su crecimiento y en su patrón de infección (Warcup & Tabolt, 1967; Clements, 1982a; Rasmussen *et al.*, 1990).
- 3) Un simple pelotón puede contener varios taxones de micorrizas que no se puedan aislar y analizar.
- 4) Es muy difícil aislar un hongo que tiene un crecimiento lento (Zhu, 2008). Debido a que los endófitos de las orquídeas tienen una competencia pobre frente a otros hongos agresivos cuando crecen en un medio nutritivo. Hadley (1990) recomendó el uso de sustratos diluidos con propósitos de aislamiento.
- 5) En la última década se ha reportado que la flora micobiana de una plántula es mayor y muy distinta a la de una planta adulta por lo que cuando los pelotones se han extraído de raíces dan resultados negativos para la germinación simbiótica *in vitro* (Rasmussen 2002)

2.12 ∞ RHIZOCTONIA ∞

Bernard (1899), en sus primeros intentos por extraer el hongo, obtuvo varias especies de *Fusarium*. Sin embargo, cuando tuvo éxito en la extracción del hongo correcto estableció un criterio que permite conocer la verdadera naturaleza del hongo: simplemente el endófito es capaz de llevar a cabo la germinación de la semilla. Al extraer de la raíz el hongo y cultivarlo, recrecerá mediante filamentos septados apicales; mientras tanto, surgen ramas laterales y se lleva a cabo la anastomosis entre las hifas. Posteriormente, surgen pelotones de hifas muy similares a las que aparecen en las células de la raíz. A medida que el micelio madura se va convirtiendo en filamentos cortos e hinchados, que aparentemente son ricos en reservas de alimentos. Estos filamentos ramifican abundantemente formando ciertas anastomosis entre sí dando lugar a un tejido esclerótico de color amarillo o marrón. Estos cuerpos esféricos forman un entrelazado masivo de hifas, estas estructuras son capaces de soportar la sequía y las inclemencias del tiempo.

Estas primeras observaciones llevaron a Bernard (1909) a colocar el hongo dentro del género *Oospora*, sin embargo tiempo después señaló que la presencia de los filamentos hinchados son estructuras muy parecidas a *Rhizoctonia violácea* la cual es muy común en papa, alfalfa y otros cultivos, donde forma pequeñas esclerosis irregulares y negruzcas, lo cual lo llevó a considerar que los hongos de las orquídeas se encuentran en el mismo género. Clasificó cerca de veinte aislados de orquídeas en tres especies de hongos: la primera y la más frecuente fue *Rhizoctonia repens* aislado de los géneros *Laelia*, *Cattleya*, *Spiranthes*, *Paphiopedilum*, *Cymbidium*, *Aerides*, *Bletizza* y *Coelogyne* esta cepa se caracterizaba por no formar esclerocitos. *Rhizoctonia mucroides* se aisló de los géneros *Phalaenopsis* y *Vanda*, Mientras que *Rhizoctonia lanuginosa* en *Odontoglossum*.

Burgeff, (1909), sin darse cuenta de la clasificación de Bernard, presenta al mismo tiempo el nuevo género *Orcheomyces* para clasificar a los hongos de orquídeas, logrando describir 15 especies de hongos, nombrando primero el género y después el nombre de la orquídea de la cual lo aisló; sin embargo, por conveniencia el más aceptado fue el nombre de *Rhizoctonia*.

El género *Rhizoctonia* es un nombre genérico que se le da a la mayoría de los hongos asociados a muchas orquídeas (Stern *et al.*, 1993). Poco se sabe de la distribución de estos endófitos en la naturaleza pero hay evidencia de que algunos de ellos (principalmente los de las orquídeas sin clorofila) pueden formar relaciones micorrízicas con plantas de otras familias, siendo un fenómeno no muy común (Warcup, 1988; Mckendrick *et al.*, 2000; Batty *et al.*, 2002). Muchos de estos hongos son saprofitos, parásitos o patógenos (Rasmussen, 1995; Pope & Carter, 2001; Batty *et al.*, 2002). Algunos de ellos pueden digerir la celulosa (Hadley, 1969; Warcup, 1975; Rasmussen, 1992) y presumiblemente pueden vivir en el suelo como otras micorrizas y en ausencia de la orquídea a distancias considerables (Mckendrick *et al.*, 2002; Batty *et al.*, 2002); sin embargo, su distribución está relacionada a ciertas propiedades del suelo asignándole cierta distribución espacio-temporal (Batty *et al.*, 2002; Rasmussen & Whigham, 2002).

Rhizoctonia es polifilético e incluye a hongos de la división Basidiomycota, particularmente de las familias Tulasnellaceae, Sebacinaceae y Ceratobasidiaceae (Andersen, 1996; Muller *et al.*, 1998). Los micelios característicos de *Rhizoctonia*, en un cultivo puro, presentan una o más de las siguientes características:

- Son organismos aerobios que raramente crecen por debajo de 10 mm de la superficie del agar en los medios de cultivo. Si es desprovisto de oxígeno tiende a crecer lentamente y eventualmente morirá (Burgueff, 1909).
- Las hifas son relativamente anchas, septadas, con ramas laterales en ángulo recto que surgen en la parte distal de la célula, constriñendo el punto de origen y con un septo cerca de la hifa principal. Forman células moniloides y esclerocios (Andersen, 1990).
- Algunos de los micelios no presentan esporulación sexual y se consideran anamorfos y resulta difícil agruparlos con los micelios reproductivos o teleomorfos; por otro lado, algunos anamorfos se les ha inducido la formación de órganos reproductivos *in vitro* (Curtis, 1939; Currah *et al.*, 1987; Currah & Zelmer 1992).

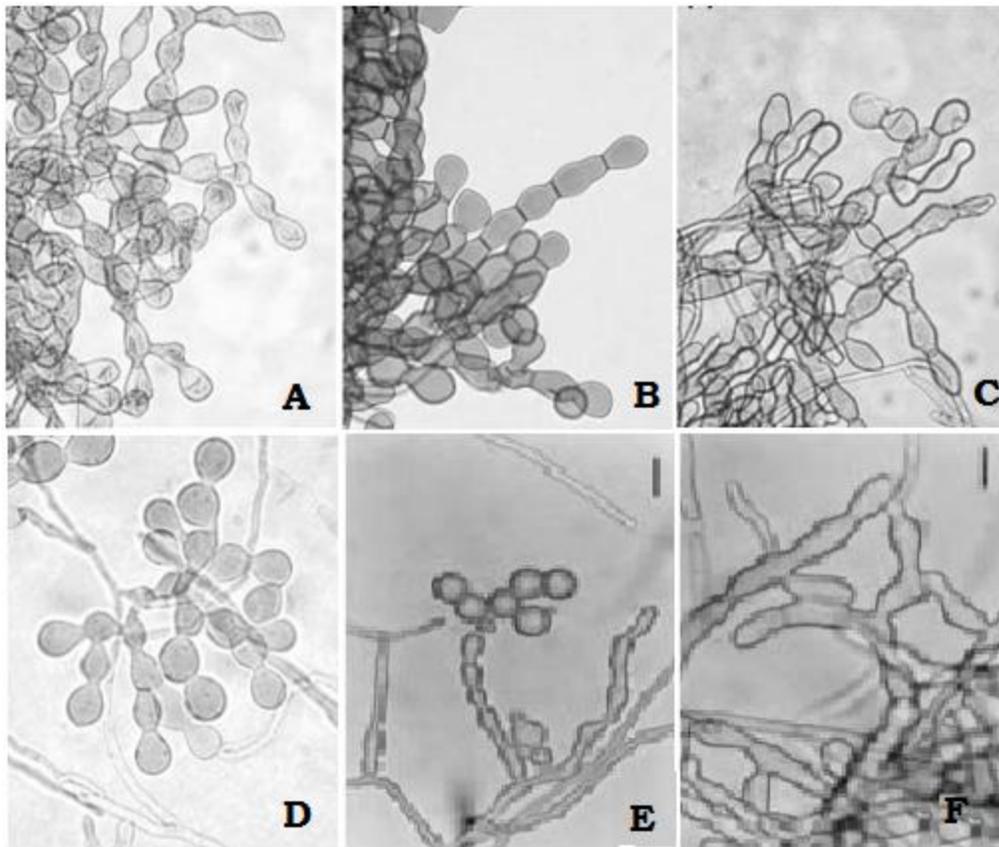


Figura 20 Morfología de distintas cepas de aisladas de diferentes orquídeas donde se puede apreciar que en la base de las ramificaciones las células se constriñen, mientras que las células más gruesas y redondeadas son las denominadas moniliodes.

A-D Micobiontes aislados de *Spiranthes floridana* y *S. brevilabris* (tomado de Stewart & Kane, (2007).

E-F Celulas moniloides de *Ceratorhiza spp.* y cepa de *Epulorhiza epiphytica* (tomado de Pereira *et al.*, 2005).

Moore (1987) propuso una división útil de *Rhizoctonia* basado en el número de núcleos y ultraestructura del septo y sus poros, aquellos con un poro simple y largo son ascomicetos de la subdivisión *Ascorhizoctonia*; mientras que, aquellos doliporos, como *Rhizoctonia*, se encuentran dentro de los grupos *Ceratorhiza*, *Epulorhiza* y *Monilopsis*.

De acuerdo con lo publicado por Rasmussen (2002 b) y Dearnaley (2007), la mayoría de los micobiontes adicionales asociados a orquídeas que han sido identificados a través de métodos de biología molecular a nivel mundial, han sido basidiomicetos; Selosse *et al.* (2004) y Bidartondo *et al.* (2004) encontraron ascomicetos potenciales en orquídeas. Sin

embargo, la presencia de estos ascomicetos en las raíces de orquídeas no indica necesariamente una relación funcional; por lo que, antes de que sean designados como asociaciones micorrízicas, estos hongos deberían ser aislados, cultivados e inoculados en plántulas para comprobarlo.

Dentro de los Basidiomicetos, las especies del género *Ceratobasidium* son muy pocas las que han sido investigadas (Rasmussen, 1995) y las que se han reconocido están en asociación con especies de orquídeas terrestres y epífitas (Warcup & Tabolt, 1971).

Reportes previos a la década de los 70's demostraban que la infección por parte de los hongos en el ambiente epífita ocurría con una baja intensidad en comparación con los ambientes terrestres (Hadley & Williamson, 1972); no obstante, reportes más recientes contradicen este punto ya que las raíces aéreas por lo general evaden la infección al no estar en contacto con el sustrato; por otro lado estos informes abarcan una considerable variación estacional y local, así como la variación entre las especies llegando a la conclusión de que el ambiente epífita es igual de diverso que el ambiente terrestre en cuanto a micorrizas (Goh *et al*, 1992; Rivas *et al*, 1998; Senthilkumar *et al*, 2000).

El estudio micorrízico de las especies epífitas había sido abandonado; probablemente, porque los primeros estudios arrojaron que estas especies tenían un nivel bajo de colonización (Hadley & Williamson, 1972). En épocas recientes un mayor número de autores han usado técnicas moleculares con propósitos taxonómicos para documentar los endófitos de las orquídeas (Otero *et al.*, 2002, 2004; Ma *et al.*, 2003; Kristiansen *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2005; Suarez *et al.*, 2006) de manera general los micobiontes encontrados en estas orquídeas son similares a las especies terrestres fotosintéticas e incluyen especies de *Ceratobasidium* y *Tulasnella.*, Richardson y Currah (1995) reportaron que *Epulorhiza* fue el género menos frecuente en orquídeas epífitas de Costa Rica; sin embargo, este género se aisló abundantemente en dos orquídeas epífitas de Brazil (Pereira *et al.*, 2003). Otero y colaboradores (2004) demostraron que los hongos, del género *Ceratobasidium*, están más estrechamente relacionados con la orquídea *Ionopsis utricularioides* que con *Tolumnia variegata*; empero, los estudios *in vitro* de esta última especie de orquídea han arrojado una mejor germinación simbiótica. No obstante desde que Knudson en 1930 tuvo éxito en germinar un híbrido de *Cattleya* en un medio artificial sin el uso del hongo, la importancia de éste decayó. Sin embargo, la germinación artificial de orquídeas terrestres de zonas templadas es extremadamente difícil y requiere formulaciones de nutrientes muy específicas en medios asépticos de germinación (Arditti, 1992). Por lo tanto, muchos cultivadores e investigadores utilizan hongos simbióticos para la propagación. Esto contrasta con el cultivo de muchas orquídeas epífitas tropicales, que en general son relativamente fáciles de germinar en condiciones asimbióticas. Por esta

razón, se conocen mucho mejor las interacciones simbióticas de germinación de las orquídeas terrestres de zonas templadas que las orquídeas epífitas tropicales. Sin embargo, las técnicas de germinación simbiótica de semillas epífitas podrían mejorar el éxito de cultivo para fines comerciales así como de conservación (Otero & Bayman, 2009).

Porras-Alfaro y Bayman (2007) examinaron las raíces de *Vanilla* spp. utilizando secuencias moleculares y número de hifas nucleares revelaron que los hongos aislados pertenecían a *Ceratobasidium*, *Thanatephorus* y *Tulasnella*, advirtiendo que *Ceratobasidium* era el más común, tanto en las raíces que tenían contacto con el suelo como aquellas en la corteza de los árboles. Sin embargo, solo los de *Ceratobasidium* indujeron la germinación. Zettler y colaboradores (2011), al utilizar técnicas moleculares, encontraron que un hongo de *Ceratobasidium/Ceratorhiza* inducía la germinación de semillas y el desarrollo de protocormos de *Epidendrum amphistomum*.

2.13 ∞ TRAMPEO MICORRÍZICO (SEED BAITING TECHNIQUE) ∞

Es difícil evaluar la participación del hongo *in situ* durante la germinación de orquídeas terrestres en el suelo; el tiempo de asociación entre micorriza y semilla, el establecimiento de la micorriza y el tiempo de germinación de las semillas es desconocido. Solo se ha podido observar esta participación, del hongo durante la germinación, bajo condiciones *in vitro*, pero no en el hábitat natural. En algunas ocasiones se han logrado encontrar plántulas inoculadas en el suelo (Ramsbottom, 1929), en algunas otras ocasiones se encontraron adyacentes a las raíces de las plantas adultas (Fabre, 1856; Ames, 1922; Mrvicka 1990) o bien, las semillas dispersadas de frutos se establecen muy cerca de la planta madre (Bernard, 1899); y en muy raras ocasiones en macetas que contenían plantas cultivadas (Beau, 1920; Wooster, 1935). La dinámica de la “fase subterránea” (protocormo o plántula) permite entender los cambios y la estructura de las poblaciones de orquídeas. La lógica indica que la duración del protocormo es incierta al ser una fase estacionaria; antes de este suceso, debió de haber existido una estación de florecimiento y fructificación por lo que en campo se pueden encontrar un grupo de edades desiguales; además, existe una dramática y fuerte selección natural ya que de los millones de semillas que se dispersan, solo unas cuantas logran alcanzar el estadio de

plántula, por lo que es importante atender las dinámicas tanto del decline como del establecimiento y los factores involucrados (Rasmussen y Whigham, 1998b).

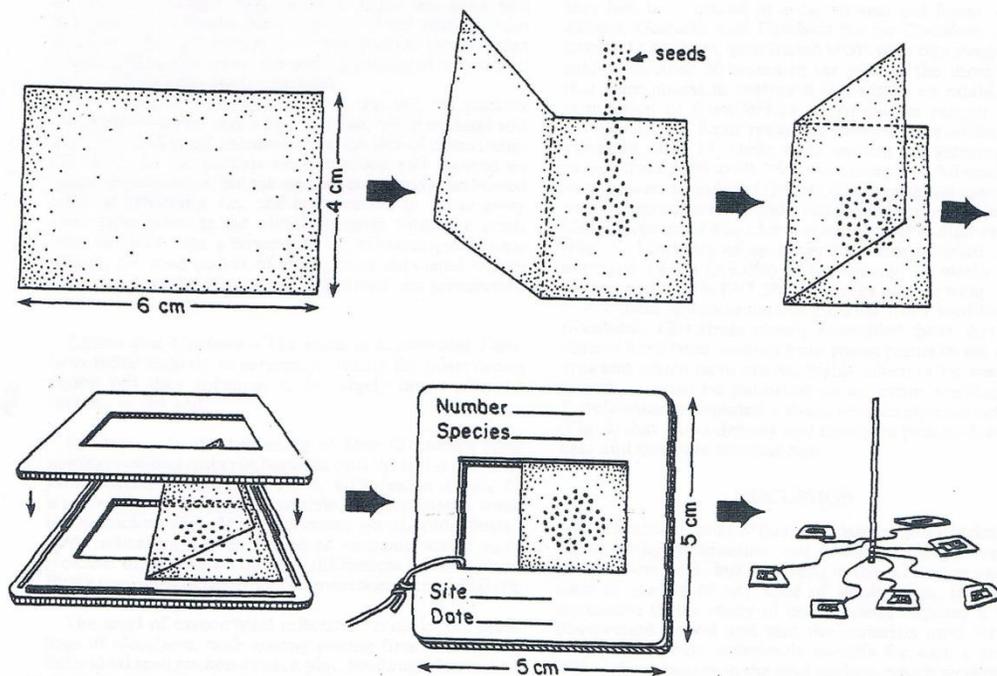


Figura 21. Paquetes empleados para la micorrización de semillas de orquídeas terrestres obtenido de Rasmussen y Whigham (1993)

La introducción de un método de trapeo (Seed Baiting Technique) para micorrizas, a través de la siembra y recuperación de semillas de cinco especies de orquídeas terrestres *in situ*, fue propuesto por Rasmussen y Whigham en 1993. La técnica inicialmente se realizó con el propósito de proporcionar información sobre la biología de los hongos involucrados en la germinación natural de semillas de orquídeas. El método consistió en elaborar trampas, utilizando malla para plancton para retener a las semillas pero que permitiera el libre paso de los microorganismos presentes en el suelo, como bacterias e hifas. La malla conteniendo las semillas fue ensamblada en un marco para diapositivas (Fig. 21). Las trampas se colocaron *in situ* cubiertas ligeramente con suelo y hojarasca; además de, una malla de acero galvanizada.

Ellos observaron las trampas durante las primeras 6 semanas y encontraron partículas finas de suelo con ciertas bacterias e hifas en el interior de la trampa. Al cabo de un año las semillas de *Liparis lilifolia* y *Tipularia discolor* no germinaron y permanecieron intactas. En *Corallorhiza odontorhiza* la germinación (o ruptura de la testa) varió según la zona de siembra *in situ* y esta ocurrió a las 30 semanas en un bosque maduro donde se

encontraba la población de esta especie. En *Galearis spectabilis* la germinación ocurrió a las 23 semanas; posteriormente, a las 62 semanas no se observó ningún desarrollo posterior y se constató que las plántulas no estaban inoculadas. Para *Goodyera pubescens* la germinación ocurrió a las 24 semanas, el nivel de asociación fúngica variaba de acuerdo con la localidad de siembra, las plántulas que presentaban una micorriza evidente pertenecían a dos localidades donde se puede encontrar a *Goodyera* de forma natural; se aisló una *Rhizoctonia*, típica de estas plántulas que fue muy similar a las aisladas en plantas jóvenes de la zona, la cual ha tenido un efecto positivo para el desarrollo *in vitro*, aquellas plántulas que no se inocularon comenzaron a morir a las 36 semanas.

El método de trampeo, permite mantener una siembra controlada *in situ*; provee información sobre la longevidad de las semillas, rango de crecimiento y mortalidad de las plántulas, se puede evaluar el estado de micorrización de plántulas, geoposicionar los sitios de inoculación, aislar endófitos y determinarlos así como evaluar la variación espacio-temporal. Las semillas en las trampas están sujetas a las condiciones fisicoquímicas del sustrato y en contacto con microorganismos haciendo posible la manipulación experimental de los componentes físico químicos del suelo así como la inoculación de diferentes organismos pudiendo derivar estudios edáficos, climáticos, o bióticos requeridos para la germinación y desarrollo de plántulas (Rasmussen, 1998 a).

Masuhara y Katsuya (1994) colocaron semillas de *Spiranthes sinensis* en gazas de algodón y las enterraron en el hábitat natural; ocho semanas después, se confirmó que de los 210 puntos de muestreo 67 contenían semillas que habían alcanzado el estadio de protocormo, además aislaron micorrizas de plantas adultas donde *Rhizoctonia repens* fue la micorriza dominante para ambos experimentos; por otro lado distinguieron que muchas de las *Rhizoctonias spp.* Aisladas a partir de raíces de plantas adultas y que no estaban asociadas con la germinación *in situ* inducían la germinación *in vitro*, por lo que concluyeron que la especificidad fúngica bajo condiciones *in situ* es muy diferente de las condiciones *in vitro*.

En 1995 van der Kideren emplea la misma técnica de Rasmussen y Whigham (1993) observando que las semillas de *Dactylorhiza maculata* y *Epipactis helleborine* poseen un tiempo corto de vida, germinan a los 3.5 meses después de la siembra *in situ* y la inoculación fúngica puede tardar en ocurrir un año; además, el desarrollo de las plántulas fue muy lento y resaltó que ésto podía deberse a la alta densidad de semillas empleadas en cada muestra; por otro lado, notó que las plantas juveniles autótrofas aparecían dos años después de la primera floración (van der Kideren, 1995 a,b). En ese mismo año Perkins y colaboradores examinaron las asociaciones micorrízicas de *Microtis parviflora* bajo condiciones *in situ* logrando extraer tanto de raíces y protocormos *Rhizoctonia*

globularis; bajo condiciones *in vitro* demostraron que este hongo y otros tres aislados formaban micorrizas con otras orquídeas presentes en el mismo hábitat, mientras que un aislado de *Rhizoctonia solanii* mataba a las semillas en proceso de germinación. Perkins & Mcgee (1995) en sus trampas colocaron semillas de *Pterostylis acuminata* las cuales se inocularon con *Rhizoctonia solanii*, al extraer de las raíces encontraron la misma micorriza y solo estas cepas inoculaban a los protocormos *in vitro* sin embargo no se infectaban con otros hongos extraídos de otras dos especies de *Pterostylis*, se concluyó que existe un modelo de co-distribución que explica la distribución del hongo y el hospedero.

Zelmer *et al.*, (1996) aíslan hongos micorrízicos de 25 especies de orquídeas terrestres maduras y 17 especies sembradas en campo, encontrando que las orquídeas maduras estaban asociadas a basidiomicetos del género *Ceratorhiza*, *Moniliopsis* y unos cuantos de *Epulorhiza*, además descubrieron unos cuantos taxones de hongos que presentaban conexiones de clamp; en los protocormos en desarrollo se encontraron cepas de *Ceratorhiza*, *Epulorhiza*, y pelotones de cepas que también formaban conexiones de clamp, pero estos basidiomicetos fueron difíciles de aislar y muy probablemente sean simbioses de plantas aledañas, la gran proporción de estos endófitos refleja los requerimientos nutricionales de la micotrofia de los protocormos y parcialmente de plantas autótrofas, mostrando que las orquídeas terrestres son relativamente menos específicas, sus micobiontes pueden ser saprobios, parásitos o estar asociados a otras plantas micorrizadas. Zelmer y Currah (1997) encontraron que las semillas de *Spiranthes lacera* germinaban en un periodo de un año con su endófito en la naturaleza; desarrollándose como micoheterotrófica en su primer año y volviéndose fotosintética en el siguiente año donde ocurre su etapa de floración.

Rasmussen y Whigham (1998a) reportaron que cada especie de orquídea tiene ciertos requerimientos y condiciones específicas que están limitadas particularmente al sustrato y los simbioses; aunque mucho de lo que se conoce sobre la germinación de orquídeas ha sido bajo condiciones *in vitro*, donde se conocen los ingredientes del medio de cultivo; es necesario tener prudencia ya que las condiciones ofrecidas *in vitro* suelen ser muy distintas a las ofrecidas en el hábitat natural. La germinación *in situ* de *Goodyera pubescens* después de 6 meses de manera similar que el experimento de 1993 donde las semillas se habían desarrollado hasta estadio de protocormo sin inoculación, en las siguientes recolectas encontró una micorriza evidente en dos localidades donde la orquídea es abundante, probando 8 cepas aisladas de diferentes orquídeas y todas inducían la germinación sin embargo los resultados más significativos se obtuvieron por la cepa M5-1 que originalmente fue obtenida del rizoma de una planta joven de *Goodyera pubescens*, la germinación asimbiótica mostró que las semillas germinaban bien en agua con agar y los mejores resultados se lograron en un medio de cultivo con la mitad de

concentración de sales, el medio de cultivo con una concentración del 100% probablemente jugó un papel negativo en cuanto a la fuerza osmótica de las plántulas embebidas. La omisión de macro elementos tuvo una influencia negativa sobre el crecimiento y la omisión de sacarosa o levadura reducía las plántulas en tamaño. Por lo que esta especie puede llegar a protocormo de manera independiente con provisiones externas esto coincidió con lo observado en campo y la germinación en agua con agar, durante esta fase experimentan gran mortalidad hasta que el simbionte inocular y estimula el rango de crecimiento. Para *Corallorhiza odontorhiza* la germinación e infección ocurrió a los 7 meses en campo en donde la población de esta orquídea es abundante. Esta especie solo germinó *in vitro* después de una estratificación de 9 semanas a 5°C con la cepa M9-5 obtenida del rizoma de una planta adulta de *Corallorhiza odontorhiza* y para los medios asimbióticos no se obtuvo ningún resultado de germinación. La germinación *in situ* de *Liparis lilifolia* no ocurrió y se tuvo que repetir el experimento donde se encontró que las semillas germinaban después de 8 meses, durante la germinación simbiótica se encontró que dos cepas aisladas del rizoma de *L. lilifolia* y dos cepas aisladas de *Aplectrum hyemale* y *Tipularia discolor* generaban una germinación positiva mientras que la cepa obtenida de *C. odontorhiza* no sustentaba la germinación, concluyendo que un gran número de simbiontes infecta a las plántulas en campo pero solo aquella que es compatible logra el establecimiento. La germinación asimbiótica no tuvo éxito inclusive en los medios cuya concentración era del 100%, sin embargo las semillas germinaron cuando a estos medios se les adicionó el hongo micorrízico, muy pocas en agua con agar, aparentemente la omisión de sacarosa no afectaba la germinación, pero la germinación se redujo drásticamente en un medio con un bajo extracto de levadura, esto mostró que la relación simbiótica entre el hongo y la orquídea requiere una fuente externa de compuestos orgánicos, en campo sugiere que existe una cierta dependencia a cierto tipo de restos vegetales o animales presentes en el suelo que limita el número de sitios potenciales para la germinación y explica el por qué de los resultados tan pobres de campo además se sugiere que la simbiosis entre las plántulas y el hongo requiere de un ajuste metabólico en donde el paso a la fotoautotrofia es un paso crítico.

De acuerdo con Rasmussen y Wigham (1988b) pocos han sido los trabajos en los cuales se describe el sustrato que acompaña la germinación, Fuch & Ziegenspeck (1926) y Curtis (1943) hallaron plántulas de *Cypripedium calceolus* creciendo bajo el musgo, en una capa de restos vegetales parcialmente descompuestos. Las plántulas de *Platanthera blephariglottis* y *Dactylorhiza fuchsii* solo se han encontrado creciendo asociadas a musgos (Case, 1964; Leeson *et al.*, 1991) mientras que las plántulas de *Orchis ustulata*, *Epipogium aphyllum* y *Corallorhiza trifida* han sido observadas creciendo sobre humus (Irmisch, 1853; Stojanow, 1916; Fusch & Ziegenspeck, 1924). Rasmussen y Wigham (1988) habían observado con anterioridad, en 1992, que las plántulas de *Tipularia discolor*

crecían cerca de troncos derribados en descomposición y en pilas de leños, basados en esta información decidieron colocar paquetes con semillas en el hábitat y sustrato natural de la orquídea y notaron que los restos vegetales de ciertas especies de árboles estimulaban la germinación, siendo también el sustrato adecuado para la micorriza que induce el posterior desarrollo de las plántulas.

Vujanovic (2000) demostraron que un aislado de *Fusarium* obtenido de protocormos *in situ* inducía la germinación *in vitro* de *Cypripedium reginae* constatando una de las primeras observaciones de Bernard (1909) en las cuales sugería que *Fusarium* era capaz de promover la germinación; aunque la germinación es relativamente menor comparada con la *Rhizoctonia* específica. De acuerdo con Bernard (1909) la formación de pelotones es característico de *Rhizoctonia*, mientras que *Fusarium* puede producir unas estructuras muy parecidas a estas causando confusión, por lo que se necesita investigación adicional para explicar este fenómeno.

Mckendrick *et al.*, (2000) encontraron que la germinación simbiótica de *Corallorhiza trifida* variaba de acuerdo a las localidades donde se encontraba la especie, tomaba 8 meses la germinación en dos comunidades de *Betula* y *Alnus*, mientras que la germinación ocurría en 7 meses para una comunidad de *Salix repens*; las semillas se encontraron con un hongo que penetraba el suspensor, morfológicamente presentaba conexiones de clamp, lograron describir los estadios de crecimiento de la especie hasta rizoma coraloide con meristemo apical, mientras que la secuenciación de genes reveló que la micorriza involucrada pertenecía a una ectomicorriza del complejo Thelephoreaceae asociados a los árboles circundantes. Mckendrick y colaboradores (2002) realizaron un experimento similar al del año 2000 y constataron que las semillas de *Neottia nidus-avis* cuanto más cerca de los individuos adultos se encontraban, se aumentaba el número de semillas germinadas, y se alcanzaban más estadios de desarrollo, esta especie mostraba tener una marcada habilidad para controlar el comienzo de la infección fúngica, al igual que Bernard (1902) lograron observar que la colonización fúngica por parte de las hifas comienza en la base micropilar del embrión, hacia las células adyacentes donde se forma el primer pelotón.

Brundrett y colaboradores (2003) modificaron la técnica de Rasmussen y Whigham (1993) realizando un trampeo *in situ* y *ex situ*, para el trampeo *ex situ* se colectó 30 cm de suelo donde se encontraban orquídeas de tres localidades distintas. El suelo fue colectado durante la estación seca de verano, época que coincide con la dormancia de las plantas y donde el hongo simbionte podría estar inactivo siendo el impacto sobre el entramado de las hifas mínimo. La capa de hojarasca más superficial del suelo se colectó por separado. El suelo se tamizó en seco para obtener dos porciones de materia orgánica fina y dos de materia orgánica gruesa. El método *ex situ* era una modificación del método de

germinación de esporas, en cuadrantes de filtro de membrana el cual permite el paso de solutos a través de las semillas que están en contacto con la solución del suelo se probaron las distintas fracciones del suelo, mostrando que la mayor actividad fúngica ocurre en las capas de suelo con abundante materia orgánica gruesa; las capas más pequeñas pueden soportar la germinación hasta protocormos con primordio foliar, algunas otras capas finas no llevan consigo reservorios efectivos del inóculo fúngico. Es bien conocido que las orquídeas terrestres crecen mejor en compostas provenientes de plantas cuyas hojas son altamente resistentes a la descomposición (Rasmussen & Whigham 1998) lo que comprueba el hábito saprobio de Rhizoctonia asociado a materia orgánica del suelo y en especial a restos vegetales (Neate, 1987; Sivasithamparam; 1993). El método mostró que el hongo micorrízico compatible con *Microtis media* y *Caladenia arenicola* es relativamente común en todos los sitios de las localidades, pero la germinación de *Monadena bracteata* y *Pterostylis vitata* se detectaron una sola vez, sugiriendo que dicho hongo es muy escaso en su hábitat. *Caladenia latifolia* y *Dinus corimbosa* germinaron de manera esporádica solo por encima de las muestras de materia orgánica, sugiriendo ser un hongo muy común pero poco compatible con otras orquídeas. Este nuevo sistema de germinación *ex situ* provee una excelente oportunidad para observar la germinación simbiótica de manera similar bajo condiciones naturales, fue posible observar un amplio rango de animales fungívoros del suelo, la competencia entre hongos saprofitos y los hongos de las orquídeas por sustancias nutritivas, en muchos de esos casos estos organismos no evitaron la germinación de las semillas. Se desarrolló un método *in situ* para permitir el trapeo simultáneo de micorrizas de diferentes especies de orquídeas el cual fue una derivación a partir de los métodos de Rasmussen y Whigham (1993) y de Mckendrick y colaboradores (2000) en el cual la malla de nylon de 90 μm se plegaba a base calor para producir múltiples compartimientos a los cuales se les insertó un paquete de papel filtro que contenía semillas de orquídea de diferente especie, por último se selló el extremo con calor, las trampas se instalaron en las zonas donde se colectaron las muestras de suelo empleadas para el trapeo *ex situ* y recolectadas después de la época de crecimiento mostrando que había cierta correlación entre ambos trapeos; sin embargo, el *ex situ* resultó más exitoso ya que permite detectar el hongo micorrízico en cualquier época del año contrario a la *in situ* que requiere cierta estacionalidad.

Zettler y colaboradores (2005) reportaron que las semillas de *Platanthera leucophaea* germinan en un periodo de 20 meses, encontrando que la localidad con menor perturbación y con población natural de la especie sustentaba mejor la germinación; de los 20 paquetes sembrados se hallaron 9 protocormos todos ellos con la misma talla, solo uno estaba inoculado con pelotones, mientras que los demás permanecían con color cremoso opaco sugiriendo que aún eran viables; posteriormente se recuperaron otros tres

protocormos de los cuales se constató una cepa anamórfica de *Ceratorhiza*, muy similar a la encontrada en *Goodeya repens*, estudios posteriores identificaron otras cepas en plantas adultas como *Epulorhizas*. Las semillas sembradas en el área perturbada no sufrieron de escarificación, menos del 1% llegaron hasta ruptura de la testa; se lograron observar ciertos hongos pero la germinación fue atribuida a la imbibición de las semillas, por lo que probablemente no se trataba del hongo adecuado, siendo los factores abióticos insuficientes para promover la germinación. *In vitro* la geminación simbiótica ocurrió hasta el estadio de plántula con hojas verdaderas con una cepa muy efectiva proveniente de los protocormos, solo sobrevivieron 23 plántulas las cuales se decidieron incubar a *ex vitro* ya que si se seguían incubando *in vitro* tendían a morir, estas plántulas cultivadas *ex vitro* presentaban una enorme mejoría al compararlas con plántulas de campo siendo el primer estudio en cultivar exitosamente la especie.

Whigham y colaboradores (2006) con el propósito de proveer información en cuanto a semillas que bajo condiciones naturales pueden crear bancos por años, manifestaron que después de 4 años aumento la producción de protocormos de todas las especies permanentes, después de 6 años y 5 meses solo dos de las especies aun contenían semillas viables, por lo que este trabajo demostró que las semillas de algunas especies no tienen una vida corta como lo sugerían los trabajos de Van der Kideren (1995), Zelmer y Currah (1997), Batty *et al.*, (2000), y Mckendrick (2000). *Goodyera pubescens* es la única especie que no forma bancos de semilla, mientras que *Liparis lilifolia* puede permanecer como protocormo en un estado de dormancia durante 4 o 5 años. Aparentemente el estado de dormancia es un factor importante para crear bancos de semilla, retardando la germinación hasta que el hongo simbiote aparece y las condiciones son las apropiadas. Concluyeron que los factores que disminuyen un banco de semillas en las orquídeas es la carencia del polinizador apropiado ó bien ocurre un cambio drástico en el hábitat que es capaz de sostener solo la fase autótrofa ó micoheterotrófica haciendo que la floración jamás ocurra.

Collins y colaboradores (2007) trampearon con semillas de seis especies diferentes de orquídeas en áreas de rehabilitación de una mina de bauxita y las zonas adyacentes no explotadas del bosque, encontrando que la detección de hongos micorrízicos era infrecuente en las zonas de rehabilitación donde solo una orquídea adulta se había detectado; constataron que la recuperación de la vegetación y la frecuencia de detección de hongos de orquídeas tanto en la zona de rehabilitación como en el bosque sin explotar aumentaba con el tiempo. Concluyendo que el fracaso de algunas especies de orquídeas para reinvadir áreas de rehabilitación es debido en gran parte a la distribución tan fragmentada de los hongos presentes en el suelo, por lo que la mayoría de de semillas dispersadas pierden ante hábitats recientemente perturbados.

Øien y colaboradores (2008) examinaron la germinación *in situ* de *Dactylorhiza lapponica* concluyeron que esta especie tiene un rango muy bajo de germinación (11%-12%), después de 11 meses en campo se notó que muchas de las semillas se degradaron, por lo que la especie no tiene la capacidad de formar bancos *in situ*, por otra parte las semillas son capaces de romper la testa sin la presencia del endófito, su trabajo en campo demostró al igual que otros trabajos (Rasmussen, 1995; Andronova, 2003) que la calidad de las semillas y su dormancia está influenciada por las condiciones climáticas y esto se vio reflejado al comparar la viabilidad contra los años, encontrando una gran variación. Por otro lado los endófitos aislados de raíces y protocormos mostraron tener un efecto positivo en el desarrollo de las plántulas *in vitro*.

Keel y colaboradores (2011) sembraron 500 paquetes de semillas de *Habenaria repens* en cinco localidades con distinta distribución geográfica, después de cinco meses encontraron solo 4 paquetes con protocormos, dos en una localidad donde existe una población de la especie y sugiriendo que el área contiene una micoflora activa capaz de soportar una nueva generación y otra zona donde la orquídea no había sido avistada desde hace 40 o 50 años, demostrando que la técnica hace posible identificar zonas donde es posible reintroducir la especie. De los protocormos se aislaron seis cepas de *Epulorhiza* todas ellas capaces de inducir la germinación *in vitro* hasta el estadio con primordio foliar, de las cuales solo 4 lograron desarrollar plántulas. Este trabajo marca una pequeña pauta para entender la migración de la especie ya que las semillas pueden ser dispersadas por el viento pueden cubrir una gran distancia aunque todavía se desconoce cómo es que el hongo coloniza nuevos sitios, esto debido a que bajo condiciones de laboratorio es teleomorfo; es muy posible que *in situ* genere numerosas esporas que son capaces de dispersarse de manera natural.

Zettler y Piskin (2011) extraerán micorrizas de *Platanthera leucophaea* de distintas localidades a partir de raíces de individuos jóvenes, adultos y protocormos generados *in situ*, de las 75 cepas aisladas alrededor del 75-80% fueron muy similares a las encontradas en el experimento del 2005; tan solo 15 de estas 75 fueron extraídas de protocormos, la adquisición de protocormos en zonas no habitadas por la especie sugiere que estas zonas son aptas para la colonización y reintroducción; por otro lado las secuenciaciones de ADN de las cepas mostraron ciertas variaciones.

Phillips y col., (2011) mediante evidencias de secuenciación y germinación simbiótica demostraron que tanto las especies comunes como las raras del género *Drakea* usan el mismo clado monofilético de hongo micorrízico; este mismo clado (*Tulasnellasceae*) fue aislado de plantas adultas y protocormos generados durante el trapeo; *In vitro* estos hongos son capaces de inducir la germinación de múltiples especies de *Drakea*, sin

embargo no todos los aislados fúngicos pueden inducir la germinación *in vitro*. Los aislados que inducen la germinación fueron colectados en un rango geográfico amplio, sugiriendo que la variación y la habilidad de los aislados para inducir la germinación no contribuyen a la rareza o a la distribución restringida de algunas especies de *Drakea*, si no que la limitación está regulada por un microhábitat específico, un microhábitat que facilita la germinación pero no permite el desarrollo hasta la talla adulta y por consiguiente la etapa reproductiva, sugiriendo que la rareza del género *Drakea* no dependa tanto de la rareza de la micorriza o su especificidad sino que más bien son cuestiones microambientales. Los hongos de las *Drakeas* tienen una pobre competencia frente a otros hongos cuando se encuentran en materia orgánica en descomposición, dejando al hongo restringido a áreas abiertas donde el suelo es arenoso con un mínimo de materia orgánica. El (los) hongo(s) pueden estar presentes en otros microhábitats pero no forman asociaciones con *Drakea* por lo que el trampeo sugiere que estos hongos y el establecimiento de las orquídeas están relacionados a variaciones ambientales, por último las *Drakeas* se ven limitadas en el número de semillas.

Zettler y colaboradores (2011) publican el primer trabajo documentado en realizar un trampeo micorrízico *in situ* de dos orquídeas epifitas *Epidendrum amphistomum* y *Epidendrum nocturnum*, la técnica es una derivación de la original de Rasmussen y Whigham de 1993; las trampas fueron aseguradas a los troncos de los árboles con una malla plástica. Posteriormente, las semillas se revisaron *in situ* 55 días después de la siembra, mientras que a los 52 días las semillas ya habían germinado en los medios asimbióticos indicando que el desarrollo asimbiótico es más rápido *in vitro* que *in situ*. Cuando el estudio terminó a los 267 días muchas de las trampas que habían sido colocadas en un sustrato con abundante musgo fueron colonizadas por este. De los 60 paquetes que fueron colocados solo uno albergaba protocormos, y pertenecía a *Epidendrum amphistomum*. En la trampa se encontraron un total de 9 protocormos en varios estadios de desarrollo. Mientras que en los paquetes que carecían de protocormos solo se encontraron residuos de semillas; muchos de estos paquetes contenían una hifa pigmentada oscura que se había infiltrado hasta las semillas y que probablemente era patógena y aparentemente un *Ceratobasidium* el que inicia la germinación y el desarrollo de esta especie.

2.14 ∞ ESPECIFICIDAD FÚNGICA ∞

La especificidad fúngica es un caso interesante de estudio de la evolución, distribución y competencia ecológica de las orquídeas. Además, es objeto de mucha discusión, esto debido a que muchos estudios solo se conocen bajo condiciones *in vitro* y muy pocos casos en la naturaleza. Alexander y Hadley (1983) no encontraron diferencias significativas entre los medios simbióticos contra los medios asimbióticos. Además de que algunas semillas pueden germinar en medio de cultivo diluidos con agua teniendo el mismo impacto que el simbionte (Downie 1940, 1941, 1943, 1949). Otras especies tienen requerimientos mínimos y pueden germinar incluso en agua con agar ya sea con o sin la presencia del endófito por lo que Rasmussen en 1995 propone estos 4 criterios en términos de dependencia fúngica, y los pone a prueba en su experimento publicado en 1998(a).

- a) La germinación (ruptura de la testa) ocurre bien en agua con agar sin infección.
- b) La germinación ocurre en agua con agar solo con la presencia del endófito
- c) Germinan asimbióticamente solo con ciertos ingredientes específicos.
- d) Germinan bien simbióticamente solo con cierto sustrato.

Estos criterios no son mutuamente excluyentes y nos hablan tanto de la dependencia hacia el sustrato como la dependencia fúngica, representando una oportunidad para investigaciones futuras.

Los experimentos en campo muestran que las semillas de algunas especies germinan con el mismo hongo o con grupos de hongos estrechamente relacionados, con hongos que se encuentran bajo las mismas o diferentes condiciones ambientales o rangos geográficos (Rasmussen 1995).

Para comprobar dicha compatibilidad y especificidad fúngica se suelen inocular los endófitos *in vitro* de plantas adultas o plántulas; sin embargo, puede haber muchos factores que intervienen en el éxito o el fracaso, como por ejemplo aislar el endófito de los tejidos, siendo los endófitos muy difíciles de identificar, existiendo el riesgo de cambios fenotípicos y genotípicos en cultivos puros con el tiempo. Existen investigaciones en las que se muestra que las cepas difieren en su habilidad para incrementar la germinación *in vitro* en muestras del mismo lote de semillas (Rasmussen, 1995).

La especificidad *in vitro* ha sido tema controversial durante muchos años. Muchas investigaciones consideran que la relación orquídea-hongo no es la misma bajo condiciones *in situ* que *in vitro* (Knudson, 1922; Curtis, 1939; Hadley, 1970; Masuhara & Katsuya 1989, Masuhara *et al.*, 1993) estas diferencias han sido evaluadas por diferentes trabajos (Masuhara & Katsuya, 1994; Taylor & Bruns, 1999; Taylor *et al.*, 2003; Bidartondo & Bruns, 2005) algunas han considerado que la especificidad es bastante baja (Hadley, 1970; Stewart & Zettler, 2002), mientras que otros han sugerido que la especificidad bajo condiciones *in vitro* es muy alta (Clements, 1988; Smreciu & Currah, 1989; Taylor & Bruns, 1997; Mckendrick *et al.*, 2002; Selosse *et al.*, 2002; McKormick *et al.*, 2006; Stewart & Kane, 2006)

Por otro lado depende del tiempo de almacenamiento de los endófitos, algunas cepas pierden su poder para inducir la germinación después de haber sido almacenadas por un periodo de dos o tres años (Bernard, 1909).

Cuando la especificidad es evaluada *in vitro* es necesario decidir hasta que punto del desarrollo de la plántula la asociación se considerara exitosa. Warcup (1973) señaló que no existe ninguna diferencia si se inoculan plántulas en estadios más avanzados. Parece ser que *in vitro* los hongos son capaces de estimular el desarrollo de las semillas y son mucho menos efectivos al promover el desarrollo de las plántulas (Muir, 1989) aparentemente esta disminución en la actividad fúngica se debe al establecimiento del aparato fotoautótrofo (Warcup, 1981; Alexander & Hadley, 1983).

Muchos de los hongos empleados para estudios *in vitro* son obtenidos a partir de raíces de plantas adultas (Rasmussen, 1993; Masuhara & Katsuya, 1994; Currah *et al.*, 1997; Zelmer & Currah, 1997) existiendo la problemática de que aparentemente los hongos asociados a las orquídeas cambian conforme a la etapa del desarrollo (Milligan & Williams, 1988; Zettler, 1997 a, b; Stewart *et al.*, 2003; Batty *et al.*, 2006). Se ha reportado que la flora micobiana de una plántula es mayor y muy distinta a la de una planta adulta (Rasmussen, 2002), por lo que la técnica del trampeo *in situ* permite obtener protocormos de los cuales se pueden extraer endófitos con importancia fisiológica para la germinación.

La dependencia micotrófica varía conforme el género y las especies de orquídeas, esto agregado a sus hábitos de crecimiento y fisiología (terrestres, epifitas, y en el caso más extremo micoheterotróficas) (Stewart & Kane, 2006; Bonnardeaux *et al.*, 2007). Aparentemente la morfología de las orquídeas y sus estrategias reproductivas nos hablan de su dependencia fúngica Bonnardeaux *et al.*, (2007) encontraron que *Pyrochis nigricans* la cual es una especie Africana invasora del sureste de Australia tiene la capacidad de usar un amplio rango de endófitos aparentemente esto le da la capacidad para crecer en hábitats muy diversos comparado con otras orquídeas nativas, además puede

reproducirse asexualmente bajo condiciones naturales produciendo poblaciones clonales y debido a que está restringida para producir semillas, no es capaz de colonizar hábitats perturbados. Por otro lado *Disa bracteata* otra orquídea originaria de Sudáfrica es capaz de usar una amplia gama de compañeros fúngicos, aparentemente en Australia encontró hongos del género *Epulorhiza* muy estrechamente relacionados a los encontrados en África lo que indica que estos hongos tienen una gran distribución a lo largo del hemisferio; esto tuvo grandes implicaciones en el éxito tan rápido para colonizar hábitats, aunado a que la especie tiene la capacidad para auto polinizarse. No obstante las *Epulorhizas* gustan de zonas con cierto grado de perturbación y son compatibles con una orquídea nativa (*Microtis media*) los resultados del estudio mostraron que estas dos especies tienden a competir por el nicho. Además otras especies australianas son capaces de usar las mismas cepas pero en lugares no perturbados y en simbiosis con otros hongos por lo que no entran en una competición tan extrema.

De acuerdo con Bonnardeaux *et al.*, (2007) aquellas especies que germinan con un amplio rango de hongos tienen cierta carencia para reconocer al simbiote llegando al punto en el que existe un aborto fisiológico de los protocormos. El proceso para reconocer al simbiote o tener una estrecha relación con ciertos hongos requiere de un balance metabólico exitoso y al tener una especificidad muy estricta asegura una asociación micorrizica con un gran impacto para la germinación de las semillas.

Rasmussen (2002) sugirió que las orquídeas fotosintéticas están asociadas a un rango más amplio de micobiontes que las orquídeas micoheterótrofas; estudios posteriores indican que existe una situación más compleja, aparentemente las orquídeas fotosintéticas tienen solo un hongo micorrízico dominante (McCormick *et al.*, 2004, 2006; Shefferson, 2005) particularmente miembros de la *Tulasnellaceae* y *Ceratobasidiaceae* se encuentran en orquídeas Fotosintéticas (Epifitas) (Otero *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2002; Suarez *et al.*, 2006) en contraste con la orquídeas Micoheterotróficas que contienen un amplio rango de micobiontes (Jolou *et al.*, 2005; Dearnaley, 2006). No obstante hay que recordar que la especificidad ha sido un tema polémico durante años (Warcup, 1981; Masuhara & Katsuya, 1994; Zelmer *et al.*, 1996).

Las asociaciones con una alta especificidad presentes en las orquídeas verdes necesitan mucha investigación (Dearnaley, 2007), dicha especificidad conduce a una alta tasa de germinación y a una eficiente asociación fisiológica (Bonnardeaux *et al.*, 2007). En las orquídeas fotosintéticas con periodos prolongados de dormancia o especies confinadas a hábitats fuertemente sombreados (como el dosel de los árboles) deben tener una alta dependencia al carbón provisto por la micorriza, que aquellas que son anuales o perenifolias de hábitats expuestos (Girlanda *et al.*, 2006) por lo que una asociación eficiente

y específica resulta en una ventaja adaptativa. Aparentemente la alta especificidad va de la mano con la rareza (ó endemismo) de la orquídea (Brundrett *et al.*, 2003; Bonnardeaux *et al.*, 2007).

Estudios moleculares recientes han demostrado que muchas especies de orquídeas aclorofílicas están relacionadas con heterobasidiomicetos (Warcup, 1971; Dearnaley, 2007) algunas forman asociaciones ectomicorrizas (Mckendrick *et al.*, 2002; Selosse *et al.*, 2002 a,b; Taylor *et al.*, 2003; Bidartondo *et al.*, 2004) con otras familias de plantas como *Ericaceae*, *Betulaceae*, *Fagaceae*, *Tilliaceae* y *Mirtaceae* (Berch *et al.*, 2002; Selosse *et al.*, 2002 a; Glen *et al.*, 2002). De acuerdo con Selosse *et al.*, (2002) las orquídeas micoheterotróficas explotan estas asociaciones obteniendo carbono a través del entramado de hifas que forma la ectomicorriza con los árboles circundantes.

Existe evidencia de que algunas orquídeas cambian de compañeros fúngicos a lo largo de su vida (Rasmussen, 2002). *Gastrodia elata* cambia de *Mycenia* a *Armillaria* cuando la planta madura, habiendo una transición entre la fase juvenil a la fase adulta. Los protocormos y raíces de *Goodyera pubescens* contienen las mismas especies fúngicas, pero cuando existe cierto estrés ambiental es capaz de cambiar de micobiontes (McCormick *et al.*, 2006). *Erythrorchis cassythoides* interacciona predominantemente con hongos ectomicorrizicos, pero cuando el árbol hospedero muere, es capaz de interactuar con hongos saprobios (Dearnaley, 2006). Estas asociaciones fúngicas parecen ser susceptibles a estímulos ambientales y probablemente se ajustan a favor de la orquídea hospedera. Estas orquídeas con compañeros fúngicos intercambiables necesitan serios enfoques de conservación, si los adultos y las semillas requieren de simbiontes distintos es esencial que de ambas partes se aislen los hongos para futuros programas de conservación (Zettler *et al.*, 2005)

2.15 FACTORES ABIÓTICOS EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO

Los factores físicos como la temperatura, luz, atmósfera entre otros, pueden ser estudiados en varios rangos *in vitro*, sin embargo estas observaciones no aplican bajo condiciones naturales (Rasmussen, 1995) por otro lado las plántulas que crecen *in vitro* pasan a través de ciertos estadios que parecen ser críticos. El primero ocurre inmediatamente después de la germinación cuando muchas plántulas mueren antes de que el primordio foliar emerja, la segunda etapa crítica coincide con la formación del meristemo y la primera raíz (Stoutamire, 1974; Van Waes, 1984). Bajo condiciones naturales cuando las plántulas se encuentran "enterradas" en el suelo o restos vegetales en un estado puramente micoheterótrofo se puede asumir que el régimen de temperatura es muy similar al que se presenta en aire pero con fluctuaciones menos extremas, y que la disponibilidad de agua usualmente es mucho más estable y predecible que en la superficie del sustrato. Mientras que el agua bajo condiciones *in vitro* es constante existen pocos reportes que muestren la mortalidad de las plántulas sobre la superficie del suelo como resultado de la sequía ocasionada por el verano (Rasmussen, 1995). Fuchs & Ziegenspeck (1926) notaron que los rizoides de las plántulas colapsaban cuando estas eran deshidratadas; por otro lado las temperaturas bajo muy probablemente deshidratan a las plántulas, sin embargo no existen reportes al respecto y los que existen son accidentales que se han observado a partir de plantas adultas, *Orchis simia* y *Ophrys apifera* que crecen superficialmente en el suelo tienen más probabilidades de morir durante los meses invernales (Willems & Bik, 1991; Wells & Cox, 1991). La temperatura óptima para el crecimiento *in vitro* oscila entre los 20-25 °C sin embargo algunas especies se desarrollan mejor a temperaturas frías 5-10°C donde se ha observado que la mortalidad disminuye (Malmgren, 1989; 1993); la característica más llamativa cuando las plántulas crecen en temperaturas óptimas es el desarrollo de nuevos rizoides, mientras que los existentes colapsan, por otro lado la humedad *in vitro* es constantemente alta; por lo que los rizoides no solo sufren daño ocasionado por la sequía sino que también por la temperatura (Harvais & Hadley, 1967; Rasmussen *et al.*, 1990).

Algunas especies requieren de tratamientos fríos para su germinación (Rasmussen, 1992) Curtis (1943) y Borris (1969) fueron los primeros en describir que la dormancia de las yemas se rompía por las bajas temperaturas en especies de orquídeas tuberosas. La vernalización tiene un efecto sincronizado con el despliegue de las hojas y la aparición de la inflorescencia para aquellas especies que tienen fase fotosintética en el verano (Mrkvicka, 1992) de acuerdo con Curtis (1943) un primer tratamiento con frío en *Cypripedium* ocasiona que se desarrolle un nuevo segmento del rizoma, mientras que un segundo tratamiento induce el desarrollo de las hojas, sugiriendo que la especie requiere

de dos estaciones de crecimiento, cuando las plántulas de *Goodyera repens* son tratadas con frío se observa que hay una elongación de los meristemas (Rasmussen no publicado).

Por otra parte las plántulas de muchas especies de orquídeas son extremadamente sensibles a la luz y algunos investigadores recomiendan incubarlas en completa oscuridad durante los primeros meses y después de su germinación (Harvais, 1973; Van Waes, 1984; Mitchell, 1989) Ichihashi (1990) observó que los internodos de *Bletilla striata* se elongaban en oscuridad., por otro lado la oscuridad promueve la formación de rizoides en las plántulas (Mitchell, 1989; Ichihashi, 1990). Fuchs & Ziegenspeck (1927) notaron que aquellos rizomas que no estaban por completo cubiertos por el sustrato presentaban rizoides en la parte más basal y en contacto con el sustrato, es importante resaltar el hecho de que gran parte de la reproducción vegetativa ocurre en el suelo; esto contrasta con las plántulas de las orquídeas epífitas que usualmente son verdes cuando se exponen a la luz; mientras que algunas terrestres permanecen pálidas excepto por el meristemo (Knudson, 1941; Stoutamire, 1964).

La oscuridad es necesaria para la formación de Protocormos (Fast, 1982); Burgueff (1936) mostró que la oscuridad estimulaba el desarrollo del protocormo y rizoma e inhibía la formación de meristemas en un híbrido de *Cymbidium*, Werckmeister (1971) observó que cuando el medio era oscurecido con carbón activado y se iluminaba, las raíces de plántulas de *Cymbidium* tendían a crecer hacia abajo. Stoutamire (1974) notó un geotropismo positivo en los micorrizomas de muchas especies de orquídeas australianas. Quizas para las orquídeas epífitas el tigmotropismo



Figura 22 Fotografía de *Prosthechea karwinskii* en su hábitat natural

junto con el geotropismo jueguen un papel muy importante para su establecimiento en la naturaleza, así como la formación e inoculación de las nuevas raíces. Un fenómeno interesante son las orquídeas que literalmente cuelgan de cabeza como *Prosthechea karwinskii*, por lo que para que estas se hayan establecido de esta manera la semilla se debió de haber colocado naturalmente debajo de la rama del árbol (Fig. 22) donde quizá el geotropismo, junto con la poca incidencia de luz jueguen un papel crucial y crítico para la germinación e inoculación del hongo.

El suelo, la materia orgánica o los restos vegetales en descomposición en el que las plántulas se instalan, crea un atmósfera local con una composición muy distinta a la del aire. No obstante las plántulas que crecen *in vitro* producen una gran cantidad de CO₂ mientras tienen grandes demandas de O₂; este fenómeno es atribuido en gran parte a la alta tasa de crecimiento (Blakeman, 1976). Altas concentraciones de CO₂ inhiben en desarrollo de los primordios foliares pero por otro lado cuando las concentraciones son menores al 1% no existe crecimiento (Nakamura, 1976). Las plántulas de *Guarianthe aurantiaca* crecen más rápido *in vitro* en contenedores herméticamente cerrados que en aquellos con cierta ventilación (Hailes & Seaton, 1989). Kano (1968) reporto una alta mortalidad de plántulas de *Cymbidium goeringii* y *Cypripedium acaule* en contenedores cerrados casi herméticamente.

El etileno afecta la densidad de los rizoides (Smith & Russell, 1969) y de acuerdo con Jackson (1985) causa geotropismo negativo al igual que si la planta creciera en un suelo inundado. Estas observaciones no pueden ser generalizadas pero sugieren que la concentración de varios gases es de vital importancia para estudios futuros (Rasmussen, 1995).

Los suelos donde habitan muchas especies de orquídeas son pobres en sales inorgánicas (Möller, 1985; Fast, 1985) existiendo una relación inversa entre la concentración de sales minerales y la densidad de rizoides en las plántulas generadas *in vitro* (Eiberg, 1970; Van Waes, 1984); una alta concentración de sales minerales promueve la formación de meristemas en *Bletilla striata* mientras que las bajas concentraciones estimulaban el desarrollo de las raíces (Ichihashi, 1979), esta reacción muestra que las plántulas tienden a buscar ciertos minerales en el suelo y la concentración de iones accesible en el suelo tienden a variar con las estaciones, este factor podría estar sincronizado con el desarrollo de nuevas raíces y determinar el cambio entre la micotrofia y fototrofia. El pH y la humedad son condiciones del suelo que están co-relacionadas con la distribución geográfica (Wherry, 1918; Currah *et al.*, 1987), por ejemplo las orquídeas de Norteamérica tienen suelos cuyo pH oscila entre 3.7-7.5, algunas especies tienen una preferencia bimodal (Stukey, 1967; Sheviak, 1983) un pH bajo retrasa la ruptura de sustancias orgánicas, se incrementa la acidez del suelo por acumulación de humus (Sundermann, 1961) por lo que no es de extrañar el por qué algunas especies prosperan en restos orgánicos los cuales tienen un bajo pH, o bien existen especies que prefieren suelos calcáreos con pH que oscilan entre 8-9 (Sundermann, 1962). Los medios de cultivo *in vitro* usualmente son ligeramente ácidos, pero después de que han sustentado el crecimiento de plántulas por arriba de 1 año el pH baja hasta 3.2 y 3.8 aparentemente sin la adición de compuestos detrimentales en cultivos de especies epífitas (Ernst, 1967); Fast (1980) considera que los valores óptimos de pH oscilan entre 4.8-5.5 para desarrollar

protocormos de especies terrestres, e indicaba que un pH de 3-4 y por encima de 6.5 retardaba el crecimiento. Eiberg (1970) notó que cuando el pH era inferior a 5 el tejido se necrosaba.

2.16 ∞EPIFITOSIS ∞

Las epífitas son un componente característico de los bosques tropicales modernos, tanto en términos de diversidad de especies como de biomasa. Aproximadamente el 7.5 % de las especies de plantas vasculares son epífitas (Gentry & Dodson 1987; Branwell, 2002). El hábitat bajo el dosel es difícil de colonizar en primer lugar porque la estabilidad del sustrato es baja (Nieder, 2004) por lo que no es de extrañar que las raíces estén adaptadas a una máxima adhesión al hospedero para garantizar la supervivencia. En segundo lugar los suministros de nutrientes y agua son limitados debido a que el sustrato es fino con baja frecuencia de transporte y capacidad de agua (Chase, 1987) por lo que las epífitas han desarrollado el metabolismo CAM, brotes operando como unidades fisiológicas especializadas e independientes, y los tejidos de absorción prolongan el contacto con fluidos transitorios tales como raíces velamentosas, necesarias para superar el estrés por sequía (Benzing, 1990). En tercer lugar, los hábitats de dosel no son de lo más accesibles para la colonización de las semillas esto se debe en gran parte por el arreglo de las ramas (Ibisch *et al*, 1996). Las semillas pequeñas y en especial las que parecen polvo se dispersan fácilmente por el viento, logrando mejorar el éxito de la germinación. En cuarto y último lugar, la densidad de población de las epifitas es a menudo baja (Wolf & Flamenco, 2003). Por lo que tienen sistemas de polinización altamente especializados en los que se garantiza una transferencia eficaz del polen entre esas poblaciones dispersas. De lo anteriormente mencionado no es de extrañar el porqué de las casi 25,000 especies de orquídeas cerca de 18,000 son epifitas (Royal Botanic Gardens, Kew, 2003).

Muchos de los hongos asociados a las orquídeas clorofílicas son parásitos de otras plantas (Sen *et al.*, 1999). Ruinen en (1953) resumió la evidencia de que los epifitos; en especial las orquídeas y helechos, son los antagonistas de sus árboles hospederos, una condición que el llamo epifitosis. Esta evidencia incluía:

- I) Existe cierta correlación entre la salud del árbol y la abundancia de los epifitos.
- II) La evidencia histológica muestra que el hongo que invade las ramas y hojas de los arboles es muy similar al que se encuentra en las raíces de las orquídeas.
- III) Las orquídeas solo crecen en ciertos árboles.

- IV) Las secciones a través de las raíces de las orquídeas y las ramas de los árboles muestran una continuidad de hifas fúngicas entre ambos organismos.

Johansson (1977) observó que algunas orquídeas epífitas eran más abundantes en árboles enfermos, no obstante no se ha podido establecer una relación casual. La teoría de la epifitosis ha sido muy controvertida y muchas orquídeas epífitas tienen micorrizas que se consideran facultativas (Benzing & Friedman, 1981). De todas maneras la dependencia micorrizica de las orquídeas epífitas no ha sido bien examinada, requiriendo de métodos modernos que refuten la teoría de Ruinen (Brundrett, 2002).

Mucho del conocimiento sobre los endófitos de orquídeas epífitas está basado en análisis moleculares (Vease Rhizoctonia en el 3.8), muy pocos son los trabajos enfocados a la germinación simbiótica de estas especies tanto a nivel nacional como mundial; la gran mayoría de ellos han extraído endófito de la raíz, solo la publicación de Zettler y colaboradores, en 2011, es el único trabajo hasta la fecha en el que se documenta que se han extraído endófitos de epífitas a partir de protocormos generados *in situ* pero solo con fines de análisis moleculares.

Pereira y colaboradores (2005) inocularon semillas de *Oncidium flexuosum* con diez aislados micorrízicos, de los cuales una cepa pertenecía a la especie y solo esa fue capaz de promover la germinación y el desarrollo de las semillas, mientras que las semillas incubadas en ausencia de hongo fallaron en la germinación.

Porras-Alfaro y Bayman (2007) aislaron hongos de varias especies de *Vanilla* spp. Encontrando que los hongos pertenecientes a *Ceratobasidium* estimulaban la germinación y el desarrollo de plantas de la especie y de un híbrido comercial de *Dendrobium*.

Otero y colaboradores (2005, 2007) encontraron que la germinación y desarrollo de semillas de *Ionopsis utricularioides* y *Tolumnia variegata* germinaban *in vitro* en presencia de hongos del género *Ceratobasidium* obtenidos a partir de raíces de plantas adultas de diferentes localidades. Otero y Bayman (2009) mostraron que las cepas obtenidas de raíces de *Tolumnia variegata* estimulaban mejor la germinación y desarrollo de semillas que los medios asimbióticos; además, se probaron estos aislados con otras epífitas como *Epidendrum ramosum*, *Lepantes rupestris*, *Psychilis monensis*, todas ellas comenzaron la germinación (ruptura de la testa) con las cepas obtenidas a partir de *Tolumnia variegata*, pero no se encontraron ventajas significativas.

Nontachaiyapoom y colaboradores (2011) probaron diferentes aislados provenientes de diferentes orquídeas sobre la germinación de *Dendrobium draconis* y *Grammatophyllum speciosum* encontrando que los cultivos simbióticos son mejores y más rápidos para

promover el desarrollo de plántulas que los controles asimbióticos. Solo dos cepas de *Epulorhiza repens* fueron los que estimularon el desarrollo y crecimiento de *G. speciosum*; Mientras que las semillas de *D. draconis* germinaron y se desarrollaron mejor con diferentes cepas del género *Tulasnella*.

Bertolini y colaboradores (2011) extrajeron micorrizas de orquídeas epífitas procedentes de la región del Soconusco en Chiapas, *Rossioglossum grande*, *Cuitlauzina convallarioides* y *Rhynchostele bictoniensis*, se aislaron 10 cepas de *R. grande* y se inocularon sobre protocormos pre-germinados; después de 10 meses solo una de las cepas promovió su desarrollo. Para *C. convallaroides* se aislaron tres cepas, las cuales se inocularon sobre semillas y después de tres meses solo una cepa logró producir protocormos. Se probaron 10 cepas de diferentes orquídeas sobre semillas de *R. bictoniensis* tres de ellas promovieron la germinación de las semillas y después de 4 meses desarrollaron protocormos.

Montaño Samaniego, (2011) aisló hongos presentes en las raíces de *Oncidium sphacelatum* y las inoculó en plántulas producidas *in vitro* con diferentes sustratos, notando que las micorrizas juegan un papel positivo durante la aclimatización.

2.17 ∞ PARQUES NACIONALES ∞

Un área natural protegida es un espacio geográfico claramente definido, reconocido, dedicado y gestionado, a través de medios legales o de otro tipo, para lograr la conservación a largo plazo de la naturaleza. Sin embargo existen excepciones; muchas de estas contienen características geológicas significativas que explican los procesos de la tierra, hasta áreas protegidas emblemáticas importantes, que constituyen el patrimonio de un país. Las áreas naturales protegidas existen en una sorprendente variedad de tamaños, ubicaciones, métodos de gestión y objetivos lo cual hace imposible darles una clasificación estricta; el enfoque de conservación suele ir desde restrictivo, es decir: se prohíben las actividades humanas como la recolección de alimentos, la caza o extracción de recursos naturales, hasta aquellas en las cuales el enfoque de conservación no es restrictivo y la conservación se integra con estilos tradicionales de vida humana e incluso se lleva a cabo con la extracción sostenible de los recursos limitados.

Dentro de las Áreas Naturales Protegidas podemos encontrar la categoría de Parque Nacional las cuales se distinguen por que comprenden las siguientes gestiones:

1. Contener ejemplos representativos de las principales regiones naturales, biológicas, ambientales o escénicas nativas que proporcionen interés científico, espiritual, recreativo o turístico.
2. El área debe ser de tamaño suficiente para mantener las funciones ecológicas y procesos que permitirán a las especies nativas y comunidades persistir a largo plazo con la intervención mínima de gestión.
3. La composición, estructural y función de la biodiversidad deben ser en gran medida de un estado “natural” o tener el potencial para ser restaurado, además de no tener la intervención de especies invasoras (Dudley, 2008).

La Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas en México administra actualmente 174 áreas naturales de carácter federal que representan más de 25,334,353 de hectáreas. La categoría con mayor número de áreas decretadas es la Reserva de la Biosfera (con 12,652,787 h) seguida de de Parque Nacional (con 1,432,024 h); sin embargo, con ésta se cubre sólo el 11.3% de la superficie total del país protegida. El 32% de los parques nacionales tienen una extensión menor a 1000 ha, superficie que se considera mínima para garantizar la conservación de los ecosistemas de acuerdo a la UICN (Ordoñez y Flores, 1995). Antes de que la mayor parte de las ANP fueran declaradas como tales, en ellas ya existían grupos humanos habitando y utilizando legalmente sus recursos, por lo que la mayor parte de ellas se han visto como zonas de usos múltiples. De acuerdo con el INEGI la población registrada en estas zonas para el año 2005 (era aproximadamente de 3, 448,470 habitantes) representaba 3.34% de la población total nacional. Una situación que afecta de forma considerable esta cifra es la presencia de un importante componente poblacional en Parques Nacionales ubicados en las zonas metropolitanas de la ciudad de México y de Monterrey (Vargas-Márquez, 1997)

3.0 PARQUE NACIONAL "EL TEPOZTECO"

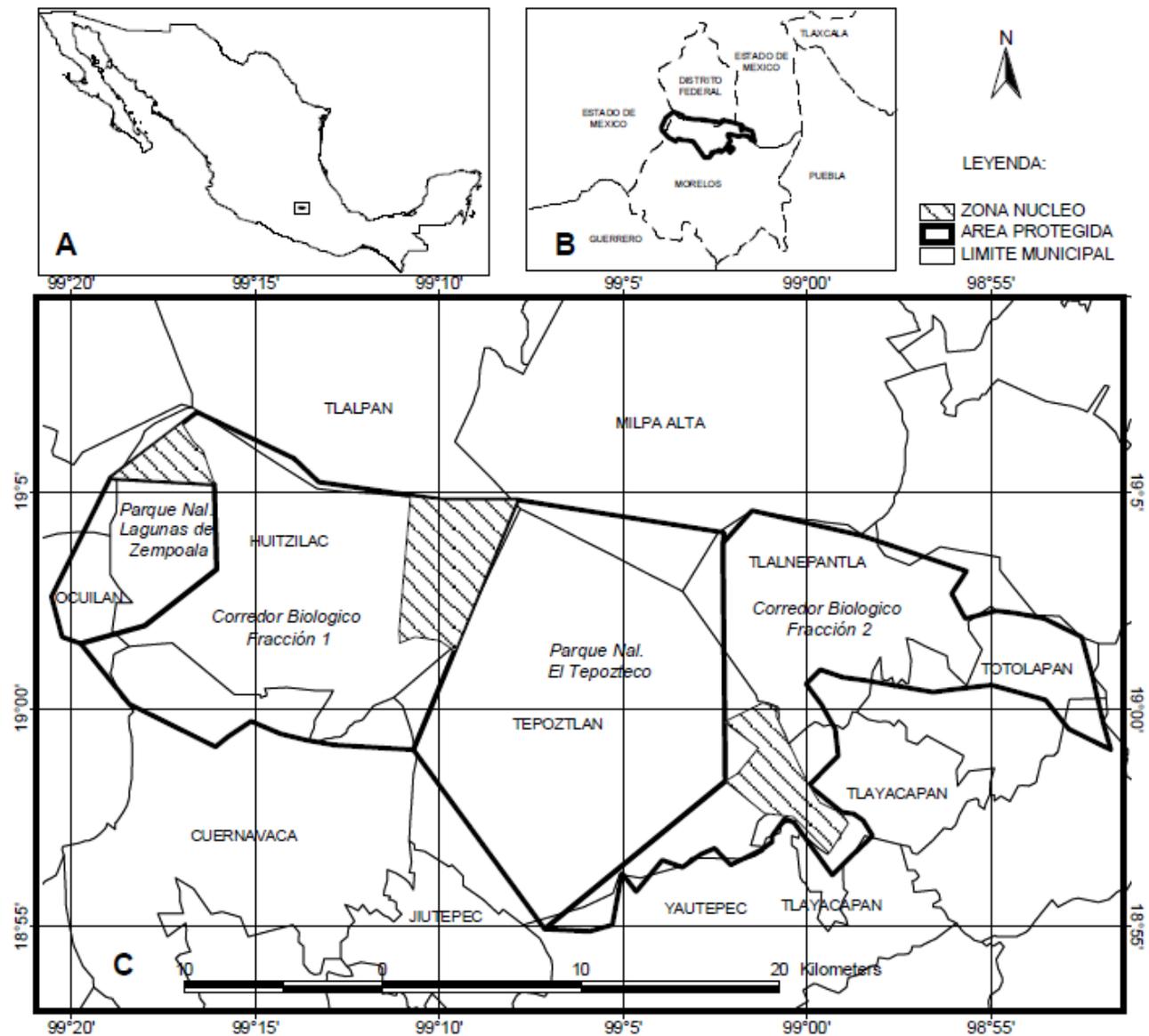


Figura 23 Ubicación geográfica del Parque Nacional el Tepozteco tomado de Pulido-Esparza 2004.

Debido a sus invaluable recursos naturales, paisajes, cultura, condiciones ambientales y su sobresaliente biodiversidad, el 22 de enero de 1937 durante el gobierno del Presidente Constitucional Lázaro Cárdenas, se decreta con categoría de Parque Nacional los terrenos del pueblo de Tepoztlán, Morelos, y sus alrededores. El Parque se localiza al sur del Distrito Federal, en el municipio de Tepoztlán, estado de Morelos. Comprendida entre los 18° 53' 20'' y 19° 05' 30'' de latitud N y los 99° 02' y 99° 12' 55'' de longitud O, abarca una superficie de 24. 000 hectáreas, tiene un rango altitudinal que va de 1,200 a 3,470 msnm.



Figura 24. La diversidad de paisajes y de riqueza biológica del Parque Nacional el Tepozteco es producto de su topografía y climas que se mezclan para formar un mosaico muy diverso de condiciones ambientales.

En la zona coinciden elementos florísticos de afinidad Neártica (*Quercus*, *Pinus*, *Arbutus*, *Arctostaphylos*, *Castilleja* y *Penstemon*) y neotropical (*Bursera*, *Agave*, *Echeveria*, *Tecoma*, *Cosmos*, *Mimosa* y *Fourcraea*), dando lugar a la gran diversidad del área. La zona se encuentra en lo que Rzedowski (1978) describe como la Provincia Florística de las Serranías Meridionales, de la cual forman parte el Eje Volcánico Transversal, la Sierra Madre del Sur y el complejo de montañas más altas del norte de Oaxaca. La provincia incluye las elevaciones más altas de México, así como muchas áreas montañosas aisladas, cuya presencia propicia el desarrollo de numerosos endemismos. De acuerdo a estudios

recientes, se sabe que existen en el Parque 1,119 especies de flora agrupadas en 138 familias y en función del número de especies destacan las familias Orchidaceae, Poaceae, Asteraceae y Lamiaceae, El estado de Morelos cubre 0.25% del territorio nacional y en él crecen 143 especies de orquídeas (Fig.25), lo que equivale más del 10 % del total del país, es importante mencionar que en mayor o menor grado prácticamente toda la vegetación primaria del estado ha sufrido alteraciones y/o perturbaciones debido a las actividades del hombre (Espejo et al 2002).

Monroy y Taboada (1990) mencionan la presencia de siete tipos de vegetación bosque de pino, bosquede oyamel, bosque de encino, bosque de aile, bosque mesófilo de montaña, matorral crasicaule y selva baja caducifolia. López y Paniagua (1990) agrega a la clasificación de Monroy y Taboada el pastizal subalpino, pradera y matorral rosetófilo. De acuerdo con Bonilla-Barbosa (2003) en el Parque también se distribuye la vegetación acuática y bosque perennifolio y deciduo ripario, también incluye la vegetación arvense (plantas asociadas a la agricultura, tanto de temporal como de riego y ruderales).

Figura 25 Fotografías tomadas *in situ* donde se puede apreciar la diversidad y belleza de algunas orquídeas presentes en el Parque Nacional el Tepozteco y sus zonas de influencia.

- 1) *Govenia liliacea* (Lex.) Lindl.
- 2) *Prosthechea squalida* (Lex.) Soto Arenas & Salazar.
- 3) *Bletia neglecta* Sosa.
- 4) *Trichocentrum cebolleta* (Jacq.) M.W.Chase & N.H.Williams
- 5) *Schiedeella albovaginata* (C.Schweinf.) Burns-Bal.
- 6) *Malaxis brachyrrhynchos* (Rchb.f.) Ames
- 7) *Erycina hyalinobulbon* (Lex.) N.H.Williams & M.W.Chase
- 8) *Trichocentrum pachyphyllum* (Hook.) R.Jiménez & Carnevali
- 9) *Hintonella mexicana* Ames.

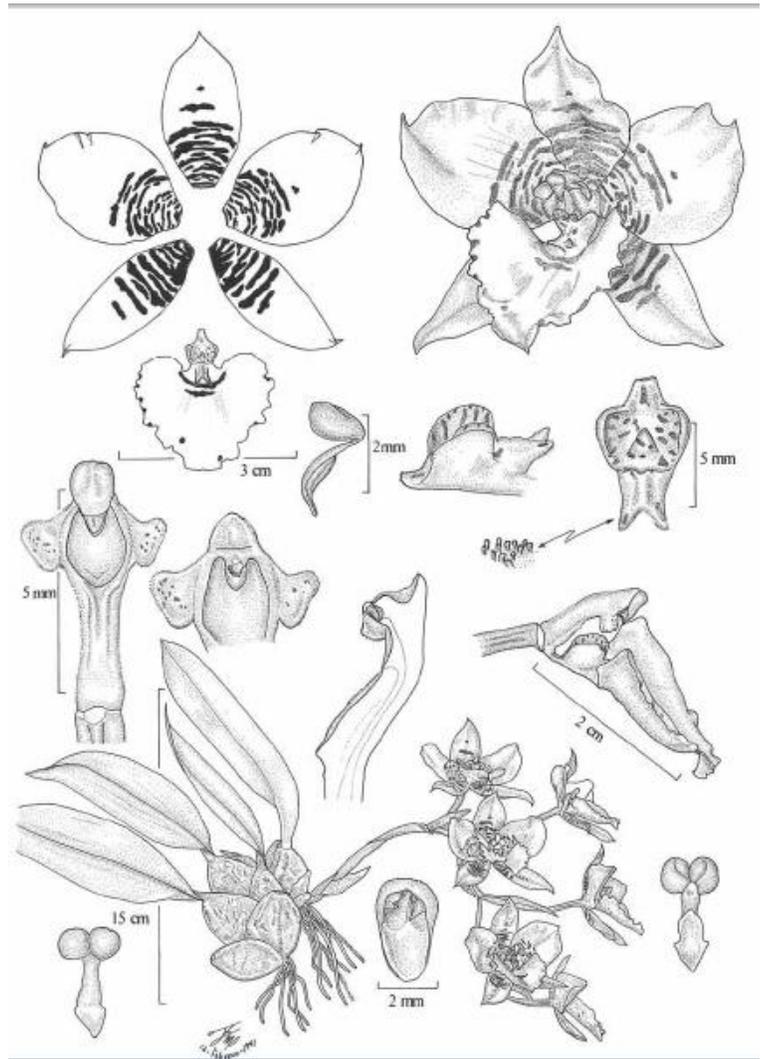


4.0 ∞ DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE ∞

❖ *Rhynchostele cervantesii* (La Llave & Lex.)

Sinónimos: *Odontoglossum cervantesii* Lex. in P.de La Llave & J.M.de Lexarza, *Oncidium cervantesii* (Lex.) Beer, *Prakt. Lemboglossum cervantesii* (Lex.) Halb. *Amparoa cervantesii* (Lex.).

Planta pequeña epífita de hasta 30 cm de alto, incluyendo la inflorescencia, rizoma abreviado y raíces filiformes flexuosas de color café blanquecino, Pseudobulbos ovoides a largamente ovoides, comprimidos, a veces agregados y de color verde oscuro manchados de café-púrpura en toda la superficie; parcialmente cubiertos por 2-3 vainas membranáceas. Una hoja apical de base estrecha y conduplicada formando un pecíolo, lamina oblongo-elíptica, lanceolada, aguda a obtusa, mucronada, subcoriácea, flexible, sulcada en el haz y quillada en el envés. Presenta una inflorescencia raramente dos, saliendo de la base del pseudobulbo maduro, erecta o arqueada, con flores simultaneas; pedúnculo comprimido, púrpura renegrido; con brácteas tubulares, apresadas, membranáceo-escariosas, cafés, traslucidas. Brácteas florales



angostamente triangular-lanceolada, membranáceas, secando en la antesis. Ovario pedicelado, distalmente sigmoide, subterete-obcónico, verde, sulcado. Flores de textura débil y de larga duración, algo más anchas que altas, blancas, raramente difuminadas de rosado, con bandas y manchas de color marrón dispuestas de forma concéntrica sobre los

tépalos y raramente sobre el labelo. Sépalo dorsal, erecto, oblanceolado-elíptico, apiculado, cóncavo, sulcado en la superficie adaxial, dorsalmente carinado. Sépalos laterales descendentes, lanceolados u oblanceolados, a veces algo falcados, sulcados en la superficie adaxial, dorsalmente carinados. Pétalos extendidos elíptico-ovados, con la base sésil, obtusa, los márgenes subenteros o ligeramente plegados distalmente, algo reduplicados en el ápice. Labelo extendido-descendente, con una uña obtriangular, lámina triangular ovada, flabelada a cordada, cóncava, márgenes enteros, diminutamente crenados o erosos. Callo cóncavocimbiforme sobre la uña de color amarillo cromo con rayas y puntos sepia, con dos alas laterales, rígidas, papilosas, formando una cavidad. Columna esbelta, arqueada, subclavada, abruptamente ensanchada a nivel del estigma, ventralmente gibosa-quillada, celularmente papilosa, a nivel de las alas; éstas dos, obovadas, flabeladas u orbiculares, subenteras, algo arqueadas descendentes a lo largo del estigma. Cavidad estigmática elíptica-ovada, cóncava, viscosa; róstelo un tabique grueso, sulcado, con una proyección piramidal-ovoide hacia el estigma que lleva un marsupio donde se encuentra el viscidio. Antera galeada, comprimida, anchamente rostrada, el extremo superior redondeado-truncado y papiloso, unilocular. Polinario con dos polinios obpiriformes, sulcados, amarillos; un estípite laminar, hialino, linear-obtriangular, abaxialmente canaliculado, arqueado, ensanchado distalmente en una lámina triangular en forma de ancla; viscidio infracto respecto al estípite, café, abaxialmente viscoso. Cápsula elipsoide- fusiforme, con tres quillas inconspicuas.

Distribución: Endémica del eje Neovolcánico transversal y una porción de la Sierra Madre del Sur, en Michoacán, México, Morelos y Guerrero. La especie esta reportada en los municipios de Cuernavaca, Huitzilac y Tepoztlán en el estado de Morelos.

Ecología: se le suele encontrar en comunidades típicas de montaña como Bosques Mesófilos, Bosques de encino-pino-encino a altitudes que van desde los 1800 a los 2700 msnm, raras veces se ha encontrado a 1400 ó 3100 msnm. Florece de enero a abril (Soto-Arenas et al.2011).

Nombres comunes: "Tigrillo", "mariposa blanca ", "gallito de monte" (Michoacán), "aguasúchil " (México).

Etnobotánica: En Oaxaca es común ver plantas de *Rhyncho스테le cervantesii* ssp. membranácea, *Artorima erubescens*, *Laelia albida* y *L. furfuracea* adornando altares y nacimientos durante la época navideña (Solano-Gómez et al., 2010)

Estado de Conservación: se le considera amenazada en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010.



Figura 27. Fotografias de *Rhynchostele cervantesii* tomadas *in situ*.

Justificación.

A pesar de que la mayoría de los miembros de la Orchidaceae son epífitas tropicales y subtropicales, la presencia de micorrizas ha sido poco investigada. El grupo mejor estudiado es el de las orquídeas terrestres (Otero., *et al.* 2002), en la última década se ha reportado que la micobiota de una plántula es mayor y muy distinta a la de una planta adulta por lo que cuando los pelotones se han extraído de raíces dan resultados negativos para la germinación simbiótica *in vitro* (Rasmussen 2001). Por tal motivo este trabajo pretende obtener micorrizas a partir de un método *in situ* para la inoculación de semillas de una orquídea epífita.

Hipótesis

Sí el patrón de distribución tanto de plántulas como de plantas adultas de orquídeas está determinado por el hongo que inicia la germinación, entonces es posible colocar una trampa con semillas que permita capturarlo *in situ* para posteriormente aislarlo, purificarlo y propagarlo para obtener la germinación simbiótica *in vitro*.

Objetivo general

- ∞ Desarrollar una trampa para hongos micorrízicos *in situ* de semillas de la orquídea epífita *Rhynchostele cervantesii* (La Llave & Lex.) en el Parque Nacional el Tepozteco.

Objetivos particulares

- ∞ Aislar y purificar las micorrizas presentes en las trampas para obtener cepas asociadas a las semillas y en las trampas.
- ∞ Comparar el efecto de las cepas sobre la germinación simbiótica *in vitro* de semillas de *R. cervantesii* (La Llave & Lex.).

5.0 ∞ METODOLOGÍA ∞

5.1 ∞ ÁREA DE ESTUDIO

Durante el mes de abril del 2011 se muestreó una localidad, en el parque nacional “El Tepozteco” en el estado de Morelos, aproximadamente a 10 km al noroeste del poblado de Tepoztlán, con altitud promedio de 2,500 msnm (± 20m). Observándose un ecotono entre lo que Silva y colaboradores (1999) denominan matorral crasicale y bosque de encino (*Quercus*). Con un suelo conformado principalmente por derrame de roca volcánica del “Chichinautzin”, dando lugar a un suelo somero (Determinado como litosol por la FAO), con abundante presencia de hojarasca hacia el Noroeste. De acuerdo con la clasificación de Köppen modificada por García (1964) y aplicado por Taboada (1981), el

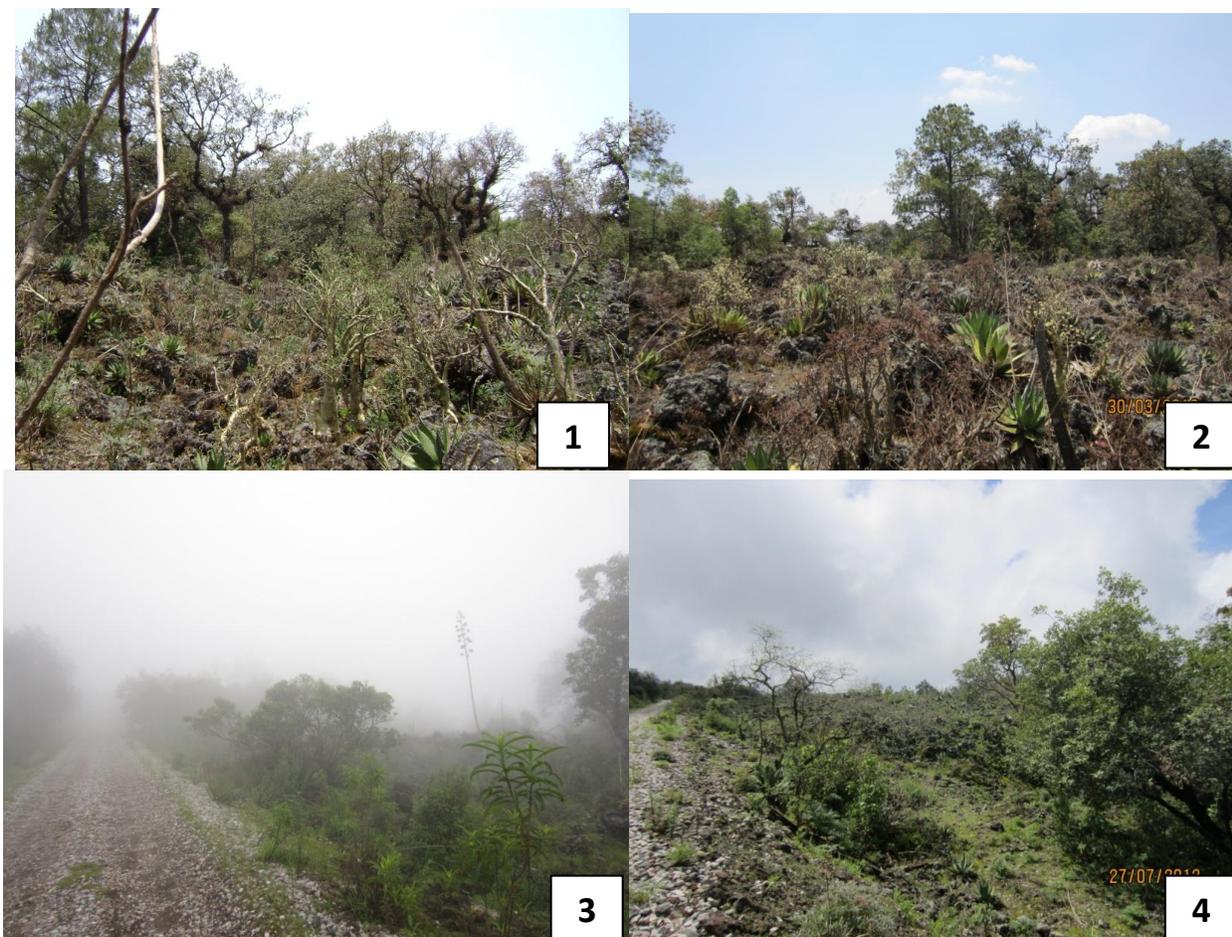


Figura 28. Fotografías tomadas de la zona de estudio en diferentes estaciones. 1.- invierno-primavera. 2.- primavera-verano. 3.- verano-otoño. 4.- otoño-invierno.

área presenta un clima de tipo **(C(w₂)(w)big)** templado subhúmedo con veranos frescos y largos donde la temperatura media anual oscila entre 12 y 18 °C isotermal con marcha tipo Ganges, canícula, y un porcentaje de lluvia invernal menor a 5mm.

A finales de verano y principios de otoño se manifestó el fenómeno de sombra de lluvia (Fig. 28). Ya que la zona presentaba un comportamiento similar al de bosque mesófilo de montaña; mientras que en invierno se notó claramente como la humedad relativa, así como la presente en el suelo, comenzaba a disminuir drástica y paulatinamente hasta llegar a la primavera donde la sequía meteorológica es muy marcada.



Figura 29. Fotografía *in situ* de forofitos albergando líquenes, musgos, helechos, bromelias, cactáceas, trepadoras, orquídeas, entre otros.

Al ser un ecotono la diversidad de organismos epífitos fue muy notorio (Fig.29), se encontrarón forofitos que podían albergar densas capas de líquenes, musgos, helechos, además de bromelias, cactáceas, trepadoras, orquídeas, entre otros. Las orquídeas epífitas correspondieron a poblaciones de *Rhynchostele cervantesii*, cuyos individuos

juveniles se distribuían desde los 50 cm sobre el nivel del suelo hasta casi las copas de los forófitos. Otras orquídeas asociadas fueron *Prosthechea rhombilabia*, *Prosthechea pringlei*, *Rhynchostele aptera*, *Epidendrum anisatum*, *Stelis retusa*, un caso muy particular fue encontrar a *Malaxis brachyrrhynchos* creciendo como epífita cuando la especie esta reportada como terrestre. En la localidad, también se observaron orquídeas terrestres como *Schiedella llaveana*, *Habenaria novemfida*, *Govenia superba* y una saprófita *Corallorrhiza bulbosa*.

5.2 ϕ ELABORACIÓN DE TRAMPAS CON SEMILLAS

Se emplearon, como material biológico, semillas de *Rhynchostele cervantesii* obtenidas del Banco de Semillas de la Unidad de Investigación en Biología Vegetal (UIBV) de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, las cuales fueron colectadas en el mes de febrero del 2011 y se encontraban almacenadas en refrigeración a -4° C. Se evaluó la viabilidad de las semillas con cloruro de trifenil tetrazolio (TTC) para certificar que ésta fuera mayor al 50%.

Las trampas, para los hongos micorrízicos *in situ*, se elaboraron considerando características del material empleado, como las siguientes:

- ⊙ Inerte para no alterar el sustrato.
- ⊙ Flexible para permitir una mayor área de contacto superficial con ramas, troncos u horquetas.
- ⊙ Mantener humedad tratando de copiar las características de su entorno.
- ⊙ Distribuir a las semillas de manera uniforme.

Las trampas se construyeron con malla de nylon de $65 \mu\text{m}$ de diámetro de poro y con rectángulos de esponja sintética; para ello se recortaron rectángulos de 10 x 5 cm (Fig. 30) se doblaron y se unieron dos de los tres bordes con la ayuda de una pistola de silicón para obtener sobres de 5 x 5 cm (Fig. 31).

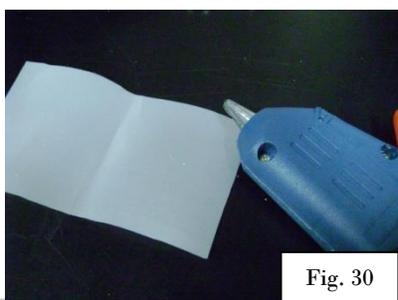


Fig. 30

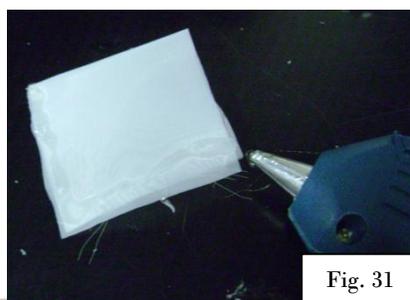
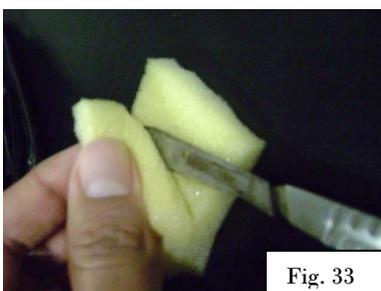
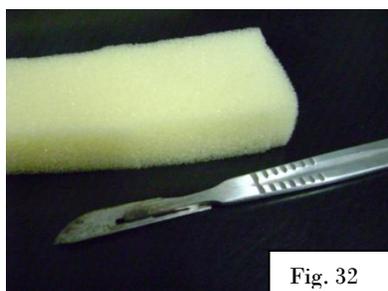


Fig. 31

Con la ayuda de un bisturí, se cortaron rectángulos de esponja sintética de 3.5 x 2.5 x 0.5 cm (largo, ancho y grosor respectivamente) (Fig. 32- 33).



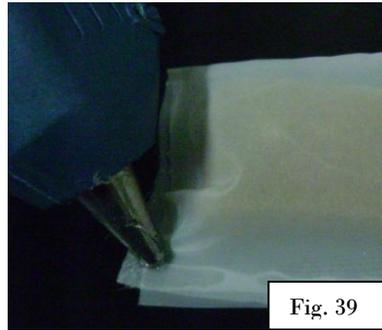
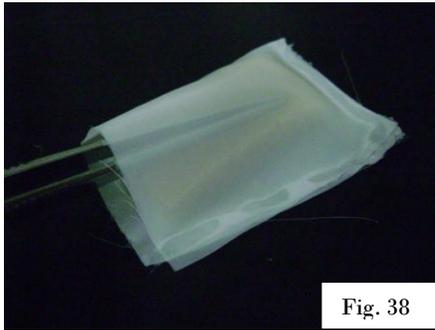
Tanto los sobres de malla de nylon como los rectángulos de esponja se lavaron con agua corriente y posteriormente desinfectados en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% v/v durante 10 minutos (Fig. 33), se enjuagaron con agua destilada estéril, con la finalidad de eliminar residuos y contaminantes de fábrica. Las esponjas guardaban una gran cantidad de burbujas, por lo que al lavarlas y enjuagarlas fue necesario removerlas presionándolas con la ayuda de una varilla de vidrio (Fig. 34)



Ambos materiales se dejaron secar sobre papel absorbente y a temperatura ambiente; una vez secos, se colocó sobre la esponja 100 mg de semillas de *R. cervantesii* (aproximadamente 7,000 a 7,500 semillas), que se esparcieron de manera dispersa y homogénea (Fig. 35-37).



La esponja con semillas se introdujo en el sobre de malla nylon (Fig. 38) se cerró el extremo faltante con silicón (Fig.39) realizando un total de 22 sobres de la misma manera.



5.3 **INSTALACIÓN DE LAS TRAMPAS PARA SU INOCULACIÓN EN CAMPO**

En campo, en el hábitat natural de *Rhynchostele cervantesii*, se seleccionaron un total de 22 forófitos (Todos ellos *Quercus rugosa*) con una o más colonias de esta orquídea, entre ellas se seleccionaron plántulas jóvenes, de aproximadamente 1.5 cm de altura con un pseudobulbo y dos hojas. Se colocó una trampa por forófito ubicándola lo más cercano a este tipo de plantas seleccionadas (Fig. 40), la trampa fue atada con hilo elástico de nylon y se cubrió con líquen y/o musgo presente en el árbol para ocultarla y garantizar que las condiciones microambientales (exposición de luz, escorrentías, humedad relativa, entre otras) fueran las propicias para cebar al hongo micorrízico (Fig. 41). Once trampas fueron colocadas *in situ* en el año 2011 y otras once en el año 2012 todas ellas durante los meses de marzo o mayo, esto con la finalidad de simular la dispersión natural de las semillas.

A cada trampa se le asignó una clave y se registraron los siguientes parámetros: coordenadas UTM con un GPS (marca Garmin® modelo etrex) para georreferenciar cada forófito; orientación de la trampa (Norte, Sur, Este, Oeste), altura sobre el suelo; se registró la ubicación de la trampa en el forofito (tronco u horqueta), organismos asociados (líquenes, musgos, helechos, bromelias, entre otros) en una superficie de 40 cm de diámetro. Además, se ató un listón al árbol para facilitar su ubicación (Fig. 42).

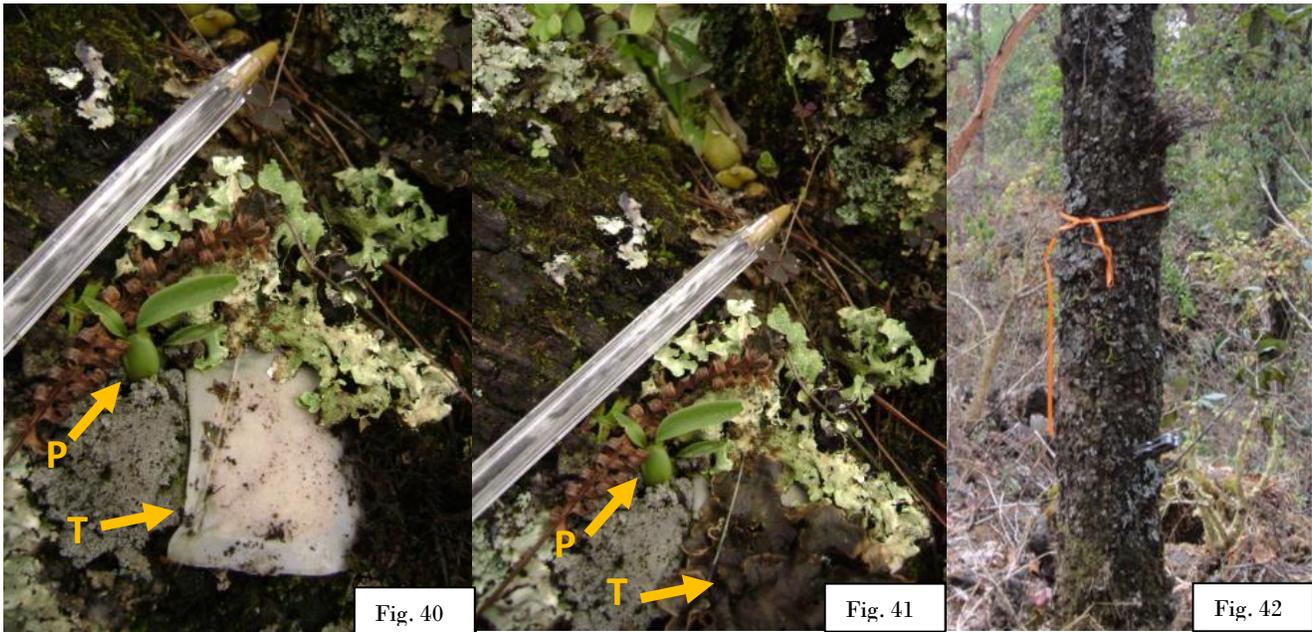


Figura. 40 Instalación *in situ* de las trampas donde se observa a la trampa (T) colocada cerca de un individuo juvenil o plántula de (P) de *Rhynchosstele cervantesii*. Figura. 41 momento en que la trampa es ocultada con el sustrato original del forófito. Figura. 42 Marcaje del forofito.

5.4 RECOLECTA DE TRAMPAS

Las trampas permanecieron en campo entre tres y cinco meses, excepto dos que permanecieron durante más de un año. Cada trampa fue recolectada de manera aleatoria; para ello, se colocó debajo de cada trampa un recipiente de vidrio (previamente esterilizado) y con ayuda de una navaja se cortó el hilo de nylon (Fig. 43), de tal manera que la trampa cayera dentro de él (Fig. 44) (esto evitó manipular lo menos posible la trampa colectada); para evitar tanto la pérdida rápida de humedad como el estrés para el material biológico, se colectó parte del sustrato (musgo, liquen y corteza) entre el cual permaneció la trampa para los hongos micorrízicos, posteriormente, el recipiente con el material biológico fue cerrado y almacenado en una hielera sin hielos, lo cual evitó el cambio brusco de temperatura durante su transporte hasta el laboratorio.



5.5 φ AISLAMIENTO FÚNGICO A PARTIR DE LAS TRAMPAS.

Una vez en el laboratorio los recipientes, que contenían las trampas, fueron extraídos de la hielera y desinfectados externamente con etanol al 70% para ser procesados en la campana de flujo laminar, donde con ayuda de unas pinzas de punta roma, se extrajo la trampa del recipiente y se sumergió en un vaso de precipitados con 100 ml de agua destilada estéril, manteniéndolo durante 10 minutos en agitación manual constante y así formar una solución patrón (1:100); de esta solución se tomó con una pipeta estéril 1ml y se diluyó con 9ml de agua destilada estéril para formar una solución de concentración 1:10; la trampa se apartó en una caja de Petri estéril para su posterior procesamiento. Enseguida se tomó 1ml de la solución 1:100 (patrón) ó de la 1:10 y se vertieron sobre una caja Petri estéril, se vertió uno de los dos medios utilizados para el aislamiento fúngico, el FIM (Fungal Isolated Media por sus siglas en inglés) ó el medio PDA (Papa Dextrosa Agar) (Anexo 2), en el momento en que comenzaban a solidificar; Realizando tres repeticiones por cada medio de cultivo de ambas concentraciones y por cada trampa.

Posteriormente, a las trampas en las cajas Petri y bajo condiciones de asepsia, se les realizó una incisión, con ayuda de un bisturí, en uno de los extremos, para extraer la esponja con semillas, la esponja fue cortada en seis porciones y cada porción se colocó sobre una caja Petri estéril y se vertieron sobre ellos uno de los dos medios utilizados para el aislamiento fúngico, FIM o PDA, obteniendo tres repeticiones de porciones de esponja con semilla para cada medio de cultivo.

Los cultivos, con las soluciones y con las porciones de esponja, en las cajas Petri se incubaron en obscuridad por 72 horas a temperatura ambiente ($23 \pm 3^{\circ} \text{C}$).

5.6 φ AISLAMIENTO FÚNGICO DE PLÁNTULAS Y PROTOCORMOS.

Cuando la esponja fue procesada bajo condiciones axénicas se apreciaron a simple vista protocormos con una talla de aproximadamente 5 mm de diámetro, los cuales fueron extraídos de la esponja o la malla de nylon; estos fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % v/v por 10 minutos., Se enjuagaron con agua destilada estéril, se disectaron por la mitad y fueron colocados sobre medio FIM. Durante la instalación y/o búsqueda de las trampas se encontró y colectó un protocormo con primordio foliar y seis plántulas de *Rhynchostele cervantesii* tres de ellas presentaban en la base del único pseudobulbo la reminiscencia del protocormo de la cual emergían las raíces verdaderas (Fig. 45), mientras que los otros individuos juveniles colectados presentaban de dos a cinco pseudobulbos (Fig. 46); estos fueron lavados con agua corriente y cepillados con jabón líquido para manos (marca equate®) posteriormente

fueron llevados bajo condiciones de asepsia donde nuevamente se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % v/v por 10 minutos; a las raíces se les retiró el velamen con ayuda de un bisturí, se seleccionaron y seccionaron las porciones que presentaban una coloración marrón, los protocormos y reminiscencias de protocormo fueron disectados por la mitad. Para finalmente colocarlas sobre medio FIM e incubarlas en oscuridad en una hielera a temperatura ambiente por tres semanas.



Figuras 45-46. Plántulas e individuos juveniles encontrados *in situ* la plántula más pequeña con la reminiscencia del protocormo median desde 1.5cm hasta 5 cm desde la punta de la raíz hasta la hoja más larga. Mientras que los individuos juveniles presentan de dos a seis pseudobulbos mayor cantidad de raíces.



Fig. 47-48. Durante la instalación y búsqueda de las trampas se encontraron protocormos y plántulas de *Stelis retusa* de las cuales se colectaron tres protocormos y dos plántulas para su aislamiento micorrizico de igual manera que con *Rhynchostele cervantesii*.

5.7 φ PURIFICACIÓN DE LAS MICORRIZAS Y OBTENCIÓN DE CEPAS

Una vez que se observó el desarrollo de algunas colonias en los diferentes recipientes con cultivos para el aislamiento fúngico, bajo el microscopio de campo claro a un aumento de 40x o el microscopio estereoscopio a un aumento de 4x, se seleccionó aproximadamente 1 cm³ de agar con el micelio de interés, marcando por debajo de la caja Petri el perímetro con un plumón indeleble de punto mediano.

Posteriormente, bajo condiciones asépticas, se utilizaron cajas Petri de tres ventanas cubiertas previa y parcialmente con medio FIM para colocar sobre la superficie libre de medio un cubo de agar con micelio. El pequeño margen libre de medio de cultivo creó un puente por el cual las hifas del hongo crecían, dejando atrás la posible contaminación bacteriana y recreciendo sobre el medio fresco; si se sospechaba de contaminación en este nuevo bloque, este procedimiento se repetía varias veces si era necesario, ya que con este método se evitó el uso de antibióticos. Para este momento, los cultivos con hongos purificados se les asignó una clave, la cual correspondió a la especie de orquídea, al número del forofito o al inóculo de donde se aisló como fue RAIZ, o reminiscencia del protocormo (RPT) o porción de esponja de la trampa (ESP), seguido por el número de cepa, el medio de cultivo, y el número de veces que se hizo pasar por la caja de tres ventanas para obtener un cultivo puro.

5.8 φ ALMACENAMIENTO MICORRÍZICO

Los hongos micorrízicos aislados y purificados recreciendo hasta cubrir el medio en su totalidad en las cajas Petri fueron almacenados en refrigeración por un periodo mínimo de 15 días o hasta que el medio de cultivo comenzó a agotarse posteriormente se subcultivaron en medios PDA con tres repeticiones por cepa para volver a ser almacenados en refrigeración.

5.9 φ GERMINACIÓN SIMBIÓTICA *IN VITRO*.

Se colocó una muestra de semillas de *Rhynchosstele cervantesii* en sobres de Papel Whatman #40 y bajo condiciones de asepsia en la campana de flujo laminar fueron desinfectados con etanol al 70% por tres minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% (v/v), durante 10 minutos en agitación constante; en seguida, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, los sobres se colocaron en una caja de Petri estéril en donde cada sobre se extendió, y con ayuda de una espátula se tomaron semillas para esparcir las, de manera homogénea, sobre medio básico de avena (MBA); posteriormente, se colocó un cubo de agar de aproximadamente 1 cm³ con hifas fúngicas, previamente

purificadas para la inoculación simbiótica *in vitro* de las semillas. Con tres repeticiones por cepa y un testigo que consistió en semillas esparcidas sobre el medio MBA sin la adición de una cepa. Se emplearon protocormos desarrollados a partir de semillas cultivadas asimbióticamente *in vitro* en el medio Murashige y Skoog (MS) con 50% de concentración de sus sales basales. Se colocaron 15 protocormos por caja Petri con MBA y, al igual que las semillas, se colocó un cubo de agar con hifas fúngicas para la inoculación simbiótica *in vitro* de los protocormos.

5.10 GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA *IN VITRO*.

Las semillas de *Rhynchostele cervantesii* fueron desinfectadas, de manera similar que en la germinación simbiótica *in vitro* y bajo condiciones axénicas, se sembraron en el medio MS, al 50% y al 100% de concentración de sus sales basales, con tres repeticiones para cada una. La incubación de las semillas, tanto en los medios simbióticos y asimbióticos, se realizó en obscuridad a temperatura ambiente por una semana, envolviendo con papel aluminio las cajas Petri con los cultivos, transcurrido este tiempo se incubaron a 25 °C en un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 obscuridad y con una intensidad luminosa de 322.9 lux , durante 15 semanas.

La germinación de las semillas y los estadios de desarrollo en el protocormo se observaron semanalmente hasta la 13ª semana bajo el microscopio estereoscopio. Se tomaron registros fotográficos de semillas y protocormos en diferentes etapas de desarrollo, tanto en los tratamientos simbióticos como asimbiótico. El porcentaje de semillas o protocormos en cada etapa de desarrollo se calculó dividiendo el número de semillas o protocormos en cada etapa por el número total de semillas y protocormos

5.11 EVALUACIÓN DE LA COMPATIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD FÚNGICA SOBRE LA GERMINACIÓN SIMBIÓTICA *IN VITRO*.

Después de la siembra se observaron las cajas Petri bajo el microscopio de campo claro a un aumento de 40x y la evaluación se realizó con base a las siete relaciones que tienen los hongos con las semillas, propuesta inicialmente por Burgeff en 1909, modificada por Downie 1959 & Hadley 1970.

- 1) No hay infección
- 2) La hifa entra por el suspensor y forma unos pocos pelotones en la parte basal del embrión. Pero no ocurre crecimiento.
- 3) En las semillas infectadas se forman de manera normal los pelotones, la semilla tiene un desarrollo normal que ocurre de manera muy lenta y algunas semillas no se infectan.

- 4) La infección ocurre de manera normal. La mayoría de las semillas infectadas presentan pelotones en la parte basal del embrión y el desarrollo ocurre aceleradamente.
- 5) La infección es demasiado intensa. Las semillas y/o plántulas infectadas se descomponen en pelotones y el desarrollo ocurre lentamente y no aparecen rizoides que infectar.
- 6) El embrión está totalmente infectado, la única parte no infectada es la porción chalazal y el embrión eventualmente muere.
- 7) La infección ocurre de manera instantánea. Las células del embrión se llenan con hifas hasta romperlo. No ocurre la germinación.

Esta clasificación proporcionó un parámetro para evaluar la simbiosis de las cepas empleadas para la inoculación simbiótica *in vitro* de semillas y protocormos. La relación 1 se consideró cuando el embrión era resistente en presencia de una cepa débil; mientras que, la relación 4 fue considerada como el equilibrio entre el hospedero y el endófito, y hasta la relación 7 se consideró como una cepa virulenta.

6.0 ∞ RESULTADOS Y DISCUSIÓN ∞

6.1 ∞ TRAMPEO *IN SITU*.

De manera general, el ambiente epífita donde se colocaron las trampas fue muy heterogéneo, en el cuadro 01 se puede apreciar que las 22 trampas fueron instaladas desde los 0.4 m hasta los 2.2 m de altura sobre el nivel del suelo; a pesar de que las trampas se colocaron a una altura promedio de 1.5 m, no existió una altura sobre el nivel del suelo que garantizará ser la adecuada para la germinación *in situ*; ya que en condiciones naturales se observó que un solo forofito podía albergar varias colonias de individuos jóvenes de *Rhynchosstele cervantessi* con apenas uno o unos cuantos pseudobulbos junto a plantas maduras con varios pseudobulbos y frutos formados, todos ellos cubriendo el tronco del forofito de una manera aleatoria; aunque, en algunos forofitos los individuos con un gran número de pseudobulbos o con frutos se encontraban a una altura mayor que los individuos más jóvenes. Lo anterior, sugiere realizar estudios previos de densidad poblacional, ubicación y densidad de colonias sobre el forófito para conocer si en verdad existen variaciones o relaciones en cuanto a la germinación con respecto a la altura y los individuos establecidos sobre el forófito, se debe tener en

cuenta, que los primeros cultivadores de orquídeas sembraban y germinaban las semillas cerca de plantas maduras, así como el mismo Bernard lo publicó en 1909 sin embargo, en la última década se ha reportado que la micobiota de una plántula es mayor y muy distinta a la de una planta adulta (Rasmussen 2001), se tiene que considerar que las pequeñas y abundantes semillas de las orquídeas son dispersadas en ambientes fragmentados y especializados (Benzing & Atwood, 1984; Rasmussen, 2000); así como es imprescindible señalar si la inoculación simbiótica *in situ* ocurre mejor en combinación de individuos juveniles y/o adultos; ésto contrasta con la disponibilidad de hongos micorrízicos *in situ* ya que Van der Kideren (1995 a,b), al realizar sus trampeos, observó que las plántulas tenían un desarrollo lento y resaltó que esto podía deberse a la alta densidad de semillas empleadas en cada muestra.

Cuadro 01. Trampas para micorrizas con semillas de *Rhynchosstele cervantesii* (RC) colocadas *in situ* en una zona del Parque Nacional El Tepozteco

Clave	Altura (m) sobre el nivel del suelo	Ubicación en el Forofito	Exposición	Organismos asociados en %			Fecha de	
				Líquén	Musgo	Helecho	Instalación	Recolecta
RC01	1.2	Horqueta	SE	70	20	10		Sep 2011
RC02	1.8	Tronco	SE	90	10	0		Oct 2011
RC03	2.0	Tronco	O	50	40	10		Sep 2011
RC04	1.3	Tronco	SO	70	30	0		Mar 2012
RC05	1.4	Tronco	SE	20	70	10	Mayo 2011	Sep 2011
RC06	1.9	Tronco	NO	10	80	10		Sep 2011
RC07	1.7	Tronco	NE	10	80	10		Sep 2011
RC08	2.1	Tronco	SO	10	90	0		Mar 2012
RC09	1.7	Tronco	NO	60	20	20		Sep 2012
RC10	1.5	Tronco	NO	10	90	0		Jun 2012
RC11	2.2	Tronco	SE	80	10	10		Jun 2012
RC12	1.8	Tronco	SE	20	80	0		Ago 2012
RC13	1.2	Tronco	SE	10	90	0		Sep 2012
RC14	0.4	Tronco	NO	10	90	0		Ago 2012
RC15	1.3	Tronco	E	20	80	0		Sep 2012
RC16	1.9	Tronco	SE	10	80	10	Marzo 2012	Jun 2012
RC17	1.5	Tronco	SE	10	80	10		Jun 2012
RC18	1.6	Tronco	SE	10	80	10		Ago 2012
RC19	1.6	Tronco	SE	10	80	10		Jun 2012
RC20	1.7	Tronco	S	90	10	0		Sep 2012
RC21	1.7	Tronco	NO	30	60	10		Ago 2012
RC22	1.7	Tronco	NO	40	60	0		Jun 2012

Las trampas colocadas, así como las orquídeas juveniles asociadas, tienden a orientarse hacia al sureste, pues de las 22 trampas totales; 10 se instalaron azarosamente con esa orientación y seis hacia al noroeste, el resto de las trampas tuvieron una exposición hacia el Suroeste, Noreste, Sur y Oeste; esto con la finalidad de aprovechar de manera óptima la luz solar, la espesura del dosel podía variar por diversas razones (los forófitos se encuentran muy cercanos a otros, el ramaje es denso, o existen árboles caídos, etc.) dando una penumbra casi total, hasta una exposición de horas continuas de luz. Rasmussen en su elegante trabajo (1995), sugiere que las semillas de las orquídeas epífitas tienen una coloración de color verde, y plantea que éstas establecen un balance más rápido entre la micotrofia-autotrofia que las de especies terrestres las cuales carecen de clorofila y que por esta condición las semillas, para germinar asimbióticamente *in vitro*, requieren de medios de cultivo más específicos; no es de sorprender que en la literatura y dependiendo de la especie algunas autoridades (Clements & Ellyard, 1979; Dixon, 1987; Smreciu & Currah, 1989; Rasmussen *et al.*, 1990; Ichihashi, 1990) recomienden que la germinación ocurra mejor bajo luz que en oscuridad o viceversa. Zettler y McInnis (1994) confirman que la calidad de luz como el correcto fotoperiodo y el hongo compatible tienen un enorme efecto sinérgico sobre el porcentaje de geminación de los medios de cultivo simbióticos. Bajo condiciones naturales la trayectoria del sol varía conforme a las estaciones en una especie de declinación, proporcionando un fotoperiodo y calidad lumínica distinta, este fenómeno podría estar correlacionado ya que algunas especies germinan mejor bajo la luz roja *in vitro*; de acuerdo con Rasmussen y Rasmussen (1991), esto confiere cierta ventaja ya que la luz roja puede ser absorbida a través del dosel del bosque, por otro lado la luz roja y la luz amarilla disparan el crecimiento de órganos micotróficos como las raíces en plántulas cultivadas *in vitro* (Islam *et al.*, 1999). De la Rosa-Manzano y colaboradores. (2013) demostraron que las epífitas que habitan bosques tropicales reciben un exceso de luz y poca agua durante las estaciones de sequía.

En el laboratorio, después de recolectar aleatoriamente las trampas para micorrizas RC: 01, 02, 03, 04, 05, 09, 10, 11, 12, 13, 16,17, 19, 20, 21, 22, durante marzo de 2011 hasta septiembre de 2012 (Cuadro 01), se observó que algunas de las semillas de *Rhynchostele cervantesii*, que contenían, estaban ubicadas entre el tejido de los segmentos de esponja, los embriones presentaron un mayor volumen al inicial, pero todavía dentro de la testa (fig. 49) , otras cuantas se encontraron capturadas por la malla de nylon, algunas de las cuales mostraban ruptura de la testa. Estas semillas permanecieron en las trampas durante los meses de verano a invierno bajo condiciones *in*

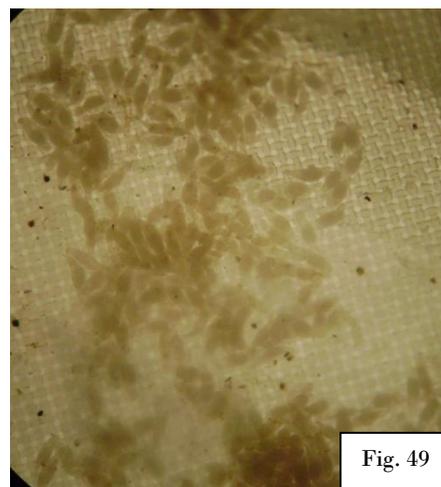


Fig. 49

situ. Por otro lado estas muestras fueron recolectadas cuando la humedad relativa fue baja, observando que los líquenes y los musgos presentes en los forófitos, donde estaban instaladas las trampas, se encontraban totalmente deshidratados. Estos embriones presentaban un color blanco cremoso sugiriendo la pérdida de viabilidad. La viabilidad de las semillas empleadas para las primeras trampas (RC01- RC11) fue superior al 90% y para las segundas (RC12-RC22) de aproximadamente 60%; muchos autores (Van der Kideren, 1995; Zelemer & Currah, 1997; Batty *et al.*, 2000; Mckendrick, 2000) sugieren que las semillas de orquídeas bajo condiciones *in situ* tienen una vida corta por lo que no son capaces de formar bancos de semillas. Whigham y colaboradores. (2006) demostraron que algunas especies terrestres son capaces de sustentar bancos de semillas por hasta 6 años bajo condiciones naturales; no obstante, hay que tener en cuenta que el ambiente terrestre es relativamente más extenso y homogéneo en comparación con el ambiente epífita, en el cual los bancos de semilla tienden, desde el momento de la dispersión a ser más pequeños y más particulares, por lo que, para que se establezca un banco de semillas de especies epífitas, se necesitan cuestiones micro-ambientales muy específicas. Esto explicaría porque las semillas de *Rhynchostele cervantesii* a pesar de mantenerse almacenadas en refrigeración a 4°C, perdieron gradualmente su viabilidad en el banco de semillas, lo cual sugiere que *Rhynchostele cervantesii* no es capaz de formar bancos de semillas tan longevos. Las trampas RC10 Y RC11 permanecieron por un periodo de casi un año en campo y las semillas permanecieron intactas; una de las ventajas que presentó la esponja, al ser colocada dentro de la malla de nylon, es que es capaz de preservar las semillas, contra la degradación de la testa, en ocasiones algunas semillas dentro de las trampas se liberaron de la esponja y quedaron capturadas por la red de nylon, estas semillas presentaron cierta degradación en la superficie de la testa, por lo que la esponja las protege contra la escarificación natural, no obstante se requiere de futuras investigaciones, para averiguar si el uso de la esponja es capaz de retardar o acelerar la inoculación de hongos tanto patógenos como micorrízicos, mientras que la ventaja de preservar las semillas podría permitir el análisis de bancos de semillas en especies epífitas.

Las trampas RC06, RC07 y RC08 fueron tres de las cinco primeras muestras de *Rhynchostele cervantesii* que permanecieron cuatro meses en campo; en el momento de ser colectadas, durante los meses en los cuales las precipitaciones eran evidentes y el fenómeno de sombra de lluvia se empezaba a manifestar, al analizar a simple vista las trampas, se observaron puntos verdes en su interior lo que sugería que eran semillas germinadas con embriones clorofilos; al revisarlas bajo el microscopio estereoscópico se constató que parte del liquen y musgo, presentes en el forofito, habían colonizado tanto la malla de nylon así como el segmento de esponja que conformaban la trampa. En esta primera inspección, la trampa RC08 contenía 4 protocormos con una coloración verde hialina uniforme (Fig. 50-52). Estos protocormos, después de ser procesados para el

aislamiento fúngico, ningún hongo recreció. La única desventaja de la esponja en la trampa fue que los protocormos, durante su crecimiento, quedan confinados dentro de los poros de la esponja (Fig. 50), impidiendo su crecimiento y desarrollo, por lo que es recomendable que las muestras con esponja no permanecieran más de un año en campo.

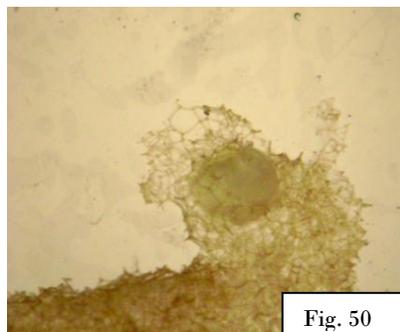


Fig. 50

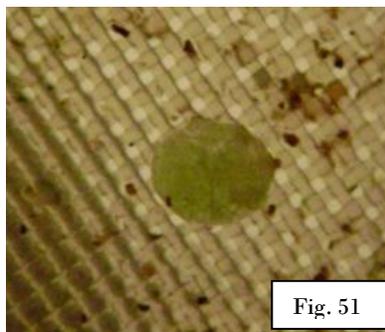


Fig. 51



Fig. 52

Los embriones de *R. cervantesii* dentro de las trampas son capaces de romper la testa y alcanzar el estadio de protocormo, de manera similar a lo reportado por Rasmussen y Whigham 1993 y 1998a con *Goodyera pubescens* este hecho no es tan dependiente del hongo micorrízico como ocurriría con especies saprobias por ejemplo Mckendrick (2000) observó de manera natural que la colonización del endófito es necesaria para que ocurra la ruptura de la testa; de acuerdo con Rasmussen (1995,1998 a), aquellas especies que son capaces de romper la testa y alcanzar el estadio de protocormo en un medio de cultivo pobre (agua con agar) poseen ciertas reservas de nutrientes; sin embargo cuando las semillas de *R. cervantesii* fueron sembradas en el medio básico de avena no ocurrió la ruptura de la testa, no se descarta el hecho de que otros micro-organismos como bacterias así como las condiciones ambientales (las primeras precipitaciones y

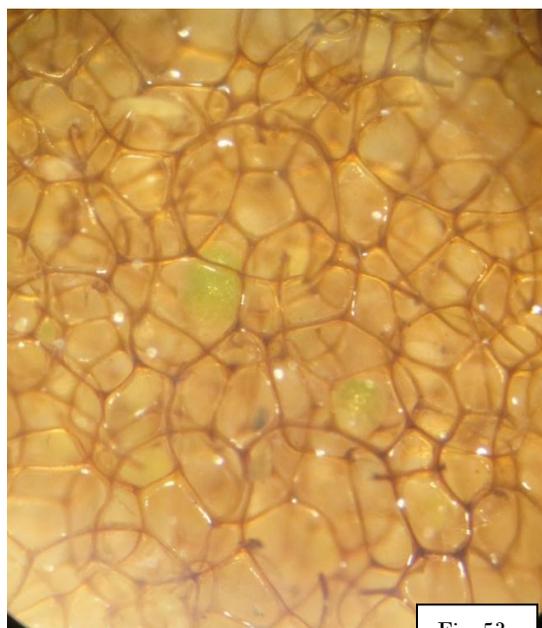


Fig. 53

escorrentías) liberen lixiviados sobre la superficie del forófito proporcionando los nutrientes externos que estimulen la germinación hasta promover el desarrollo del protocormo.

Los fragmentos de las trampas RC06 y RC07 cultivados en los medios de aislamiento fúngico se observaron inmediatamente bajo el microscopio, encontrando embriones con una coloración verde hialina (Fig. 53) semillas de las cuales aproximadamente el 95% estaban inoculadas, logrando apreciar que las hifas del hongo penetraban (Fig. 54) a

través de la región del suspensor y en el interior de la región basal del embrión, se distinguían manchas café oscuras constatando que estaba inoculado con pelotones. Al mismo tiempo se encontraron semillas en estadios más avanzados como embrión con ruptura de la testa y protocormo inoculado (Fig. 56)

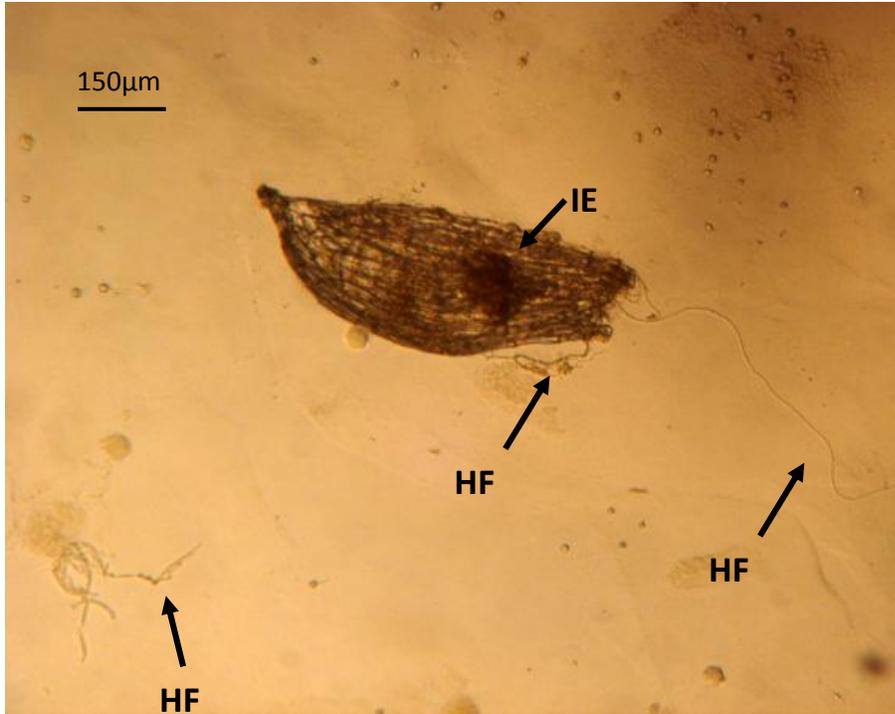


Figura 54-55. fotografías tomadas a 40x donde se aprecia el momento en que una de las hifas fúngicas (HF) pasa a través del suspensor (S) inoculando la región basal o posterior del embrión (IE)



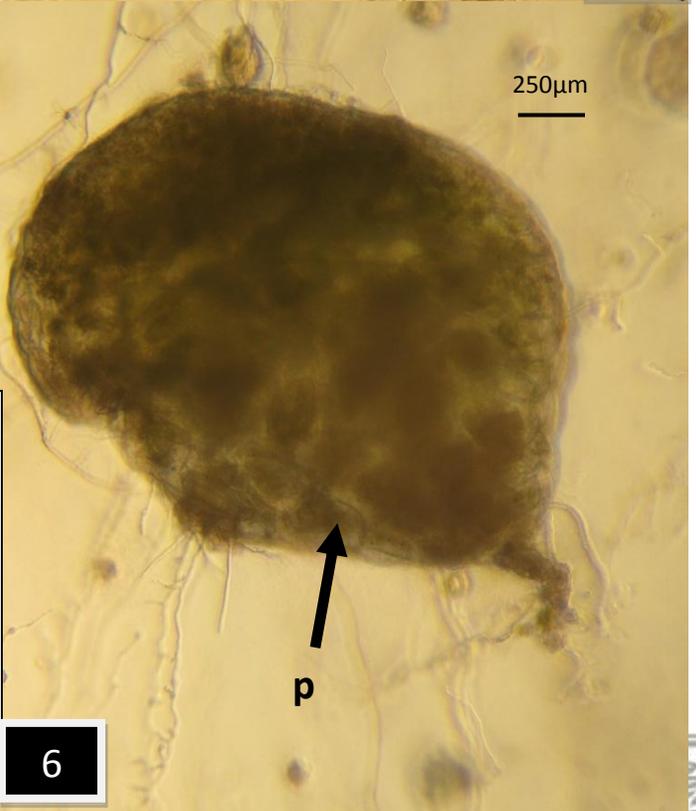
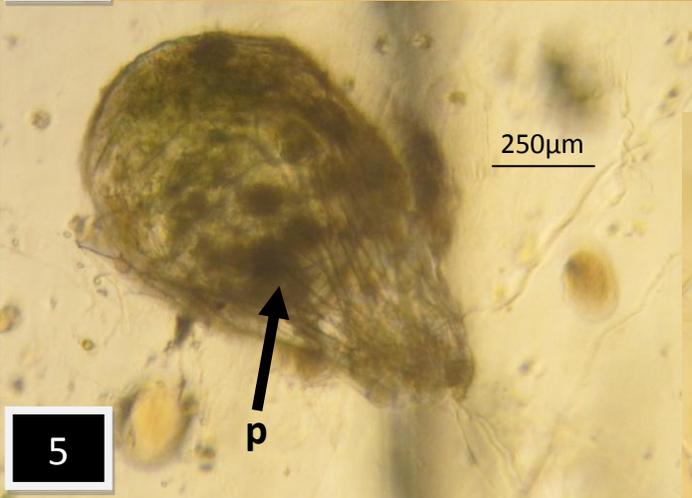
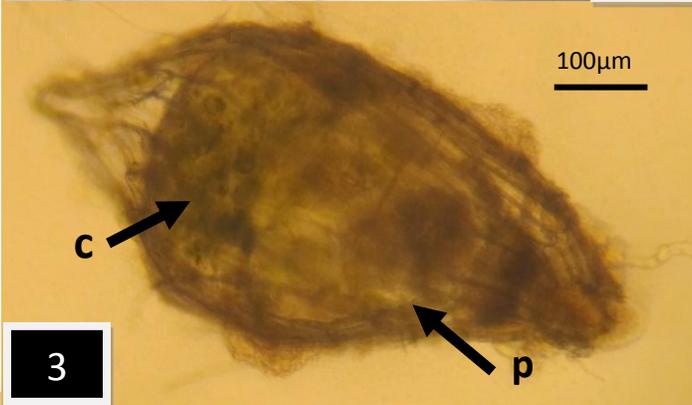
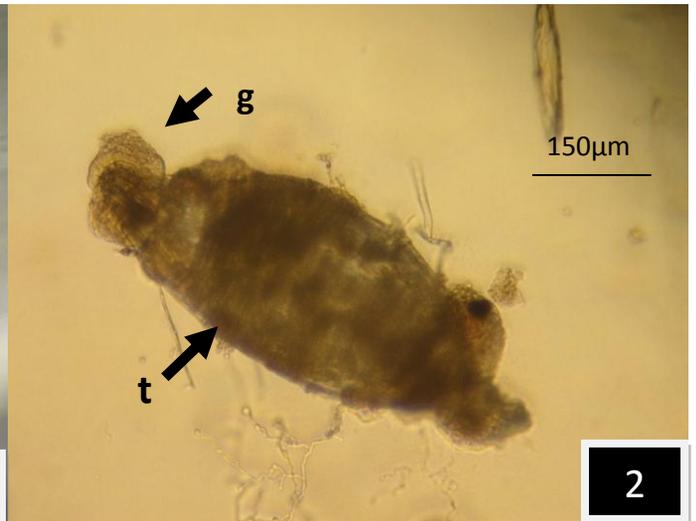
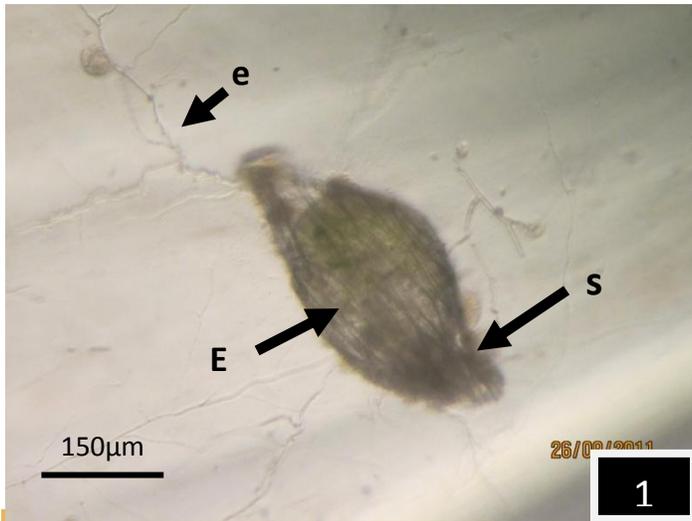


Figura 56 Semillas de *Rhynchosstele cervantesii* provenientes de las trampas RC06-07 inoculadas *in situ* y en diferentes estadios de desarrollo: 1: Se puede apreciar las hifas del endófito (e) colonizando a la semilla, en la parte inferior derecha el suspensor (s) está dilatado con una sombra que se aprecia cercano al embrión (E). 2: Sobre la superficie de la testa (t) se aprecia una sustancia color café marrón aparentemente segregada (g) por el endófito. 3: Las células del embrión en el polo chalazal (c) son de menor tamaño que las del polo cercano al suspensor donde se aprecian la formación de pelotones (p). 4-5 Se observa al embrión a punto y rompiendo la testa y se observan pelotones, las secreciones externas del endófito han disminuido drásticamente. 6. protocormo en el cual no se observa ninguna secreción en su superficie y las células con mayor tamaño albergan al endófito.

Existen indicadores biológicos en la localidad donde se instalaron las trampas con semillas para su inoculación que muestran cierta variación espacio-temporal; las trampas RC01, RC02, RC04, RC11, RC20 fueron instaladas sobre dos tipos de forófitos (en su mayoría *Quercus rugosa* y lo que parece ser una especie de *Arbutus* probablemente *Arbutus xalapensis*) que presentaban una capa delgada de ritidioma, sobre la cual crecía, a manera de costra, una capa principalmente de líquen con 20% de musgo, las raíces de los individuos juveniles de *Rhynchostele cervantesii* así como las trampas asociadas a este sustrato quedaban más expuestas lo que probablemente ocasionó la pérdida de su viabilidad ó no encontraran los suministros exógenos y/ó fúngicos que estimularan su germinación. Posiblemente la zona de estudio, en un pasado fue más húmeda; lo que permitió la colonización de *R. cervantesii* y su micorriza en un sustrato muy somero; además, esto explicaría por qué es posible encontrar, en casos muy aislados, a *Malaxis brachyrrhynchos* creciendo como epífita. Mientras que aquellas trampas colocadas sobre forofitos de *Q. rugosa*, cuya capa de ritidioma era más gruesa, sobre la cual el líquen y principalmente el musgo formaban un



Fig. 57



Fig. 58

tapete denso y esponjoso sobre la superficie del forofito; de una manera algo análoga a los horizontes o estratos en los suelos; en algunas ocasiones la espesura del “estrato” llegaba a medir hasta un poco mas de 5 cm (Fig. 57). En el cuadro 01 se puede observar que las trampas RC06, RC07 y RC08, en donde ocurrió la germinación y la inoculación, estuvieron colocadas sobre un sustrato con el 80-90% de musgo. Tal vez el caso más sobresaliente es la trampa RC06, en la cual el forófito era un árbol muerto en pie a manera de un poste a decir por la corteza muy probablemente era un tipo de encino de

aproximadamente 40 cm de diámetro, donde las colonias jóvenes y maduras de *R. cervantesii* se distribuían de una manera algo homogénea sobre todo el forófito, desde los 0.6 a los 5.0 m sobre el nivel del suelo, cubriendo casi todo el tronco se podía observar una capa densa de musgos, líquenes y rizomas de helechos muertos dando una apariencia esponjosa de coloración negruzca.

Al coleccionar las plántulas, para el aislamiento de micorrizas, se removió la capa de musgo sobre el forofito, encontrando un protocorno creciendo entre el ritidioma y la capa de musgo muerto que había dejado atrás el musgo durante su crecimiento, y se observó que sobre este tronco habían quedado ciertos detritos y lixiviados (Fig. 58) confirmando las observaciones de Fuch & Ziegenspeck (1926), Curtis (1943) Case, (1964), Leeson y colaboradores (1991), Irmisch, (1853), Stojanow, (1916), Fusch & Ziegenspeck, (1924) y Rasmussen y Wigham (1988) quienes mencionan que los restos vegetales de ciertas especies de árboles y el humus estimulan la germinación, siendo también el sustrato adecuado para la micorriza que induce el posterior desarrollo de las plántulas, revelando que en efecto el hongo es un organismo saprobio. Por lo que para futuros trabajos se recomendaría buscar este tipo de sustratos y colocar sobre ellos la trampa con semillas. Por otro lado las trampas estuvieron *in situ* asociadas a un porcentaje superior al 60% de musgo cuando eran procesadas bajo la campana de flujo laminar y los segmentos eran sembrados sobre los medios de cultivo crecían una exuberante diversidad de hongos, esta diversidad se veía enormemente favorecida en el medio PDA.

Independientemente del sustrato, sobre el cual permanecieron las trampas para su inoculación, se observó que aquellas que fueron recolectadas entre los meses de marzo y junio (RC: 05, 09, 11, 12, 17, 19, 22) en los cuales el fenómeno de sombra de lluvia no se presentó, la diversidad de hongos obtenidos fue menor en ambos cultivos de aislamiento fúngico (FIM y PDA), comparadas con aquellas trampas que fueron recolectadas entre los meses de Agosto a Octubre (Rc 01, 02, 03, 04, 06, 07, 08, 10, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21) durante los cuales el fenómeno de sombra de lluvia con precipitaciones fue evidente, incrementando la humedad en la zona, provocando un efecto sinérgico en la diversidad de hongos. De acuerdo con algunos autores (Bentivenga & Hetrick, 1992; Rosendahl & Rosendahl, 1992; Sanders & Fitter, 1992; De Mars & Boerner, 1995; Allen, 1996) los patrones fúngicos estacionales están estrechamente relacionados con la fenología del hospedero y las variaciones climáticas el panorama general muestra que la biodiversidad de hongos aumenta en los meses húmedos, así como la frecuencia e intensidad de colonización en las raíces, mientras que muchos de estos hongos permanecen en latencia como esporas durante las estaciones secas (Ebbers *et al.*, 1987; Gemma *et al.*, 1989; Allen, 1991; Bentivenga & Hetrick, 1992; Rosendahl & Rosendahl, 1992; Sanders & Fitter,

1992; Blaszkowski, 1994; Mars & Boerner, 1995; Sigüenza *et al.*, 1996; Wilson & Hartnett, 1997; Collado *et al.*, 1999; Lugo & Cabello, 2002; Dumbrell *et al.*, 2010).

Lo observado en campo coincide con el Climograma de la figura 59, ya que la germinación e inoculación de *R. cervantesii* en campo, a partir de las trampas, así como el aumento de la diversidad de hongos presente en los medios de cultivo FIM Y PDA ocurre en los meses de junio a septiembre coincidiendo con el aumento de las precipitaciones.

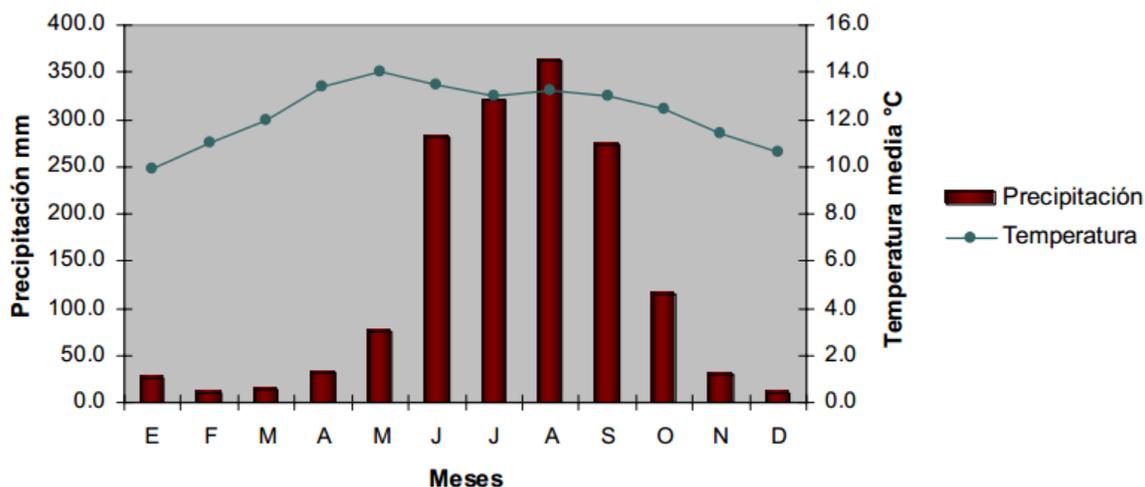


Figura 59. Climograma de la estación Huitzilac correspondiente al clima templado, precipitación y temperatura promedio extraída de CONAGUA 2006

De acuerdo con lo publicado por Aguirre (1977) (Fig. 60), mucho del crecimiento vegetativo y dispersión de las semillas de *Rhynchostele cervantesii* ocurre en la época en la cual las precipitaciones aumentan sugiriendo que efectivamente, la micorriza está disponible en estas épocas. Por lo que se propone para futuros estudios de reintroducción de plántulas de *Rhynchostele cervantesii* generadas *in vitro* se realicen durante los meses de Junio a Septiembre ya que tienen más probabilidades de establecer contacto con una amplia diversidad de hongos y se aumenta la probabilidad de su inoculación micorrizica *in situ* por otro lado el aumento de la humedad relativa y de las precipitaciones de la zona amortiguaría la pérdida de agua a través de los estomas y las plántulas tendrían más probabilidades para su establecimiento.

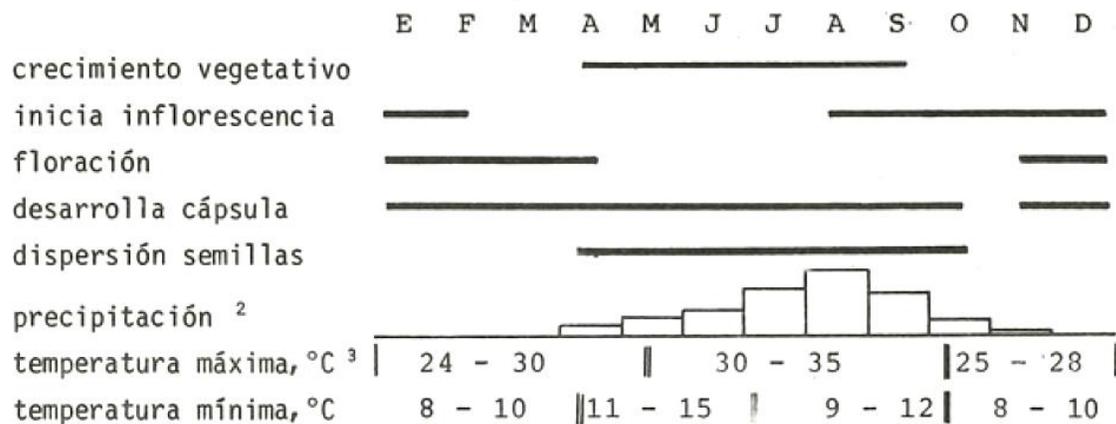


Figura 60. Fases del ciclo anual de crecimiento y reproducción de *Rhynchosstele cervantesii*

Por otro lado hay que tener en cuenta que la deposición de la niebla y las precipitaciones en bosques tropicales ha sido reconocido como un componente hidrológico importante en el ciclo de nutrientes; la niebla y la lluvia en zonas no perturbadas aporta iones en bajas concentraciones principalmente SO_4^{2-} , junto con aniones tales como Cl^- y NO_3^- . El catión dominante en la niebla es H^+ seguido de Ca^{2+} , Na^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} , y K^+ (Shih-Chieh *et al.*, 2002). Retomando lo anterior, los líquenes y en especial los musgos han evolucionado para retener agua (Poikilohidria), durante estos periodos húmedos aprovechan para el crecimiento y colonización, momento en el cual los líquenes liberan ácido oxálico, ácido carbónico y compuestos líquénicos como el ácido úsnico (Ando & Matsuo 1984; Asakawa 1990) mientras que los musgos acidifican su medio por intercambio de cationes e inhibiendo el crecimiento microbiano, liberando compuestos fenólicos no polares con estructuras similares a ligninas o taninos lo que hace difícil su descomposición cuando mueren, formando en los suelos bancos de nutrientes recalcitrantes (Clymo *et al.*, 1963; Craigie & Maass 1966; Spearing, 1972), los líquenes fijan nitrógeno atmosférico con sus fotobiontes mientras que los musgos pueden fijar grandes cantidades de Nitrógeno atmosférico al establecer una simbiosis facultativa con cianobacterias del género *Nostoc* y otras algas, durante esta simbiosis el cianobionte recibe carbohidratos y provee nitrógeno a su hospedero que más tarde lo utilizará en forma de aminoácidos, asimismo durante su nutrición los musgos pueden absorber lixiviados de las escorrentías (Rai *et al.*, 2000; DeLuca *et al.*, 2002;) Por lo que no es de extrañar que algunos autores sugieran que conservan mucho de ese nitrógeno después de su muerte y durante su descomposición (Clarck *et al.*, 1998; Turetsky, 2003; Clarck *et al.*, 2005). Los briofitos y líquenes así como sus interacciones en los ciclos de nutrientes está bien documentado para las especies terrestres boreales, mientras que todavía se desconoce mucho de las especies tropicales y epifitas (Turetsky, 2003).

El hecho más sobresaliente es que los líquenes y sobre todo los musgos son auténticos almacenes de nitrógeno y carbono cuyas concentraciones son mayores en las briofitas epifitas que en las terrestres y que cuando mueren producen restos o humus altamente solubles en agua, siendo una masa dominante de carbono y nitrógeno que participa en el ciclo de nutrientes al fluir por las escorrentías al suelo del dosel (Oechel & Van Cleve 1986; Clarck *et al.*, 1998; Chia-Chun *et al.*, 2002; Turetsky, 2003; Clarck *et al.*, 2005, Cornelissen *et al.*, 2007)

Si bien los briofitos influyen en la actividad microbiana, proveen microhábitats para invertebrados que pueden romper partículas e incrementar el área para otros microorganismos (Gersen, 1982; Merrifiel & Ingham, 1998) un hecho sobresaliente es que los briofitos absorben grandes cantidades de CO₂ de la respiración de las plantas cercanas, cuando son epifitos pueden obtener CO₂ del forófito (Sveinbjörnsson & Oechel; 1992), conjuntamente hospedan hongos microscópicos descomponedores de carbono orgánico (Tsuneda *et al.*, 2001; Thorman *et al.*, 2002) Cuando mueren los briofitos epifitos liberan grandes cantidades de azúcares solubles en forma de lixiviados que son capaces de favorecer el crecimiento de hongos micorrízicos (Coxon *et al.*, 1992; Carleton & Read 1991; Charman *et al.*, 1999; Chasar *et al.*, 2000) por otro lado un gran número de hongos han sido reportados como parásitos de musgos (Felix, 1988) sin embargo tanto los líquenes como los briofitos al estar vivos parecen inmunes al ataque de bacterias u otros hongos (During & Van Tooren, 1990). Esto podría explicar en gran parte el microhábitat de la micorriza y los requerimientos nutricionales de *Rhynchostele cervantesii* para su germinación y por qué es posible tener mejores posibilidades de cebar el hongo en musgos muertos.

Cuando se colectó la primera plántula de *Rhynchostele cervantesii*, con la reminiscencia de protocormo, se pensó que era alguna especie de malformación al ser la única muestra, después se encontraron plántulas más pequeñas confirmando claramente que aquella protuberancia debajo del primer pseudobulbo correspondía a la reminiscencia del protocormo, al disectar la reminiscencia del protocormo se observó que casi en su totalidad eran células de digestión, la reminiscencia del protocormo variaba en cuanto volumen con respecto a la talla y las condiciones climáticas; la primera plántula fue colectada durante los meses de abril que coincide con la sequía y la reminiscencia del protocormo se notaba plasmolizada; mientras que, las plántulas colectadas en los meses de septiembre, que coincide con el fenómeno de sombra de lluvia y la inoculación de las semillas de las trampas se notaban más turgentes sugiriendo que la digestión de las hifas ocurre en los meses que los nutrimentos y el agua no están disponibles. Fisiológicamente los hongos micorrízicos endófitos como los vesículo Arbusculares, no pueden ocupar más de un nicho que no sea la raíz del hospedero e incrementan su dinámica cuando los

recursos se ven limitados (Tilman, 1987; Bobbink *et al.*, 1998; Stevens, *et al.*, 2004) por lo que la micorriza de las orquídeas es más versátil ya que puede ser saprobio o patógeno de otras plantas y por lo visto incrementan su dinámica cuando los recursos en especial el agua y los lixiviados se encuentran disponibles hasta que forman asociaciones con las orquídeas y las hifas son parasitadas en una asociación explotativa. Posiblemente cuando llega el invierno y la temperatura disminuye (Octubre- Febrero ver Fig. 59-60) aquellas semillas y/o protocormos que fueron inoculados tienen más probabilidades de sobrevivir que aquellas que no fueron inoculadas; parte de las muestras (RC06-RC07) fueron almacenadas en refrigeración por hasta seis meses, después de este tiempo las semillas inoculadas y los protocormos comenzaron a necrosarse indicando que la inoculación micorrizica confiere cierta tolerancia a las bajas temperaturas. Este fenómeno de alimentarse de hongos durante las épocas invernales quizás sea un fenómeno que algunos miembros de las orquídeas de bosques templados empleen para su supervivencia, por ejemplo algunas *Barkerias* pierden sus hojas durante las épocas de otoño e invierno por lo que la nutrición por parte de la fotosíntesis es muy pobre; para este punto ya han desarrollado raíces masivas, en una época en la que las precipitaciones son muy escasas; su morfología nos habla que en épocas invernales son capaces de alimentarse y alojar una gran cantidad de hongos que suplan a la fotosíntesis y permitan la supervivencia de la especie así como de los compañeros fúngicos; sin embargo de acuerdo con Rasmussen (1995) el tema de resistir las bajas temperaturas con ayuda de los endófitos esta poco investigado. La evidencia muestra que durante el invierno los días son más cortos y fríos reduciendo la fotosíntesis y por consiguiente el crecimiento de las raíces por lo que la disponibilidad de carbono proporcionado por el hospedero disminuye reduciendo la dominancia de muchas comunidades de hongos como las micorrizas arbusculares (Lekberg *et al.*, 2007; Öpik *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2008). El panorama general apunta a que las orquídeas son capaces de alimentarse de los pelotones durante el invierno, esta estrategia quizá ha contribuido a la pérdida del endospermo en las semillas y al éxito de la Orchidaceae en sus estadios más tempranos así como su distribución alrededor del mundo. En la zona de estudio fue notorio que cuando llega el principio de la primavera la temperatura aumenta mientras que la sequia permanece, para este entonces el protocormo de *Rhynchostele cervantesii* probablemente siga dependiendo del hongo y el hongo del protocormo para sobrevivir ante estas adversidades, estas observaciones coinciden con las de Bernard (1909) quien sugería que el protocormo inoculado sobrevivía ante adversidades climáticas; Ambos permanecen en latencia hasta que llegan las primeras precipitaciones (Abril-Mayo) donde posiblemente se generen nuevas células de digestión y de pasaje, listas para su posterior inoculación durante los meses otoñales (ver anexo 1 de ciclo de vida de *R. cervantesii*); de acuerdo con Burgeff (1936) este tipo de células se generan cuando la humedad no está presente. Por otro lado no se descarta la

posibilidad de que algunos hongos micorrízicos completen su ciclo de vida esporulando desde las raíces de las orquídeas en épocas de sequía y que estos en su mayoría sean los que no esporulan bajo condiciones *in vitro* (Anamorfos). En campo se ha observado que las hojas de *R. cervantesli*, *R. aptera* y *R. maculata* de individuos adultos, son inoculadas por lo que pareciera liquen. En la Unidad de Investigación de Biología Vegetal, se ha realizado el cultivo *in vitro* de hojas de *R. cervantesii*; sin embargo, el establecimiento del cultivo aséptico ha sido difícil de realizar; pero es importante mencionar que a partir de estos explantes emergen micelios de hongos con características morfológicas un tanto similares a los aislados a partir de las raíces de plántulas colectadas y de las muestras de las trampas; tampoco se descarta el hecho de que en época de sequía él o los endofitos resguarden su fase reproductiva (esporas) en las hojas de su hospedero. Tal vez el ejemplo más destacado es *Periconella* el cual es un hongo endofítico anamorfo de varias especies de *Quercus*, cuya actividad patógena sobre las hojas de su hospedero aumenta en las épocas de sequía (Whalley, 1985; Vannini & Scarascia-Mugnozza, 1991; Vannini *et al.*, 1996; Collado *et al.*, 1999). Si bien la especificidad fúngica es un tema de debate, muchos autores han sugerido que las orquídeas fotosintéticas y en especial las epífitas están asociadas a un solo hongo micorrízico dominante (Otero *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2002; Shefferson, 2005; Suarez *et al.*, 2006; McCormick *et al.*, 2004, 2006) en contraste con las orquídeas terrestres o micoheterótrofas que suelen emplear un amplio rango de endófitos (Jolou *et al.*, 2005; Dearnaley, 2006) Aún cuando las trampas fueron colocadas en distintos forófitos se apreció que en los cultivos para aislamiento, aquellas trampas cuyas semillas inoculadas tendían a ser simbiontes de un hongo con una morfología muy similar (Fig. 56), por lo que muy probablemente *R. cervantesii* requiera de una micorriza específica, involucrada durante el proceso de germinación, un punto muy importante, es que la zona es un ecotono, estas zonas se caracterizan por tener una elevada biodiversidad por lo que todos los organismos y en especial los epífitos tendrán a entrar en competencia por lo que tener una micorriza específica resulta ser una ventaja tanto adaptativa como evolutiva, además explicaría el por qué *Rhynchostele cervantesii* es endémica.

Las gotículas presentes sobre la superficie de la testa se consideraron, en un inicio, que podrían ser micoplasmas ó bien fitoalexinas secretadas por el embrión (Fig. 56.2); sin embargo la cepa RCRAIZ01FIM y la cepa RPLB6.3 en cultivo puro secretaron lo que aparentaba ser la misma sustancia. Por lo que muy probablemente cuando la hifa penetra a través del suspensor al embrión comienza a secretar nutrientes que estimulen rápidamente la germinación, posiblemente en una asociación del tipo biotrófica, y cuando llega a protocormo los pelotones son digeridos en una asociación del tipo necrotrofica. Los sistemas biotróficos parecen ser dominantes en los sistemas de micorrizas de otros grupos de plantas, sin embargo las micorrizas de orquídeas han demostrado que el

intercambio puede suceder en ambos sentidos (Mollison, 1943; Harley, 1984; Hadley & Williamson; 1971). La existencia de los exudados fúngicos que estimulan la tasa, así como el porcentaje de germinación están bien establecidos *in vitro* (Rasmussen, 1995; 1998). Wolf (1933), Holländer (1932), y Harvais & Raitsakas (1975) en sus estudios establecen que los hongos de las orquídeas y en especial los de las micoheterotróficas necesitan medios de cultivo con altas concentraciones de taninos o humus, y por lo visto solo son capaces de aprovechar el Nitrógeno de manera orgánica, recientemente Whigham y colaboradores (no publicado) han recreado la germinación natural en medios de cultivo a base de suelo o madera magra. Por ejemplo agua con agar y 0.5% de corteza de madera o agua con agar y virutas de madera pueden sustentar algunos simbiosiontes de orquídeas y producir plántulas pequeñas a partir de semillas (Whigham *et al.*, MS citado en Rasmussen 2002), por lo que esto abre nuevas posibilidades para el análisis del comportamiento de la germinación, así como el análisis de la disponibilidad fúngica y como afectan los sustratos en el establecimiento de las orquídeas, por lo que no sería extraño que en algún futuro, la avena, como componente del medio básico de avena para la germinación simbiótica de orquídeas, sea sustituida por trozos de corteza para la germinación simbiótica de especies epifitas.

Al procesar la trampa RC07 se observaron semillas con un embrión verde hialino que no había rotó la testa (Fig. 61), mientras que en otras el embrión se notaba embebido con una coloración blanca y llena de pelotones sugiriendo la pérdida de la viabilidad el contorno del embrión era algo irregular (Fig. 62), algunas hifas que salían de estas semillas se conectaban con semillas que tenían un embrión de color verde, por lo que al parecer el hongo tiene cierta actividad patógena sobre semillas que no están vivas; Algunos grupos de Rhizoctonia son patógenos de plantas que primero matan al hospedero y subsecuentemente viven saprofiticamente de sus restos (Garret, 1962; Roberts, 1999) por lo que el embrión vivo es capaz de controlar ó encontrar el balance para que la simbiosis de se lleve a cabo.

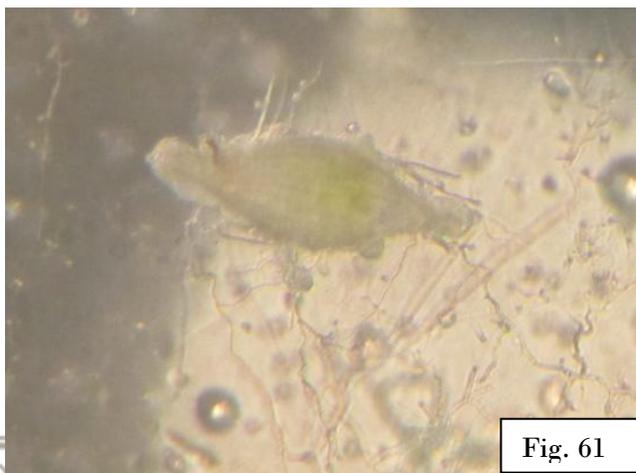
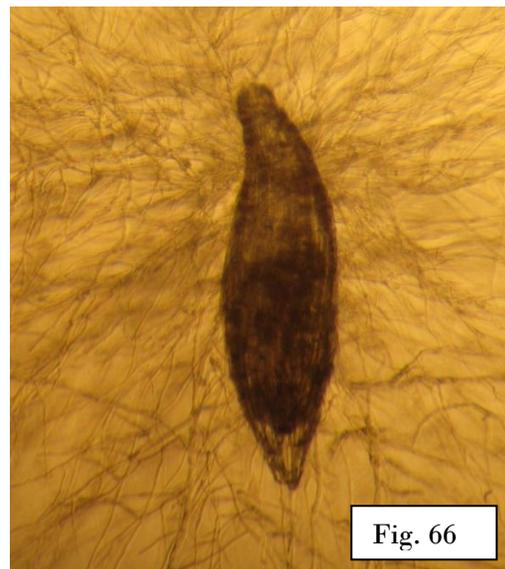
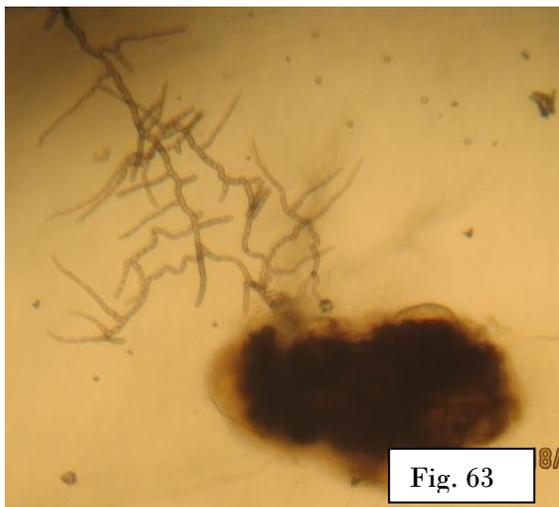


Fig. 61



Fig. 62

En la trampa RC 04 se observó un hongo con una morfología muy distinta a las que inoculaban a las semillas de las trampas RC06,RC07 segregando grandes cantidades de exudados sobre la superficie de la testa, muy probablemente este hongo es la micorriza de alguna otra especie de orquídea que comparte el forófito con *R. cervantesii* (Fig.63). Este hecho podría tener alguna relación ya que en campo y en casos aislados se logró observar que las raíces de *R. cervantesii* se entrelazaban o crecían sobre las masivas raíces de *Epidendrum anisatum*, (Fig. 64) hasta qué punto pueden llegar a competir estas especies o si comparten algún tipo de hongo simbionte es desconocido; este mismo fenómeno se logró observar en una localidad del municipio de Temascaltepec en Toluca estado de México solo que asociada a una *Prosthechea* sp. (Fig. 65).



En las trampas (RC14, 16, 20) aparecieron hongos con una morfología similar entre sí; (en especial el que se muestra en la fig. 66) las hifas crecían sobre la superficie de la testa pero no se apreciaban gotículas secretadas por las hifas ni tampoco que entrara por el suspensor. A pesar de estas observaciones no se descarta la posibilidad de que otros hongos participen durante el proceso de germinación de manera indirecta; ya que cuando las cajas de petri eran almacenadas en oscuridad a temperatura ambiente algunas cajas de petri sobre las que recrecían los hongos de las trampas o algunas cepas puras desprendían un olor *sui generis* (un tanto parecido a una sustancia alcohólica). Lo anterior puede estar respaldado ya que Holländer (1932) notó que simbiontes de orquídeas micoheterotróficas como *Galeola* y *Gastrodia* que no son Rhizoctonia producen enzimas que degradan la lignina; plántulas de *Tipularia discolor* se establecen en escombros leñosos lo cual indica que están asociadas a degradadores de madera (Rasmussen, 1992) algunos hongos del genero *Mycena* los cuales son hongos saprobios estan asociados a especies de *Cymbidium* y *Gastrodia* (Fan *et al.*, 1996; Lan *et al.*, 1996) la hifa saprotrofica del hongo shiitake (*Lentinus edodes* Berk) puede apoyar el crecimiento de la orquídea aclorofica *Erythrorchis ochobiensis* (Umata, 1998) *Galeola altissima* otra orquidea aclorofica establece una relación con *Erythromyces crocicreas* un agente infeccioso de raíces leñosas (Hjortstam & Tellería, 1990; Umata, 1995).

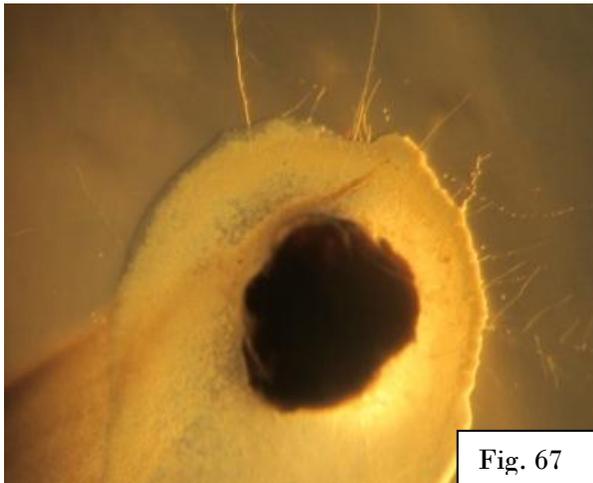


Fig. 67

En la trampa RC 14 se encontró un protocormo necrótico con hifas fúngicas (Fig. 67) por otra parte la técnica del trampeo ha sido empleada con éxito durante las estaciones de crecimiento para evaluar la presencia de hongos capaces de apoyar la germinación (Van der Kinderen, 1995; Mckendrick *et al.* 2000; Batty *et al.*, 2002). Estos métodos de cebo también se han

utilizado para cuantificar la germinación de otras plantas y técnicas similares se emplean para detectar hongos patógenos en el suelo (Tieu *et al.*, 2001; Sanfuentes *et al.*, 2002). Hay que tener en cuenta que las orquídeas son los parásitos de hongos patógenos y/o saprobios de otras especies vegetales por lo que ecológicamente hablando juegan un papel al controlar la población de estos hongos desde el momento de su germinación hasta su etapa adulta.

Las modificaciones efectuadas en las trampas mostraron tener ventajas y algunas desventajas; Zettler y colaboradores., (2011a) fueron los primeros en adaptar y documentar a nivel mundial la técnica de trampeo utilizando los marcos de diapositivas

para orquídeas terrestres establecida por Rasmussen y Whigham (1993) colocándolos sobre el tronco del forófito y fijándolas con una malla plástica (Fig. 68); en el presente estudio al establecer las modificaciones para las trampas se consideró la posibilidad de encontrar plántulas sobre ramas muy delgadas; sí la trampa hubiera estado en una armazón rígido probablemente se hubiera caído al suelo perdiendo la muestra; o bien las semillas no hubieran estado en estrecho contacto con la superficie del forófito, corriendo el riesgo de perder su viabilidad al quedar desprotegidas, o ni siquiera inocularse. Por lo que al sustituir el marco rígido por



uno flexible elaborado a partir de la malla de nylon, el silicón hace más sencillo la instalación de las trampas sobre las ramas, troncos y horquetas en la superficie del forofito; en algunas ocasiones un extremo de las trampas era mal sellado y este se abría liberando parte de las semillas por lo que en un futuro sugeriría que los extremos del sobre fueran sellados con calor aunque se desconoce hasta qué punto la trampa perdería o ganaría flexibilidad; no obstante la gran mayoría de semillas y protocormos se quedaban alojados en interior de la esponja.

Considerando en que las semillas quedarían concentradas en un solo punto dentro del sobre, estarían a merced de uno o varios hongos entre ellos los patógenos, por lo que se consideró, dispersar las semillas dentro del sobre sin perder su elasticidad, así al estar distribuidas, se podrían detectar más fácil la inoculación de hongos micorrízicos o patógenos, por este motivo se decidió el uso de la esponja; En los primeros diseños de las trampas, se cortaron varias secciones de esponja, sobre las cuales se les distribuyeron semillas de otras especies de orquídeas, que habían estado almacenadas en el banco de semillas, las cuales habían perdido su viabilidad. Cuando se cortaban secciones de esponja muy gruesas estas caían sobre los poros de la esponja, perdiéndose lo que dificultaría su obtención o extracción en un futuro; por otro lado cuando se cortaban trozos de esponja muy delgados, la mayoría de las semillas atravesaban la esponja por lo que la mejor

medida resultó 3.5 x 2.5 x 0.5 cm (largo, ancho y grosor respectivamente), ya que las semillas podían observarse a simple vista y no atravesaban la esponja; durante primeras pruebas las trampas se colocaron sobre troncos, a los cuales se les rociaba un chorro de agua continuo, notando que las semillas se mantenían en su lugar. Otra característica que se pensó al incluir la esponja, es imitar la capacidad de retención de agua de los musgos, esto debido a que las carpetas de musgos facilitan la germinación de semillas al proveer una superficie húmeda (Black & Bliss, 1980; Zasada, 1986) así las semillas no perderían tan rápido la humedad, aumentando la posibilidad de cebar al hongo micorrízico. Al recuperar las muestras de campo fue sorprendente ver varios hongos, líquenes y musgos que colonizaron tanto la red de nylon como a la esponja, por lo que al ser un material inerte no altera la composición química de la superficie del forofito; al absorber el agua puede captar con ella nutrientes liberados a partir de las escorrentías, que permitan la colonización de los hongos, se recomienda para futuros trampeos identificar taxonómicamente la especie del briofito asociado a la trampa y a las plántulas ya que Clark y colaboradores (1998) establecen que cada especie de briofito epífita tiene distinta capacidad de retención de agua como distintos requerimientos de luz por lo que la temperatura de los briofitos está en función del balance entre la energía de radiación, intercepción, conducción condensación y calor latente de evaporación esto hace que los briofitos pierdan menos calor por convección y evaporación que las plantas vasculares (Longton, 1992). Por otro lado el uso de la esponja proporciona cierta aireación, de acuerdo por publicado por Yoder y colaboradores (2000) quienes establecen que la retención de agua de las semillas de una orquídea epífita es menor que la de una terrestre y que la pérdida de agua ocurre a través de la superficie de la testa, ya que las semillas de las orquídeas epífitas son capaces de ganar más agua con la humedad relativa, llegando hasta el punto de saturación, dicha capacidad sugiere que estas semillas son capaces de adquirir el agua de lluvia en un sustrato muy poroso; y que la lluvia es la clave para coordinar la germinación. Por otro lado la aireación en la esponja hace posible la colonización del hongo micorrízico ya que es un organismo saprobio aerobio, puesto que Burgueff (1909) establece que cuando el hongo es desprovisto de oxígeno en medios de cultivo, tiende a crecer lentamente y eventualmente morirá. Se recomendaría para futuros estudios que se tomen trozos de esponja donde se han observado las semillas y protocormos inoculados, para ser sembradas en corteza de encino previamente esterilizada y húmeda con la finalidad de realizar un trampeo e inoculación *ex situ* muy similar a lo realizado por Brundrett y colaboradores (2003), brindando mediante el uso de humidificadores una elevada humedad relativa imitando el fenómeno de sombra de lluvia. Es posible que en un futuro se prueben alternativas más eficientes como el uso de otras esponjas; aunque el uso de una esponja dentro de los sobres de nylon es algo novedoso y que nunca se había probado (Zettler. com. per. 2012); por otro lado todavía quedan una

amplia gama de materiales sintéticos y/o naturales que faciliten el uso del trapeo coincidiendo con lo publicado por Zettler y colaboradores (2011).

6.2 AISLAMIENTO MICORRÍZICO

Se lograron aislar un total de 22 cepas con morfología distinta de las soluciones patrón 1:100, 1:10 y segmentos de esponja. Una de las adversidades para aislar hifas y/o micelios de los medios de cultivo obtenidos, a partir de la solución patrón (1:100), 1:10 y los segmentos de la esponja, es que ciertos hongos son capaces de colonizar por completo el medio de cultivo en un lapso menor a 24 h; aún cuando se mantuvieron bajo condiciones de almacenamiento (4°C); o bien, algunos hongos esporulaban colonizando primero el medio de cultivo fresco e impidiendo el crecimiento de la hifa o micelio de interés. La diversidad de hongos presentes en los medios de cultivo FIM y PDA, pertenecientes a las estaciones lluviosas, fue cuantiosa, pudiendo observar hongos con morfologías distintas y puntos de crecimiento en distintos lugares, algunos hongos solo se podían observar en el microscopio de campo claro a aumentos de 100x o más, por su diminuto tamaño estos hongos necesitaban de más tiempo para colonizar una caja de Petri con medio nutritivo fresco que los hongos con hifas más grandes y largas. De manera casi general, la capacidad para proliferar de algunos hongos se vio considerablemente favorecido en el medio PDA, por esta razón fue casi imposible aislar hongos en las cajas Petri provenientes en estos medios. Por otro lado, el medio FIM, al ser más pobre en carbohidratos y almidones (Anexo 2), comparado con el PDA, facilitó la selección de hifas y/o micelios más individualizados, ante esta problemática se tenía planeado emplear medios selectivos, pero ante tal diversidad de hongos probablemente se hubieran obtenido otros tipos de hongos y menos los que se buscaban. Se ensayó con uno de los cortes de la esponja en la trampa RC16, y bajo la campana de flujo laminar, se desinfectó con una solución de hipoclorito de sodio al 5% v/v por 10 minutos, algunas semillas se liberaron, notando un hongo que colonizaba la testa sin embargo éste no creció sobre el medio de cultivo, por lo que en estadios muy tempranos de inoculación es posible matar al endófito, se sugiere que las trampas sean colectadas entre los meses de invierno o primavera cuando la humedad en el ambiente es baja teniendo probablemente menos diversidad de hongos pero protocormos con una talla mayor en los cuales no estén por completo digeridos los endófitos y cuya manipulación sea más sencilla. De acuerdo con Brundrett y colaboradores (2003) la época de sequía coincide con la dormancia de las plantas y el hongo simbionte podría estar inactivo, provocando que el impacto sobre el entramado de las hifas sea mínimo. Aún cuando se desinfectó esta muestra, algunas hifas comenzaron a crecer y el punto de crecimiento se iniciaba en la esponja, por lo que nuevamente la esponja provee un sustrato óptimo en el cual diversos hongos o esporas se pueden alojar y es un tanto difícil a la hora de desinfectarla.

6.3 AISLAMIENTO FÚNGICO DE PLÁNTULAS Y PROTOCORMOS.

Las raíces de *Rhynchostele cervantesii* son relativamente delgadas, al momento de decorticarlas (eliminar el velamen) se podían apreciar zonas con coloraciones desde aquellas que eran amarillentas a aquellas con un color marrón sugiriendo distintos grados de intensidad de colonización fúngica; a pesar de que estas zonas estaban colonizadas por cierta diversidad de hongos muy parecidas a las observadas en las trampas a veces era posible observar que uno o dos hongos emergían de las raíces y en ocasiones ninguno, esto permitió seleccionar y obtener cepas puras de una manera más rápida; no obstante, los pelotones presentes en la reminiscencia del protocormo de *Rhynchostele cervantesii* eran de mayor tamaño comparados con el de las raíces (Fig.71) y que con otras especies de orquídeas.

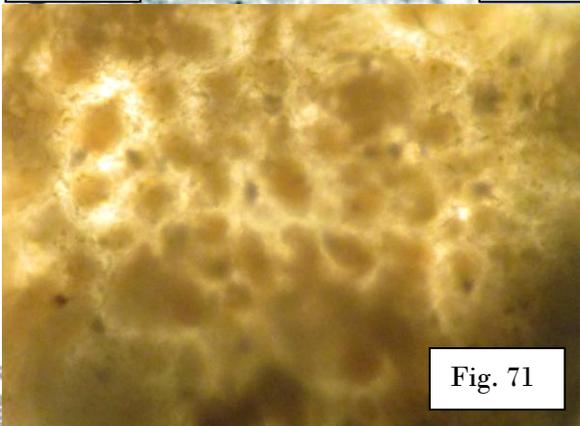
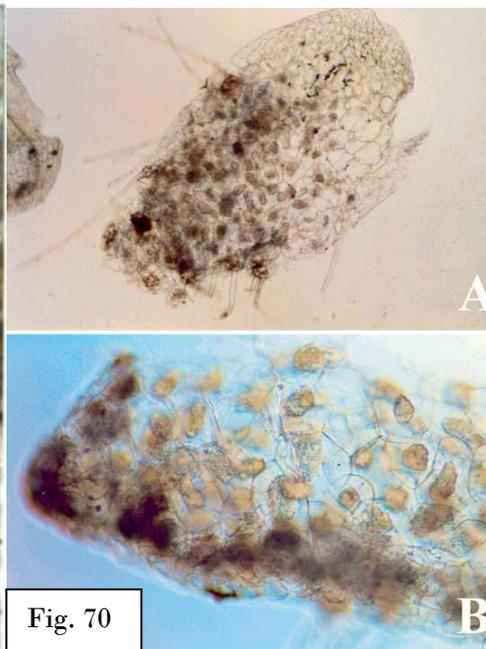
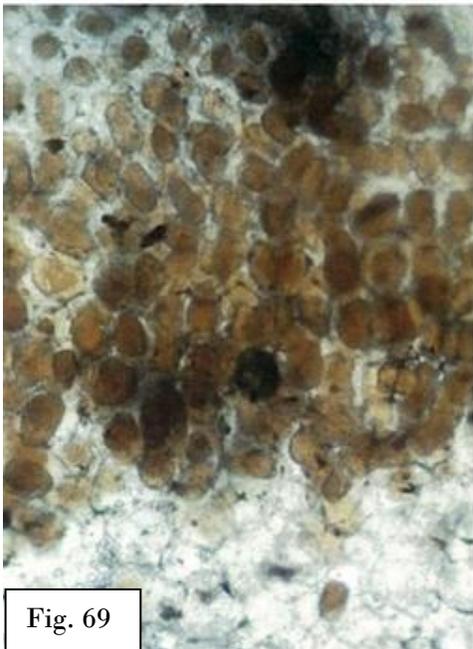


Figura 69. Imagen tomada de Athipunyakom *et al.*, 2004 Corte transversal de la Raíz de *Dipodium variegatum* mostrando pelotones alojados en las células de digestión barra de escala 100 μ m (Bougoure & Dearnaley, 2005)

Figura 70. Protocormos de *Spathoglottis plicata* inoculados después de 21 días con *Epulorhiza repens* formando pelotones 100X(A), 400X(B)

Figura 71. Corte transversal de la reminiscencia del protocormo de *R. cervantesii* (40x)

Cuando las secciones de la reminiscencia del protocormo eran colocadas sobre el medio de cultivo se notó que algunos pelotones se desprendían con facilidad. Sí bien, es cierto que mucho de nuestro conocimiento acerca de los micobiontes asociados a las orquídeas están basados en micobiontes aislados a partir de raíces (Bernard, 1904; Currah *et al.*, 1987; 1988; 1990; Rasmussen, 1995; Zettler, 1997; Zettler *et al.*, 2005; Sharma, 2003b; Stewart & Kane, 2006; 2007), este tipo de técnicas tiene sus desventajas; en primer lugar se corre el riesgo de matar al/los endófito(s), esto debido a que las raíces son un órgano de absorción (Burgues, 1939; Frank, 1981). Histológicamente, las células de la raíz son largas y estrechas por lo que el endófito se aloja de manera irregular, además de que se pueden encontrar en la raíz pelotones digeridos (Bernard, 1909; Rasmussen, 1995; Rasmussen; 2002); hay que considerar que la microbiota de una plántula es muy distinta a la de los individuos adultos (Rasmussen, 2002). Por lo que, las áreas más prometedoras a encontrar endófitos, que estimulen la germinación *in vitro*, es en el protocormo; asimismo, el protocormo tiene células más grandes y la infección por parte del endófito es más extensa (Bernard, 1909; Rasmussen, 1995; Rasmussen & Whigham, 2002) por lo que el trampeo es una herramienta útil que permite la obtención de protocormos para el estudio de sus endófitos (Rasmussen, 1993, Masuhara & Katsuya, 1994; Van der Kideren, 1995 a,b; Perkins, 1995; . Perkins & Mcgee, 1995; Zelmer *et al.*, 1996; Zelmer & Currah, 1997; Rasmussen y Whigham, 1998 a,b; Vujanovic, 2000; Mckendrick *et al.*, 2000; 2002; Brundrett *et al.*, 2003; Zettler *et al.*, 2005; Whigham *et al.*, 2006; Collins *et al.*, 2007; Øien *et al.*, 2008; Phillips *et al.*, 2011; Keel *et al.*, 2011; Zettler & Piskin, 2011; Zettler *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). Morfológicamente, al disectar, de manera longitudinal las plántulas de *Rhynchosstele cervantesii*, se notó claramente que tanto el protocormo como la reminiscencia del protocormo estaban inoculados intracelularmente por pelotones; el primer pseudobulbo que emerge de esta reminiscencia contiene células parenquimatosas; pudiendo observar cómo cambia el tejido de una manera gradual; a ambas estructuras las separa una pequeña estele con células pequeñas de un color verde, marrón hialino, sugiriendo ser un verdadero puente entre tejido micoheterotrófico y autotrófico, sugiriendo que gran parte de la nutrición del primer pseudobulbo depende de la digestión de los hongos micorrízicos alojados y que en este estadio la planta puede depender en una gran porción a la micoheterotrófia; y quizás en una pequeña porción a la autotrófia. De manera general las hifas extraídas a partir de secciones de la reminiscencia del protocormo, presentaban un crecimiento lento, ya que aproximadamente después de dos o más semanas para comenzar a emerger del tejido; hubo casos en los que después de varios meses nada recreció, sugiriendo que los pelotones estaban digeridos; Hadley (1990) y Rasmussen (1995), establecen que los endófitos de las orquídeas tienen un

crecimiento lento manteniendo una competencia pobre frente a otros hongos; por lo que al aislarlos de la soluciones patrón, la solución 1:10 y de los segmentos de esponja, hubiera resultado una ardua labor. Sin embargo, al aislar hongos distintos no se descarta la posibilidad de que alguno de ellos o la combinación de algunos hongos estimulen la germinación de algunas especies de orquídeas. Posiblemente, el crecimiento de los hongos endófitos de las orquídeas está regulado en el hábitat natural por la aireación del sustrato, por la cantidad y composición química de restos orgánicos en descomposición; así como, cuestiones ambientales y estacionales, como son la luz, temperatura y principalmente la humedad relativa. No obstante se lograron aislar cerca de 18 cepas distintas a partir de las raíces de plántulas y 9 cepas distintitas a partir de la reminiscencia del protocormo.

6.4 GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA

Cuadro 2. Germinación asimbiótica de *Rhynchosstele cervantesii* en distintos medios de cultivo durante 13 semanas

Semana	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Medio													
Estadios/ La media de N=3 expresado en %													
MS 100%	0/100	0/94 1/6	0/88 1/12	0/80 1/15 2/5	0/80 1/10 2/10	0/85 1/0 2/9 3/6	0/79 1/0 2/3 3/18	0/78 1/0 2/0 3/22					
MS 50%	0/100	0/93 1/7	0/83 1/17	0/82 1/12 2/6	0/78 1/3 2/15 3/5	0/75 1/0 2/5 3/20	0/74 1/0 2/4 3/22	0/73 1/0 2/1 3/25 4/1	0/73 1/0 2/1 3/17 4/9	0/73 1/0 2/0 3/11 4/16	0/72 1/0 2/0 3/10 4/18	0/72 1/0 2/0 3/4 4/24	0/72 1/0 2/0 3/0 4/26 5/1
MBA (Testigo)	0/100	0/100	0/98 1/2	0/98 1/2	0/97 1/3	0/97 1/3	0/97 1/3	0/97 1/3	0/97 1/0 2/3				

Valor del Estadio	Descripción
0	Semilla con la testa intacta
1	Embrión con aumento de volumen y rompiendo la testa
2	Embrión globular, presenta rizoides
3	Protocormo con protomeristemo
4	Plántula con primer primordio foliar
5	Elongación del primordio foliar y eventual desarrollo

Etapas de desarrollo de semillas y protocormos de orquídeas adaptado por Jhonson et al. 2007.

Como resultado de la germinación asimbiótica *in vitro* se asume directamente que la viabilidad de las semillas fue del 22-26% (Cuadro 2).

En el medio MS [100%] los embriones que rompieron la testa, comenzaron a perder la clorofila entre la octava y novena semana (Fig. 72). Probablemente el medio a esta concentración de sales resultó fito-tóxico a diferencia del medio MS [50%] donde los embriones se desarrollaron hasta protocormos con primordio foliar; sin embargo, después de la quinceava semana éstos se desdiferenciaban formando tejido calloso, en ocasiones con una coloración verde-amarillenta (Fig 73) sugiriendo que la concentración de sales resultó menos tóxica. El medio básico de avena (MBA) es un medio relativamente pobre en nutrientes, a diferencia del medio MS (Anexo 3), en el cual hasta la novena semana las semillas alcanzaron el estadio de embrión goblular y además perdieron la clorofila sin mayor desarrollo (Fig 74).

En algún momento del experimento, para la obtención de protocormos se sembraron semillas en medio MS [50%] pero en esta ocasión se le adicionó 1 grL^{-1} de carbón activado notando que las semillas se desarrollaban más rápido; no había la presencia de formación de callo, se presentó en menor medida la formación de tejido necrosado, y la morfología de las plántulas (Fig.75) era similar a la de las observadas en campo; por lo que la adición de carbón activado al medio de cultivo MS con 50% de la concentración de sales es favorable para inducir la germinación asimbiótica *in vitro* de *Rhynchosthele cervantesii*.

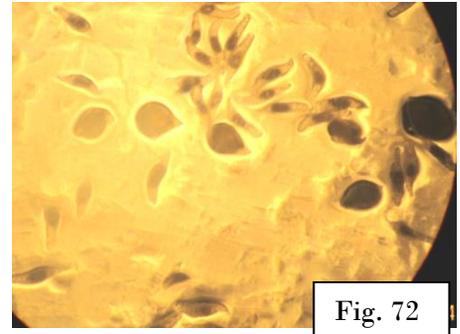


Fig. 72

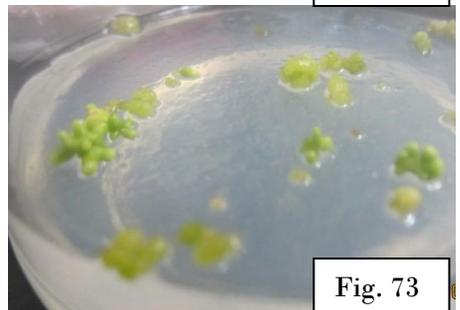


Fig. 73

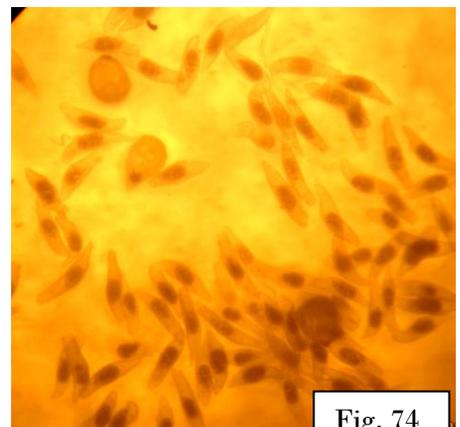


Fig. 74

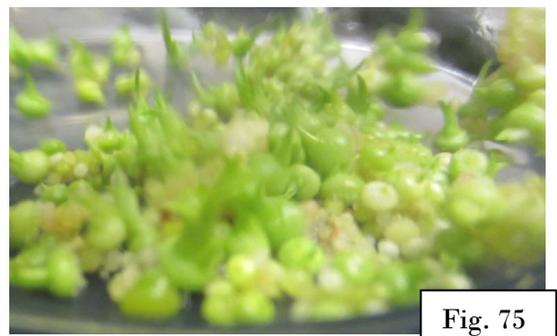


Fig. 75

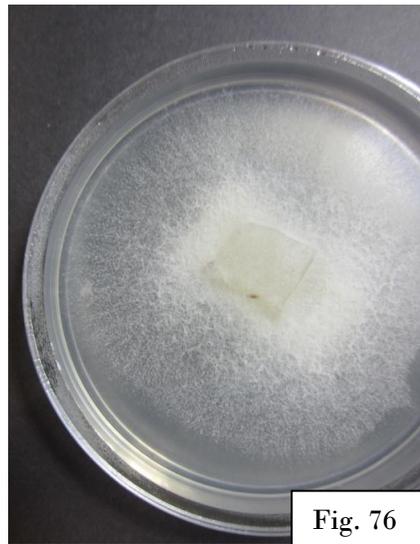


Fig. 76

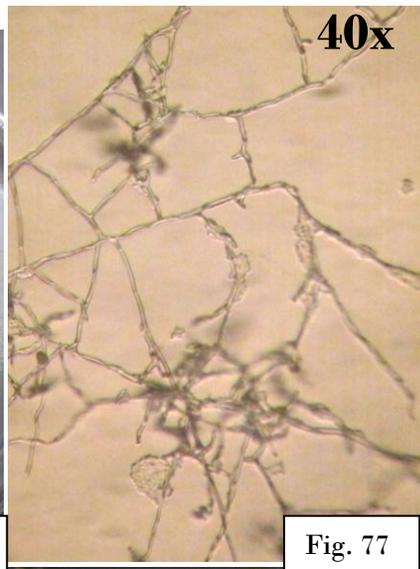


Fig. 77

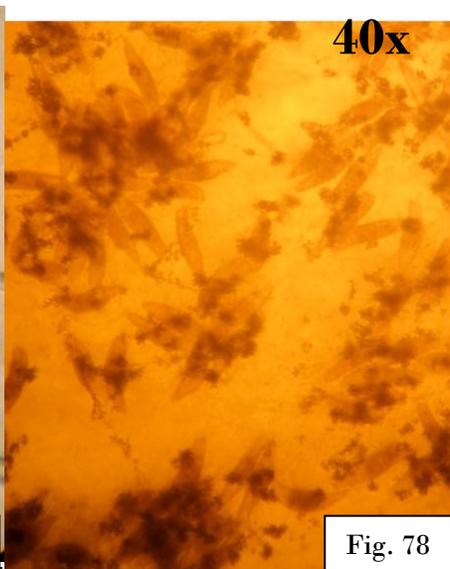


Fig. 78

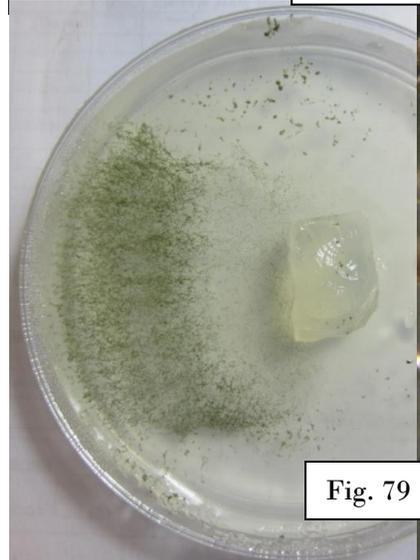


Fig. 79

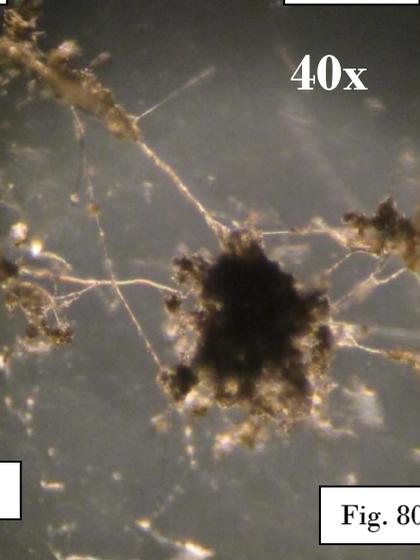


Fig. 80

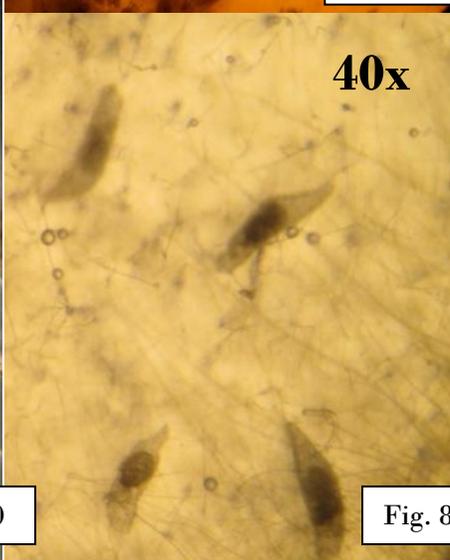


Fig. 81

6.5 GERMINACIÓN SIMBIÓTICA

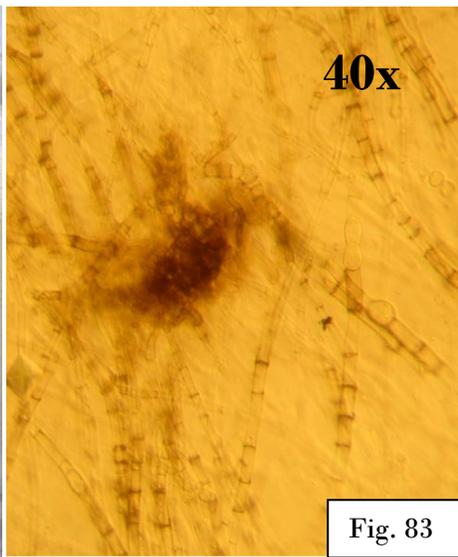
La cepa RCO630ESPFIM.6 (Figuras 76-78) en una semana coloniza toda la superficie del medio MBA. A los 40 días de cultivo creció sobre la superficie de la testa de las semillas, sobre la cual se apreció una masiva producción de conidios (Fig. 78);

igualmente, a los 30 días

inoculó superficialmente a los protocormos lo que provocó se necrosarán La cepa RCO1051:10FIM3 (Figura 79-80) no inoculó a las semillas (Figura 81). La cepa después de 72 h cubrió el medio de cultivo, para los protocormos después de 48 h fue patógena al invadirlos superficialmente y necrosarlos.



Fig. 82

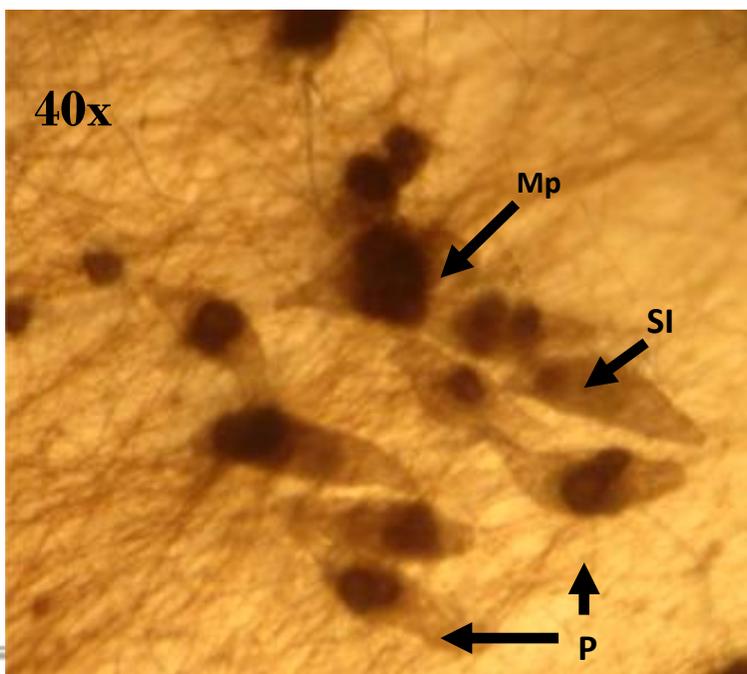


40x

Fig. 83

RC0624ESPFIM.4 (Figura 82-83) al cabo de 10 días de cultivo el hongo invade las semillas y las inocula aparentemente por la región del suspensor y coloniza al embrión (Figura 84), y después de 28 días en cultivo induce el desarrollo de protocormos

con una coloración verde más oscura que en los medios asimbióticos; esto transcurrió en un tiempo muy similar como sucedió en los medios de cultivo asimbióticos; sin embargo, los protocormos que se desarrollaron fueron de menor tamaño y con protuberancias que muestran cierta actividad epiparásita sobre las semillas (Figuras 85-88), es importante mencionar que una cepa con la misma morfología fue aislada de las raíces de una plántula colectada en campo; por otro lado, al extraer una muestra de este cultivo con protocormos inoculados con esta cepa para observarlos, bajo el microscopio, se notó que parte de las hifas formaban un entrelazado en la base del protocormo (Fig. 86). La cepa en cultivo puro generó estructuras parecidas a picnidios que se podrían confundir fácilmente con protocormos, pero al examinar detenidamente una de las muestras con semillas inoculadas con esta cepa se observó claramente como a partir de la testa emerge un protocormo con las características anteriormente mencionadas (Fig. 87-88). A los 60 días los protocormos se adquirieron una coloración marrón (Fig. 87-88) apreciando ser patógena. La cepa no inocula a los protocormos, éstos se necrosaron a los 8 días y no se observó la presencia de pelotones.



40x

Mp

SI

↑

P

Figura 84 Fotografía tomada a 40x donde se aprecia el suspensor inoculado (SI) lo que parecen pelotones dentro de la testa (P) y masas de pelotones en el embrión (MP).

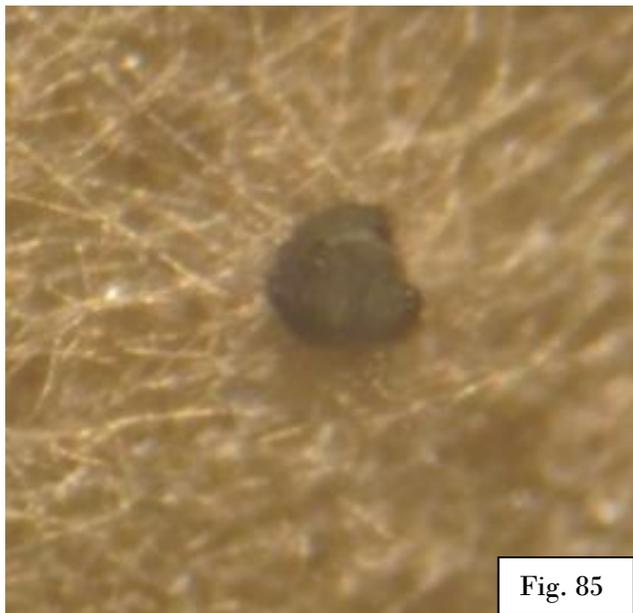


Fig. 85

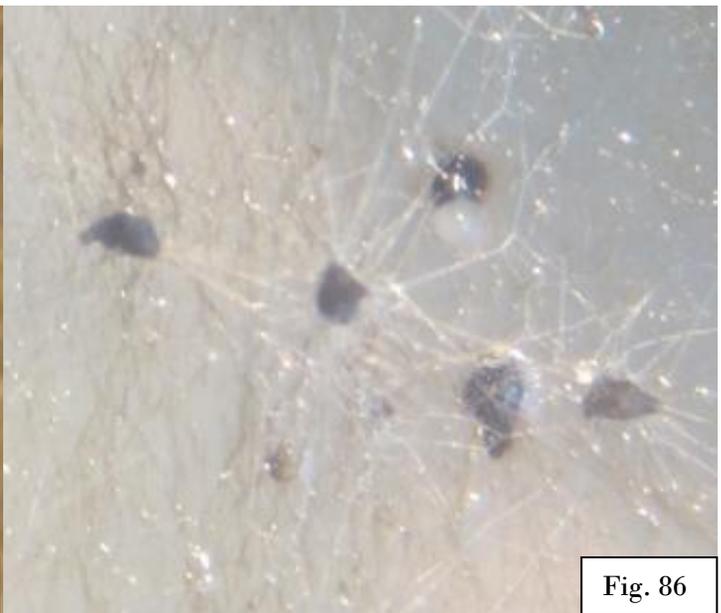


Fig. 86



Fig. 87

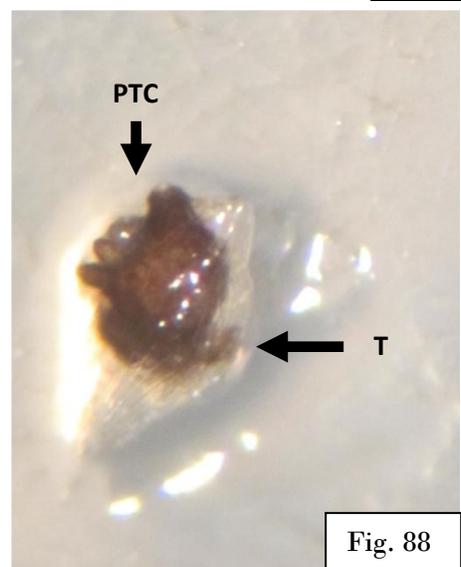


Fig. 88

Figuras 85-88. Fotografías tomadas al microscopio estereoscopio a 400x donde se aprecia al protocormo (PTC) con una morfología anormal y de color marrón emergiendo de la testa (T). En la figura 93 se observan masas fúngicas dentro de la testa (MF), y un embrión dentro de la testa necrosado (E).



Fig. 89

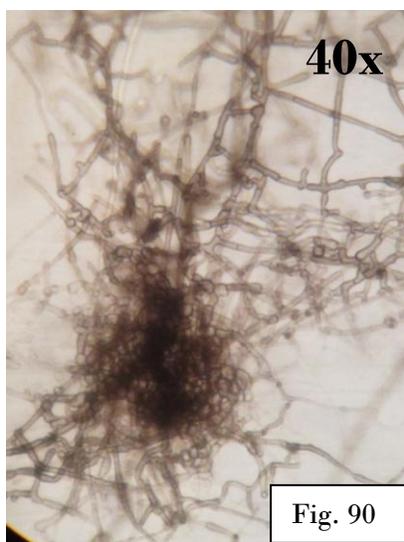


Fig. 90

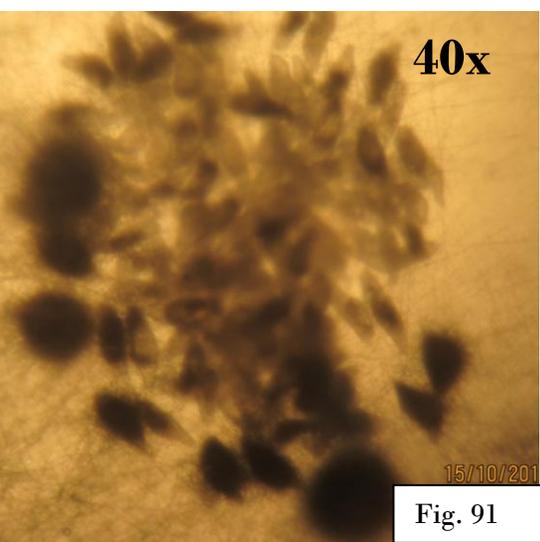


Fig. 91

La cepa RCRAIZ04FIM (Fig. 89-90) invade a las semillas en un lapso de 48 h (Fig. 91) y después de 72 h invade todo el medio de cultivo; al cultivarse esta cepa con los protocormos, la cepa fue patógena al cabo de 36 h.



Fig. 92

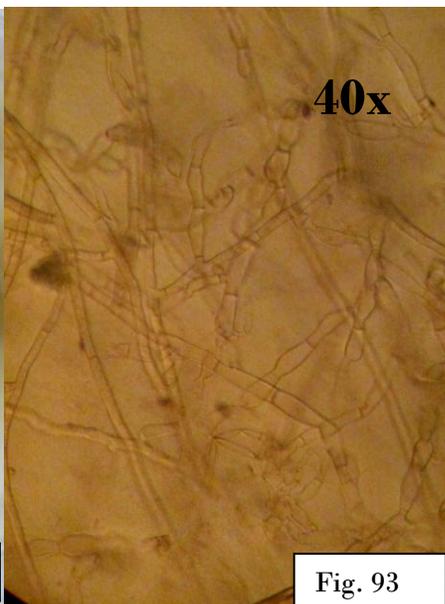


Fig. 93



Fig. 94

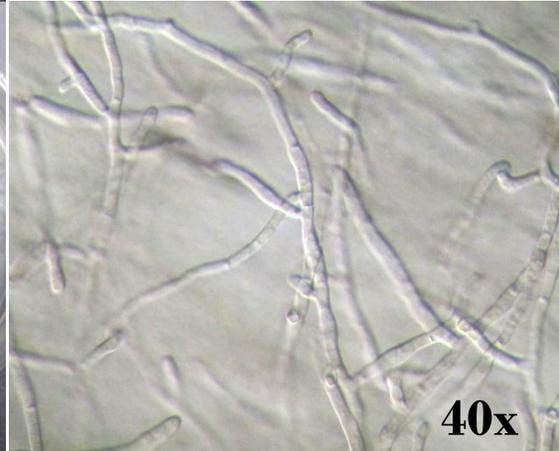
La cepa RCRAIZ01FIM (Fig. 92-94) en cultivo puro muestra exudados; sin embargo a los 45 días no fue capaz de inocular las semillas o inducir la germinación (Fig.91), los protocormos se revisaron al cabo de 30 días y no presentaban pelotones en su interior, después de la quinceava semana pierden su clorofila.

RCRPTC1.2FIM



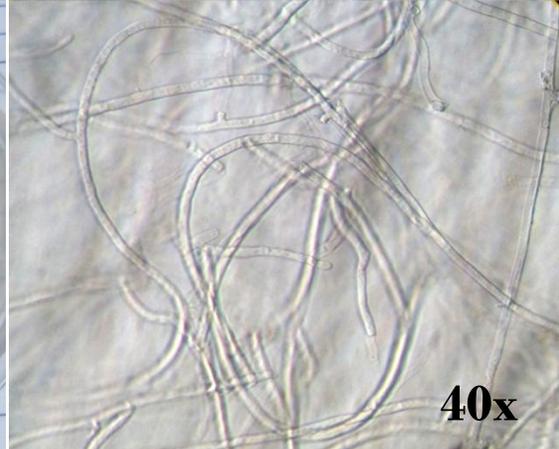
40x

RCRPTC2.1FIM



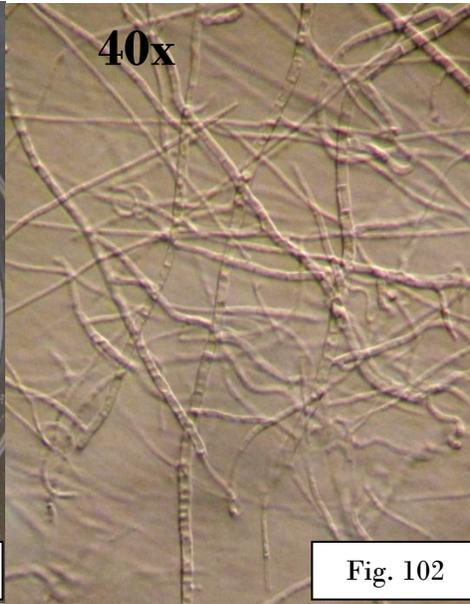
40x

RCRPTC6.2FIM



40x

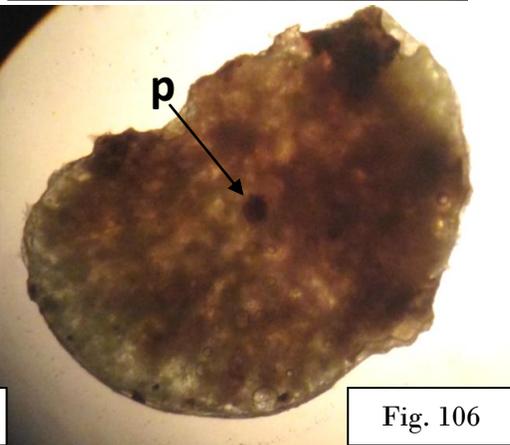
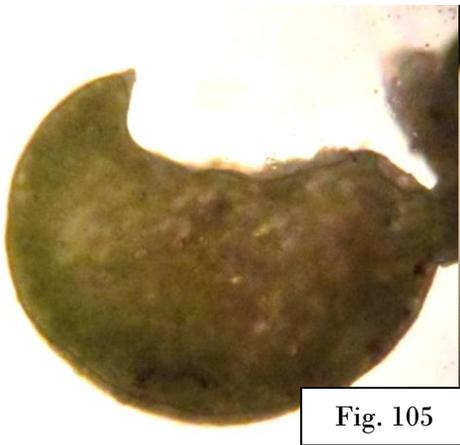
Las cepas RCRPTC1.2FIM01, RCRPTC2.1FIM y RCRPTC6.2FIM (Fig. 95-100) no inocularon a las semillas, ni a los protocormos y éstos pierden la clorofila después de 15 semanas de cultivo.

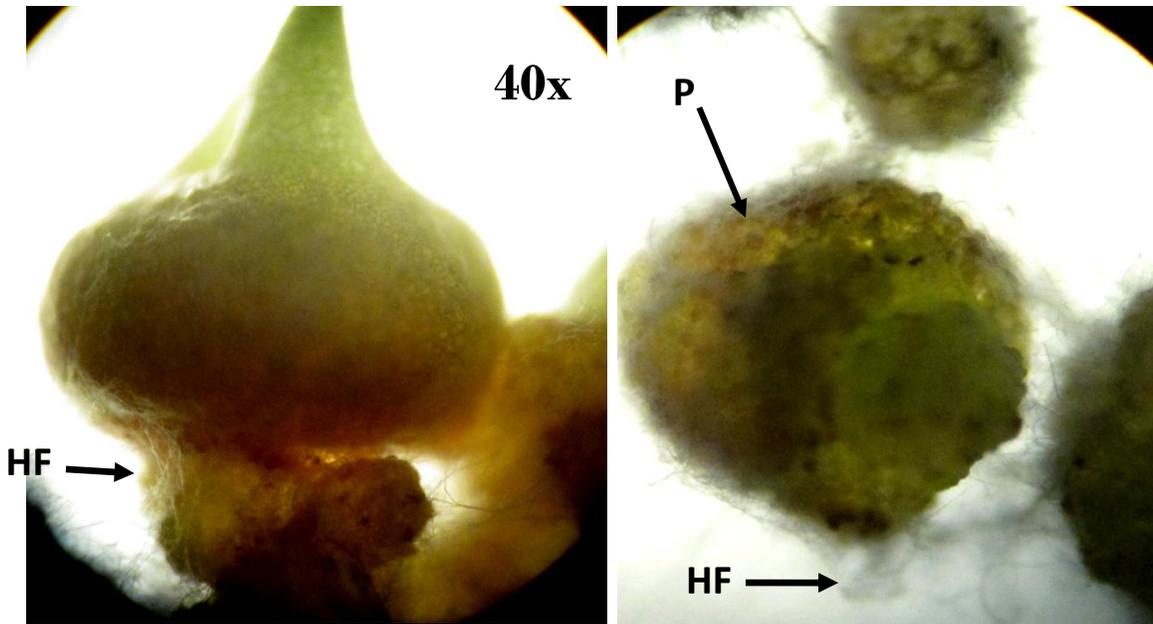


RCRPTC6.3FIM (Fig. 101-102), la cepa no inocula las semillas, pero sí a protocormos después de 12 días de cultivo, (Figuras 104 y 106); sin embargo, a los 17 días, resultó patógena.



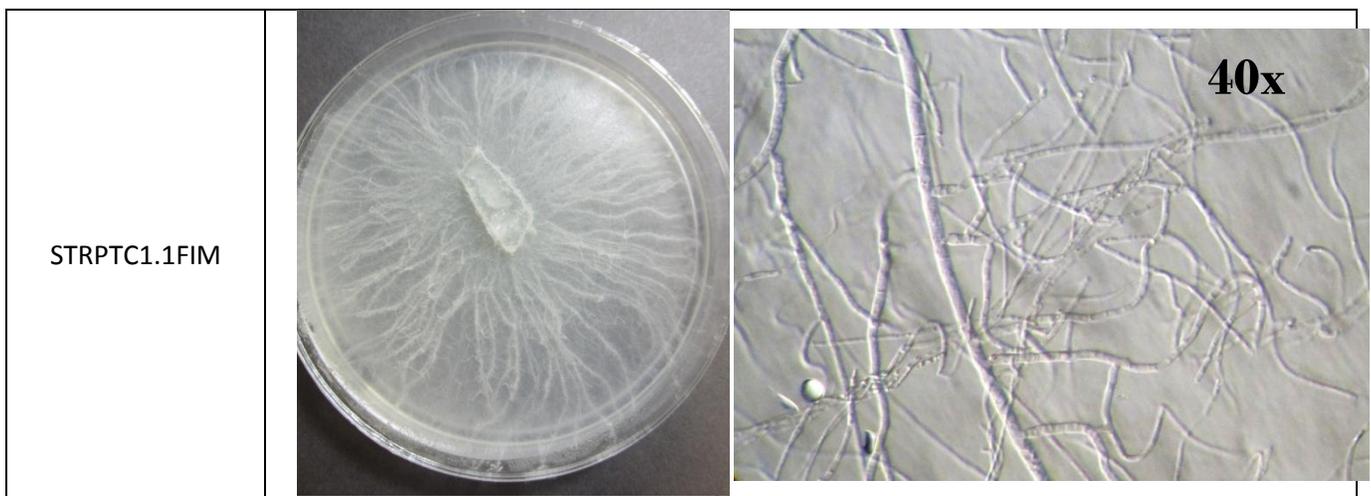
Figura 103 protocormo sembrado en MBA sin la adición de cepa (Testigo); **Figura 104** protocormo sembrado e inoculado con la cepa RCRPTC6.3FIM se observa en su base una coloración marrón sugiriendo estar inoculado; **figura 105** corte transversal de la base del protocormo testigo sin la presencia de pelotones, **Figura 106** corte transversal del protocormo inoculado donde se aprecia la presencia de pelotones (P) intracelulares.

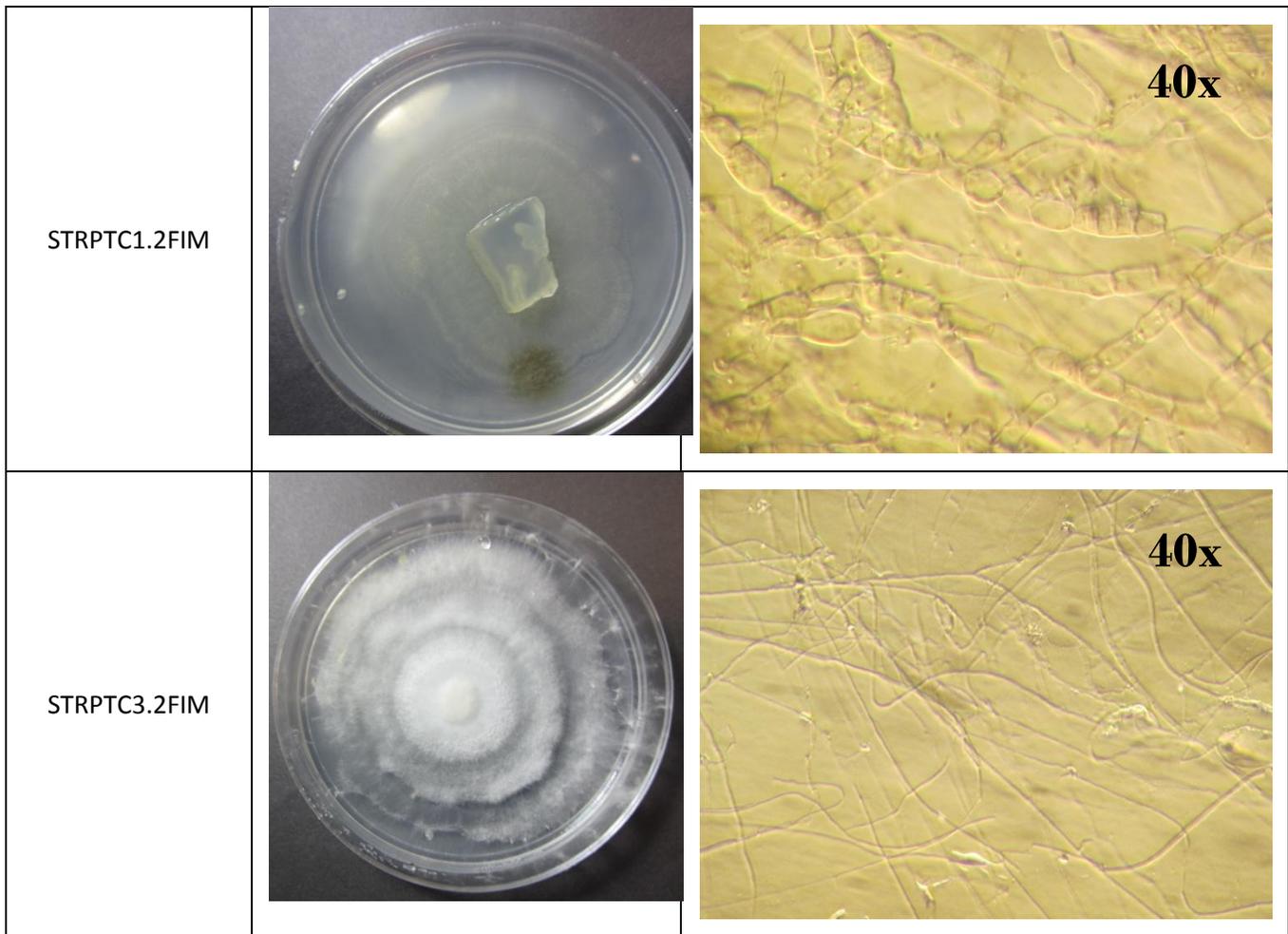




Figuras 107-108 protocormo con ápice donde se puede apreciar que la cepa coloniza la parte basal del protocormo con sus hifas (HF); Fig. 105 protocormo rodeado de hifas fúngicas (HF), por su coloración hialina se aprecia contra la luz los pelotones intracelulares (P)

Cuadro 3. Cepas obtenidas a partir de protocormos y reminiscencia de protocormos de *Stelis retusa*





6.6 ESPECIFICIDAD FÚNGICA

La especificidad fúngica ha sido un tema controversial durante muchos años; muchos investigadores coinciden que la relación orquídea-hongo no es la misma bajo condiciones *in situ* que *in vitro* (Knudson, 1922; Curtis, 1939; Hadley, 1970; Masuhara & Katsuya 1989, Masuhara *et al.*, 1993; 1994; Taylor & Bruns, 1999; Taylor *et al.*, 2003; Bidartondo & Bruns, 2005). De manera similar es interesante observar que en las muestras traídas de campo un hongo con una morfología muy similar inoculó a las semillas de *Rhynchostele cervantesii*, mientras que bajo condiciones *in vitro* la cepa RC0624ESPFIM.4 fue la única capaz de estimular la ruptura de la testa y el desarrollo del embrión hasta protocormo. Sí bien, una cepa con exactamente la misma morfología fue extraída de las raíces y tuvo el mismo efecto sobre las semillas, la morfología de esta cepa es muy distinta a la observada en las trampas inoculadas por hongos simbiotes. (Fig. 109)

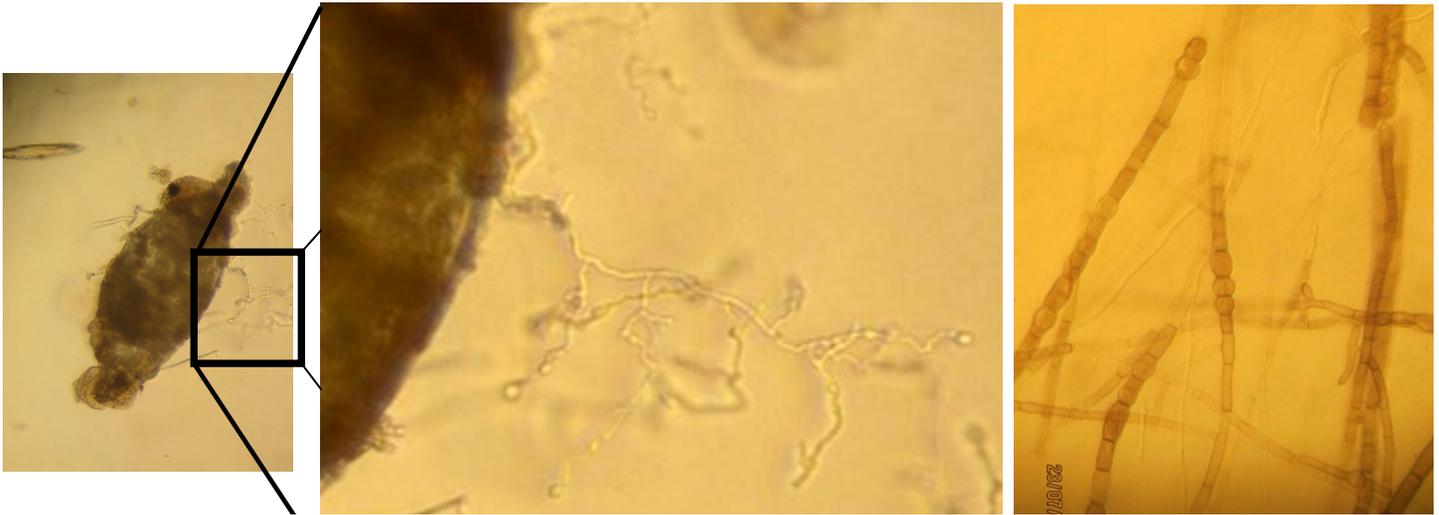


Fig. 109. Acercamiento de la figura 52.2 donde se aprecia como las hifas del hongo simbiote específico involucrado en germinación son bifurcadas y sinuosas comparas con la cepa RC0624ESPFIM.4 donde sus hifas son rectas y no bifurcadas.

En cambio la cepa RCRPTC6.3FIM fue capaz de inocular intracelularmente protocormos, pero no inocular o induce el desarrollo de los embriones de las semillas; hay que tomar en cuenta que muchos de los hongos empleados para estudios *in vitro* son obtenidos a partir de raíces de plantas adultas, existe la problemática de que las orquídeas cambian de simbiontes fúngicos conforme a su etapa de desarrollo (Milligan & Williams, 1988; Zettler, 1997, a,b; Rasmussen, 2002; Stewart *et al.*, 2003; Batty *et al.*, 2006); esto podría explicar porque en campo un solo hongo es capaz de inocular a las semillas y la razón por la cual cuando se aíslan hongos a partir del protocormo o reminiscencia del protocormo se obtienen cepas distintas; además, Zhu (2008) propuso otro método para aislar e individualizar pelotones a partir de las raíces, estableciendo que en ocasiones un solo pelotón puede tener más de un taxón de hongos. Así pues la cepa RCRAIZ01FIM en cultivo puro y al inocularlo con las semillas y protocormos fue capaz de secretar una sustancia sobre el medio de cultivo; esta sustancia fue muy similar a la observada sobre la superficie de las semillas inoculadas en campo; quizás el medio básico de avena no sea la mejor opción para evaluar si dichos exudados son capaces de estimular la germinación; la mejor opción sería probar un medio de cultivo elaborado a base de corteza, agua y agar ó lixiviados con agar, con esto se estaría simulando el sustrato natural y hábitat saprobio en donde ocurre la germinación; por otro lado, el MBA no tiene los suficientes nutrientes que estimulen la germinación. Sí bien, la existencia de exudados fúngicos que estimulan la tasa y porcentaje de germinación están bien establecidos *in vitro* (Rasmussen 1995; 1998) de acuerdo con Wolf (1933), Hollander (1932) y Harvais y Raitsakas (1975) los hongos micorrízicos de orquídeas necesitan cultivarse en altas concentraciones de taninos ó

humus ya que solo pueden aprovechar el nitrógeno de manera orgánica principalmente en forma de aminoácidos. Bernard (1909) establece que algunas cepas que han sido almacenadas por periodos de dos a tres años, pierden su potencial para inducir la germinación de las semillas; quizás esto, esté relacionado a que los hongos están almacenados en medios de cultivo con una baja disponibilidad de compuestos orgánicos y que para recuperar su propiedad para inducir la germinación de las semillas necesiten una recarga previa de compuestos orgánicos en forma de aminoácidos. Para ilustrar mejor este punto Rasmussen y Whigham (1998a) sembraron semillas de *Liparis lilifolia* sobre los medios asimbióticos sin ninguna respuesta; sin embargo las semillas germinaron cuando a estos medios se les adicionó el hongo micorrízico mostrando cierta relación hongo-semilla y una fuente externa de nutrientes.

Con respecto a las cepas obtenidas a partir de los protocormos de *Stelis retusa* fue interesante observar que algunas cepas son muy similares morfológicamente hablando a algunas encontradas en la reminiscencia del protocormo de *Rhynchostele cervantesii*, si bien estudios moleculares han arrojado que las orquídeas aclorofilas establecen ectomicorrizas con otras familias de plantas como *Ericaceae*, *Betulaceae*, *Fagaceae*, *Tiliaceae* y *Mirtaceae* (Berch *et al.*, 2002; Selosse *et al.*, 2002 *a*; Glen *et al.*, 2002), la evidencia de la última década indica que las orquídeas verdes también establecen relaciones ectomicorrizas de tipo epiparasíticas con los árboles circundantes (Taylor & Bruns, 1997; Selosse *et al.*, 2002; Selosse *et al.*, 2002; Gebauer & Meyer, 2003; Trudell *et al.*, 2003; Bidartondo *et al.*, 2004; Whitridge & Southworth 2005; Joloul *et al.*, 2005; Girlanda *et al.*, 2006; Abadie *et al.*, 2006). Los hongos involucrados son miembros de la Tulasnellaceae y Ceratobasidiaceae, se han mostrado como hongos ectomicorrizicos (Warcup 1985; 1991; Bidartondo *et al.*, 2003) siendo quizá los hongos endofíticos más comunes para orquídeas epífitas (Otero *et al.*, 2002, 2004; Ma *et al.*, 2003; Kristiansen *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2003,2005; Suarez *et al.*, 2006 Porras-Alfaro & Bayman, 2007; Zettler *et al.*, 2011); por lo que, no es de extrañar que en el mismo hábitat las orquídeas epífitas en este caso *Rhynchostele cervantesii* y *Stelis retusa* compartan endófitos que actúen como ectomicorrizas sobre la superficie del forófito, Por lo que la protección de las orquídeas requiere una protección complementaria de los forófitos asociados.

Habría también que mencionar que las orquídeas fotosintéticas tienden a ser específicas de un solo hongo dominante; para las epífitas son particularmente miembros de la Tulasnellaceae y Ceratobasidiaceae en contraste con las orquídeas micoheterotróficas que son simbioses de un amplio rango de micobiontes (Ma *et al.*, 2002; Otero *et al.*, 2002; McCormick *et al.*, 2004, 2006; Shefferson, 2005; Jolou *et al.*, 2005; Suarez *et al.*, 2006; Dearnaley, 2006). Aparentemente una alta especificidad va de la mano con la rareza (ó endemismo) de la orquídea; no obstante, hay que considerar que la dependencia a ciertos

hongos varia conforme el género, la especie, hábitos de crecimiento, estrategias reproductivas, fisiología y morfología (Brundrett *et al.*, 2003; Stewart & Kane, 2006; Bonnardeaux *et al.*, 2007); así como los microhábitats específicos que permiten el establecimiento de las orquídeas (Phillip *et al.*, 2011); estos atributos explicarían él porque *Epidendrum radicans* que es una trepadora, rastrera, florece todo el año, se autopoliniza, forma frutos relativamente grandes, tiene semillas con poliembrionia, forma keikis y es de amplia distribución y se establece en sitios perturbados, puede germinar y establecer simbiosis con ciertos hongos bajo condiciones *in vitro* aun siendo hongos procedentes de los forofitos de *Rhynchostele cervantesii*, y en una zona donde *Epidendrum radicans* no habita de manera natural; esto contrasta con la germinación simbiótica de *Rhynchostele cervantesii* que es una especie endémica, epífita, florece una vez al año por lo tanto forma cápsulas más pequeñas que *E. radicans* y libera las semillas de manera anual, su germinación simbiótica *in vitro* es muy difícil y requiere de mayores estudios, es una especie amenazada, su germinación en campo está regulada por las precipitaciones y la diversidad de hongos que trae como consecuencia, para poder encontrar un hongo específico que desencadene la germinación hasta protocormo.

Morfológicamente los protocormos de *Rhynchostele cervantesii* son casi glaucos tanto los observados en campo como los generados *in vitro* en los medios asimbióticos indicando que en esta primera etapa dependan del simbiote específico para su supervivencia; después de este estadio de protocormo transcurren, al utilizar el medio asimbiótico MS [50%], adicionado con 1 gL⁻¹ de carbón activado, alrededor de tres semanas para que del protocormo diferencie el primordio foliar y se generen rizoides en la base de la reminiscencia del protocormo; por lo que, muy probablemente este estadio *in situ* este fuertemente regulado por las precipitaciones, un aumento en la humedad relativa y el consecuente aumento estacional de los hongos presentes en el sustrato, es posible que al tener rizoides disminuya su especificidad fungica albergando a otros hongos estacionales.

Al visitar las instalaciones del orquidario Rio Verde, en donde nos atendió personalmente el Ingeniero Sandro Cusi, fue interesante constatar que tenía algunos híbridos del género *Rhynchostele*, muy probablemente de *Rhynchostele rosii* y *Rhynchostele bictoniensis* las cuales cultiva y pone en venta. Ante la necesidad de protocormos y semillas en cierta etapa del experimento y sabiendo que la especie se puede encontrar en el estado de México, se le preguntó si en las instalaciones cultivaba o tal vez la tenía en venta *Rhynchostele cervantesii*, él comentó que ya había intentado propagar a la especie y que resulta muy difícil tanto propagarla *in vitro* como en invernadero; recientemente se visitó el Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología (AMO) donde nos atendió el ilustrador y Biólogo Rolando Jiménez, cuando nos mostró el invernadero del Ingeniero Erick Hagstater se le preguntó si la especie se encontraba en la colección de invernadero,

a lo cual comentó, que cuando se cultiva tienden a decaer con el tiempo(los brotes nuevos se marchitan, no hay floración y terminan por morir), ante la curiosidad también se le preguntó si contaban con *Epidendrum eximium* a lo que respondió que era una especie rara de bosques templados y que le pasaba exactamente lo mismo que a *R. cervantesii* en cultivo de invernadero. Por lo que muy probablemente las orquídeas epífitas raras o endémicas que pertenecen a bosques templados o estacionales requieren para su supervivencia aún en la etapa adulta de ciertos recambios de floras micobianas estacionales y por ello hace difícil su cultivo y propagación aún bajo condiciones de invernadero.



Figuras 110-112.
Híbridos del género
***Rhynchostele*.**

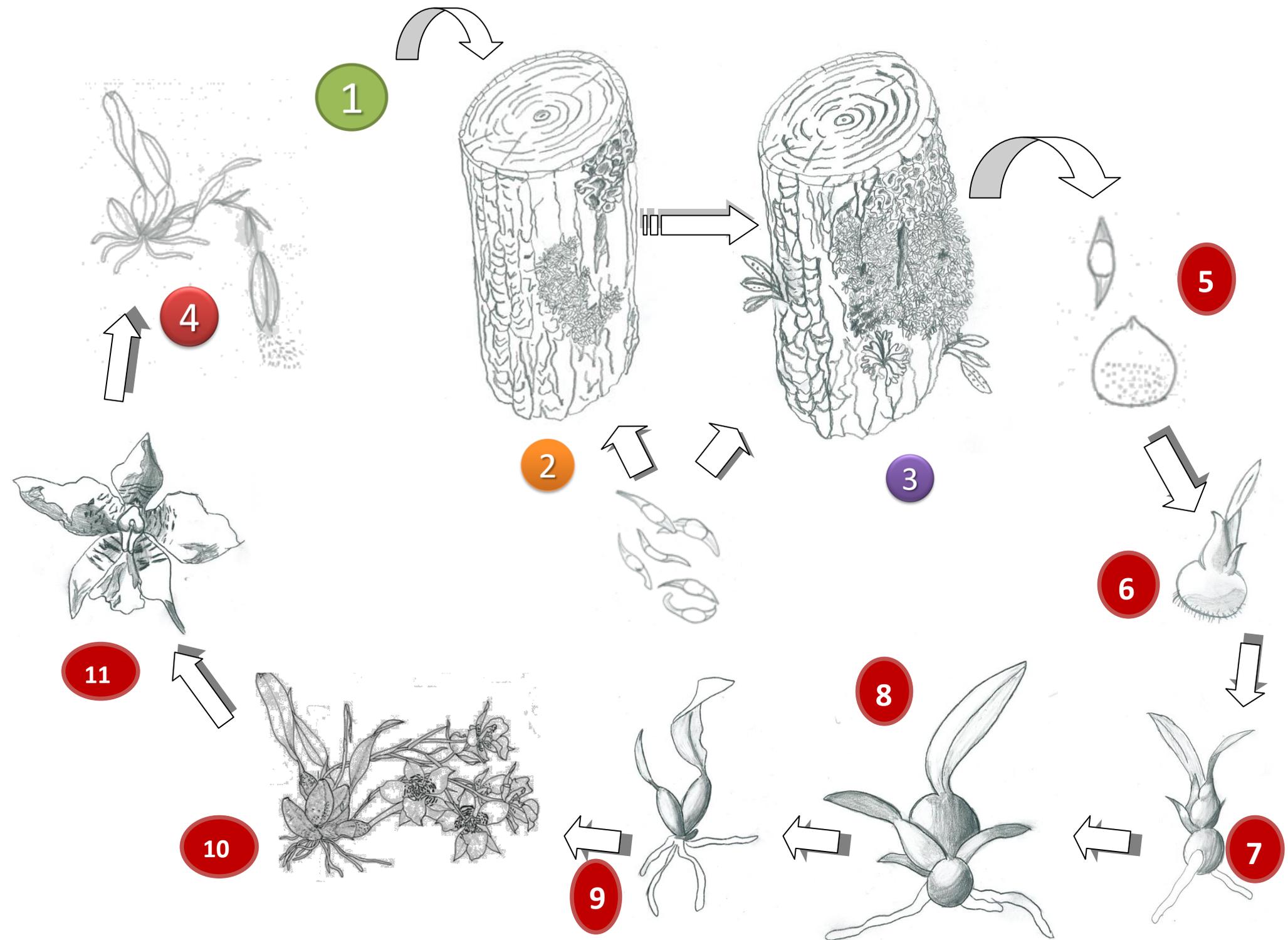
Figura 113.
Rhynchostele rosii
cultivados con fines
comerciales en las
instalaciones de Rio
verde en Temascaltepec
(Estado de México).

7.0 CONCLUSIONES

-  La trampa para micorrizas fue útil para la inoculación *in situ* de semillas de *Rhynchostele cervantesii* con diversos endófitos.
-  La inoculación *in situ* de las semillas indujo diferentes estadios de desarrollo durante su germinación como son embriones hinchados, embriones hinchados con ruptura de testa y protocormos
-  La gran cantidad de hongos aislados a partir de embriones y protocormos inoculados *in situ* dentro de las trampas impiden la purificación de endófitos específicos para la germinación.
-  De las 22 cepas aisladas y purificadas de las trampas solo una indujo la germinación simbiótica *in vitro*.
-  Ninguno de los 27 endófitos aislados y purificados a partir de raíces y reminiscencias de protocormos colectados *in situ* indujo la germinación simbiótica de semillas de *R. cervantesii*, sin embargo, uno fue endófito de los protocormos.
-  Las condiciones climatológicas específicas y estacionarias *in situ* condicionan la diversidad de hongos aislados, tanto de las trampas como de los protocormos de *Rhynchostele cervantesii*, ya que a mayor humedad relativa y precipitaciones mayor diversidad de micobiontes.
-  Para que la germinación e inoculación simbiótica de *Rhynchostele cervantesii* tenga éxito es indispensable un sustrato adecuado (capas densas de líquenes y Musgos) sobre los forofitos de *R. cervantesii* que proporcionen un microhábitat con mayor diversidad de micobiota.
-  *Rhynchostele cervantesii* inicia la germinación asimbiótica en el medio de cultivo Murashige y Skoog, a los 14 días de cultivo.
-  La especificidad fúngica *in vitro* ofrece distintas condiciones que las *in situ*.
-  Las semillas de *Rhynchostele cervantesii* son inoculadas por una micorriza específica que bajo condiciones naturales estimula la germinación y desarrollo de los primeros estadios.

 *Rhynchostele cervantesii* es una especie con requerimientos fúngicos nutricionales y estacionales de los cuales deriva su endemismo así como la dificultad para su cultivo, al ser una especie amenazada requiere de una mejor conservación.

 Con el presente estudio se aportan conocimientos sobre los requerimientos estacionales y fúngicos para fines de reintroducción de *Rhynchostele cervantesii*



Anexo 1

Ciclo de vida de *Rhynchostele cervantesii*

1. El forófito germina en el suelo del bosque, a partir de este momento sobre sus raíces tallo y hojas crecen ciertas bacterias y hongos microscópicos; a medida que crece desarrolla una capa de ritidioma aumentando gradualmente la diversidad de microorganismos.
2. El tiempo, las condiciones y las relaciones simbióticas favorecen la colonización de organismos más complejos tal vez los primeros colonizadores macroscópicos sean los líquenes seguido de los musgos. Con el tiempo se establecen organismos más complejos como los helechos
3. Durante las estaciones algunos organismos epifitos (principalmente musgos y líquenes) crecen y/o mueren dejando atrás materia orgánica (inclusive las capas más gruesas de ritidioma del forófito) que los hongos (como *Rhizoctonia*) y las bacterias aprovechan para degradar en forma de lixiviados.
4. Durante la primavera las flores de las orquídeas circundantes son polinizadas, a la primavera del siguiente año el fruto madura dispersando las millones de semillas.
5. Las semillas pueden instalarse en un forófito con poco ritidioma (dibujo 2) corriendo el riesgo de estar más expuestas a condiciones climáticas adversas provocando la muerte del embrión o bien pueden instalarse en un forófito con una densa capa de musgo (dibujo 3), donde las semillas formaran un pequeño banco.

A finales de verano y principios de otoño aumentan las precipitaciones y con ellas las escorrentías que contienen nutrientes en forma de lixiviados; la diversidad de hongos presentes en los forófitos comienza a aumentar; las semillas pueden llegar a protocormo sin la necesidad de estar inoculadas o bien encuentran a la micorriza adecuada y comienza a desencadenarse el proceso de germinación y desarrollo.

Aparentemente durante el invierno aquellas semillas que llegaron a protocormo y se establecieron en un sustrato adecuado tienen más posibilidades de sobrevivir hasta finales de primavera cuando se reanudan las lluvias.

6. Quizás al año siguiente y con las primeras precipitaciones se elonga el primordio foliar y se desarrolla un denso tapete de rizoides en la base del protocormo, teniendo la probabilidad de emplear otros hongos por medio de los rizoides, fisiológicamente en este estadio es más dependiente de la micoheterotrofia que de la autótrofia.

7. En este estadio aparece el primer brote vegetativo en posición apical a partir de la reminiscencia del protocormo, emergen las primeras raíces; la reminiscencia del protocormo está llena en su totalidad de células de digestión aparentemente la plántula en esta etapa aumenta la cantidad de endófitos que puede emplear, (esto puede corroborarse por la cantidad de endófitos aislados de la reminiscencia del protocormo, posiblemente tenga que pasar otro año para llegar al siguiente estadio ya que esta fase fue encontrada a principios de primavera).

8. Cuando se reinician las lluvias se desarrolla del primer pseudobulbo a partir de la digestión de los hongos que se encuentran en la reminiscencia del protocormo, las raíces, y los nutrientes en forma de lixiviados que pueda absorber por la rizosfera. *In vitro* se desarrollan rápidamente brotes vegetativos y la reminiscencia del protocormo es de un tamaño despreciable comparada con la plántula colectada y observada en campo. Cuando llega el principio del invierno y finales del verano, las condiciones no son las óptimas, la reminiscencia del protocormo es digerida en su totalidad, gradualmente la plántula se vuelve autótrofa, y el pseudobulbo se convierte en un órgano de almacenamiento de agua y nutrientes que permitirán la supervivencia de la plántula.

9. Al año siguiente se ha generado otro pseudobulbo, las estaciones influyen sobre la diversidad de endófitos inoculados en la raíz pudiendo emplear diversas micorrizas; fisiológicamente se establece un balance entre la micotrofia-autotrofia en una simbiosis del tipo equilibrada, esta estrategia es usada durante años hasta llegar a la etapa de floración.

10. Es posible la etapa de floración así como la supervivencia de la especie dependa de ciertos suministros fúngicos almacenados por años en los pseudobulbos como Nitrógeno, Fosforo y Potasio, (Al ser una especie de difícil cultivo); El hongo micorrízico que desencadena la germinación posiblemente se reproduzca en la rizosfera o en los estomas de plantas adultas y las esporas son transportadas por el viento para colonizar nuevos forófitos).

11. Para completar el ciclo entra el polinizador, los cambios que acontecen la post-polinización consiste en el descenso de las alas de la columna desde una posición de 50° hasta una de 20° con respecto a un eje central, cubriendo así la cavidad estigmática, mediante la hinchazón de la cabeza de la columna; el proceso se desarrolla en un lapso de 48 hrs. La capsula tarda en desarrollarse y madurar 11 meses hasta la primavera siguiente cuando las semillas son nuevamente dispersadas por el viento.

Anexo 2.

Composición de medios para micorrizas

Cuadro 1. Componentes del medio FIM (Fungal Isolated Media)

Sales inorgánicas		gr/L
Nitrato de calcio tetra hidratado	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	0.5
Fosfato ácido de potasio	KH_2PO_4	0.2
Cloruro de potasio	KCl	0.1
Sulfato de magnesio	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1
Constituyentes Orgánicos		
Extracto de levadura		0.1
Agar bacteriológico		5.0
pH	4.5	

Cuadro 2. Componentes del medio Papa Dextrosa Agar (PDA).

Constituyentes Orgánicos	gr/L
Trozos de papa	200.0
Dextrosa	20.0
Agar bacteriológico	5.0
pH	5.6

Cuadro 3. Componentes del medio Básico de Avena (MBA).

Para siembra de semillas y hongo micorrízico.

Constituyentes Orgánicos	gr/L
Polvo de avena	3.5
Extracto de levadura	0.1
Agar bacteriológico	5.0
pH	5.5

Anexo 3.

Composición del Medio de cultivo Murashige & Skoog (MS).

MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE & SKOOG (MS) (1962)		
	[100%]	[50%]
CONSTITUYENTES INORGANICOS	mg/l	mg/l
<i>Macronutrientes</i>		
MgSO₄·7H₂O	370.0	185.0
NH₄NO₃	1650.0	825.0
KH₂PO₄	170.0	85.0
KNO₃	1900.0	950.0
CaCl₂·2H₂O	440.0	220.0
<i>Micronutrientes</i>		
ZnSO₄·7H₂O	8.6	4.15
CoCl₂·6H₂O	0.025	0.0125
H₃BO₃	6.2	3.1
MnSO₄H₂O	22.3	11.15
CuSO₄·5H₂O	0.025	0.0125
Na₂MoO₄·2H₂O	0.25	0.125
KI	0.83	0.415
Na₂EDTA	37.3	18.65
FeSO₄·7H₂O	27.8	13.9
CONSTITUYENTES ORGANICOS		
<i>Vitaminas</i>		
Tiamina HCl (B₁)	0.4	0.2
Niacina	0.5	0.25
Piridoxina HCl (B₆)	0.1	0.05
<i>Hexitol o azúcar alcohol</i>		
Myo-Inositol	100.0	50.0
<i>Carbohidrato</i>		
Sacarosa	30,000.0	15,000.0
<i>Agente gelificante</i>		
Agar-gel (Sigma)	5,000.0	5,000.0
pH	5.7	5.7

8.0 ∞ BIBLIOGRAFIA ∞

- ❖ Abadie J-C., Püttsepp Ü., Gebauer G., Faccio A., Bonfante P. & Selosse M-A. 2006. *Cephalanthera longifolia* (Neottieae, Orchidaceae) is mixotrophic: a comparative study between green and nonphotosynthetic individuals. *Can J Bot* 84:1462-1477.
- ❖ Aguirre L. E. 1977. *Odontoglossum cervantesii*. *ORQUIDEA* (Méx) 6 (10) 293-324.
- ❖ Alexander C. & Hadley G. 1983. *Variation in symbiotic activity of Rhizoctonia isolates from Goodyera repens mycorrhizas*. *Transactions of the British Mycological Society* 80: 99-106.
- ❖ Alexander C., Alexander I. J. & Hadley G. 1984. *Phosphate uptake in relation to mycorrhizal infection*. *New Phytologist*, 97, 401-11.
- ❖ Allen M.E. 1996. *The ecology of arbuscular mycorrhizas a look back into the 20th century and a peek into the 21 st. Mycol Res.* 100. 769-782.
- ❖ Ando H. & Matsuo A. 1984. *Applied bryology*. *Advances in Bryology*. 2. 133-224.
- ❖ Ames, O. 1922. *Notes on New England orchids II. The mycorrhiza of Goodyera pubescens*. *Rhodora* 24: 37–46.
- ❖ Andersen T.F. 1990. *A study of hyphal morphology in the form genus Rhizoctonia*, *Mycotaxon*. 37: 25-46.
- ❖ Andersen T.F., 1996. *A comparative taxonomic study of Rhizoctonia sensu lato employing morphological, ultrastructural and molecular methods*. *Mycological Research*, 100, 1117-1128.
- ❖ Andrade, G; DeLeij, FAAM; Lynch, JM. 1998. *Plant mediated interactions between Pseudomonas fluorescens, Rhizobium leguminosarum and arbuscular mycorrhizae on pea*. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 311-316.
- ❖ Andronova E. V. 2003. *In situ seed germination of Dactylorhiza maculata s.l. (Orchidaceae)*. *Bot. Zh* 88: 63-71
- ❖ Arditti, J. 1992. *Fundamentals of orchid biology*. John Wiley, New York. U.S.A.
- ❖ Arditti, J., Ghani, A.K.A., 2000. *Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications*. *New Phytologist* 145, 367-421.
- ❖ Asakawa Y. 1990. *Terpenoids and aromatic compounds with pharmacological activity from bryophytes*. In *bryophytes their chemistry and chemical taxonomy*, (eds H.D. Zinsmeister and R. Mues), pp 369-410. Oxford Science Publications.
- ❖ Athipunyakom P., Manoch L., Piluek C., Artjariyasripong S. & Tragulrung S. 2004. *Mycorrhizal Fungi from Spathoglottis plicata and the Use of these Fungi to Germinate Seeds of S. plicata in vitro*. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 37 : 83 – 93
- ❖ Augé R.M., 2001. *Water relations, drought and VA mycorrhizal symbiosis*. *Mycorrhiza* 11: 3–42.
- ❖ Bansal M. & Mukerji K.G. 1994. *Positive correlation between Vam-Induced changes in root exudation and micorrhizosphere mycoflora*. *Mycorrhiza* 5: 39-44.

- ❖ Barroso J. & Pais M.S.S. 1985. *Cytochimie. Caractérisation cytochimique de l'interface hôte/endophyte des endomycorrhizes d'Ophrys lutea. Rôle de l'hôte dans la synthèse des polysaccharides*. Annales des Sciences Naturelles, Botanique 13, 237-44.
- ❖ Barroso J., Chaves N. H. & Pais M. S. S. 1986. *Production of indole-3-ethanol and indole-3-acetic acid by the mycorrhizal fungus of Ophrys lutea (Orchidaceae)*. New Phytologist, 103, 745-9.
- ❖ Barroso J., Chavez N. H. & Pais M. S. S. 1986. *Ultrastructural, cytochemical and biochemical aspects related to the formation of O. lutea endomycorrhizae*. In Physiological and genetical aspects of mycorrhizae, ed. V. Gianinazzi-Pearson & S. Gianinazzi, pp. 265-8. Paris:INRA
- ❖ Barroso J. & Pais M. S. S. 1987. *Coated vesicles in the cytoplasm of the host cells in Ophrys lutea Cav. Mycorrhizas (Orchidaceae)*. New Phytologist, 105, 67-70.
- ❖ Barroso J. 1988. *Micorrizas em Ophrys lutea Cav. Aspectos citológicos, citoquímicos e bioquímicos da interacção hospede/hospedeiro*. Doctoral thesis. Lisbon.
- ❖ Barroso J. & Pais M.S.S.1990. *Nuclear features in infected roots of Ophrys lutea Cav. (Orchidaceae)*. New Phytologist, 115, 93-8.
- ❖ Batty A.L., Dixon K.W., Brundett M. & Sivasithamparam K. 2002. *Orchid conservation and mycorrhizal associations*. Microorganism in plant conservation and biodiversity. Kluwer Academic Publishers. 205-2335.
- ❖ Batty A.L., Brundrett M.C., Dixon K.W. & Sivasithamparam K. 2006. *New Methods to improve symbiotic propagation of temperate terrestrial orchid seedlings from axenic culture to the soil*. Austr. J. Bot. 54: 367-374.
- ❖ Bayman P., Gonzales E.J., Fumero J.J. & Tremblay R.L. 2002. *Are fungi necessary? How fungicides affect growth and survival of the orchid Lephantes rupestris in the field*. Ecol 90:1002-1008.
- ❖ Beau C. 1920. *Sur le role trophique des endophytes d'orchidées*. compte Rendu Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences Paris, 171, 675-7.
- ❖ Beck-Nielsen D. & Madsen T.V. 2001. *Occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhiza in aquatic macrophytes from lakes and streams*. Aquatic Botany 71, 141-148.
- ❖ Bentivenga S.P. & Hetrick B.A. 1992. *Seasonal and temperatura effects on mycorrhizal activity and dependence of cool and warm season tallgrass prairie grasses*. Can J Bot 70:1596-1602.
- ❖ Benzing D. H. & Friedman W.E. 1981. *Mycotrophy: it's occurrence and possible significance among epiphytic Orchidaceae*. Selbyana 5, 243-247.
- ❖ Benzing D.H. & Atwood J.T. Jr. 1984. *Orchidaceae; ancestral habitats and current status in forest canopies*. Systematic Botany. 9: 155-65.
- ❖ Benzing, D. H. 1990. *Epiphytism: a preliminary overview*. In *Vascular epiphytes. General biology and related biota* (ed. P. S. Ashton, S. P. Hubbell, D. H. Janzen, A. G. Marshall, P. H. Raven & P. B. Tomlinson), Cambridge University Press. pp. 1-42.
- ❖ Berch S.M., Allen T.R., Berbee M.L. 2002. *Molecular detection, community structure and phylogeny of ericoid mycorrhizal fungi*. Plant Soil 244:55-66
- ❖ Bernard, N. 1899. *Sur la germination du Neottia nidus-avis*. Compte Rendu Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences, Paris 128: 1253-1255.
- ❖ Bernard N. 1902. *Étude sur la tubérisation*. Revue Générale de Botanique, 14, 5-25,58-71,101-19, 170-83, 219-34, 269-79.
- ❖ Bernard N. 1904. *Recherches expérimentales sur les orchidées*. La germination des orchidées. Revue Générale de Botanique, 16, 405-51, 458-75.

- ❖ Bernard N. 1909. *L'évolution dans la symbiose, les orchidées et leurs champignons commensaux*. Ann. Sci. Nat. Bot., Sér 9, 9:1-196.
- ❖ Bernard N. 1911. *Sur la fonction fongicides des bulbes d'ophytodes*. Ann Sci Natl Bot 14:221–234
- ❖ Bertolini V., Damon A. & Rojas Velaquez A.N. 2011. *Symbiotic germination of three species of epiphytic orchids susceptible to genetic erosion, from Soconusco (Chiapas, Mexico)*. European Journal of Environmental Sciences. 2: 60-68.
- ❖ Beyrle H., Penningsfeld F. & Hock B. 1985. *Orchideenmykorrhiza; symbiotische Anzucht einiger Dactylorhiza-arten*. Zeitschrift für Mykologie, 51, 185-98.
- ❖ Beyre H., Penningsfeld F. & Hock B. 1991. *The role of nitrogen concentration in determining the outcome of the interaction between Dactylorhiza incarnata (L.) Soo and Rhizoctonia*. New Phytologist. 117. 665-72.
- ❖ Beyrle H. F., Smith S. E., Peterson R. L. & Franco C. M. M. 1995. *Colonization of Orchis morio protocorms by a mycorrhizal fungus: Effects of nitrogen nutrition and glyphosate in modifying the responses*. Can. J. Bot. 73, 1128–1140.
- ❖ Bidartondo M. I. & Bruns T. D. 2005. *On the origins of extreme mycorrhizal specificity in the Monotropoideae (Ericaceae): performance trade-offs during seed germination and seedling development*. Mol. Ecol. 14:1549–1560.
- ❖ Bidartondo MI, Bruns TD. 2001. *Extreme specificity in epiparasitic Monotropoideae (Ericaceae): Widespread phylogenetic and geographic structure*. Molecular Ecology 10: 2285–2295.
- ❖ Bidartondo M.I., Bruns T.D., Weiß M., Sergio C. & Read D. J. 2003. *Specialised cheating of the ectomycorrhizal symbiosis by an epiparasitic liverwort*. Proc. Royal Soc. Lond B 270:835-842.
- ❖ Bidartondo M.I., Burghardt B., Gebauer G., Bruns T. D. & Read D. J. 2004. *Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees*. Proc Royal Soc Lond B 271:1799-1806
- ❖ Black R.A. & Bliss L.C. 1980. *Reproductive ecology of Picea mariana (Mill) B.S.P., at tree line near Inuvik, Northwest Territories, Canada*. Ecological monographs. 50 331-54.
- ❖ Blakeman J. P., Mokahel M. A., & Hadley G. 1976. *Effect of mycorrhizal infection on respiration and activity of some oxidase enzymes of orchid protocorms*. New Phytologist, 77, 697-704.
- ❖ Blasius D., Feil W., Kottke I. & Oberwinkler F. 1986. *Hartig net formation in fully ensheated ectomycorrhizas*. Nordic J Bot 6, 837-842.
- ❖ Blaszkowski J. 1994. *Arbuscular fungi and mycorrhizae (Glomales) of the hel Peninsula Poland*. Mycorrhiza 5: 71-88.
- ❖ Bobbink R., Hornung M. & Roelofs J.M.G. 1998. *The effects of air-borne nitrogen pollutants on species diversity in natural and semi-natural European vegetation*. Journal of Ecology 86: 717-738.
- ❖ Boller A., Corrodi H., Gäumann E., Hardegger E., Kern H. & Winterhalter-Wild N. 1957. *Über induzierte Abwehrstoffe bei Orchideen*. In Proceedings of the 2nd European Orchid Congress, PP. 74-8 Paris.
- ❖ Bonnardeaux Y., Brundrett M., Batty A., Dixon K., Koch J. & Sivasithamparam K. 2007. *Diversity of mycorrhizal fungi in terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions*. Mycol Res 111:51-61.
- ❖ Borris H. 1969. *Samenvermehrung und Anzucht europäischer Erdorchideen*. In proceedings of the 2nd European Orchid Congress, pp. 74-8. Paris.
- ❖ Borris H., Jeschke E. M. & Bartsch G. 1971. *Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Ultrastruktur der Orchideen-Mykorrhiza*. Biologische Rundschau, 9, 177-80.

- ❖ Bougoure J.J. & Dearnaley J.D.W. 2005. *The fungal endophytes of **Dipodium variegatum** (ORCHIDACEAE)*. Australasian mycologist 24:(1) 15-19.
- ❖ Bramwell, D. 2002. *How many plant species are there?* P1. Talk 28, 32-33.
- ❖ Brundrett M. C. 1991. *Mycorrhizas in natural ecosystems*. Advances in Ecological Research 21, 171–313.
- ❖ Brundrett M. C. 2002. *Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants*. New Phytologist 154, 275–304.
- ❖ Brundrett M. C., Scade A., Batty L. A., Dixon W. & Sivasithamparam K. 2003. *Development of in situ and ex situ seed baiting techniques to detect mucorrhizal fungi from terrestrial orchids habitats*. Mycol Res 107: 1210-1220.
- ❖ Brundrett M. 2004. *Diversity and classification of mycorrhizal associations*. Biol Rev 79, 473-495.
- ❖ Burgues A. 1936. *On the significance of mycorrhiza*. New Phytologist. 35: 117-31.
- ❖ Burges A. 1939. *The defensive mechanism in orchid mycorrhiza*. New Phytologist 38, 273-83.
- ❖ Burgeff H. 1932. *Saprophytismus und Symbiose, Studien an tropischer Orchideen*. Gustav Fischer, Jena
- ❖ Burgeff H. 1936. *Samenkeimung der Orchideen*. Jena: Gustav Fischer.
- ❖ Burgeff H. 1909. *Die Wurzelpize der Orchideen, ihre Kultur und ihre Leben in der Pflanze*. Jena: Gustav Fisher.
- ❖ Cameron D.D., Leake J. R. & Read D. J. 2006a. *Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid **Goodyera repens***. New Phytologist. 171. 405-416.
- ❖ Cameron D.D., Jhonson I., Leake J.R. & Read D. J. 2006b. *Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid **Goodyera repens***. Ann. Bot. 99. 831-834.
- ❖ Cantelmo A.J. & Ehrenfeld, J. G. 1999. *Effects of microtopography on mycorrhizal infection in Atlantic white cedar (**Chamaecyparis thyoides** (L.) Mills.)*. Mycorrhiza 8, 175–180.
- ❖ Carleton T.J. & Read D.J. 1991. *Ectomycorrhizas and nutrient transfer in conifer feather moss ecosystems*. Canadian Journal of Botany 69: 778-785.
- ❖ Carlson M. C. 1940. *Formation of the seed of **Cypripedium parviflorum***. Botanical Gazette, 102, 295-301.
- ❖ Case F. W. 1964. *Orchids of the western Great Lakes region*. Cranbrook Institute of Science, Bloomfield Hills, MI.
- ❖ Castellano MA, Trappe JM. 1985. *Mycorrhizal associations of five species of monotropoideae in Oregon*. Mycologia 77: 499-502
- ❖ Cavagnaro T. R., Gao L.L., Smith F.A. & Smith S.E. 2001. *Morphology of arbuscular mycorrhizas is influenced by fungal identity*. New Phytol 151, 469-475.
- ❖ Chang Ch-N. D. & Chou L-CH. 2007. *Growth responses, enzyme activities, and component changes as influenced by Rhizoctonia Orchid mycorrhiza on Anoectochilus formosanus Hayata*. Botanical Studies 48: 445-451
- ❖ Chase, M. W. 1987. *Obligate twig epiphytism in the Oncidiinae and other neotropical orchids*. Selbyana 10, 24-30.
- ❖ Charman, D. J., Aravena, R., Bryant, C. L., & Harkness, D. D. 1999. *Carbon isotopes in peat, DOC, CO₂, and CH₄ in a Holocene peatland on Dartmoor, southwest England*. Geology 27: 539–542.

- ❖ Chasar, L. S., J. P. Chanton, P. H. Glaser, D. I. Siegel & J. S. Rivers. 2000. Radiocarbon and stable carbon isotopic evidence for transport and transformation of dissolved organic carbon, dissolved inorganic carbon, and CH₄ in a northern Minnesota peatland. *Global Biogeochemical Cycles* 14: 1095–1108.
- ❖ Chia-Chun H., Fu- Wen H. & Chen-Meng K. 2002. *Epiphyte biomass and nutrient capital of a moist subtropical forest in north-eastern Taiwan*. *Journal of Tropical Ecology* 18: 659-670.
- ❖ Clark D.L., Nadkarni N.M. & Gholz H.L. 1988. Growth, net production, litter decomposition, and net nitrogen accumulation by epiphytic bryophytes in a tropical montane forest. *Biotropica* 30: 12-23.
- ❖ Clark D.L., Nadkarni N.M. & Gholz H.L. 2005. Retention of inorganic nitrogen by epiphytic bryophytes in a tropical montane forest. *Biotropica* 37: 328-326.
- ❖ Clapperton M.J. & Read D.J. 1992. *A relationship between plant growth and increasing VAM mycorrhizal inoculum density*. *New Phytologist* 120, 227–234.
- ❖ Clements M.A. & Ellyard R.K. 1979. *The symbiotic germination of Australian terrestrial orchids*. *Am. Orchid Soc. Bull.*, 48. 810-816.
- ❖ Clements M.A. 1982. *The germination of Australian orchid seed*. In *Proceedings of the Orchid Symposium, 13th International Botanical Congress, Sidney*, ed. L. Lawer & R.D. Kerr, pp. 5-8. New South Wales: Orchid Society.
- ❖ Clements M.A, Muir H. & Cribb P.J. 1986. *A preliminary report on the symbiotic germination of European terrestrial orchids*. *Kew Bulletin* 41: 437-45.
- ❖ Clements M. A. 1988. *Orchid mycorrhizal associations*. *Lindleyana* 3: 73-86.
- ❖ Clymo R.S., Turunen J. & Tolonen K. 1963. Ion Exchange in sphagnum and its relation to bog ecology. *Annals of Botany* 27: 309-324.
- ❖ Collado J., Platas G., Gonzáles I., & Peláez F. 1999. *Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in Quercus ilex*. *New phytol.* 144: 525-532.
- ❖ Collins M., Brundrett M., Koch C. J. & Sivasithamparam K. 2007. *Colonisation of jarrah forest bauxite-mine rehabilitation areas by orchid mycorrhizal fungi*. *Australian Journal of Botany* 55(6) 653–664.
- ❖ CONANP. 2010. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, en <http://www.conanp.gob.mx> (Consultado en Marzo 2012).
- ❖ Constantin J. & Dufo L. (1920). *Sur la biologie du Goodyera repens*. *Revue Général de Botanique* 32:529-533.
- ❖ Cook R. 1977. *The Biology of Symbiotic Fungi*. John Wiley and Sons, London.
- ❖ Cornelissen J.H.C., Lang I.S., Soudzilovskaia N.A., & During H.J. 2007. *Comparative cryptogam ecology: A review of Bryophyte and lichen traits that drive biogeochemistry*. *Annals of Botany* 99: 987-1001
- ❖ Coxson D.S., McIntyre D.D. & Vogel H.J. 1992. *Pulse releases of sugars and polyols from canopy bryophytes in tropical montane rain forest Guadeloupe French West Indies*. *Biotropica* 24: 121-133.
- ❖ Craige J.S. & Maass W.S.G 1996. *The cation exchanger in sphagnum spp*. *Annals of Botany* 30. 153-154.
- ❖ Cribb P.J., Keel S.P., Dixon K. W. & Barrett R. L. 2003. *Orchid conservation a global perspective*. *Orchid conservation*. Natural History Publications (Borneo) Kota Kinabalu, Sabah. 1-24
- ❖ Currah R.S., Sigler L. & Hambleton S. 1987. *New records and taxa of fungi from the mycorrhizae of terrestrial orchids of Alberta*. *Canadian Journal of Botany*. 65: 2473-2482.

- ❖ Currah R. S., Hambleto S. & Smreciu A. 1988. *Mycorrhizae and mycorrhizal fungi of Calypso bulbosa*. *America mycorrhizal fungi of Calypso Journal of Botany*. 75:739-52.
- ❖ Currah R.S., Smreciu, E.A. & Hambleton S. 1990. *Mycorrhizae and mycorrhizal fungi of boreal species of Platanthera and Coeloglossum (Orchidaceae)*. *Canadian Journal of Botany*. 68:1171-1181.
- ❖ Currah R.S. & Zelmer C. 1992. *A key and notes for the genera of fungi mycorrhizal with orchids and a new species in the genus Epulorhiza*. *Reports of the Tottori Mycological institute*, 30, 43-59.
- ❖ Currah R.S., Zelmer C.D., Hambleton S. & Richardson K.A. 1997. *Fungi from orchid mycorrhizas*. In *Orchid Biology: reviews and perspectives (J. Arditty & A.M. Pridgeon eds)* 7: 117-170. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- ❖ Curtis J.T. 1939. *The relation of specificity of orchid mycorrhizal fungi to the problem of symbiosis*. *American Journal of Botany*. 26:390-9.
- ❖ Curtis J.T. 1943. *Germination and seedling development in five species of Cypripedium L.* *American Journal of Botany* 30: 199–203.
- ❖ Dangeard M.M. & Armand L. 1898. *Oservations de biologie cellulaire (Mycorhizes d'Ophrys aranifera)*. *Revue de Mycologie, Toulouse*, 20, 13-8.
- ❖ De Bary, H.A. Die Erscheinung der Symbiose (Karl J. Trubner, Strasburg, 1879) citado en inglés en Relman, D.A. "Till death do us part": coming to terms with symbiotic relationships. *Nature Reviews Microbiology* 6, 721-724 (2008)
- ❖ De la Rosa-Manzano E., Andrade-Torres J.L., Simá-Gómez J.L., Us-Samtamaria R. 2013. *Fotoproteccion de orquídeas epifitas en dos selvas secas de Yucatán*. *Memorias del IV congreso de ecología*. Pp 37.
- ❖ DeLuca T.H., Zackrisson O. & Sells-Tedt A.2002. *Quantifying nitrogen-fixation in feather moss carpets of boreal forest*. *Nature* 419: 917-920
- ❖ Dearnaley J. D. W. & McGee P. A. 1996. *An intact microtubule cytoskeleton is not necessary for interfacial matrix formation in orchid protocorm mycorrhizas*. *Mycorrhiza*. 6, 175–180.
- ❖ Dearnaley, J.D.W. 2005. *ITS-RFLP and sequence analysis of endophytes from Acianthus, Caladenia and Pterostylis (Orchidaceae) in southeastern Queensland*. *Mycological Research* 109: 452-460.
- ❖ Dearnaley J.D.W. & Le Brocque A.F. 2006. *Molecular identification of the primary root fungal endophytes of Dipodium hamiltonianum (Yellow hyacinth orchid)*. *Aust J Bot* 54:487-491.
- ❖ Dearnaley J.D.W. 2007. *Further advances in orchid mycorrhizal research* . *Mycorrhiza*, 17: 475-88.
- ❖ DeMars B.G. & Boerner R.E.J. 1995. *Mycorrhizal dynamics of three woodland herbs of contrasting phenology along topographic gradients*. *Am. J. Bot.* 52. 1126-1131.
- ❖ Dexheimer J. & Serrigny J. 1983. *Étude ultrastructurale des endomycorhizes d'une orchidée tropicale; Epidendrum ibaguense H.B.K. I, Localisation des activités phosphatiques acides et al., calines*. *Bulletin de la société Botanique de France, Lettres Botanique*, 130, 187-94.
- ❖ Dijk E. 1990. *Effects of mycorrhizal fungi on in vitro nitrogen response of juvenile orchids*. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 29, 91-7.
- ❖ Dijk E. & Olf H. 1994. *Effects of nitrogen, phosphorus and potassium fertilization on field performance of Dactylorhiza majalis*. *Acta Bot. Neerlandica* 43, 383–392.
- ❖ Dijk E. & Eck N. D. 1995. *Effects of mycorrhizal fungi on in vitro nitrogen response of some Dutch indigenous orchid species*. *Can. J. Bot.* 73, 1203–1211.

- ❖ Dijk, E., J. H. Willems, & J. van Andel. 1997. *Nutrient responses as a key factor to the ecology of orchid species*. Acta Bot. Neerlandica 46:339–363.
- ❖ Dixon K. 1987. *Raising terrestrial orchids from seed*, in: W.K. Harris (Ed.), *Modern Orchid Growing for Pleasure and Profit*, Orchid Club of South Australia, Inc., Adelaide, South Australia. Pp. 47-54.
- ❖ Dörr I. & Kollmann R. 1969. *Fine structure of mycorrhiza in Neottia nidus-avis (L.) L.C. Rich. (Orchidaceae)*. Planta, 89, 372-5.
- ❖ Douglas, Angela E. 2010. *The symbiotic habit*. New Jersey: Princeton University Press.
- ❖ Downie D.G. 1940. *On the germination and growth of Goodyera repens*. Transactions of the Botanical Society of Edinburgh. 33: 36-51.
- ❖ Downie D.G. 1941. *Notes on the germination of some British orchids*. Transactions of the Botanical Society of Edinburgh. 33:94-103.
- ❖ Downie D.G. 1943. *Source of the symbiont of Goodyera repens*. Transactions of the Botanical Society of Edinburgh. 33: 383-90.
- ❖ Downie D.G. 1949. *The germination of Goodyera repens (L.) R.Br. In fungal extract*. Transactions of the Botanical Society of Edinburgh. 35. 120-5.
- ❖ Downie D.G. 1949. *The germination of listera ovata (L.)R.BR*. Transactions of the Botanical Society of Edinburgh. 35:126-30.
- ❖ Dressler R. L. 1965. *Notes on the genus Govenia in Mexico (Orchidaceae)*. Brittonia, 17, 266-77.
- ❖ Duddridge J.A. 1985. *A comparative ultrastructural analysis of the host-fungus interface in mycorrhizal and parasitic associations*. In *Developmental biology of higher fungi*, ed, D. Moore, L. A. Casselton, D. A. Wood & J.C. Frankland, pp. 141-73. Cambridge: Cambridge University Press.
- ❖ Dudley, N., L. Higgins-Zogib and S. Mansourian. 2006. *Beyond Belief: Linking faiths and protected area networks to support biodiversity conservation*. Gland and Bath: WWF International and Alliance on Religions and Conservation
- ❖ Dudley, N. 2008. *Guidelines for Applying Protected Area Management Categories*. Gland, Switzerland: IUCN. x + 86pp.
- ❖ Dumbrell A.J., Ashton P.D., Aziz N., Feng G., Nelson M., Dytham C., Fitter A.H., & Helgason T. 2010. *Distinct seasonal assemblages of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by massively parallel pyrosequencing*. New Phytol. 190: 794-804.
- ❖ During H.J. & Van Tooren B.F. 1990. *Bryophyte interactions with other plants*. Botanical Journal of the Linnean Society, 104, 79-98.
- ❖ Ebbers B.E., Anderson R.C. & Liberta A.E. 1987. *Aspects of the mycorrhizal ecology of prairie dropseed. Sporobolus heterolepis (Poaceae)*. Am. J Bot. 71: 564-573.
- ❖ Eiberg H. 1970. *Asymbiotisk frøspiring og Kulturforsøg hos nogle europæiske jordorkideer*. MSc thesis. University of Copenhagen: Plant Physiological Laboratory.
- ❖ Ek M., Ljungquist P.O. & Stenström E. 1983. *Indole-3-acetic acid production by mycorrhizal fungi determined by gas chromatography-mass spectrometry*. New Phytologist. 94, 401-7.
- ❖ Elliott, H.B. (Ed). 1974. *Second World Conference on National Parks, Proceedings*. Morges: IUCN.
- ❖ Ernst R. 1967. *Effect of carbohydrate selection on the growth rate of freshly germinated Phalaenopsis and Dendrobium seed*. American Orchid Society Bulletin, 36, 1068-73.

- ❖ Evans RD, Johansen JR. 1999. Microbiotic crusts and ecosystem processes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18: 183–225.
- ❖ Fabre, J.-H. 1856. *De la germination des Ophryde'es*. *Annales des Sciences Naturelles IV, Se'rie Botanique*, 5: 163–186, Plate II.
- ❖ Fan L., Guo S., Cao W., Xiao P.G. & Xu J.T. 1996. *Isolation, culture, identification and biological activity of Mycena orchidicola sp. nov. In Cymbidium sinense (Orchidaceae)*. *Acta Mycol. Sin.* 15, 251-255.
- ❖ Fast G. 1980. *Vermehrung und Anzucht. In Orchideenkultur. Botanische Grundlagen Kulturverfahren, Pflanzenbeschreibungen*, ed G. Fast pp.207-23.
- ❖ Fast G. 1982. European terrestrial orchids (Symbiotic and asymbiotic methods). In *orchid Biology. II. Reviews and Perspectives. Orchid seed Germination and seedling culture- a manual*, ed. J Arditti, pp. 309-26. Ithaca, NY: Cornell University Press.
- ❖ Fast G. 1985. Zur Ökologie einiger mitteleuropäischer Waldorchideen unter besonderer Berücksichtigung der Bodenverhältnisse in Bayern. *Die Orchidee*, 36, 148-52.
- ❖ Fenner M. 1985. *Seed Ecology*. Chapman and Hall, London.
- ❖ Felix H. 1988. Fungi on bryophytes, a review. *Botanica Helvetica* 98:239-69.
- ❖ Frank A.B. 1885. *Ueber die auf Wuzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze*. *Ber. D. deutsch. Bot. Gesell III. Lehrbuch der Botanik*, Bd. P.264.
- ❖ Frank A.B. 1891. *Über die auf Verdauung von Pilzen abziehende Symbiose der mit endotrophen Mykorrhizen begabten Pflanzen, sowie der Leguminosen und Erlen*. *Berich der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. 9:244-53.
- ❖ Fuchs A. & Ziegenspeck H. 1924. *Aus der Monographie des Orchis Traunsteineri Saut. III. Entwicklungsgeschichte einiger deutscher Orchideen*. *Botanisches Archiv* 5: 120–132.
- ❖ Fuchs A. & Ziegenspeck H. 1925. *Bau und Form der Wurzeln der einheimischen Orchideen in Hinblick auf ihre Aufgaben*. *Botanisches Archiv*, 11, 290-397.
- ❖ Fuch A. & Ziegenspeck H. 1926. *Entwicklungsgeschichte der Axen der einheimischen Orchideen und ihre Physiologie und Biologie I. Cypripedium, Helleborine, Limodorum, Cephalanthera*. *Botanisches Archiv* 14: 165–260.
- ❖ Fuchs A. & Ziegenspeck H. 1927. *Entwicklungsgeschichte der Axen der einheimischen Orchideen und ihre Physiologie und Biologie, III*. *Botanisches Archiv*, 18, 378-475.
- ❖ Furman T.E. & Trappe, J.M.1971. *Phylogeny and ecology of mycotrophic achlorophyllous Angiosperms*. *Quarterly Review of Biology* 46, 219–275
- ❖ Gange A.C.1999. *On the relation between arbuscular mycorrhizal colonization and plant 'benefit'*. *Oikos* 87, 615–621.
- ❖ García, E. 1981. *Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana)*. Offset. Larios, S. A. México, D. F. pp 220
- ❖ Garrett S.D. 1962. *Decomposition of cellulose in soil by Rhizoctonia solanii Kühn*. *Trans. British Mycol. Soc.* 45, 115-120.
- ❖ Gäumann E. & Kern H. 1959. *Über die Wurzelpilze von Loroglossum hircinum (L.) Rich.* *Phytopathologische Zeitschrift*, 36. 1-26.

- ❖ Gäumann E. & Hohl H. R. 1960. *Weitere Untersuchungen über die chemischen Abwehrreaktionen der Orchideen*. Phytopathologische Zeitschrift, 38. 93-104.
- ❖ Gäumann E., Nüesch J., & Rimpau R. H. 1960. *Weitere Untersuchungen über die chemischen Abwehrreaktionen der Orchideen*. Phytopathologische Zeitschrift, 38, 274-308.
- ❖ Gäumann E., Müller E., Nüesch J., & Rimpau R. H. 1961. *Über die Wurzelpilze von **Loroglossum hircinum** (L.) Rich.* Phytopathologische Zeitschrift, 41. 89-96.
- ❖ Gebauer G. & Meyer M. 2003. ¹⁵ *N and* ¹³ *C natural abundance of autotrophic and mycoheterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association*. New Phytol 160:209-223.
- ❖ Gehlert R. & Kindl H. 1991. *Induced formation of dihydrophenanthrene and bibenzyl synthase upon destruction of orchid mycorrhiza*. Phytochemistry 30, 457-60.
- ❖ Gehrig H, Schußler A, Kluge M. 1996. *Geosiphon pyriforme, a fungusforming endocytobiosis with Nostoc (cyanobacteria), is an ancestralmember of the Glomales: evidence by SSU rRNA analysis*. Journal of Molecular Evolution 43: 71–81.
- ❖ Gemma C.A., Whitman T.G. & Carreiro M.M. 1989. *Seasonal dynamics of selected species of VA mycorrhizal fungi in sand dune*. Mycol Res. 92: 317-321.
- ❖ Gentry, A. H. & Dodson, C. H. 1987. *Diversity and biogeography of neotropical vascular epiphytes*. Ann. Miss. Bot. Gard. 74, 205-233.
- ❖ Gersen U. 1982. Bryophytes and invertebrates, pp. 291-332. In A.J. E. Smith (ed.), *Bryophyte Ecology* Chapman Hall, NY.
- ❖ Gillman H. 1876. *Aplectrum* with coral-like root, *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 6, 94-5.
- ❖ Girlanda M., Selosse M.A., Cafasso D., Brilli F., Delfine S., Fabbian R., Ghignone S., Pinelli P., Segreto R., Loreto F., Cozzolino S. & Perotto S. 2006. *Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid **Limodorum abortivum** is mirrored by specific association to ectomycorrhizal **Russulaceae***. Mol Ecol 15:491-504.
- ❖ Glen M., Tommerup I.C., Bougher N.L. & O'Brien P.A. 2002. *Are **Sebacinaceae** common and widespread ectomycorrhizal associates of Eucalyptus species in Australian forests?* Mycorrhiza 12:243-247.
- ❖ Goh C.J., Sim A.A., & Lim G., 1992. *Mycorrhizal associations in some tropical orchids*. Lindleyana 7, 13-17.
- ❖ Hadley G. 1969. *Cellulose as a carbon source for orchid mycorrhiza*. New Phytologist 68:933-939.
- ❖ Hadley G. 1970. *Non-especificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza*. New Phytologist, 69, 1015-23.
- ❖ Hadley G. & Williamson B. 1971. *Analisis of the post-infection growth stimulus in orchid mycorrhiza*. New phytologist, 70, 445-55.
- ❖ Hadley G., Johnson R. P. C. & John D. A. 1971. *Fine structure of the host-fungus interface in orchid mycorrhiza*. Planta, 100, 191-9.
- ❖ Hadley G. & Williamson B. 1972. *Features of mycorrhizal infection in some Malayan orchids*. New Phytol 71:1111-1118.
- ❖ Hadley G. 1982. *Germination of British Orchids*. Orchid review, 90, 84-6.
- ❖ Hadley G. 1984. *Uptake of ¹⁴C glucose by asymbiotic and mycorrhizal orchid protocorms*. New Phytologis. 96, 263-73.
- ❖ Hadley, G. and G. F. Pegg. 1989. *Host-fungus relationships in orchid mycorrhizal systems*. p. 57–71. In: Pritchard, H. W. (ed.). *Modern methods in orchid conservation*. Cambridge University Press. Cambridge, United Kingdom.

- ❖ Hadley G. 1990. *The role of mycorrhizae in orchid propagation*. In North American native terrestrial orchid propagation and production, ed. C.E. Sawyers, pp. 15-24.
- ❖ Hadley N.F. 1994. *Water Relations of Terrestrial Arthropods*, Academic Press, New York.
- ❖ Hailes N.S.J. & Seaton P.T. 1989. *The effects of the composition of the atmosphere on the growth of seedlings of **Cattleya aurantiaca***. In Modern Methods in orchid conservation, ed. H. W. Pritchard, pp. 73-85. Cambridge: Cambridge University Press.
- ❖ Harley, J. L. & Smith, S. E. 1983. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London.
- ❖ Harley J. L. 1984. The mycorrhizal associations. In cellular interactions, ed. H.F. Linskens & J. Heslop-Harrison, pp. 148-86. Berlin: Springer.
- ❖ Harrison C. R. 1977. *Ultrastructural and histochemical changes during the germination of **Cattleya aurantiaca** (Orchidaceae)*. Botanical Gazette, 138, 41-5.
- ❖ Harvais G. & Hadley G. 1967 a. *The development of **Orchis purpurella** in asymbiotic and inoculated cultures*. New Phytologist, 66, 205-15.
- ❖ Harvais G. & Hadley G. 1967 b. *The relation between host and endophyte in orchid mycorrhiza*. New Phytologist, 66, 205-15.
- ❖ Harvais G. 1972. *The development and growth requirements of **Dactylorhiza purpurella** in asymbiotic cultures*. Canadian Journal of Botany, 50, 1223-9.
- ❖ Harvais G. 1973. *Growth requirements and development of **Cypripedium reginae** in axenic culture*. Canadian Journal Botany, 51, 327-32.
- ❖ Harvais G. 1974. *Notes on the biology of some native orchids of Thunder Bay, their endophytes and symbionts*. Canadian Journal of Botany, 52, 451-60.
- ❖ Harvais G. & Pekkala D. 1975. *Vitamin production by a fungus symbiotic with orchids*. Canadian Journal of Botany, 53, 156-63.
- ❖ Harvais G. & Raitsakas A. 1975. *On the physiology of a fungus symbiotic with orchids*. Canadian Journal Botany, 53, 144-55.
- ❖ Hibbert D.S., Gilbert L.B., Donoghue M. 2000. *Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbiosis in basidiomycetes*. Nature 407: 506-508.
- ❖ Hijner J. A. & Arditti J. 1973. *Orchid mycorrhiza; vitamin production and requirements by the symbionts*. American Journal of Botany, 60, 829-35.
- ❖ Hjortstam K. & Tellería M.A. 1990. *Columnocystis, a synonym of Veluticeps*. Mycotaxon 37, 53-56.
- ❖ Hofsten A. von. 1973. *The ultrastructure of mycorrhiza in **Ophrys insectifera***. Zoon, Suppl 1, 93-6.
- ❖ Hogberg, P; Plamboeck, AH; Taylor, AFS; Fransson, PMA. 1999. Natural C-13 abundance reveals trophic status of fungi and host-origin of carbon in mycorrhizal fungi in mixed forests. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96: 8534-8539.
- ❖ Holdgate, M. 1999. *The Green Web*. London: Earthscan.
- ❖ Höllander S. 1932. *Ernährungsphysiologische Untersuchungen an Wurzelpilzen saprophytisch lebender Orchideen*. Würzburg Dissertation Julius-Maximilian-Universität.
- ❖ Horton T.R., Bruns T.D. & Parker V.T. 1999. *Ectomycorrhizal fungi associated with **Arctostaphylos** contribute to **Pseudotsuga menziesii** establishment*. Can. J. Bot.-Rev. Can. Bot., 77: 93-102.

- ❖ Ichihashi S. 1979. *Studies on the media for orchid seed germination*. III. The efecto of total ionic concentración, catión/anion ratio, NH₄/NO₃ ratio and minor elements on the growth of **Bletilla striata** seedlings. *Engei Gakkai Zasshi (Journal of the Japanese Society for Horticultural Science)* 47, 524-36.
- ❖ Ichihashi S. 1990. *Effects of light on root formation of Bletilla striata seedlings*. *Limdleyana* 5(2). 140-143.
- ❖ Irmisch T. 1853. *Beitrãge zur Biologie und Morphologie der Orchideen*. Ambrosius Abel, Leipzig.
- ❖ Islam M.O., Matsui S. & Ichihashi S. 1999. *Effects of light Quality on seed germination and seedlings growth of Cattleta orchids in vitro*. *Journal of Japanese Society for Horticultural Science*. 68, 1132-1138.
- ❖ Jackson M.B. 1985. Ethylene and the responses of plants to excess wáter in their enviroment- a review. In *Ethylene and plant development*, ed. J.A. Roberts & G.A. Tucker, pp, 241-65. London. Butterworth.
- ❖ Johansson D. R. 1977. *Epiphytic orchids as parasites of their host trees*. *American Orchid Society Bulletin* 46, 703-707.
- ❖ Johnson T.R., Stewart S.L., Dutra D., Kane M.E. & Richardson, L. 2007. *Asymbiotic and symbiotic seed germination of Eulophia alta (Orchidaceae) – preliminary evidence for the symbiotic culture advantage*. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 90, 313–323.
- ❖ Jordano P. 1993. Geographical ecology and variation of plant-seed disperser interactions-southern Spanish Juniperes and frugivorous thrushes. *Vegetatio*, 108, 85-104.
- ❖ Julou T., Burghardt B., Gebauer G., Berveiller D., Damesin C. & Selosse M.-A. 2005. *Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of Cephalanthera damasonium*. *New Phytol* 166:639-653.
- ❖ Kano K. 1968. *Acceleration of the germination of so-called hard-to-germinate orchid seeds*. *American Orchid Society Bulletin*, 37, 690-8.
- ❖ Kawakita A. & Kato M. 2004. Evolution of obligate pollination mutualism in New Caledonia *Phyllantus* (Euphorbiaceae). *Americal Journal Botany*, 91, 410-415.
- ❖ Keel B.G., Zettler L.W. & Kaplin B.A. 2011. *Seed germination of Habenaria repens (Orchidaceae) in situ beyond its range, and its potential for assisted migration imposed by climate change*. *Castanea* 76(1):43-54.
- ❖ Knudson, L. 1922. *Non-symbiotic germination of orchid seeds*. *Bot. Gaz.* 77:212–21.
- ❖ Knudson L., 1930. *Physiological investigations on orchid seed germination*. In *proc. Int. Cong. Plant Sci.*, New York, August 16-23.
- ❖ Koide RT & Schener R. P. 1992. *Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis*. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 43, 557–581.
- ❖ Kristiansen K.A., Freudenstein J.V., Rasmussen F.N. & Rasmussen H.N. 2004. *Molecular identification of mycorrhizal fungi in Neuwiedia veratrifolia (Orchidaceae)*. *Mol Phylogenet Evol* 33:251-258.
- ❖ Lan J., Xu J. & Li J. 1996. *Study on the infecting process of Mycena osmundicola on Gastrodia elata by autoradiography*. *Acta Mycol. Sin* 15, 197-200.
- ❖ Leake J. R. 2005. *Plants parasitic on fungi: unearthing the fungi in myco-heterotrophs and debunking the “saprophytic” plant myth*. *Mycologist* 19:113-122
- ❖ Leake J.L. 1994. The biology of myco-heterotrophic (‘saprophytic’) plants. *New Phytologist* 127, 171–216.
- ❖ Lee S., Park S., Kim T., Paek K., Lee S. S., Park S. S., Kim T. J. & Paek K. Y. 1997. *Effect of orchid habitat soil on growth of tissue cultured Cymbidium kanran and C. goeringii, and root infection by orchid mycorrhizal fungus*. *J. Korean Soc. Horticultural Sci.* 38, 176–182.

- ❖ Leeson E., Haynes C. & Wells T. C. E. 1991. *Studies of the phenology and dry matter allocation of Dactylorhiza fuchsii*. In T. C. Wells E. & J. H. Willems [eds.], Population ecology of terrestrial orchids, 125–138. SPB Academic Publishing, The Hague.
- ❖ Lekberg Y., Koide R.T., Rohr J.R., Aldrich-Wolfe L. & Morton J.B. 2007. *Role of niche restrictions and dispersal in the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities*. Journal of Ecology 95:95-105.
- ❖ Lewis, D.H. 1985. Symbiosis and mutualism: crisp concepts and soggy semantics. In: The Biology of Mutualism. Ecology and Evolution. (Boucher, D.H., Ed.) pp. 29-39. Oxford University Press, New York.
- ❖ Link H.F., 1840. *Icones selectae anatomico-botanicae*. II, P.10, t. VII.
- ❖ Lucas R. L. 1977. *The movement of nutrients through fungal mycelium*. Transactions of the British Mycological Society. 69, 1-9.
- ❖ Lugo A.M. & Cabello M.N. 2002. *Native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from mountain grassland (Córdoba, Argentina) I. Seasonal variation of fungal spore diversity*. Mycologia 94:579-586.
- ❖ Lussenhop, J; Fogel, R. 1999. Seasonal change in phosphorus content of Pinus strobus-Cenococcum geophilum ectomycorrhizae. Mycologia. 91(5):742-746.
- ❖ Longton R. E. 1992. The role of bryophytes and lichens in terrestrial ecosystems. In Bryophytes and lichens in changing environment. Edited by Jeffrey W. Bates and Andrew M. Farmer. Oxford Science Publications, Department of Biology Imperial College of Science Technology and Medicine. London. pp 33-76.
- ❖ Ma M., Tan T.K. & Wong S.M. 2003. *Identification and molecular phylogeny of Epulorhiza isolates from tropical orchids*. Mycol Res 107:1041-1049.
- ❖ MacDougal D. T. 1899. *Symbiotic saprophytism*. Annals of Botany 13, 1-47.
- ❖ Magnus W., 1800, *Studien an der endotropen Mycorrhiza von Neottia Nidusavzs L.* Jahr. f. wissensch. Bot. xxxv, pp. 205-272.
- ❖ Magrou J. 1924. *A propos du pouvoir fungicide des tubercules d'Ophrydees*. Annales des Sciences Naturelles (Paris) 10. Sér. VI, 18, 256-70.
- ❖ Malmgren S. 1989. *Asymbiotisk Fröförökning från frö av guckusko, flugblomster, brunkulla och nagra andra svenska orkidéarter*. Svensk Botanisk Tidskr, 83, 347-54
- ❖ Malmgren S. 1993. *Asymbiotisk Fröförökning i stor skala av Anacamptis, Ophrys, Orchis och andra orkideer med runda rotknölar*. Svensk Botanisk Tidskrift, 87, 221-34.
- ❖ Manning J. C. & Van Staden J. 1987. *The development and mobilisation of seed reserves in some African orchids*. Australian Journal of Botany. 35. 343-53.
- ❖ Marx D.H., 1972. Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections, Annu. Rev. Phytopathol. 10 429–454.
- ❖ Masuhara G. & Katsuya, K. 1989. *Effects of mycorrhizal fungi on seed germination and early growth of three Japanese terrestrial orchids*. Scitia Hort. 37:331–337.
- ❖ Masuhara G., Katsuya K. & Yamagucki K. 1993. *Potential for symbiosis of Rhizoctonia solani and binucleate Rhizoctonia with seeds of Spiranthes amoena var. amoena in vitro*. Myco. Res. 97:746–752.
- ❖ Masuhara G. & Katsuya K. 1994. *In situ and in vitro specificity between Rhizoctonia spp. and Spiranthes sinensis (Persoon) Ames. var. amoena (M. Biebertsien) Hara (Orchidaceae)*. New Phytol 127:711-718.
- ❖ Mayr & Schmucker. 1998. *Orchid Names and their Meanings*, by Hubert Mayr, translated by M. Schmucker, 1998 (encontrado en <https://lab.troymeyers.com/flasking/item.php?kind=flask&id=TN1647>).

- ❖ Merrifield K. & Ingham R.E., 1998. *Nematodes and other aquatic invertebrates in Eurhynchium oregonum from Marys's peak, Oregon Coast Range*. The Bryologist 101: 505-511.
- ❖ McCormick M.K., Whigham D.F. & O'Neill J. 2004. *Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids*. New Phytol 163:425-438.
- ❖ McCormick M. K., Whigham D. F., Sloan D. & O'Malley, K.; Hodkinson, B. 2006. *Orchid–fungus fidelity: a marriage meant to last?* Ecol. 87:903–911.
- ❖ McKendrick S.L., Leake J.R. & Read D.J. 2000 a. *Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal **Salix repens** and **Betula pendula** to the orchid **Corallorhiza trifida** through shared hyphal connections*. New Phytol 145:539-548.
- ❖ McKendrick S.L., Leake J.R., Taylor D.L. & Read D.J. 2000 b. *Symbiotic germination and development of Myco-heterotrophic plants in nature: Ontogeny of **Corallorhiza trifida** and Characterization of its Mycorrhizal fungi*. New phytologist. 150: 523-537
- ❖ McKendrick S.L., Leake J.L., Taylor D.L. & Read D.J. 2002. *Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid **Neottia nidus-avis** in nature and its requirements for locally distributed **Sebacina spp.*** New Phytol. 154:233–247.
- ❖ Miller J.E., Shafer S.R., Schoeneberger M.M., Pursley W.A., Horton S.J. & Davey C.B. 1997. *Influence of a mycorrhizal fungus and/or rhizobium on growth and biomass partitioning of subterranean clover exposed to ozone*. Water Air Soil Pollut. 96(1-4): 233-248.
- ❖ Milligan M.J. & Williams P.G. 1988. *The mycorrhizal relationship of multinucleate rhizoctonias from non-orchids with **Microtis** (Orchidaceae)*. New Phytologist. 108:205-210.
- ❖ Mitchel R.B. 1989. *Growing Hardy orchids from seeds at Kew*. The plantsman 11:152-69.
- ❖ Möller O. 1985. *Die Mineralsalze der Standortböden der europäischer Orchideen*. Die Orchidee, 36, 118-21.
- ❖ Mollison J. E.1943. ***Goodyera repens** and its endophyte*, Transactions and Proceedings of the Botanical Society of Edinburgh, 33, 391-403.
- ❖ Molvray M., Kores P.J. & Chase M.W. 2000. *Polyphyly of mycoheterotrophic orchids and functional influences on floral and molecular characteristics*. *Monocots. Systematic and evolutions (eds. K.L. Wilson and D.A. Mossison)* CSIRO. Melbourne. 441-448.
- ❖ Moncalvo J.M., Lutzoni F.M., Rehner S.A., Johnson J. & Vilgalys R. 2000. *Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences*. Systematic Biology 49: 278-305.
- ❖ Montaña 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*. Universidad Tecnológica de la Huasteca Hidalguense. Trabajo de tesis para obtener el título de técnico superior universitario en agrobiotecnología.
- ❖ Moore R.T. 1987. *The genera **Rhizoctonia**-like fungi: **Ascorhizoctonia**. **Ceratorhiza** gen. nov. **Epulorhiza** gen nov. **Monillioopsis** and **Rhizoctonia***. Mycotaxon 29:91-9.
- ❖ Mora C.I., Driese S.G., Colarusso I.A. 1996. *Middle to Late Proterozoic CO₂ levels from soil carbonate and organic matter*. Science 271:1105-1107.
- ❖ Morton, J.B. & Redecker D. 2001. *Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera Archeospora and Paraglomus, based on concordant molecular and morphological characters*. Mycologia 93, 181-195.

- ❖ Morton, J.B. 1988. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: Classification, nomenclature, and identification. *Mycotaxon* 32, 267-324.
- ❖ Mrkvicka A. C. 1990. *Neue Beobachtungen zu Samenkeimung und Entwicklung von Ltparis loeselii* Rich. Mitteilungsblatt, Airbetskreis heimische Orchideen Bden-Württemberg, 22. 172-80
- ❖ Mrkvicka A. C. 1992. *Zur Einfluss von Temperatur. Feuchte und Tagelänge auf Spross- und Blütenentwicklung europäischer Erdorchideen.* Die Orchidee. 43. 28-33.
- ❖ Muir H.J. 1989. *Germination and mycorrhizal fungus compatibility in European orchids.* In *Modern methods in orchid conservation*, ed. H.W. Pritchard, PP. 39-56. Cambridge. Cambridge University Press.
- ❖ Muller W.H., Stalpers J.A., Van Aelst A.C., Van der Krift T.P. & Boekhout T. 1998. *Field emission gun-scanning electron microscopy of septal pore caps of selected species in the Rhizoctonia s.l. Complex.* Mycologia, 90, 170–179.
- ❖ Neate S.M. 1987. *Plant debris in soil as a source of inoculum of Rhizoctonia in wheat.* Transactions of the British Mycological Society 88: 157-162.
- ❖ Ngham E.R. & Massicote H.B. 1994. *Protozoan communities around conifer roots colonized by ectomycorrhizal fungi.* Mycorrhiza. 5: 53-61.
- ❖ Nieder, J. 2004. *Distribution patterns of epiphytic orchids present research, past causes and future consequences.* In *Proc. Eur. Orchid Conf. and Show*, March 2003 (ed. J. Hermans & P. Cribb), pp. 241-258. London: The British Orchid Council and the Royal Horticultural Society.
- ❖ Nieuwdorp P. J. 1972. *Some observations with light and electron microscope on the endotrophic mycorrhiza of orchids.* Acta Botanica Neerlandica. 21. 128-44.
- ❖ Nobecourt P. 1923. *Sur la production d'anticorps par les tubercules des Ophrydées.* Compte Rendu Hebdomadaire des Séances de l'Academie Sciences. Paris. 17. 1055-77.
- ❖ Nontachaiyapoom S., Sasirat S., & Manoch L., 2011. *Symbiotic seed germination of Grammatophyllum speciosum Blume and Dendrobium draconis Rchb. f., native orchids of Thailand.* Scientia Horticulturae 130: 303–308
- ❖ Oechel W.C. & Van Cleve k. 1986. The role of bryophytes in nutrient cycling in the taiga. In *forest ecosystems in the Alaskan taiga*, (eds. K. Van Kleve, F.S. Chapim, P. W. Flanagan , L.A. Viereck and T.C. Dyrness) pp. 121-37. Springer, NY.
- ❖ Øien D.-I., O'Neil J.P., Whigham D.F. & McCormick M.K. 2008. *Germination ecology of the boreal-alpine terrestrial orchid Dactylorhiza lapponica (Orchidaceae).* Ann. Bot. Fennici 45: 161-72.
- ❖ Olsson PA; Baath E; Jakobsen I; Soderstrom B. 1996. Soil bacteria respond to presence of roots but not to mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi. *SOIL BIOLOGY & BIOCHEMISTRY*. 28(4-5):463-470.
- ❖ Öpik M., Moora M., Zobel M., Saks U., Wheatley R., Wright F. & Daniell T. 2008. *High diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreal herb-rich coniferous forest.* New Phytol 179: 867-876.
- ❖ Ordóñez, M. J. y O. Flores. 1995. *Áreas naturales protegidas en México.* Pronatura. México.
- ❖ Otero J.T., Ackerman J.D. & Bayman P. 2002. *Diversity and host specificity of endophytic Rhizotonia-like fungi from tropical orchids.* American Journal of Botany 89: 1852-1858.
- ❖ Otero J.T., Ackerman J.D. & Bayman P. 2004. *Diversity in mycorrhizal preferences between two tropical orchids.* Mol Ecol 13:2393-2404.

- ❖ Otero J.T., Flanagan S.N., Allen Herre E., Ackerman D.J. & Bayman P. 2007. *Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid **Ionopsis utricularioides** (Orchidaceae)*. American Journal of Botany 94(12): 1944-50.
- ❖ Otero Ospina J. T. & Bayman P. 2009. *Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epifitas*. Acta agronómica. 58. 270-276.
- ❖ Pais M.S.S. & Barroso J. 1983. *Localization of polyphenoloxidases during the establishment of **Ophrys lutea** endomycorrhizas*. New Phytologist. 95, 219-22.
- ❖ Paracer, S. & Ahmadjian V. 2000. Symbiosis an Introduction to Biological Interactions. Oxford University Press, Oxford.
- ❖ Parniske, M. 2004. Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Curr Opin Plant Biol 7, 414-421.
- ❖ Pellmyr O., Thompson J.N., Brown J.M., Harrinson R.G. 1996. Evolution of pollination and mutualism in the yucca moth lineage American Naturalist, 148,827-847.
- ❖ Pereira O.L., Rollemberg C.L., Borges A.C., Matsuoka K. & Kasuya M.C.M. 2003. *Epulorhiza epiphytica sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil*. Mycoscience 44:153-155
- ❖ Pereira O. L., Kasuya M.C. M., Rollemberg C.L. & Borges A.C. 2005. *In vitro seed Germination of **Oncidium flexosum** (Orchidaceae) by Rhizoctonia-like Mycorrhizal fungi*. R. Bras. Ci. Solo 29: 199-206.
- ❖ Pereira O.L., Kasuya M.C.M., Borges A.C. & de Araujo E.F. 2005. *Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil*. Can J Bot 83: 54-65.
- ❖ Pérez E., Fernández F., Fernández K. Y Márquez R. 2002. *Efecto de un biopreparado micorrízico en el cultivo de orquídeas ya establecidas en diferentes localidades*. Cultivos tropicales. 23. 3. 53-55.
- ❖ Perkins A.J. & Mcgee P.A. 1995. *Distribution of the Orchid Mycorrhizal Fungus, **Rhizoctonia solani**, in Relation to Its Host, **Pterostylis acuminata**, in the Field*. Australian Journal of Botany 43(6) 565 – 575
- ❖ Perkins A.J., Masuhara G. & McGee P.A. 1995. *Specificity of the associations between **L. parvilflora** (Orchidaceae) and its mycorrhizal fungi*. Australian Journal of Botany 43: 85-91.
- ❖ Perombelon M. & Hadley G. 1965. *Production of pectic enzymes by pathogenic and simbiotic Rhizoctonia strains*. New Phytologist. 64, 144-51.
- ❖ Peterson R. L. & Currah R. S. 1990. *Synthesis of mycorrhizae between protocorms of **Goodyera repens** (Orchidaceae) and **Ceratobasium cereale***. Canadian Journal of Botany, 68, 1117-25.
- ❖ Peterson R. L., Bonfante P., Faccio A. & Uetake Y. 1996. *The interface between fungal hyphae and orchid protocorm cells*. Can. J. Bot. 74: 1861–1870.
- ❖ Peterson, R. L. and Massicotte, H. B. 2004. *Exploring structural definitions of mycorrhizas, with emphasis on nutrient-exchange interfaces*. Can J Bot 82, 1074-1088.
- ❖ Peterson, R. L., H. B. Massicott, and L. H. Melville. 2004. *Mycorrhizas: anatomy and cell biology*. NRC Research Press. Ottawa, Ontario.
- ❖ Peyronel, B., Fassi, B., Fontana, A. and Trappe, J. M. 1969. *Terminology of mycorrhizae*. Mycologia 61, 410-411.
- ❖ Phillips R.D., Barret D., Dixon W.K. & Hopper D.S. 2011. *Do mycorrhizal symbioses cause rarity in orchids?* Journal of Ecology. 99, 858-869.

- ❖ Pope E.J. & Carter D.A. 2001. *Phylogenetic placement and host specificity of mycorrhizal isolates belonging to AG-6 and AG-12 in the **Rhizoctonia solani** species complex*. Mycologia 93: 712-19.
- ❖ Porras-Alfaro A. & Bayman P. 2007. *Mycorrhizal fungi of **Vanilla**: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth*. Mycologia 99(4): 510–525.
- ❖ Prillieux E. & Riviere A. 1856. *Observations sur la germination et le développement d'une orchidée*. Annales des Sciences Naturelles IV. Série Botanique, 5, 119-36.
- ❖ Purves S. & Hadley G. 1976. *The physiology of symbiosis in **Goodyera repens***. New Phytologist, 77, 689-96.
- ❖ Rai A.N. E., Soderback & Bergman B. 2000. *Cyanobacterium-plant symbioses*. New Phytol 147: 449-481.
- ❖ Ramsbottom J. 1929. *Orchid mycorrhiza, Proceedings of the Internacional Congress Plant Science, 2, 1676-87*.
- ❖ Rasmussen F.N. 2000. *Ins and outs of orchid phylogeny*. Monocots systematics and evolution. CSIRO. Melbourne. 430-435.
- ❖ Rasmussen H.N., Andersen T.F. & Johansen B. 1990. *Light simulation and darkness requeriment for the symbiotic germination of **Dactylorhiza majalis (Orchidaceae) in vitro***. Physiol. Plant.79. 226-230.
- ❖ Rasmussen, H.N., Andersen, T.F., Johansen, B., 1990. *Temperature sensitivity of in vitro germination and seedling development of **Dactylorhiza majalis (Orchidaceae)** with and without a mycorrhizal fungus*. Plant Cell Environ. 13, 171–177.
- ❖ Rasmussen H.N. 1990. *Cell differentiation and mycorrhizal infection in **Dactylorhiza majalis (Rchb.f.) Hunt & Summerh. (Orchidaceae)** during germination **in vitro***. New Phytologist, 116, 137-47.
- ❖ Rasmussen H.N. & Rasmussen F.N.1991. *Climatic and seasonal regulation of seed plant establishment in **Dactylorhiza majalis** inferred from symbiotic experiments **in vitro***. Lindleyana. 6(4).221-227.
- ❖ Rasmussen H.N. 1992. *Germination and growth of mycorrhizal seedlings of **Tipularia discolor (Orchidaceae)** on woody debris*. American Journal of Botany. Suppl., 79. 68.
- ❖ Rasmussen H. N. and Whigham D. F. 1993. *Seed ecology of dust seeds in situ: a new study technique and its application in terrestrial orchids*. Am. J. Bot. 80, 1374–1378.
- ❖ Rasmussen H. N. 1995. *Terrestrial orchids. From seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press, Cambridge.
- ❖ Rasmussen H. N. & Whigham D. F. 1998 a. *The underground phase: a special challenge in studies of terrestrial orchids populations*. Botanical Journal of the Linnean Society 126, 49-64.
- ❖ Rasmussen H. N. & Whigham D. F. 1998 b. *Importance of woody debris in seed germination of **Tipularia discolor (Orchidaceae)***. American Journal of Botany 85, 829-834.
- ❖ Rasmussen H.N. & Whigham D.F. 2002 a. *Phenology of roots and mycorrhizal in orchid species differing in phototrophic strategy*. New Phytologist 154: 797-807.
- ❖ Rasmussen H.N. 2002 b. *Recent developments in the study of orchid mycorrhiza*. Plant and soil 244: 149-163.
- ❖ Raven J.A. & Edwards D. 2001. *Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance*. Journal of Experimental Botany 52: 381-401.
- ❖ Redecker D., Morton J.D., Bruns T.D., 2000. *Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales)*. Molecular Phylogenetics and Evolution 14: 276-286.
- ❖ Reissek S. 1847. *Über Endophyten der Pflanzenzelle, eine gesetzmässige den Samenfäden oder beweglichen Spiralfarsen analoge Erscheinung*. Naturwiss Abhandl. Von W. Haidinger. I. pp. 31-46.

- ❖ Richard P.- Shefferson., D.- Lee Taylor. & Seth-Adams. 2005. Lady-slipper orchid mycorrhizal associations reveal specificity suggestive of resource fragmentation and resource tracking. *Forestry and Forest Products Research institute*.20, 762-780.
- ❖ Richardson K. A., Peterson R. L., & Currah R. S. 1992. *Seed reserves and early symbiotic protocorm development of **Platanthera hyperborea** (Orchidaceae)*. *Canadian Journal Botany*, 70, 291-300.
- ❖ Richardson K.A. & Currah R.S. 1995. *The fungal community associated with the roots of some rainforest epiphytes of Costa Rica*. *Selbyana* 16: 49–73.
- ❖ Rivas M. Warner J. & Bermudez M. 1998. *Presence of mycorrhizas in orchids of a neotropical botanical garden*. *Revista de Biología Tropical* 46, 211–216.
- ❖ Roberts P. 1999. *Rhizoctonia-forming fungi. A taxonomic guide*. The Herbarium, Royal Botanic gardens, Kew. ISBN 1900347695.
- ❖ Robertson DC, Robertson JA. 1982. Ultrastructure of Pterospora andromedea Nuttall and Sarcodes sanguinea Torrey mycorrhizas. *New Phytologist* 92: 539-551.
- ❖ Rosendahl S. & Rosendahl C.N. 1992. Seasonal variation in occurrence of VA Mycorrhizal infection types in a Danish Grassland community In Read DJ. Lewis DH. Fitter AH. Alexander IJ. Eds. *Mycorrhizas in Ecosystems*. Cambridge. UK: CAB. 100 p.
- ❖ Royal Botanic Gardens, Kew 2003 Monocot checklist. Published on the Internet at <http://www.rbgbkew.org.uk/data/>
- ❖ Ruinen J. 1953. *Epiphytosis a second view of epiphytism*. *Annales Bogorienses* 1, 53-58.
- ❖ Ruiz-Herrera J. 1992. *Fungal cell wall: structure, synthesis, and assembly*. Boca Raton. Florida: CRC Press.
- ❖ Rygielwicz P.T. & Andersen C.P. 1994. *Mycorrhizae alter quality and quantity of carbon allocated below ground*. *Nature*. 369:58-60.
- ❖ Saikkonen K., Faeth S.H., Helander M. & Sullivan T.J.1998. *Fungal endophytes: a continuum of interactions with plants*. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29, 319–343
- ❖ Salisbury R.A. 1804. On the germination of the seeds of Orchideae. *Trans Linn Soc* 7:29–32
- ❖ Salisbury F.B. & Ross C.W.1985. *Plant Physiology*, 3rd edn. Belmont, California; Wadsworth.
- ❖ Salmia A. 1989. *General morphology and anatomy of chlorophyll-free and green forms of **Epipactis helleborine** (Orchidaceae)*. *Annales Botanici Fenici*. 26. 95-105.
- ❖ Sanders I.R. & Fitter A.H. 1992. *The ecology and functioning of vesicular-arbuscular mycorrhizas in co-existing grassland species*. Seasonal patterns of Mycorrhizal occurrence and morphology. *New Phytol.*120.517-524.
- ❖ Sanfuentes E., Alfenas, A. C., Maffia, L. A. & Silveira, S. F., 2002. *Comparison of baits to quantify inoculum density of Rhizoctonia spp. in Eucalyptus clonal garden soils*. *Australasian Plant Pathology* 31: 177–183.
- ❖ Scheidegger C. & Brunner I. 1993. *Freeze-fracturing for low-temperature scanning electron microscopy of Hartig net in synthesized **Picea abies** – **Hebeloma crustuliniforme** and - **Tricholoma vaccinum** ectomycorrhizas*. *New Phytol* 123, 123-132.
- ❖ Schüßler A, Kluge M. 2000. *Geosiphon pyriforme, an endocytosymbiosis between fungus and cyanobacteria, and its meaning as a model system for Arbuscular mycorrhizal reseasch*. In: Hock B, ed. *The mycota IX fungal associations*. Berlin, Germany: Springer Verlag, 151–161.

- ❖ Schüßler A., Gehrig H., Schwarzott D. & Walker C. 2001. *Analysis of partial Glomales SSU Rna gene sequences: implication for primer design and phylogeny*. Mycological Research. 105: 5-15.
- ❖ Selosse M.A. & Le Tacon F., 1998. The land flora: a phototrophfungus partnership?, *Trends Ecol. Evol.* 13 15–20.
- ❖ Selosse M.-A., Weiß M., Jany J.-L. & Tillier A. 2002 a. *Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid **Neottia nidus-avis** (L.) L.C.M. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae*. Mol Ecol 11:1831-1844
- ❖ Selosse M.-A., Bauer R. & Moyersoen B. 2002b. *Basal **hymenomyces** belonging to the **Sebacinaceae** are ectomycorrhizal on temperate deciduous trees*. New Phytol 155:183-195.
- ❖ Selosse M-A., Faccio A., Scappaticci G. & Bonfante P. 2004. *Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of **Epipactis microphylla** (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal **septomyces**, including truffles*. Microb Ecol 47:416-426
- ❖ Selosse M-A., Richard F., He X. & Simard S. W. 2006. *Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses?*. Trends in Ecol Evol 21:621-628.
- ❖ Selosse M-A., Boullard B. & Richardson D. 2011. *Noël Bernard (1874-1911): orchids to simbiosis in a dozen years, one century ago*. Springer Science Business. 10. 31-5.
- ❖ Sen R., Hietala A.M., & Zelmer C. 1999. *Common anastomosis and internal transcribed spacer RFLP grouping in binucleate **Rhizoctonia** isolates representing root endophytes of **pinus sylvestris**, **Ceratorhiza** spp. from orchid micorrhizas and phytopathogenic anastomosis group*. New Phytologist 144, 331-341.
- ❖ Senthilkumar S., Britto S. J., Krishnamurthy K. V., & Hariharan C., 2000. *Biochemical analysis of mycorrhizal roots of **Aerides maculosum***. Phytomorphology 50, 273–279.
- ❖ Setälä H. 1995. *Growth of birch and pine-seedlings in relation to grazing by soil fauna on ectomycorrhizal fungi*. Ecology 76: 1844-1851.
- ❖ Shan X.C., Liew E.C.Y., Weatherhead M.A. & Hodgkiss I.J. 2002. *Characterization and taxonomic placement of **Rhizoctonia**-like endophytes from orchid roots*. Mycologia 94: 230-239.
- ❖ Sharma J., Zettler L.W. & Van Sambeek J.W. 2003. *A survey of mycobionts of federally threatened **Platantera praeclara** (Orchidaceae)*. Symbiosis 34: 145-155.
- ❖ Shefferson R.P., Weiß M., Kull T. & Taylor D.L. 2005. *High specificity generally characterises mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus **Cypripedium***. Mol Ecol 14:613-626.
- ❖ Sheviak C.J. 1983. *United States terrestrial Orchids*. Patterns and problems. In North American Terrestrial Orchids. Symposium II. Proceedings and lectures, ed, E.H. Plaxton pp. 49-60. Ann Arbor, USA: Michigan Orchid Society.
- ❖ Shi-Chie C, I-Ling L. & Jiunn-Tzou W. 2002. Estimation of fog deposition on epiphytic bryophytes in a subtropical montane forest ecosystem in northeastern Taiwan. Atmospheric research. 64. 159-167.
- ❖ Sigüenza C., Espejel I. & Allen E.B. 1996. *Seasonal of mycorrhizae in coastal sand dunes of Baja California*. Mycorrhiza 6:151-157.
- ❖ Singh B.K., Nunan N., Ridway K.P., McNicol J., Young J.W.P., Daniell T.J., Prosser J.L. & Millard P. 2008. *Relationship between assemblages of mycorrhizal fungus and bacteria on grass roots*. Environmental Microbiology 10: 534-541.

- ❖ Silva L. C., Romero F.J., Velásquez A. y Almeida-Leñero I. 1999. La vegetación de la región de montaña del sur de la cuenca de México. En Velásquez A. y F. Romero (Comp.) 1999. UAM-X Y SMA-CORENA. Capítulo 3: 66-92.
- ❖ Sivasithamparam K. 1993. *Ecology of root infecting pathogenic fungi in mediterranean environments*. Advances in plant pathology 10: 245-279.
- ❖ Smerciu E.A. & Currah R.S. 1989. *Symbiotic germination of seeds of terrestrial orchids of North America and Europe*. Lindleyana. 1. 6-15.
- ❖ Smith S.E. 1966. *Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition*. New Phytologist. 65, 488-99.
- ❖ Smith K.A. & Russell R.S. 1969. *Ocurrence of ethylene, and its significance, in anaerobic soil*. Nature, 222, 769-71.
- ❖ Smith S.E., Long C. M., & Smith E. A. 1990. *Infection in roots with a dimorphic hipodermis: possible effects on soluble uptake*. Agriculture Ecosystem & Environment, 29, 403-7.
- ❖ Smith, S. E. and Read, D. 1997. Mycorrhizal symbiosis, 2nd edn. London, UK: Academic Press.
- ❖ Solano Gómez R., Cruz Lustre G., Martínez Feria A. y Lagunez Rivera L. 2010. *Plantas utilizadas en la celebración de la Semana Santa en Zaachila, Oaxaca*. Poli botánica 29: 263-279
- ❖ Soto Arenas M. A., Solano Gómez R., Hågstater E., Jiménez Machorro R., Sosa V., Y Salazar Chávez G.A. 2008. **Icones Orchidacearum**. Fascículo 10: Orchids of México Part 4. AMO A.C. México, D.F. Plate 1077.
- ❖ Spearing A.M. 1972. Cation- Exchange capacity and galautronic acid content of several species of sphagnum in Sandy Ridge Bog. The Bryologist 75: 154-158.
- ❖ Starr M. P. 1975. *A general scheme for classifying organismic associations*. In Symbiosis (eds. D. H. Jennings and D. L. Lee), pp. 1–20. Cambridge University Press, Cambridge.
- ❖ Stern W.I., Cheadle V.I. & Thorsch J. 1993. *Apostasiads, systematic anatomy, and the origins of Orchidaceae*. Botanical Journal of the Linnean Society. 111: 411-55.
- ❖ Stevens C.J., Dise N.B., Mountford J.O. & Gowing D.J. 2004. *Impact of nitrogen deposition on the species richness of grasslands*. Science 303: 1876-1879.
- ❖ Stewart S. L. & Zettler L.W. 2002. *Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (**Habenaria repens**, **H. quinqueseta**, **H. macroceratitis**) from Florida*. Aquat. Bot. 72:25–35.
- ❖ Stewart S.L., Zettler L.W., Minso J. & Brown P.M. 2003. *Symbiotic germination and reintroduction of **Spiranthes brevilabris** Lindley, an endangered orchid native of Florida*. Selbyana. 24:64-70.
- ❖ Stewart S.L. & Kane M.E. 2006. *Symbiotic seed germination of **Habenaria macroceratitis** (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 86:159–167.
- ❖ Stewart S.L. & Kane, M.E. 2007. *Symbiotic seed germination and evidence for in vitro mycobiont specificity in **Spiranthes brevilabris** (Orchidaceae) and its implications for species-level conservation*. **In Vitro** Cellular and Developmental Biology-Plant 43:178-186.
- ❖ Stoessl A. & Arditti J. 1984. *Orchid phytoalexins*. In Orchid biology. Reviews and perspectives III, ed, J. Arditti, pp. 153-75. Ithaca. New York; Cornell University Press.
- ❖ Stojanow, N. 1916. *U"ber die vegetative Fortpflanzung der Ophrydineen*. Flora Neue Serie 9: 1–39.

- ❖ Stone J.K., Bacon C.W. & White J.F. Jr. 2000. *An overview of endophytic microbes: endophytism defined*. In Microbial Endophytes (eds. C. W. Bacon and J. F. White Jr.), pp. 3–29. Marcel Decker Inc, New York.
- ❖ Stoutamire W. P. 1974. *Terrestrial orchids seedlings*. In the orchids. *Scientific studies*. Ed. C.I. Withner. Pp. 101-28. New york.
- ❖ Stoutamire W. P. 1983. *Early growth in North American terrestrial seedlings*. In North American Terrestrial Orchids. Symposium II. Proceedings and lectures, ed, E. H. Plaxton, pp. 14-24, Ann Arbor, USA: Michigan Orchid Society.
- ❖ Strullu D.-G. & Gourret J.-P. 1974. Ultrastructure *et evolution du champignon symbiotique des racines de **Dactylorhiza maculata*** (L.) Vermeul. *Journal de Microscopie*, 20, 285-94.
- ❖ Stukeney I.H. 1967. *Environmental factors and the growth of native orchids*, *American Journal of Botany*, 54, 523-41.
- ❖ Suarez J.P., Weiß M., Abele A., Garnica S., Oberwinkler F. & Kottke I. 2006. *Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest*. *Mycol Res* 110:1257-1270.
- ❖ Suarez J.P., Weiß M., Abele A., Garnica S., Oberwinkler F. & Kottke I. 2006. *Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest*. *Mycol Res* 110:1257-1270.
- ❖ Sundermann H. 1961. *Standorte europäischer Orchideen*. I. Gliederung in Standorttypen. *Die Orchidee* 12, 131-7.
- ❖ Sundermann H. 1962. *Standorte europäischer Orchideen*. II. Die Halbtrockenrasen (Mesobrometen) des Kaiserstuhlgebietes. *Die Orchidee*, 13, 5-9.
- ❖ Székely, A. 1994. Protección legal a la biodiversidad en México. Informe de trabajo. Conabio. México.
- ❖ Taboada, S. M. 1981. *Aportación al conocimiento frutícola con enfoque etnobotánico y ecológico en el Estado de Morelos*. Tesis Licenciatura Escuela de Ciencias Biológicas, UAEM, Cuernavaca, Mor.
- ❖ Taylor T.N. & Osborn J.M. 1996. *The importance of fungi in shaping the paleoecosystem*. *Review of Paleobotany and Palynology* 90: 249–262.
- ❖ Taylor D.L. & Bruns T.D. 1997. *Independent, specialized invasion of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:5410–5415.
- ❖ Taylor D.L. & Bruns T.D. 1999. *Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the 'cheating' orchids **Corallorhiza maculata** and **C. mertensiana***. *Mol. Ecol.* 8:1719–1732.
- ❖ Taylor D.L., Bruns T.D., Szaro T.M. & Hodges S.A. 2003. *Divergence in mycorrhizal specialization within **Hexalectris spicata** (Orchidaceae), a nonphotosynthetic desert orchid*. *Am J Bot* 90:1168-1179.
- ❖ Thormann M.N., Currah R.S. & Bayley S.E. 2002. *The relative ability of fungi from **Sphagnum fuscum** to decompose selected carbon substrates*. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 204-211.
- ❖ Tieu A., Dixon K.W., Meney K.A. & Sivasithamparam, K. 2001. *Interactions of soil burial and smoke on germination patterns in seeds of selected Australian native plants*. *Seed Science Research* 11: 69–76.
- ❖ Tilman D. 1987. *Secondary succession and the pattern of plant dominance along experimental nitrogen gradients*. *Ecology Monographs* 57: 189-214.
- ❖ Trappe, J. M. 2005. A.B. Frank and mycorrhizae: *the challenge to evolutionary and ecologic theory*. *Mycorrhiza* 15, 277-281.
- ❖ Treub M. 1890. *E 'tues sur les Lycopodiace'es*. *Ann Jardin Bot Buitenzorg* 8:1–37

- ❖ Trudell S.A., Rygielwicz P.T. & Edmonds R. L. 2003. *Nitrogen and carbon stable isotope abundances support the myco-heterotrophic nature and host specificity of certain achlorophyllous plants*. *New Phytol* 160:391-401.
- ❖ Tsuitsui K. & Tomita M. 1990. *Suitability of several carbohydrates as the carbon sources for symbiotic seedling growth of two orchid species*. *Lindleyana*. 5. 134-9.
- ❖ Tsuneda A. Thormann M.N. & Currah R.S. 2001. *Modes of cell-wall degradation of **sphagnum fuscum** by **Acremonium cf. Curvulum** and **Oidiodendron maius***. *Canadian Journal of Botany* 79:93-100.
- ❖ Turetsky M. R. 2003. *The role of Bryophytes in Carbon and Nitrogen Cycling*. *The bryologist* 106: 395-409.
- ❖ Uetake Y. & Peterson R. L. 1998. *Association between microtubules and symbiotic fungal hyphae in protocorm cells of the orchid species, **Spiranthes sinensis***. *New Phytol.* 140, 715–722.
- ❖ Umata H. 1995. *Seed germination of **Galeola altissima**, an achlorophyllous orchid, with aphylophorales fungi*. *Mycoscience* 36, 369-372.
- ❖ Umata H. 1998. *In vitro symbiotic association of an achlorophyllous orchid, **Erythrorchis ochobiensis**, with orchid and non-orchid fungi*. *Memoirs of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University* 34.
- ❖ Urech J., Fechtig B., Nüesch J. & Vischer E. 1963. *Hircinol eine antifungisch wirksame Substanz aus Knollen von **Loroglossum hircinum** (L.) Rich.* *Helvetica Chimica Acta* 46, 2758-66.
- ❖ Van der Kinderen G. 1995a. *A method for the study of field germinated seeds of terrestrial orchids*. *Lindleyana* 10: 68-73.
- ❖ Van der Kinderen G. 1995b. *Observations on in situ germination of **Eptactis hellebonne** (L.) Crantz*. *Lindleyana* 10: 223-231.
- ❖ Van Waes J. 1984. *In vitro studie van de kiemingsfysiologie van Westeuropese orchideeën*. Thesis. *Rijksuniversiteit Gent*.
- ❖ Vannini A. & Scarascia Mugnozza G. 1991. *Water stress predisposing factor in the pathogenesis of **Hypoxyton mediterraneum** **Quercus cerris***. *European Journal of Forest Pathology* 21: 193-201
- ❖ Vannini A., Valentini R. & Luisi N. 1996. *Impact of drought and **Hypoxyton mediterraneum** on oak decline in the Mediterranean region*. *Annales des Sciences Forestières (Paris)* 53: 753-760.
- ❖ Vargas, F. 1984. *Parques Nacionales de México y Reservas Equivalentes*. Instituto de Investigaciones Económicas. UNAM. México.
- ❖ Vargas-Márquez, F. 1997 *Parques Nacionales de México*. Vols. I y II. Instituto Nacional de Ecología, Semarnap, México.
- ❖ Vermeulen P. 1947. *Studies on **Dactylorchids***. Utrecht: Schotanus & jens.
- ❖ Vermeulen P. 1966. *The system of Orchidales*. *Acta Botanica Neerlandica* 15, 224-53.
- ❖ Vöth W. 1980. *Naturgegebenes Verhalten von **Gymnadenia conopsea** und **Listeria ovata***. *Jahresbericht des Naturwissenschaftlichen Vereins in Wuppertal*. 33, 136-45.
- ❖ Vujanovic V., ST-Arnaud M., Barabé D. & Thibeault G. 2000. *Viability Testing of Orchid Seed and the Promotion of Colouration and Germination*. *Annals of Botany* 86: 79-86.
- ❖ Wang, D.Y.C., Kumar S. & Hedges S.B. 1999. *Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants. **Animals and fungi***. *Proceedings of the Royal Society of London*. 266: 163-177.
- ❖ Wahrlich W. 1886. *Beitrag zur Kenntniss der Orchideenwurzelpilze*. *Bot Z* 44(481–490):497–505
- ❖ Wang, B. and Qiu, Y. L. (2006). *Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants*. *Mycorrhiza* 16, 299-363.

- ❖ Warcup J.H. & Talbot P.H.B. 1967. *Perfect states of Rhizoctonias associated with orchids*. New Phytologist 66:631-641.
- ❖ Warcup J.H. & Talbot P.H.B. 1971. *Perfect states of Rhizoctonia's associated with orchids II*. New Phytologist. 70:35-40.
- ❖ Warcup J.H. 1971. *Specificity of mycorrhizal association in some Australian terrestrial orchids*. New Phytol 70:41-46
- ❖ Warcup J.H. 1973. *Symbiotic germination of some Australian terrestrial orchids*. New Phytologist. 70:41-6.
- ❖ Warcup J.H. 1975. *Factors affecting symbiotic germination of orchid seed*. Proceedings of a symposium held at the University of Leeds, 22-25 July 1974. Academic Press, London. 87-104.
- ❖ Warcup J.H. 1981. *The mycorrhizal relationships of Australian orchids*. New Phytologist. 87:371-81.
- ❖ Warcup J. H. 1985. *Rhizanthella gardneri (Orchidaceae), its Rhizoctonia endophyte and close association with Melaleuca uncinata (Myrtaceae) in Western Australia*. New Phytol 99:273-280.
- ❖ Warcup J.H. 1988. *Mycorrhizal associations of isolates of Sebacina vermifera*. New Phytologist 110: 227-31.
- ❖ Warcup J.H. 1991. *The Rhizoctonia endophytes of Rhizanthella (Orchidaceae)*. Mycol Res 95:656-659.
- ❖ Wells T.C.E. & Cox R. 1991. Demographic and biological studies of *Ophrys apifera*: some results from 10-year study. In *population ecology of terrestrial orchids*.ed. T.C.E Wells & J.H. Willems, pp. 47-61. The Hague: SPB. Academic Publishing
- ❖ Werkmeister P. 1971. *Light induction of geotropism, and the control of proliferation and growth of Cymbidium in tissue culture*. Botanical Gazette, 132, 346-50.
- ❖ Whalley A.J.S. 1985. *The Xylariaceae: some ecological considerations*. Sydowia 38: 369-382.
- ❖ Wherry E.T. 1918. *The reaction of the soils supporting the growth of certain native orchids*: Journal of the Washington Academy of Sciences 8. 589-98.
- ❖ Whigham D. F., Rasmussen H. N., O'Neill J., Caldwell B., Smith C., McCormick M. & Daniell T. *MS Interactions between decomposing wood, mycorrhizas and terrestrial orchid seeds and protocorms. In Underlying mechanisms of trends and fluctuations in terrestrial orchid populations. Eds. P Kindlmann, J Willems and D F Whigham. In Press.*
- ❖ Whigham D.F., O'Neil J.P., Rasmussen H.N., Caldwell B.C. & McCormick K.M. 2006. *Seed longevity in terrestrial orchids-Potential for persistent in situ seed Banks*. Biological Conservation 129: 24-30.
- ❖ Whitridge H. & Southworth D. 2005. *Mycorrhizal symbionts of the terrestrial orchid Cyrtopodium fasciculatum*. Selbyana 26:328-334.
- ❖ Wilkinson K. G., Dixon K. W., Sivasithamparam K. & Ghisalberti E. L. 1994. *Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria*. Plant Soil 159, 291-295.
- ❖ Willems J.H. & Bik L. 1991. *Population biology of Orchis simia in the Netherlands. In population ecology of terrestrial orchids*.ed. T.C.E Wells & J.H. Willems, pp 33-45. . The Hague: SPB. Academic Publishing
- ❖ Williamson B. 1970. *Induced DNA synthesis in orchid mycorrhiza*. Planta, 92, 347-54.
- ❖ Williamson B. 1973. *Acid phosphatase and esterase activity in orchid mycorrhiza*. Planta, 112, 146-58.
- ❖ Wilson D. 1995. *Endophyte – the evolution of a term, and clarification of its use and definition*. Oikos 73, 274–276.

- ❖ Wilson G.T.W & Hartnett D.C. 1997. *Effects of mycorrhizae on plant growth and dynamics in experimental tallgrass prairie microcosm*. Am. J Bot. 81: 178-182.
- ❖ Wolff H. 1933. *Zur Assimilation atmosphärischen Stickstoffs durch die Wurzelpilze von Coralliorhiza innata R.Br., sowie der Ephyten Cattleya bowringiana und Laelia anceps Ldl*. Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik. 77. 657-84.
- ❖ Wolf, J. H. D. & Flamenco, A. 2003. *Patterns in species richness and distribution of vascular epiphytes in Chiapas, Mexico*. J. Biogeogr. 30, 1689-1707.
- ❖ Wooster, K. R. 1935. *The lizard orchid*. Gardener's Chronicle 98: 244
- ❖ Yam W.T. & Arditti J. 2009. *History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology*. Plant biotechnology 3: 1-56.
- ❖ Yeung E. C. & Law S. K. 1992. *Embriology of Calypso bulbosa*. II. Embryo development. Canadian Journal Botany 70, 461-8.
- ❖ Yoder J. A., Zettler L. W. & Stewart S. L. 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.
- ❖ Zasada J. 1986. Natural regeneration of trees and tall shrubs on forest sites in interior Alaska. In forest ecosystems in the Alaskan taiga. Pp 44-73. Springer NY.
- ❖ Zelmer C.D. & Currah R.S. 1995. *Evidence for a fungal liason between Corallorhiza trifida (Orchidaceae) and Pinus contorta (Pinaceae)*. Canadian Journal of Botany. 73:862-866.
- ❖ Zelmer, C. D. & R. S. Currah. 1995. *Ceratorhiza pernecatena and Epulorhiza calendulina* spp. nov.; mycorrhizal fungi of terrestrial orchids. Can. J. Bot 73:1981–1985. CrossRef, CSA
- ❖ Zelmer C.D., Cuthbertson L. & Currah R.S. 1996. *Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms*. Mycoscience 37:439-448.
- ❖ Zelmer C.D. & Currah R.S. 1997. *Symbiotic germination of Spiranthes lacera (Orchidaceae) with naturally occurring endophyte*. Lindleyana 12:142-148.
- ❖ Zettler L.W. & McInns T.M Jr. 1994. *Light enhancement of symbiotic seed germination and development of an endangered terrestrial orchid (Platanthera integrilabia)*. Plant science 102. 133-138.
- ❖ Zettler L.W. 1997a. *Orchid fungal simbiosis and its value in conservation*. McIlvaninea 13:40-45.
- ❖ Zettler L.W. 1997 b. *Terrestrial orchid conservation by simbiotic seed germination: Techniques and perspectives*. Selbyana. 18: 188-194.
- ❖ Zettler L. W., Sharma J., & Rasmussen, H. N. 2003. *Mycorrhizal diversity. Orchid conservation*. Natural History Publications (Borneo) Kota Kinabalu, Sabah. 205-226.
- ❖ Zettler L.W., Piskin K.A. Stewart S.L., Hartsock J.J., Bowles M.L. & Bell T.J. 2005. *Protocorms mycobionts of the federally threatened eastern prairie fringed orchid, Platanthera leucophaea (Nutt.) Lindley, and technique to prompt leaf elongation in seedlings*. Mycology 53: 163-171.
- ❖ Zettler, L. W. 2005. *Nature's fungal connoisseurs*. Orchids 74:292–297.
- ❖ Zettler L.W., Corey L.L., Richardson L.W., Ross A.Y. & Moller-Jacobs L. 2011 a. *Protocorms of an epiphytic orchid, (Epidendrum amphistomum A. Richard) recovered in situ, and subsequent identification of associated mycorrhizal fungi using molecular markers*. European Journal Environmental Sciences 1:108-114.

- ❖ Zettler L.W. & Piskin K.A. 2011 b. *Mycorrhizal fungi from protocorms, seedlings, and mature plants of the eastern prairie fringed orchid, **Platanthera leucophaea**: A comprehensive list to augment conservation.* American Midland Naturalist 166:29-39
- ❖ Zhu G.S., Yu Z.N., Gui Y. & Liu Z.Y. 2008. *A novel technique for isolating orchid mycorrhizal fungi.* Fungal Diversity 33: 123-137.