



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
EDAFOLOGÍA

**Colonización micorrízica y diversidad de hongos
micorrízicos de algunas especies de orquídeas epífitas
tropicales en el Sureste de Chiapas, México.**

JESÚS CRUZ BLASÍ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO
2007

CONSEJO PARTICULAR



DR. JESÙS PÈREZ MORENO

Colegio de Posgraduados



DRA. MARÍA DEL PÍLAR ORTEGA LARREA

Instituto de Geología, UNAM

La presente tesis titulada: “Colonización micorrízica y diversidad de hongos micorrízicos de algunas especies de orquídeas epifitas tropicales en el Sureste de Chiapas, México”, **realizada por el alumno:** Jesús Cruz Blasi **bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:**

MAESTRO EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

DR. JESÚS PÉREZ MORENO
Colegio de Posgraduados

DIRECTORA
DE TESIS

DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA
Instituto de Geología, UNAM

ASESORA

DRA. ANNE ASHBY DAMON BEALE
El Colegio de la Frontera Sur, ECOSUR

COLONIZACIÓN MICORRÍZICA Y DIVERSIDAD DE HONGOS MICORRÍZICOS DE
ALGUNAS ESPECIES DE ORQUÍDEAS EPIFITAS TROPICALES EN EL SURESTE DE
CHIAPAS, MÉXICO

Jesús Cruz Blasi, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2007

Resumen

El status de la colonización micorrízica, los factores que la influyen y la diversidad fúngica asociada, fue investigada en orquídeas de hábitos epífitos que crecen en las ramitas de los cafetales y en árboles remanentes de la selva tropical del Sureste de México. El 97% de los individuos presentaron algún grado de colonización micorrízica. La intensidad de colonización estuvo inversamente relacionada con el diámetro de la raíz. Orquídeas de raíces delgadas estuvieron intensamente colonizadas, alcanzando en algunos casos hasta 98%. Así también, existió una relación positiva entre la edad de las raíces y su intensidad de colonización. Las raíces más viejas concentraron la mayor colonización. En términos generales, las células recién colonizadas se ubicaron en las áreas cercanas al ápice de las raíces, mientras que pelotones altamente digestados se concentraron de la parte media a la base de la raíz. Orquídeas que crecían sobre las ramitas del café presentaron una intensa colonización activa, representado por la presencia de pelotones con hifas intactas, durante la época de secas. En contraste, orquídeas que crecían en árboles de fuste grueso localizadas en zonas de menor precipitación, solo presentaron células con pelotones altamente digestados. En cuanto a la diversidad fúngica asociada, se obtuvieron aislados de pelotón y de tejido cortical. Siete morfotipos (MT) del género *Rhizoctonia* fueron reconocidos. Un MT coincidió con las características morfotaxonómicas de *Ceratorhiza* y cuatro más con *Epulorhiza*. Más de un MT fue aislado de una misma planta. MT-1 y MT-7 fueron aislados de la misma raíz joven de *Epidendrum stamfordianum*. MT-7 es un aislado característico de *Epulorhiza*. Un mismo morfotipo de hongo, afín a *Epulorhiza*, fue aislado de pelotón en dos especies de orquídeas colectadas en el mismo árbol. De acuerdo al alto grado de colonización micorrízica observada en las especies de orquídeas que crecen sobre las ramitas del café, este hábitat constituye un refugio para los simbiontes fúngicos de orquídeas epífitas tropicales en el Sureste de México.

Palabras clave: *Rhizoctonia*, *Epulorhiza*, *Ceratorhiza*, micorriza orquideoide, orquídeas epífitas, selva tropical húmeda, cafetales, orquídeas de ramitas.

MYCORRHIZAL COLONIZATION AND DIVERSITY OF MYCORRHIZAL FUNGI
FROM SOME TROPICAL EPIPHYTIC ORCHIDS OF SOUTHEAST CHIAPAS, MEXICO

Jesús Cruz Blasi, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2007

Summary

The status of mycorrhizal colonization, the factors influencing it and the associated fungal diversity was investigated in orchids of epiphytic habits growing in the branches of coffee plantations and in remnant trees of the tropical forest of Southeastern Mexico. Some degree of mycorrhizal colonization was observed in 97% of the individuals. The intensity of colonization was inversely related to the root diameter. Orchids of thin roots were intensely colonized, some them reaching up to 98%. Similarly a positive relationship was observed between the rot age and their colonization. The older roots had higher colonization. In general the recently colonized cells were located near to the root apices, while the highly digested pelotons were concentrated from the middle part to the root base. Orchids growing on the coffee branches showed an intense active colonization represented by the presence of pelotons with intact hyphae during the dry period. On the contrary, the orchids growing on the trees having thick trunk located in lower precipitation zones only showed cells with highly digested pelotons. As far as associated fungal diversity is concerned, isolates of pelotons and cortical tissues were obtained. Seven morphotypes (MT) of genus forma-*Rhizoctonia* were recognized. One MT coincided with morphotaxonomic characteristics of *Ceratorhiza* and four of them more with *Epulorhiza*. More than one MT was isolates from the same plant. MT-1 and MT-7 were isolated from the same young root of *Epidendrum stamfordianum*. MT-7 is a characteristic isolate of *Epulorhiza*. A same fungal morphotype similar to *Epulorhiza* was isolated from pelotons in two orchid species collected from the same tree. Keeping in view the high extent of mycorrhizal colonization observed in orchid species growing on coffee branches, their habitat constitutes a refuge for the fungal symbionts of tropical epiphytic orchids of Southeast Mexico.

Key words: *Rhizoctonia*, *Epulorhiza*, *Ceratorhiza*, orchid mycorrhiza, epiphytic orchids, rain tropical forest, coffee, twig orchids.

Este trabajo esta dedicado a:

Mi hermano Víctor, por todo su apoyo durante todo este tiempo

To Yumi Igusa, from Japan, for your sincere love

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca para realizar mis estudios de maestría.

Al fondo mixto SEMARNAT-CONACYT por haber financiado el proyecto “Restauración y aprovechamiento sustentable de las orquídeas del Soconusco, Chiapas” C01-0697/A-1 bajo la dirección de la Dra. Anne Damon, de cuyo proyecto se financió los trabajos realizados en esta tesis.

A la Dra. María del Pilar Ortega Larrocea, por permitirme trabajar en su laboratorio, por su enseñanza, su tiempo dedicado y por las exhaustivas revisiones al escrito. Mil gracias y mis sinceras disculpas por mi obstinada y terca actitud.

A la Dra. Anne Damon, por su apoyo en el financiamiento del trabajo, sus sugerencias en cuanto a la ecología y taxonomía de las orquídeas, las revisiones y la traducción del artículo.

Al Dr. Jesús Pérez Moreno, por su invaluable apoyo en la escritura del artículo.

A la M.C. Mónica Rangel Villafranco, por su amistad y apoyo durante mi estancia en el laboratorio Microcosmos Bioedáfico del Departamento de Edafología del Instituto de Geología de la UNAM.

A la M.C. Guadalupe Nieto López, por su apoyo en la toma de imágenes en microscopía electrónica de barrido.

Al M.C. Javier Valle Mora, por su apoyo en el análisis estadístico.

A mis amigos: Gabriel Flores del Carpio, Joel Barrios Gerardo, José Antonio Atilano Briscon y Víctor Manuel Perea Estrada por su apoyo en las salidas a campo. A Rufo y Lulú por todo su apoyo durante este tiempo. A Muhammad Ehsan por la traducción de los resúmenes.

Contenido

	Página
Índice de cuadros.....	viii
Índice de figuras.....	ix
Capítulo 1. Introducción general.....	1
1.2. Literatura citada.....	4
Capítulo 2. Objetivos.....	7
2.1. Objetivo general.....	7
2.2. Objetivos específicos.....	7
Capítulo 3. Intensidad de colonización micorrízica de siete orquídeas epifitas tropicales del Sureste de México.....	8
3.1. Resumen.....	8
3.2. Abstract.....	9
3.3. Introducción.....	10
3.4. Materiales y métodos.....	11
3.4.1. Sitios de estudio y especies de orquídeas estudiadas.....	11
3.4.2. Recolección de raíces y evaluación micorrízica.....	13
3.4.3. Análisis estadístico.....	14
3.5. Resultados.....	14
3.5.1. Intensidad de colonización micorrízica.....	14
3.5.2. Edad, diámetro de raíz y colonización micorrízica.....	17
3.5.3. Colonización micorrízica en orquídeas de las ramitas del café y orquídeas de árboles de fuste grueso.....	19
3.6. Discusión.....	24
3.7. Literatura citada.....	30
Capítulo 4. Hongos micorrízicos asociados a tres orquídeas epifitas neotropicales del Sureste de Chiapas, México.....	33
4.1. Resumen.....	33
4.2. Abstract.....	34
4.3. Introducción.....	35
4.4. Materiales y métodos.....	37
4.4.1. Selección de las especies de estudio.....	37
4.4.2. Recolección del material biológico.....	38
4.4.3. Aislamiento de endófitos micorrízicos.....	38
4.4.4. Determinación taxonómica de los aislados.....	39
4.5. Resultados.....	40
4.6. Discusión.....	45

4.7 Literatura citada.....	50
Conclusiones generales y consideraciones finales.....	55
Anexos	
Anexo 1a. Características morfológicas de los aislados de hongos micorrízicos de orquídeas epifitas de Chiapas.....	56
Anexo 1b. Características morfológicas de los aislados de hongos micorrízicos de orquídeas epifitas de Chiapas.....	57
Anexo 1c. Características morfológicas de los aislados de hongos micorrízicos de orquídeas epifitas de Chiapas.....	58
Anexo 1d. Características morfológicas de los aislados de hongos micorrízicos de orquídeas epifitas de Chiapas.....	59
Anexo 2a. Micario de hongos micorrízicos aislados de orquídeas epifitas del Sureste de Chiapas.....	60
Anexo 2b. Micario de hongos género forma-Rhizoctonia aislados de orquídeas epifitas del Sureste de Chiapas.....	61
Anexo 2c. Micario de hongos género forma-Rhizoctonia aislados de orquídeas epifitas del Sureste de Chiapas.....	62
Anexo 2d. Micario de hongos género forma-Rhizoctonia aislados de orquídeas epifitas del Sureste de Chiapas.....	63
Anexo 2e. Micario de hongos micorrízicos aislados de orquídeas epifitas del Sureste de Chiapas.....	64
Anexo 2f. Micario de hongos micorrízicos aislados de orquídeas epifitas del Sureste de Chiapas.....	65
Anexo 3a. Micario de secciones transversales de raíz de orquídeas epifitas del Sureste de Chiapas.....	65
Anexo 3b. Micario de secciones transversales de raíz de orquídeas epifitas del Sureste de Chiapas.....	66

Índice de Cuadros

	Página
Cuadro 3.1. Descripción de sitios de estudio.....	12
Cuadro 3.2. Ejemplo de intensidad de colonización micorrízica (%) a lo largo de raíces de orquídeas epifitas en <i>Coffea arabica</i> (L) como forofito....	15
Cuadro 3.3. Ejemplo de intensidad de colonización (%) a lo largo de las raíces de orquídeas epifitas que crecen sobre árboles de fuste grueso.....	16
Cuadro 3.4. Volumen de raíz colonizada y extensión de la colonización de acuerdo a la especie de orquídea, forofito y altitud del sitio de muestreo.....	20

Índice de Figuras

	Página
Figura 3.1. Intensidad de colonización del córtex de las orquídeas epífitas de acuerdo al diámetro de la raíz.....	17
Figura 3.2. Volumen del córtex colonizado (barras negras) y extensión de la colonización (barras blancas) de acuerdo a la edad de la raíz de orquídeas epífitas.....	18
Figura 3.3. Patrón de colonización micorrízica en raíces maduras de tres orquídeas epífitas del café.....	21
Figura 3.4. Patrón de distribución de la colonización micorrízica a lo largo de las raíces de diferente edad en <i>Nonylia barkeri</i>	22
Figura 3.5. Patrón de la colonización micorrízica en raíces maduras de orquídeas epífitas de árboles de fuste grueso, ubicadas en zonas de muestreo a menor altitud.....	23
Figura 3.6. Hábitat y colonización micorrízica de orquídeas epífitas tropicales	28
Figura 4.1. Claves de aislados micorrízicos de raíces de orquídeas adultas, de acuerdo al hospedero y sitio de muestreo.....	41
Figura 4.2. Morfología colonial y micromorfología de células monilioides en aislados del género forma- <i>Rhizoctonia</i>	43
Figura 4.3. Morfología colonial y micromorfología de células monilioides en aislados del género forma- <i>Rhizoctonia</i>	44
Figura 4.4. El mismo aislado en diferente especie de orquídea, muestreadas en el mismo árbol.....	46

Capítulo 1

Introducción general

La familia Orquidaceae es bien reconocida porque algunos de sus miembros presentan flores de extraordinaria belleza que son altamente cotizadas por aficionados cultivadores de flores. Siendo probablemente la familia más grande de plantas con flores (Pridgeon 1992) y la más diversa, las orquídeas presentan los más complejos sistemas estructurales y de función, de todas las monocotiledones. Tienen una profunda especialización para la polinización, toma y almacenamiento de agua y asociaciones con hongos (Pridgeon 1992). Todos los miembros de esta familia se caracterizan por depender obligadamente de simbiontes micorrízicos durante la germinación de sus semillas en la naturaleza y como complemento de su alimentación micotrófica (mediada por hongos) durante todo su ciclo de vida hasta la etapa adulta (Rasmussen 1995, Smith y Read 1997). La interacción micorrízica funciona a varios niveles, desde las especies fotosintéticas que presentan una parcial micotrofia, hasta las micotrófas obligadas que carecen de clorofila y dependen totalmente de sus hongos simbiontes para su sobrevivencia (Leake 1994, Gebaur y Meyer 2003, Julou et al. 2005).

Los hongos participan en una simbiosis parasítica en donde son la fuente de alimento para las semillas de orquídeas que carecen de energía para iniciar el proceso de germinación (Rasmussen 1995, Smith y Read 1997). El embrión embebido es rápidamente colonizado por la hifa de un hongo específico, el que invade algunas células del embrión formando enrollamientos hifales en su interior, llamados pelotones. Estos pelotones son digeridos por las células del embrión y los nutrientes que obtiene de esta digestión enzimática son usados para el proceso de la germinación, desencadenando la diferenciación de órganos vegetativos (Rasmussen 1995). Sin la participación de los hongos, el proceso de germinación no ocurre o ocurre sin un posterior desarrollo. La probabilidad de que una semilla de orquídea germine, aunque esté en contacto con el simbionte micorrízico es baja en algunas especies y únicamente algunas de los millones de semillas producidas por una sola planta germinarán (Arditti 1992).

Durante la etapa adulta, las orquídeas pueden ser menos dependientes de la simbiosis micorrízica, al observarse que no siempre están colonizadas por hongos (Rasmussen 1995).

A pesar de que la mayoría de los miembros de la familia Orchidaceae son epífitas tropicales y subtropicales, la presencia de micorrizas ha sido poco investigada en orquídeas con estos hábitat y en estos climas. El grupo mejor estudiado es el de las orquídeas terrestres de clima templado, particularmente las especies nativas de Norteamérica, Europa, parte de Asia y Australia (Rivas et al. 1998). En las especies terrestres estudiadas, la micorrización ha sido descrita en todos los individuos, pero los estudios hechos con orquídeas epífitas han demostrado grados variables de asociación. Algunos autores han considerado que la colonización micorrízica en zonas tropicales es esporádica o menos común que en orquídeas terrestres de zonas templadas (Hadley y Williamson 1972, Lesica y Antibus 1990; Otero et al. 2002) y otros han encontrado intensas colonizaciones (Benzing y Friedman 1981, Benzing 1982, Goh et al., 1992; Rivas-Rossi et al., 1998).

Adicionalmente, la condición epífítica pudiera hacer a las orquídeas más dependientes de la asociación micorrízica, debido a una limitada adquisición de nutrientes al crecer sobre los árboles. A pesar de que algunos estudios demuestran que el sustrato orgánico de la canopia de los árboles, presenta los mismos contenidos de nutrientes que el horizonte orgánico de los suelos en bosques tropicales (Nadkarni y Matelson 1991, Nadkarni et al. 2002), éste pudiera ser insuficiente volumétricamente o menos disponible que en la solución del suelo en cuanto al aporte de minerales. La disponibilidad de acumulación de este sustrato orgánico es variable espacial y temporalmente en la canopia de los árboles (Benzing 1986, Nadkarni 1986).

Diversos autores han argumentado la importancia de la presencia y contacto del detritus orgánico en la colonización micorrízica de orquídeas epífitas, observando que las zonas de colonización ocurren normalmente en los sitios de la raíz adjunta al sustrato y que las raíces aéreas están siempre libres de colonización (Hadley y Williamson, 1972; Goh et al. 1992). Adicionalmente a esto, otro factor que se ha observado que influye en la colonización micorrízica, es la edad de las raíces, al observar que raíces más viejas concentran la mayor colonización (Benzing 1982, Rasmussen y Whigham 2002). Sin embargo, todavía son pocos los trabajos que argumentan estos fenómenos.

Los hongos micorrízicos en orquídeas fotosintéticas han sido descritos dentro del género forma-*Rhizoctonia* (Basidiomycota: Hymenomycetes). La forma *Rhizoctonia* incluye

los géneros anamórficos (asexual), *Ceratorhiza*, *Epulorhiza*, *Moniliopsis* y *Rhizoctonia*, de una variedad de teleomorfos (estado sexual de *Ceratobasidium*, *Thanatephorus*, *Tulasnella* y *Sebacina*) (Currah et al. 1997, Otero et al. 2002). Sin embargo, orquídeas terrestres aclorófilas, que crecen en el sotobosque de densas comunidades arbóreas en zonas templadas, presentan una alta especialización micotrófica asociándose predominantemente con ectomicorrizas hymenomycetes (Thelephoraceae y Cortinaceae), derivando el carbono necesario de los árboles a su alrededor (Taylor y Bruns 1997, McKendrick et al. 2000, Selosse et al. 2002, Taylor et al. 2003, Julou et al. 2005, Girlanda et al. 2006). Con respecto a la diversidad de hongos micorrízicos asociados a orquídeas de hábitos epífitos, poco se ha explorado al respecto. Hasta lo que se conoce, los géneros anamórficos *Ceratorhiza* y *Epulorhiza* también son comunes en los hábitos epífitos (Otero et al. 2002, Pereira et al. 2003, 2005, Suárez et al. 2006).

En México, a pesar de ser un país que alberga aproximadamente 1 200 especies de orquídeas, no existen descripciones que registren en detalle la presencia micorrízica en orquídeas epífitas. La mayoría de esta riqueza de orquídeas ocurre en las selvas tropicales del Sur del país. Sin embargo, en el Sureste de Chiapas las plantaciones de café han reemplazado a extensas áreas de bosque nublado montaño, dominando el sistema de producción de café que se caracteriza por presentar una sombra con una diversidad de árboles de la vegetación original (Moguel y Toledo 1999, Hietz 2005). En estudios recientes se ha demostrado que estas plantaciones pueden funcionar como refugio para una gran proporción de las orquídeas del bosque original, al proveerlos de los recursos como la conservación de sus polinizadores (Moguel y Toledo 1999, Solís-Montero et al. 2005). Durante la época de lluvias una gran cantidad de plántulas de orquídeas han sido observadas en las ramitas del café. Dado que las orquídeas requieren de manera obligada de un simbionte micorrízico apropiado para germinar en la naturaleza decidimos explorar si las plantaciones de café también están permitiendo albergar a los hongos micorrízicos que requieren las orquídeas para su prevalencia en este hábitat modificado. El propósito de este estudio fue evaluar la intensidad de colonización micorrízica y fortalecer el conocimiento que se tiene sobre la posible importancia micotrófica en orquídeas epífitas. Además se evaluó la relación entre la intensidad de colonización y el diámetro y la edad de las raíces. Así mismo se describió el patrón de digestión a lo largo de las

raíces. Adicionalmente se presenta una descripción inicial de algunos hongos micorrízicos aislados de pelotones y células corticales de orquídeas epifitas en México.

Literatura citada

- Arditti J** (1992) Fundamentals of orchid biology. John Wiley & Sons, New York, USA, 613 p
- Benzing DH** (1982) Mycorrhizal infection of epiphytic orchids in southern Florida. *Amer Orchid Soc Bull* 51:618-622
- Benzing DH** (1986) The vegetative basis of vascular epiphytism. *Selbyana* 9: 23-43
- Benzing DH, Friedman WE** (1981) Mycotrophy: its occurrence and possible significance among epiphytic Orchidaceae. *Selbyana* 5:243-247
- Currah RS, Zelmer CD, Hambleton S, Richardson KA** (1997) Fungi from orchid mycorrhizas. In: Arditti J, Pridgeon AM (eds.) *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*, VII. Kluwer Academic, Great Britain, pp:117-170
- 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
- Girlanda M, Selosse MA, 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
- Goh CJ, Sim AA, Lim G** (1992) Mycorrhizal associations in some tropical orchids. *Lindleyana* 7:13-17
- Hadley G, Williamson B** (1972) Features of mycorrhizal infection in some Malayan orchids. *New Phytol* 71:1111-1118
- Hietz P** (2005) Conservation of vascular epiphyte diversity in Mexican coffee plantations. *Con Biol* 19:391-399
- Julou T, Burghardt B, Gebauer G, Berveiller D, Damesin C, Selosse MA** (2005) Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytol* 166:639-653
- Leake JR** (1994) The biology of mycoheterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytol* 127:171-216

- Lesica P**, Antibus RK (1990) The occurrence of mycorrhizae in vascular epiphytes of two Costa Rican rain forests. *Biotropica* 22:250-258
- McKendrick SL**, Leake JR, Read DJ (2000) Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plant in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. *New Phytologist* 145: 539-548.
- Moguel P**, Toledo VM (1999) Biodiversity conservation in traditional coffee systems of Mexico. *Con Biol* 13:11-21
- Nadkarni NM** (1986) The nutritional effects of epiphytes on host trees with special reference to alteration of precipitation chemistry. *Selbyana* 9:44-51
- Nadkarni NM**, Matelson TJ (1991) Fine litter dynamics within the tree canopy of a tropical cloud forest. *Ecology* 72:2071-2082
- Nadkarni NM**, Schaefer D, Matelson TJ, Solano R (2002) Comparison of arboreal and terrestrial soil characteristic in a lower montane forest, Monteverde, Costa Rica. *Pedobiologia* 46:24-33
- Otero JT**, Ackerman JD, Bayman P (2002) Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany* 89: 1852-1858
- Pereira OL**, Kasuya MCM, Borges AC, Araújo EF (2005) Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. *Can J Bot* 83:54-65
- Pereira OL**, Rolleberg CL, Borges AC, Matsuoka K, Kasuya MCM (2003) *Epulorhiza epiphytica* sp.nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. *Mycoscience* 44: 153-155
- Pridgeon A** (1992) The illustrated encyclopedia of orchids. Alasdair Morrison-Timber Press, USA
- Rasmussen HN** (1995) Terrestrial orchids: From seed to mycotrophic plants. Cambridge University Press, London, UK, pp:167-172
- Rasmussen HN**, Whigham DF (2002) Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. *New Phytol* 154:797-807
- Rivas RM**, Warner J, Bermúdez M (1998) Presencia de micorrizas en orquídeas de un jardín botánico neotropical. *Rev Biol Trop* 46:211-216
- Selosse MA**, Weib M, Jany J-L, Tillier A. 2002. 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.

- Smith SE**, Read DJ (1997) Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London
- Solis-Montero L**, Flores-Palacios A, Cruz-Angón A (2005) Shade-coffee plantations as refuges for tropical wild orchids in central Veracruz, Mexico. *Con Biol* 19: 908-916
- Suárez JP**, Weib 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
- Taylor DL**, Bruns TD (1997) Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4510-4515
- Taylor DL**, Bruns TD, Szaro TM, Hodges SA (2003) Divergence in mycorrhizal specialization within *Hexalectris spicata* (Orchidaceae), a nonphotosynthetic desert orchid. *American Journal of Botany* 90: 1168-1179

Capítulo 2.

Objetivos

2.1. Objetivo general

Caracterizar la colonización micorrízica, los factores que la influyen y la diversidad fúngica asociada a orquídeas de hábitos epífitos que crecen en la selva tropical del Sureste de Chiapas, México.

2.2. Objetivos particulares

1. Evaluar la intensidad de micorrización en orquídeas epífitas que crecen en las ramitas del café y en árboles remanentes de la selva tropical en el Sureste de Chiapas, México.
2. Determinar si existe relación entre la intensidad de colonización, el diámetro y la edad de la raíz en orquídeas epífitas.
3. Iniciar la caracterización de la diversidad de hongos relacionados con la colonización micorrízica en orquídeas.

Capítulo 3

Intensidad de colonización micorrízica de siete orquídeas epífitas tropicales del Sureste de México

3.1. Resumen

La evaluación de la intensidad de la colonización micorrízica en orquídeas epífitas tropicales en la naturaleza y los factores que la influyen, ha recibido en términos generales escasa atención. Se estudiaron siete especies de orquídeas epífitas tropicales del Sureste de México: *Epidendrum stamfordianum*, *Trichocentrum ascendens*, *Stelis quadrifida*, *Notylia barkeri*, *Leochilus labiatus*, *Erycina crista-galli* y *Specklinia marginata* en dos hábitat distintos: i) en selva tropical remanente con árboles tropicales de fuste grueso como forofitos y ii) en un cafetal con sombra de árboles nativos de la selva tropical. Se evaluó el grado de colonización micorrízica, en términos del volumen y extensión de la colonización, a lo largo de las raíces de distintas edades: recién formadas o jóvenes, de mediano tamaño y de mayor longitud o maduras. A pesar de que todas las raíces fueron colectadas durante la época seca, la mayoría de dichas especies presentaron una intensa colonización, la cual alcanzó en algunos casos hasta 98 % del área cortical colonizada. El grado de colonización micorrízica estuvo inversamente relacionado con el diámetro de las raíces evaluadas. A su vez, se observó una relación positiva entre la edad de las raíces y su intensidad de colonización. Frecuentemente las zonas de mayor colonización estuvieron ubicadas en donde se acumulaba el detritus orgánico. En términos generales, las células recién colonizadas se encontraron ubicadas en las áreas cercanas al ápice de las raíces, mientras que los pelotones digeridos estuvieron distribuidos a lo largo de las raíces. De acuerdo con el alto grado de colonización micorrízica observada, este hábitat constituye evidentemente un refugio para los simbiontes fúngicos de orquídeas epífitas tropicales. El hecho de que todas las especies estudiadas en época de secas, hayan presentado una intensa presencia de estos hongos en las raíces en ambos ecosistemas, permite plantear la posibilidad de que las orquídeas que se establecen en los cafetales, encuentren los hongos micorrízicos adecuados para su sobrevivencia. Este trabajo es la primera contribución mexicana que documenta de manera sistemática algunos aspectos de la relación hongo orquídea en una selva tropical húmeda de México.

Palabras clave: Micorriza orquideoide, orquídeas epífitas, selva tropical húmeda, cafetales.

Intensity of mycorrhizal colonization of seven tropical epiphytic orchids from southeast Mexico

3.2. Abstract

The evaluation of mycorrhizal colonization intensity in tropical epiphytic orchids in the nature, and the factors influencing it has received little attention generally. They studied seven tropical epiphytic orchids from southeast of Mexico namely *Epidendrum stamfordianum*, *Trichocentrum ascendens*, *Stelis quadrifida*, *Notylia barkeri*, *Leochilus labiatus*, *Erycina crista-galli* and *Specklinia marginata* in two different habitats: i) in tropical forest fragments with tropical trees with thick trunks as hosts, and ii) in coffee plantations with shade trees from the original tropical humid forests. In this research, the extent of mycorrhizal colonization was evaluated in terms of volume and extension of colonization in roots of different age: young roots, medium roots and old roots. Even though all roots were collected in the dry season, the majority of the given species showed an intense colonization reaching in some cases upto 98%. The extent of mycorrhizal colonization was inversely related to the root diameter. On the contrary, a positive relationship between root age and their colonization intensity was found. The intensity and the distribution of colonization were directly influenced by contact with accumulations of organic matter and contact with the substrate itself. In general recently colonized cells were found in the areas next to the root apices, while the dead pelotons were distributed along the roots. Due to the high degree of mycorrhizal colonization observed, the branches of coffee plant under the shadow of native tropical forest can be consider a refuge for the fungal symbionts of tropical epiphytic orchids. This work is the first contribution which describes some aspect of orchid-fungi relation in rain tropical forest from Mexico.

Key words: Orchid mycorrhiza, epiphytic orchids, tropical rain forest, coffee plantations.

3.3. Introducción

El papel nutricional de las micorrizas en la familia Orchidaceae ha sido bien documentado para especies terrestres de clima templado, particularmente de Norteamérica, Europa, parte de Asia y Australia (Rasmussen 1995). La interacción micorrizica funciona a varios niveles, desde las especies fotosintéticas que presentan una parcial mixotrofia (mixotrofia), hasta las micotróficas obligadas las cuales dependen completamente de sus hongos simbiosntes para el suplemento de carbono y nitrógeno (Leake 1994, Gebauer y Meyer 2003, Julou et al. 2005). Sin embargo, alrededor del 80% de las orquídeas del mundo son epifitas tropicales, las cuales no viven conectadas al suelo, y sobreviven adheridas a los troncos y ramas de los árboles, con sus raíces parcialmente expuestas al aire (Atwood 1986). Se ha asumido que en las especies de orquídeas epifitas la dependencia micorrizica en los primeros estadios de germinación puede ser no obligada (Smith y Read 1997). Se han mencionado al menos tres razones para apoyar este planteamiento: i) algunas semillas contienen lípidos y proteínas en el embrión (Zettler et al. 2003), ii) existe una rápida asimilación de nutrimentos simples en medio de cultivo *in vitro* (Arditti 1992) y iii) a que éstas semillas de orquídeas epifitas al estar en una superficie expuesta a la luz, rápidamente pasan a un estado fotosintético después de asimilar agua (Arditti 1992). Sin embargo, estudios de germinación simbiótica *in vitro* sugieren que la dependencia va más allá de un evento germinativo simple y el hongo micorrizico interviene en la diferenciación y el desarrollo a los siguientes estadios (Zettler et al. 1998). Algunas especies, detienen su crecimiento y mueren cuando no son colonizadas por un simbionte micorrizico adecuado (Zettler et al. 1998, Markovina y McGee 2000, Pereira et al. 2005a).

Adicionalmente, la condición epifítica, pudiera hacer a las orquídeas más dependientes de esta asociación debido a una limitada adquisición de nutrimentos al crecer sobre los árboles. A pesar de que los análisis de los sustratos acumulados en las copas de los árboles indican que éstos son ricos en materia orgánica y nutrientes, principalmente NO_3 , NH_4 y PO_4 en comparación con los suelos del bosque tropical, éstos resultan insuficientes o inaccesibles por la condición ácida y el balance de nutrientes (Lesica y Antibus 1990, Nadkarni y Matelson 1991, Nadkarni et al. 2002). Además esta acumulación de sustrato orgánico es variable espacial y temporalmente en la canopia de los árboles (Benzing 1986, Nadkarni 1986). Es por esto que las raíces de orquídeas epifitas han desarrollando varias adaptaciones como una espesa estructura epidérmica de células muertas (velamen) no sólo para absorber rápidamente

el agua, sino también para conservarla; diferenciar estructuras anatómicas (tilosomas) para reducir la transpiración al verse expuestas a la intemperie, así como la función de fotoasimilar el CO₂ vía metabolismo C₃, CAM o ambas (Benzing y Ott 1981, Goh et al. 1983). Con todo esto, es de suponerse como lo indicó Benzing y Friedman (1981), que “una combinación de fototrofia y micotrofia puede ser ventajosa para una epífita,” tal como sucede con su contraparte las orquídeas terrestres (Rasmussen y Whidham 2002, Julou et al. 2005, Girlanda et al. 2006).

Sin embargo, la intensidad de la colonización micorrízica en la naturaleza, en orquídeas epífitas ha sido motivo de controversias. Algunos autores establecieron la idea inicial de que en especies epífitas, la intensidad de colonización era esporádica (Hadley y Williamson 1972, Lesica y Antibus 1990). Recientemente, mayor evidencia sostiene que una densa colonización es común en muchas especies tropicales (Bermudes y Benzing 1989, Rivas et al. 1998, Pereira et al. 2005b).

En términos generales, el grado de colonización micorrízica en orquídeas epífitas tropicales en campo y los factores que la influyen, han sido escasamente estudiados y en el caso particular de México, no existen registros que documenten la condición micorrízica de muchas especies de selva tropical de manera detallada. En el presente trabajo, se evaluó la intensidad de colonización micorrízica en términos de volumen y extensión de raíces en siete especies de orquídeas epífitas tropicales del Sureste de México. También se relacionaron dichos parámetros con el diámetro y la edad de las raíces. Finalmente, se documentaron los patrones de digestión de los pelotones fúngicos a lo largo de las raíces.

3.4. Materiales y métodos

3.4.1. Sitios de estudio y especies de orquídeas estudiadas

Se seleccionaron cinco sitios de estudio de acuerdo a la distribución de las epífitas en un gradiente altitudinal en la región del Soconusco, Estado de Chiapas, en el Sureste de México (Cuadro 3.1). Esta región se caracteriza por la extrema fragmentación de la vegetación original de selva lluviosa de montaña (Miranda y Hernández 1963) y la presencia de extensas áreas de plantaciones de café (*Coffea arabica* L. y *C. canephora* Pierre ex Frochner.; Rubiaceae) con árboles de sombra del género *Inga* spp. (Fabaceae), mezcladas con árboles de la selva original (Damon y Colin-Martínez 2005). Uno de los sitios estudiados, Izapa, presenta extensas

plantaciones de cacao (*Theobroma cacao* L. Sterculiaceae). El clima de los sitios estudiados va del cálido húmedo en las partes bajas a templado en las partes altas, con abundantes lluvias de junio a octubre, seguida por una pronunciada estación seca. La precipitación anual varía de 2,668 mm a los 118 m, a 4,800 mm a los 900 m de altitud.

Cuadro 3.1. Descripción de sitios de estudio.

Sitio	Latitud y longitud	Altitud (m)	Temperatura media diaria (°C)	Precipitación media anual (mm)
Tuzantán (Tu)	15°06'N, 92°24'W	118	28	2,668 ^a
Izapa (Iz)	14°58'N, 92°09'W	482	26	4,660 ^b
Unión Roja(UR)	15°04'N, 92°12'W	508	22	4,800 ^c
El Edén (Ed)	15°03'N, 92°17'W	543	22	4,800 ^c
Santo Domingo (SD)	15°01'N, 92°07'W	900	21	4,800 ^c

^aDe diciembre a abril con menos de 60 mm por mes. ^bDe diciembre a febrero con menos de 60 mm por mes. ^cDe diciembre a febrero con menos de 100 mm por mes. Datos de los últimos 5 años 2001-2006. CNA Comisión Nacional del Agua.

Las especies de orquídeas estudiadas fueron: *Erycina crista-galli* (Rchb. F) N. H. Williams & M. W. Chase es una especie pequeña clasificada como una epífita de ramitas porque ocurre casi exclusivamente en las ramas del café. *Leochilus labiatus* (Sw.) Kuntze y *Noylia barkeri* Lind. son orquídeas de tamaño similar, también comunes en este hábitat del café. *Trichocentrum ascendens* (Lindl.) M.W. Chase & N. H. Williams es una orquídea de tamaño mediano con hojas en forma de aguja, encontrada en ramas del café, árboles frutales y de sombra. *Stelis quadrifida* (La Llave & Lex) Solano & Soto Arenas (antes *Pleurothallis racemiflora* Lindl. Ex Hook) es una orquídea de tamaño medio sin pseudobulbos que habita frecuentemente árboles propios de la selva u ocasionalmente de hábito litófilo. *Epidendrum stamfordianum* Bateman es una especie de tamaño grande, comúnmente encontrada en árboles de sombra, propios de la selva. Estas seis especies pueden ser consideradas como oportunistas que se han adaptado a los agroecosistemas encontrados en el Soconusco. En contraposición, la orquídea miniatura *Specklinia marginata* (Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase, está desapareciendo de la región por la pérdida de su hábitat y es encontrada en especies de árboles

nativos como *Tabebuia donell-smithi* Rose, *T. rosea* (Bert.) A. DC. (Bignoniaceae) y *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb (Leguminosae) los cuales tienen una corteza rugosa. Todas las especies estudiadas, con la excepción de *E. stamfordianum* y *T. ascendens*, presentan raíces finas y delgadas. *S. quadrifida* y *Specklinia marginata* presentan numerosas raíces cortas, delgadas que crecen agrupadas. *E. stamfordianum*, *T. ascendens*, *N. barkeri*, *E. crista-galli* y *L. labiatus* producen escasas raíces largas con pocas ramificaciones, que crecen separadamente y se extienden a lo largo de la superficie de las ramas. La mayoría de las raíces de las especies estudiadas crecen sobre la superficie de la corteza. Sin embargo, las raíces de *S. quadrifida* penetran la superficie externa de la corteza, que está en descomposición y donde la materia orgánica se acumula.

3.4.2. Recolecta de raíces y evaluación micorrízica

El estudio fue efectuado en un periodo relativamente corto de dos meses, durante la época seca (febrero y marzo del 2006). Durante este periodo todas las especies de orquídeas se encontraban en la finalización del periodo de floración e inicio de la producción de cápsula. Se efectuaron tres recolectas de raíces de cada especie de orquídea en dos sitios, tomando dos plantas de cada especie por sitio al mismo tiempo a excepción de *S. marginata* y *L. labiatus* en las que solamente se pudo localizar un sitio de muestreo, debido a que están en grave riesgo de extinción en la región de estudio. Esto dio un total de 72 plantas en las que se muestrearon tres tamaños de raíz (la edad de la raíz fue inferido por la longitud de la misma) por cada planta: la más corta, que se consideró la más joven recién formada; una mediana y la más larga, que se consideró la más vieja. Las raíces completas y de apariencia vigorosa fueron retiradas cuidadosamente de la corteza de los árboles con un bisturí y conservadas a 5°C. Para cada raíz muestreada se registraron tres medidas de su diámetro con un Vernier manual: basal, intermedia y apical. El número de capas de células y el grosor del velamen fueron cuantificados en 10 secciones transversales a 400× en todas las especies.

La cuantificación de la micorrización se realizó siguiendo los métodos propuestos por Rasmussen y Whigham (2002) y Goh et al. (1992) evaluando tanto la intensidad de la colonización (definida como la proporción del córtex ocupada por pelotones), como la extensión de la colonización (el número de secciones colonizadas a lo largo de la raíz). La micorrización fue evaluada para las raíces de cada especie de orquídea en secciones

transversales hechas a mano. En el primer milímetro del meristemo apical de cada raíz evaluada se realizaron tres secciones transversales seriadas y a partir de ahí, el resto de la raíz fue seccionada cada 1.5 veces el diámetro de la raíz. Para las especies de raíces delgadas, cada raíz fue envuelta en Parafilm MR para facilitar el corte. La intensidad fue cuantificada en una escala visual cualitativa de 0, 12.5, 25, 50, 75 y 100 % del área cortical. El volumen de raíz colonizada se estimó considerando ambas variables. En total 3118 secciones de raíces fueron evaluadas. Los cortes fueron montados en portaobjetos, teñidos con fushina ácida (0.01 % w/v en ácido láctico-glicerol y agua destilada 14:1:1) y montados en alcohol polivinílico (PVLG) para ser evaluadas en un microscopio óptico a 400×.

Para la evaluación cualitativa del estado de digestión de pelotones fúngicos se siguió el criterio propuesto por Rasmussen y Whigham (2002) considerando tres categorías: i) células con pelotones intactos bien definidos con hifas apreciables a 400×; ii) células que contenían simultáneamente hifas intactas y pelotones en estado avanzado de degradación y iii) células con densos pelotones digestados, en donde no se logran ya apreciar las hifas y que se tiñen intensamente (Fig. 3.7d).

3.4.3. Análisis estadístico

Se realizaron ANOVAs de una vía para cada variable evaluada y con los resultados significativos ($P < 0.05$ ó $P < 0.001$) fueron analizados por la prueba de Tukey. Para comparar el efecto de la edad de la raíz en la extensión de la colonización, los datos fueron transformados en rangos. Se usó el programa Statistica 6.0 (StatSoft, Tulsa, USA)

3.5. Resultados

3.5.1. Intensidad de colonización micorrízica

Todas las especies muestreadas presentaron colonización micorrízica (Cuadros 3.2 y 3.3). La intensidad de la misma varió conspicuamente a lo largo de las raíces, presentándose desde secciones libres de colonización hasta 98% del área del córtex colonizada. Los máximos valores de intensidad de colonización (95-98%) fueron registrados para raíces de talla mediana o adulta de *E. crista-galli*, *N. barkeri* y *L. labiatus* (Cuadro 3.2), las cuales tienen raíces delgadas de 0.6 a 1.1 mm. La extensión de la colonización en las raíces varió entre secciones a diferentes longitudes del mismo individuo, entre raíces de diferente edad y entre las diferentes

Cuadro 3.2. Ejemplo de intensidad de colonización micorrizica (%) a lo largo de raíces de orquídeas epifitas en *Coffea arabica* (L) como forofito^a

Orquídea epifita	Edad de Raíz ^b	Secciones de raíz ^c																										
		Ápice→																						Base				
<i>E. crista-galli</i>	Rj ^d	0	0	0	0	0	0	0	*																			
	Rm	0	0	60	60	75	70	80	50	70	85	50	50	50	50	0	0	50	40	*								
	Ra	0	80	80	50	80	80	55	50	75	45	65	65	60	98	80	75	90	65	60	0	20	30	82	45	*		
<i>N. barkeri</i>	Rj ^f	0	0	0	0	38	38	38	20	90	38	0	0	*														
	Rm	0	0	0	0	0	0	0	30	70	33	70	65	50	85	45	*											
<i>L. labiatus</i>	Ra	0	0	0	0	0	0	0	0	50	20	80	67	12	55	40	50	60	60	40	50	25	40	50	45	65	50	40
	→60	65	45	2	40	75	50	65	70	85	90	95	38	45	40	50	60	65	0	0	0	0	0	0	0	0	*	
	Rj ^f	0	45	35	43	55	45	55	25	25	50	37	55	*														
<i>T. ascendens</i>	Rm	0	0	0	40	95	55	55	65	60	70	22	50	30	0	0	70	45	55	0	0	35	45	40	70	55	50	90
	90	40	20	25	30	25	25	0	0	*																		
	Ra	0	0	0	50	55	65	40	50	60	43	45	40	60	37	58	60	50	77	38	43	40	40	40	80	40	58	68
	43	82	78	70	65	77	55	52	70	75	65	65	70	60	72	75	85	50	70	70	60	50	55	55	60	70	70	
	68	55	60	65	50	55	75	77	55	60	73	55	77	77	70	70	60	63	45	50	30	38	50	45	53	50	50	
	35	27	55	20	50	0	45	55	40	33	93	87	58	70	45	35	60	*										
Rj ^f	0	0	0	30	22	35	0	35	20	20	45	1	35	*														
<i>T. ascendens</i>	Rm	0	70	30	50	48	50	70	40	50	55	60	45	45	35	45	30	0	3	20	0	67	78	85	0	0	0	0
	6	0	33	65	33	30	*																					
	Ra	0	0	0	2	0	28	0	30	35	24	12	24	0	0	30	30	21	0	28	35	10	30	0	18	30	30	30
0	18	10	20	0	18	23	28	10	20	18	33	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0	35	0	0	0	0	0	*

^a Se seleccionaron para presentarse en el cuadro, individuos que tenían raíces adultas de la máxima longitud observada, dentro de las plantas muestreadas. ^bRj= Raíz joven, Rm= Raíz mediana, Ra= Raíz adulta. ^cLas distancias entre secciones variaron para cada especie y edad (longitud) de la raíz por lo que algunos registros ocuparon varias líneas en las que los datos son consecutivos en la dirección del corte empezando por la izquierda. ^d Raíces recién formadas aéreas. ^fRaíces jóvenes en contacto con el sustrato * sitio de inserción de la raíz con el tallo o bulbo.

especies evaluadas. En la totalidad de las raíces muestreadas, la única zona libre de colonización fue el ápice meristemático. De un total de 72 individuos muestreados solamente 2, uno de *T. ascendens* y uno de *E. stamfordianum* no presentaron pelotones en las tres raíces muestreadas.

3.5.2. Edad, diámetro de raíz y colonización micorrízica

Se observó una tendencia inversamente proporcional entre el diámetro de la raíz y el área cortical colonizada (Fig. 3.1). En las especies de orquídeas estudiadas, el diámetro de raíz fue un factor más relevante que el grosor del velamen en términos del área cortical colonizada. Por ejemplo, *S. quadrifida*, *T. ascendens* y *E. stamfordianum* con similares grosores de velamen, pero con distintos diámetros de raíz, presentaron distintas colonizaciones en el área cortical ($P \leq 0.001$, Fig. 3.1). En términos generales, las especies epífitas que crecían sobre las ramitas

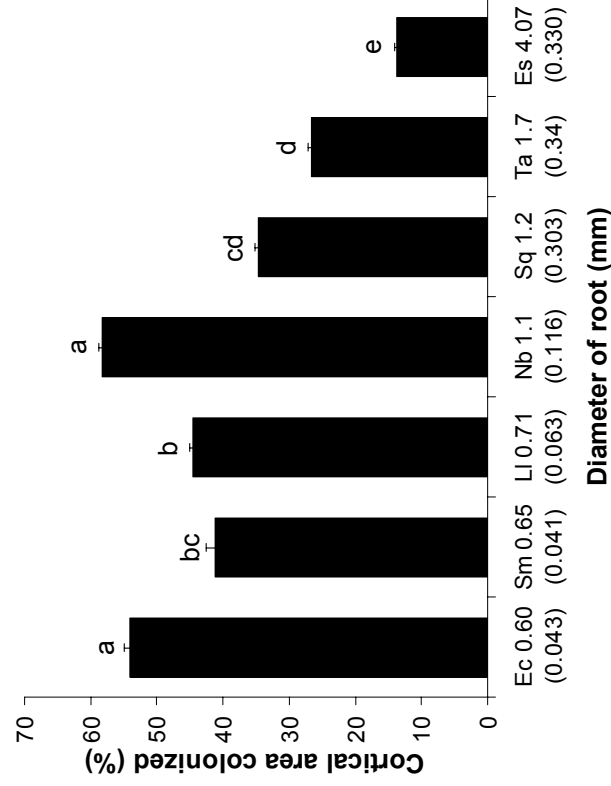


Figura 3.1 Intensidad de colonización del córtex de las orquídeas epífitas de acuerdo al diámetro de la raíz. Los valores entre paréntesis indican el grosor del velamen en mm. Ec = *Erycina crista-galli*, Sm = *Specklinia marginata*, LI = *Leochilus labiatus*, Nb = *Notylia barkeri*, Sq = *Stelis quadrifida*, Ta = *Trichocentrum ascendens* y Es = *Epidendrum stamfordianum*. Los valores junto a la abreviatura de especie de orquídea corresponden a los diámetros de raíz en mm. Los valores son medias \pm el error estándar de la media (datos no transformados). Medias con la misma letra no son diferentes significativamente ($P \leq 0.001$), de acuerdo a la prueba de Tukey. El total de secciones evaluadas fueron 3118.

del café (*E. crista-galli*, *L. labiatus* y *Notylia barkeri*, con diámetros de raíz de 600 a 1100 μm) presentaron mayor colonización del área cortical que aquellas que crecían sobre árboles de fuste grueso (*S. quadrifida* y *E. stanfordianum*, con diámetros de raíz de 1200 y 4070 μm).

En promedio para las siete especies de orquídeas estudiadas, el volumen del córtex colonizado y la extensión de la colonización estuvieron directamente relacionados con la edad (Fig. 3.2). Para las siete especies de orquídeas estudiadas, en promedio existieron conspicuas diferencias ($P \leq 0.001$) entre la colonización en raíces jóvenes y maduras. Por ejemplo, 14.6 y 79.4% de la extensión de la raíz estuvo colonizada en las raíces recién formadas aéreas y en las raíces adultas, respectivamente (Fig. 3.2). Una tendencia similar se observó en el caso del volumen de raíz colonizada.

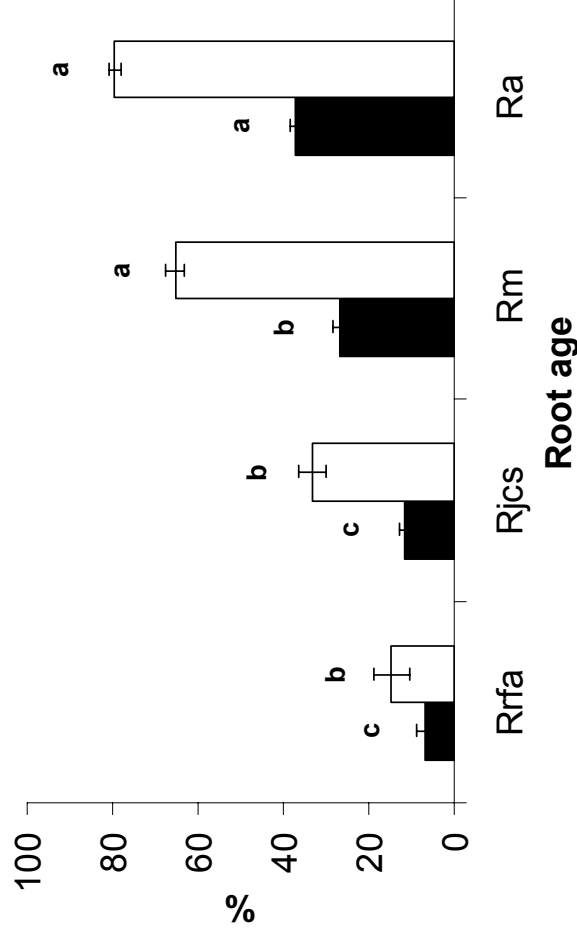


Figura 3.2. Volumen del córtex colonizado (barras negras) y extensión de la colonización (barras blancas) de acuerdo a la edad de la raíz de orquídeas epífitas. Rrfa = raíz recién formada aérea, Rjcs = raíz joven en contacto con el sustrato, Rm= raíz mediana, Ra = Raíz adulta. Los valores representan el promedio de las siete especies de orquídeas estudiadas, en total se evaluaron 3118 secciones. Los valores son medias \pm el error estándar de la media. Los valores de extensión de la colonización se transformaron en rangos. Medias con la misma letra, para el volumen del cortex infectado o la extensión de colonización, no son diferentes significativamente ($P \leq 0.001$) de acuerdo a la prueba de Tukey.

Raíces recién formadas áreas (Rrfa) estuvieron casi siempre libres de colonización, excepto para *S. quadrifida* que presentó una raíz con 10.6% y *L. labiatus* que presentó dos raíces con un 36% del volumen colonizado. Es posible entonces asumir que en cuanto las

raíces entran en contacto con el sustrato, la extensión y el volumen colonizado aumentan, y como consecuencia las raíces viejas poseen mayor colonización que las raíces jóvenes ($P \leq 0.001$). Es claro que en las especies de orquídeas estudiadas, tanto el diámetro como la edad de la raíz afectan el porcentaje de colonización.

3.5.3. Colonización micorrízica en orquídeas de las ramitas del café y orquídeas de árboles de fuste grueso

Dentro de las orquídeas que habitan sobre las ramitas del café: *E. crista-galli*, *L. labiatus*, *Notylia barkeri* y *T. ascendens*, las de porte pequeño y raíces delgadas presentaron los mayores volúmenes de raíz colonizada (en promedio 40.5%) y de extensión de la colonización (en promedio 80.3%). *T. ascendens*, la cual posee el mayor diámetro de raíz dentro de las especies de ramitas del café estudiadas, presentó menores extensiones y volúmenes de raíces colonizadas (Cuadro 3.4.). En las especies que crecen sobre fuste grueso, se observó una tendencia similar a la observada en las especies que crecen sobre las ramitas del café. En términos generales, el volumen y la extensión de raíces colonizadas estuvo inversamente relacionado con el diámetro de raíz (Cuadro 3.4). Para aquellas especies en las que se evaluaron dos sitios, no existieron diferencias entre ellos en términos de volumen y extensión de raíz colonizada.

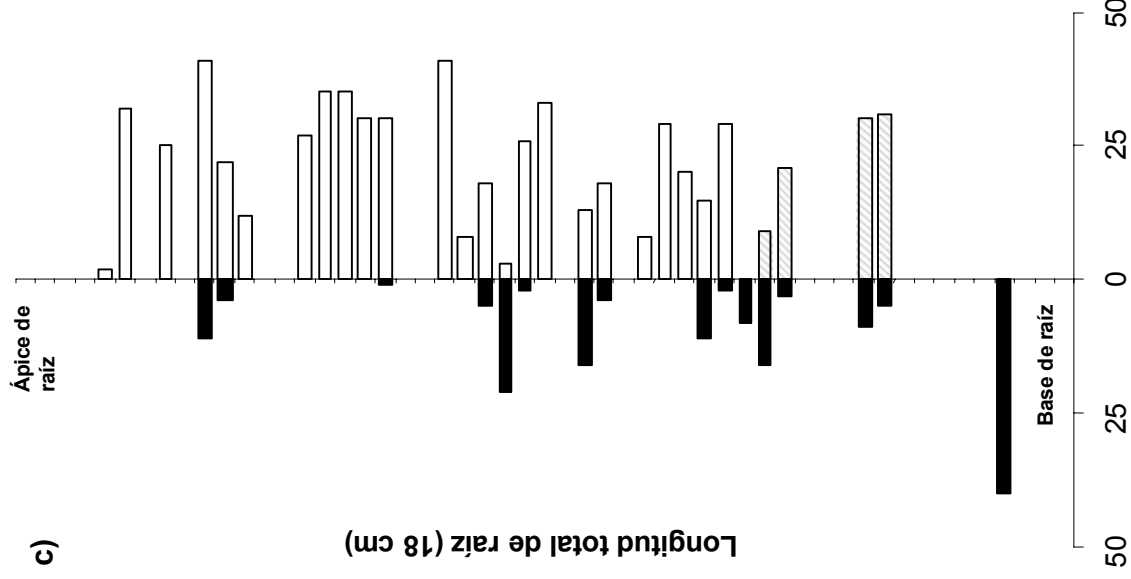
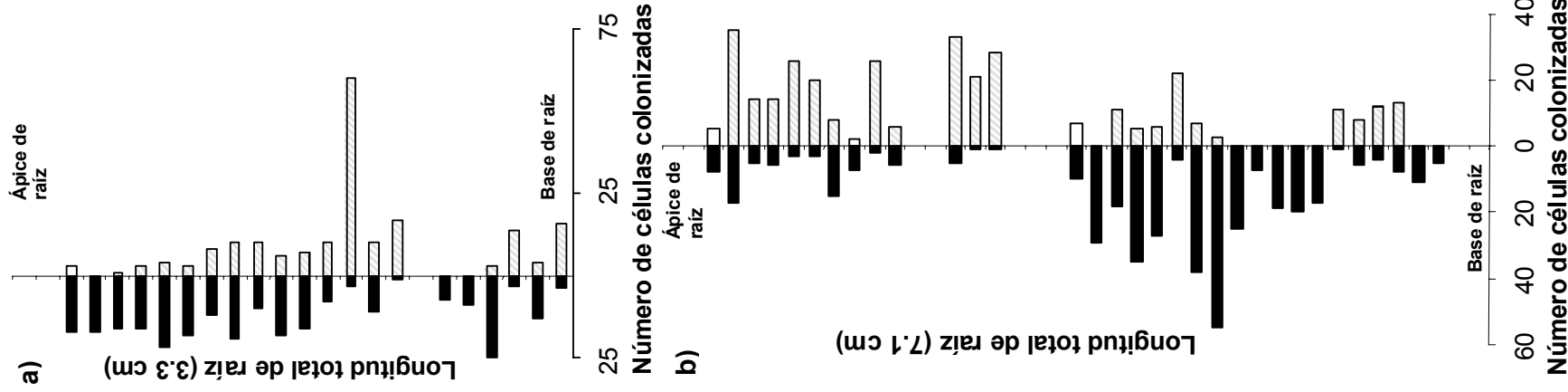
La tolipofagia fue la única forma de digestión observada en las especies de orquídeas estudiadas. En términos generales, existieron altos niveles de colonización y recolonización de células en las especies de orquídeas que crecían sobre las ramitas del café (Fig. 3.3 y 3.4). En contraste, las especies de orquídeas que crecían sobre árboles de fuste grueso, no presentaron células recién colonizadas, sino pelotones en estados avanzados de digestión (Fig. 3.5). Este patrón fue consistente en todos los individuos muestreados para ambos grupos de orquídeas. En algunas ocasiones, en raíces maduras, existieron diferencias en las proporciones entre células con pelotones digestados y células recién colonizadas, de acuerdo con las especies estudiadas (Fig. 3.3). En *N. barkeri* la proporción de pelotones muertos fue menor en raíces jóvenes comparada con la de raíces adultas (Fig. 3.4).

Cuadro 3.4. Volumen de raíz colonizada y extensión de la colonización de acuerdo a la especie de orquídea, forofito y altitud del sitio de muestreo.

Orquídea	Grosor de velamen (μm)	Diámetro de raíz (mm)	Forofito	Altitud (m)	Volumen de raíz colonizada (%)	Extensión de la colonización (%)	Proporción de pelotones digestados (%)
<i>Specklinia marginata</i> *	41	0.65 ^a	AFG ^b	118	28.72 \pm 1.08	74.04 \pm 3.98	100%
<i>Epidendrum stamfordianum</i>	330	4.07	AFG	118	2.96 \pm 1.34	13.5 \pm 5.94	100%
<i>Stelis quadrifida</i>	303	1.2	AFG	482	9.78 \pm 0.96	49.18 \pm 4.7	100%
<i>Erycina crista-galli</i>	43	0.6	Café	482	27.14 \pm 3.05	73.84 \pm 3.72	100%
<i>Leochilus labiatus</i> *	63	0.7	Café	592	22.03 \pm 5.15	46.76 \pm 12.07	100%
<i>Notylia barkeri</i>	116	1.1	Café	508	53.87 \pm 3.40	87.83 \pm 2.62	<20%
<i>Trichocentrum ascendens</i>	340	1.7	Café	712	36.12 \pm 2.37	78.86 \pm 3.35	<20%
				712	37.87 \pm 2.49	81.59 \pm 3.90	<30%

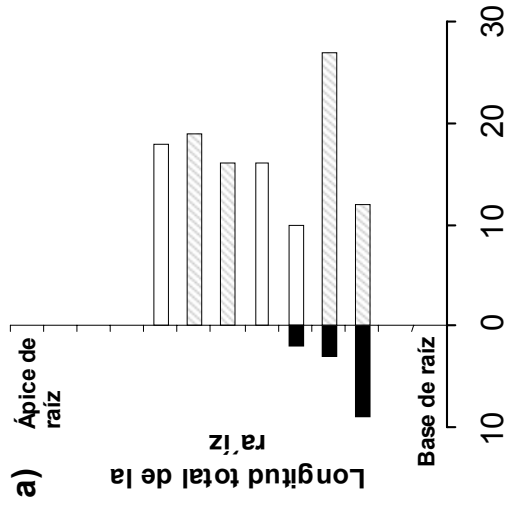
* Cada especie de orquídea fue muestreada en dos sitios cuyas altitudes son las que se muestran, *L. labiatus* y *S. marginata* sólo se localizaron en un sitio debido a lo disminuido de sus poblaciones. ^aEl diámetro es el promedio de 108 mediciones efectuadas en el ápice, parte media y base de la raíz, en 12 plantas de cada especie. ^b AFG= Árboles de fuste grueso. Los valores de volumen y extensión de la colonización son medias \pm el error estándar de la media

Generalmente, tanto el ápice como la base de la raíz carecieron de colonización micorrízica (Fig. 3.3 a 3.5). En el caso de *N. barkeri*, se observó que en términos generales las células con pelotones digestados se distribuyeron en las áreas cercanas a la base de la raíz. En contraste, las células recién colonizadas para dicha especie, se observaron a lo largo de toda la raíz, independientemente de su edad (Fig. 3.4). Este patrón se repitió para todas las especies estudiadas.



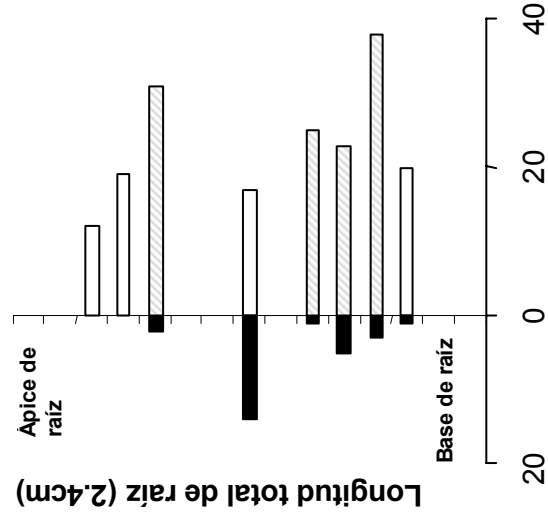
Número de células colonizadas

Figura 3.3 Patrón de colonización micorrízica en raíces maduras de tres orquídeas epífitas del café. a) *Erycina crista-galli*, b) *Leochilus labiatus* y c) *Trichocentrum ascendens*. Las categorías de células son tres: i) células recién colonizadas con pelotones intactos (barras blancas), ii) células recolonizadas con pelotones intactos (barras achuradas) y iii) células con pelotones digeridos (barras negras), de acuerdo como se explica en la metodología. Cada sección en el eje de las ordenadas representa 1.2, 1.5 y 2.5mm de raíz para a, b y c, respectivamente.



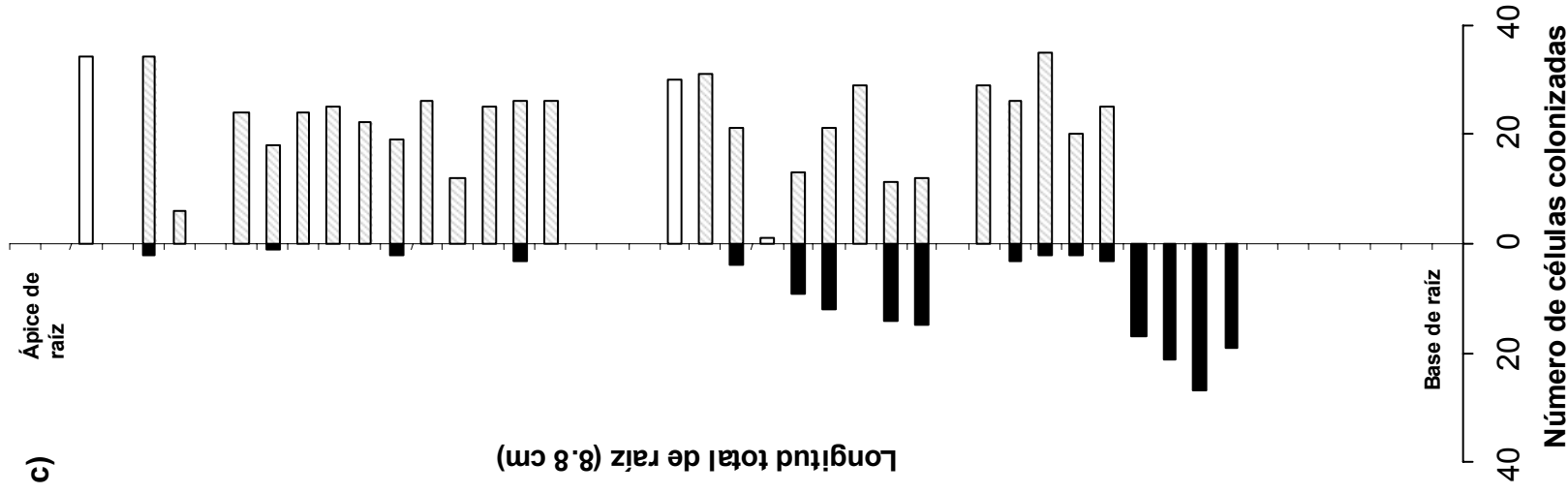
Número de células colonizadas

b)

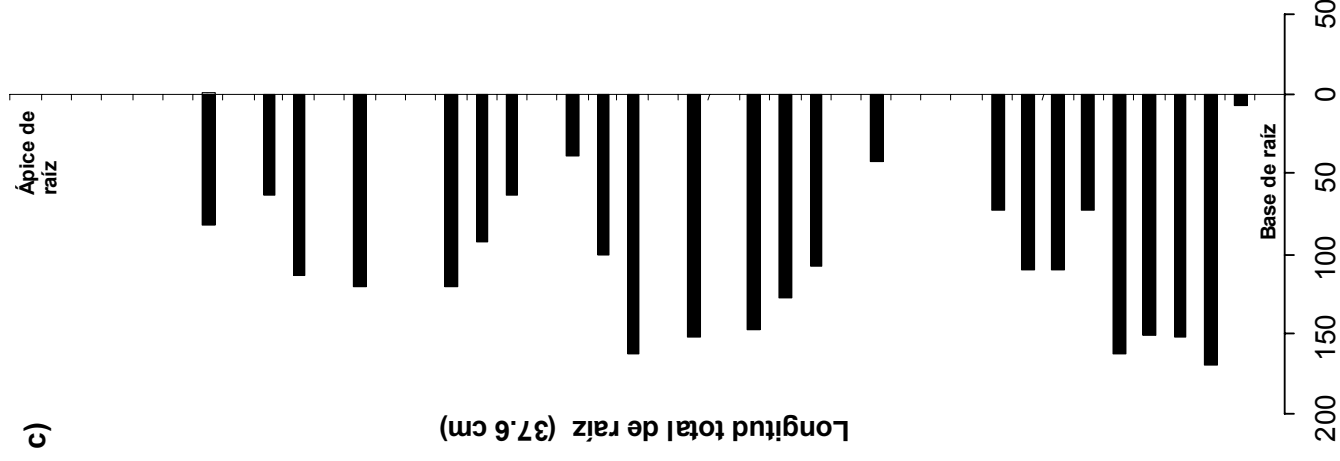
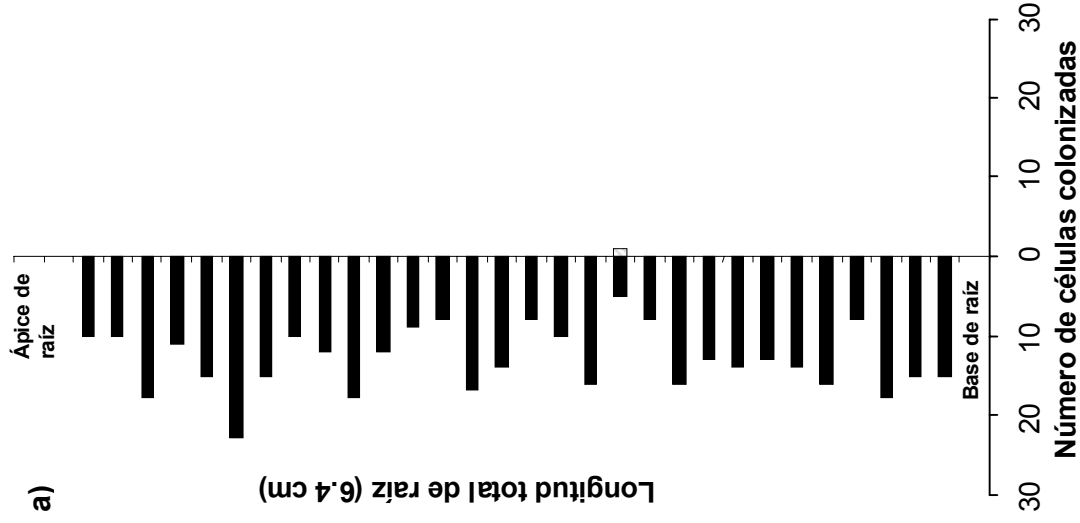


Número de células colonizadas

Figura 3.4 Patrón de distribución de la colonización micorrízica a lo largo de las raíces de diferente edad en *Notylia barkeri*. a) raíz joven, b) raíz mediana y c) raíz madura. Las categorías de células son las mismas que las de la figura 5. Cada sección en el eje de las ordenadas representa 1.7 mm de raíz.



Número de células colonizadas



Número de células colonizadas

Figura 3.5 Patrón de la colonización micorrízica en raíces maduras de orquídeas epífitas de árboles de fuste grueso, ubicadas en zonas de muestreo a menor altitud. a) *Stelis quadrifida*, b) *Specklinia marginata* y c) *Epidendrum stamfordianum*. Las categorías de células son las mismas que las de la figura 5. Cada sección en el eje de las ordenadas representa 1.8, 1.0 y 6 mm de raíz, para a, b, y c, respectivamente.

3.6. **Discusión**

La intensidad de colonización micorrízica en orquídeas epifitas tropicales en la naturaleza, ha sido objeto de controversia. Esto se debe a que existen pocos estudios precisos para la gran variedad de hábitats, forofitos y especies de orquídeas involucradas. Hadley y Williamson (1972) documentaron una colonización esporádica e inferior al 1% del área cortical, en orquídeas epifitas de Malasia.

De manera similar Lesica y Antibus (1990) al estudiar 14 epifitas de Costa Rica mencionaron que “la colonización fue esporádica y confinada a las áreas de la raíz que estaban directamente en contacto con las ramas de los árboles.” Tan sólo seis especies de las 14 estudiadas presentaron colonización y de éstas, cuatro presentaron valores promedios abajo de 12% del cortex colonizado. Sin embargo, un número mayor de trabajos han encontrado una tendencia opuesta. Por ejemplo, estudios en varios ecosistemas tropicales y en especies muy diversas como 8 especies de orquídeas epifitas de Florida (Benzing 1982), 20 de Ecuador (Bermudes y Benzing 1989, Suárez et al. 2006), una de Singapur (Goh et al. 1992), 15 de Costa Rica (Rivas et al. 1998) y 10 especies de Brazil (Pereira et al. 2005b, Kasuya et al. 2006) han coincidido en que, si bien algunos individuos se encontraron libres de colonización micorrízica, casi todas las especies presentaron una densa colonización. De manera similar a lo encontrado por estos últimos autores; en nuestro caso, en las siete especies de orquídeas estudiadas, 97% de las plantas muestreadas presentaron algún grado de colonización micorrízica. Estos datos apoyan la evidencia de que las orquídeas epifitas pueden estar tan intensamente colonizadas como las orquídeas terrestres (Goh et al. 1992, Rivas et al. 1998, Pereira et al. 2005b).

Por otro lado, tal y como ha sido reportado por otros autores como Goh et al. (1992), en las especies de orquídeas estudiadas en nuestro trabajo, se observó una conspicua variación en la colonización a lo largo de las raíces. Solo el ápice meristemático permaneció libre de colonización micorrízica, de manera similar a lo observado por Benzing (1982), Goh et al. (1992) y Rivas et al. (1998). De acuerdo a las variaciones de colonización a lo largo de la raíz encontradas en nuestras evaluaciones se puede asumir que cualquier estudio que evalué exclusivamente algunas secciones de raíz lleva riesgo de inexactitud. Un parámetro que permite conocer con mayor precisión el grado de colonización micorrízica de las raíces es el volumen de raíz colonizada, el cual ha sido utilizado por autores como Rasmussen y Whigham

(2002). Esta variable es generada a partir de la cuantificación de la intensidad de colonización en cada sección de raíz y la extensión de la colonización a lo largo de la misma. Para evaluar la colonización micorrízica, Rasmussen y Whigham (2002) efectuaron cortes cada 2-3 mm y cada 8-10 mm en el caso de las raíces largas de *Tipularia discolor* (Pursh) Nutt. Hadley y Williamson (1972) y Goh et al. (1992) realizaron secciones transversales seriadas cada 0.5 y 1 cm respectivamente. En el presente trabajo, se decidió efectuar cortes a diferentes distancias dependiendo del diámetro de las raíces estudiadas. Estos cortes fueron efectuados cada 1.5 veces el diámetro de las raíces. Se considera que debido a que existe una conspicua variación en el diámetro y longitud de las raíces en las diferentes especies de orquídeas epifitas, si se efectúan evaluaciones diferenciales en cada especie de acuerdo al diámetro de la raíz es posible obtener observaciones más realistas.

Al respecto, los resultados en estas especies estudiadas evidenciaron una relación entre el diámetro de la raíz y el área del córtex colonizada. Diversos autores han reportado que, algunas especies de orquídeas epifitas presentan altos porcentajes de colonización. La mayoría de éstas han sido orquídeas de raíces delgadas. Por ejemplo, Goh et al. (1992) y Pereira et al. (2005b) reportaron una intensa colonización, de hasta 80% del área del córtex de *Dendrobium crumenatum*, *Maxillaria marginata*, *Oncidium flexuosum* y *Oncidium varicosum*, especies cuyo diámetros de raíz son menores a 3 mm. Hadley y Williamson (1972) mencionaron que solo *Dendrobium crumenatum* Sw. y *Epigeneium longipes* (Hook. F.) Summerh., cuyas raíces poseen un diámetro menor a 1.5 mm, presentaron una densa colonización con cerca de 90 % del córtex.

En nuestro trabajo también confirmamos la observación de Benzing (1982), que la edad de las raíces influye en la colonización micorrízica, al observar que las raíces viejas tienden a soportar una mayor colonización. Este fenómeno también ha sido observado en orquídeas terrestres. Rasmussen y Whigham (2002), al comparar el desarrollo fenológico y la dinámica de la colonización micorrízica a lo largo de dos años, en orquídeas terrestres de los bosques decíduos de Norteamérica, concluyeron que la colonización dependió conspicuamente de la edad de la raíz, dado que raíces más jóvenes presentaron una irregular colonización, dominada mayormente por pelotones intactos, mientras que las raíces más viejas presentaron una densa acumulación de pelotones digestados. Observaciones similares han sido reportados

por Hadley y Williamson (1972) en orquídeas terrestres y epífitas de Malasia y para la orquídea terrestre *Caladenia formosa* por Huynh et al. (2004).

Otro factor que podría estar involucrado en la variación de la colonización micorrízica dentro de la raíz, entre una raíz y otra y entre individuos, es la distribución del detritus orgánico en la canopia de los árboles ya que la deposición del detritus orgánico es heterogénea entre la canopia de los árboles y dentro de la corteza de un mismo árbol o rama (Benzing 1986, Nadkarni 1986). En nuestro trabajo observamos que tanto la intensidad como la distribución de la colonización estuvieron directamente influenciadas por las zonas donde se acumula el detritus orgánico y por el crecimiento de las raíces dentro de dicho detritus. Es claro que la colonización se concentró en aquellas áreas de la raíz en contacto con el sustrato. En aquellas orquídeas de raíces finas, algunas raíces jóvenes, que no tocaban el sustrato pero que estaban poco separadas de él, presentaban colonización micorrízica de la base hasta la mitad de la raíz. Así también observamos, que en el caso de *Epidendrum stamfordianum* casi siempre sus raíces gruesas (3.3-5.3 mm) solo estaban colonizadas en el área pegada al sustrato, pero cuando alguna sección de la raíz se encontraba inmersa en el detritus orgánico, esta sección estaba totalmente colonizada. Diversos autores (Hadley y Williamson 1972, Bermudes y Benzing 1989, Lesica y Antibus 1990, Goh et al. 1992, Rivas et al. 1998, Suárez et al. 2006) han mencionado que las zonas de mayor colonización ocurren normalmente en los sitios de la raíz en contacto con el sustrato y que raíces aéreas se han encontrado libres de colonización.

Un factor adicional que podría influir en la colonización, es la humedad ambiental. La disponibilidad de agua es uno de los factores más importantes que limitan en general, el crecimiento y sobrevivencia de una epífita (Benzing 1990, Zotz y Tyree 1996). Rasmussen y Whitham (2002) argumentaron que las fluctuaciones observadas en la colonización micorrízica durante el desarrollo de la raíz, pueden estar influenciadas por eventos climáticos como la lluvia o la sequía. En nuestro caso se observó, en un muestreo previo (datos no mostrados), una mayor colonización micorrízica en plantas colectadas en época de lluvias. La composición de la colonización micorrízica en épocas del año con diferente precipitación constituye un tema de enorme interés, el cual no ha sido estudiado. Se ha reportado que en plantas epífitas distintas de las orquídeas, que se asocian a micorriza arbuscular y ericoide, la abundancia micorrízica está directamente influenciada por el contenido de humedad en el sustrato orgánico (Rains et al. 2003) o por la humedad ambiental (Lesica y Antibus 1990).

Muchas orquídeas tienen raíces fotosintéticas (Benzing y Ott 1981, Goh et al. 1983, Pridgeon et al. 1999) y se ha demostrado que llegan a fijar carbono (Goh et al. 1983). En raíces de orquídeas epífitas, el tejido cortical clorofílico se concentra en las zonas de mayor exposición a la luz, y las zonas de colonización mayormente se localizan en las zonas pegadas al sustrato (Hadley y Williamson 1972), sugiriendo una combinación de fototrofia y micotrofia ocurriendo al mismo tiempo en una misma raíz. Este fenómeno se observó con frecuencia en nuestro caso para las especies estudiadas, excepto en *Stelis quadrifida*. Sin embargo, cuando alguna sección de la raíz no estaba expuesta a la luz y crecía embebida en el detritus orgánico, el córtex presentaba una total ocupación por pelotones. Pelotones con hifas intactas y pelotones en estados avanzados de digestión fueron encontrados en la misma célula, sugiriendo que las células pueden ser reinfectadas varias veces. Esto también ha sido reportado por diversos autores (Hadley y Williamson 1972, Benzing 1982, Rasmussen y Whigham 2002, Suárez et al. 2006).

En todas las orquídeas de raíces delgadas, se observó abundante micelio externo recorriendo la superficie de las raíces y dentro del velamen, concentrándose en la superficie de la exodermis. Hifas que infectaban células corticales, formadoras de pelotones, fueron localizadas en células de pasaje en diversos puntos de la exodermis y a lo largo de toda la raíz, corroborando lo mencionado por Benzing (1982) y Goh et al. (1992) que, “la entrada hifal ocurre repetidamente a lo largo de la interfase raíz-hospedero”. Sin embargo, hifas de hongos se encontraron también en el interior de los pelos epidermales, en todas las especies estudiadas, sugiriendo una posible segunda ruta de acceso. Estos pelos epidermales solo se localizaron en las zonas donde se acumula el detritus orgánico.

T. ascendens, *L. labiatus*, *N. barkeri*, *E. crista-galli* (Cymbidiae: Oncidiinae) y *S. marginata* presentaron la misma distribución de la colonización dentro del tejido cortical. Pelotones en varios estados de digestión y células recolonizadas se localizaron desde los estratos celulares más externos del córtex hasta la endodermis (Fig. 3.6e, f). En cambio *S. quadrifida* fue la única especie que presentó una especialización en cuanto a la composición de las células del córtex que son colonizadas. En esta especie los pelotones fúngicos se localizaron exclusivamente dentro de células relativamente grandes que formaban un anillo alrededor del cilindro central de la raíz (Fig. 3.6g-i). Este patrón fue consistente a lo largo de todas las raíces evaluadas, en todos los individuos de dicha especie. Pridgeon (1982) observó



Figura 3.6. a-i Hábitat y colonización micorrízica de orquídeas epífitas tropicales. **a** Agroecosistema del café, un hábitat modificado que sirve de refugio de orquídeas en las regiones neotropicales. **b** *Erycina crista-galli* creciendo sobre las ramitas del café, obsérvese las raíces creciendo externamente. **c** *Stelis quadrifida* creciendo sobre árboles de fuste grueso, las raíces crecen en este caso dentro del tapete del detritus orgánico de la corteza. **d** Células corticales de *Nolyia barkeri* con pelotones en dos estados de digestión: células con pelotones sueltos con aparente hifas intactas (lado izquierdo de la figura) y células con densos pelotones intensamente teñidos y estructuras hifales pobremente distinguibles (lado derecho de la figura), teñidos con fushina ácida, barra de escala= 40 μm . **e-i** secciones transversales de raíces **e**: *Leochilus labiatus*, barra de escala= 200 μm . **f**: *Nolyia barkeri*, barra de escala= 250 μm . **g**: *S. quadrifida*, observándose el grosor del velamen comparado con el córtex barra de escala = 250 μm . **h**: Acercamiento de **g**, observándose que los pelotones teñidos intensamente con fushina ácida forman un anillo alrededor del cilindro central, barra de escala = 250 μm . **i**: Microscopia electrónica de barrido de *S. quadrifida*, observándose la presencia de pelotones en las células agrandadas del córtex. Cp=células de pasaje, Es= estele y Ex = exodermis, barra de escala = 20 μm .

previamente, sin reportar la colonización micorrízica, que en los géneros *Pleurothallis* y *Stelis* (Pleurothallidinae) existía un anillo de células relativamente grandes que ocupan gran parte del volumen del córtex. Hasta donde conocemos, el nuestro es el primer reporte de una especialización anatómica de la colonización micorrízica en orquídeas epifitas.

El hecho de que en todos los individuos muestreados (en total 42), de las cuatro especies presentes en las ramitas del café, presentaron una intensa colonización y recolonización en época de secas, nos indica que el cambio de uso de la selva al agroecosistema de café con sombra de árboles nativos de la selva, esta favoreciendo la presencia de los hongos micorrízicos en una variedad de condiciones y orquídeas hospederas. Las zonas de cafetal en las selvas lluviosas de montaña: Santo Domingo, El Edén y Unión Roja (Cuadro 3.1), presentan condiciones similares como una mayor altitud, una precipitación mayor a 4,000 mm y 7°C menos de temperatura promedio. Además de mantener una elevada humedad ambiental comparada con los sitios a bajas altitudes. Estas condiciones ambientales del sitio están permitiendo que se mantenga una colonización activa durante la época de secas, lo que podría explicar que, particularmente orquídeas de las ramitas, se estén adaptando al agroecosistema del café cuando se manejan con sombra de los árboles propios de la selva original como lo han documentado diversos autores (Sosa y Platas 1998, Hietz 2005, Solis-Montero et al. 2005, Espejo-Serna et al. 2005). Otras especies no estudiadas en este trabajo como *Leochilus scriptus*, *L. oncidioides*, *Erycina pumila*, *Trichocentrum oerstedii*, *Ornithocephalus tripterus*, *Ionopsis satyrioides* (Cymbidieae: Oncidiinae, las últimas dos son consideradas raras), *Campylocentrum micranthum* y *Scaphyglottis imbricada*, habitan las ramitas del café de las plantaciones del Sureste de Chiapas, México. Este hábitat modificado, está favoreciendo la adaptación de las plantas a nuevos forofitos y sirve como un recurso de conservación de las epifitas y posiblemente de los simbiontes micorrízicos. Que puede ser aprovechado en conjunto con la explotación cafetalera en el Sureste de México.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por SEMARNAT-CONACYT, México, bajo el proyecto: Restauración y aprovechamiento sustentable de las orquídeas del Soconusco, Chiapas, México. Nuestro agradecimiento a Guadalupe Nieto por su apoyo en la toma de imágenes de microscopía electrónica y a Javier Valle Mora en el análisis estadístico.

3.7. Literatura citada

- Arditti J** (1992) Fundamentals of orchid biology. John Wiley & Sons, New York, USA, 613 p
- Atwood JT** (1986) The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. *Selbyana* 9:171-186
- Benzing DH** (1982) Mycorrhizal infection of epiphytic orchids in southern Florida. *Amer Orchid Soc Bull* 51:618-622
- Benzing DH** (1986) The vegetative basis of vascular epiphytism. *Selbyana* 9: 23-43
- Benzing DH** (1990) Vascular epiphytes. General biology and related biota. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Benzing DH, Friedman WE** (1981) Mycotrophy: its occurrence and possible significance among epiphytic Orchidaceae. *Selbyana* 5:243-247
- Benzing DH, Ott DW** (1981) Vegetative reduction in epiphytic Bromeliaceae and Orchidaceae its origin and significance. *Biotropica* 13:131-140
- Bermudes D, Benzing DH** (1989) Fungi in neotropical epiphyte roots. *BioSystems* 23:65-73
- Damon A, Colín-Martínez H** (2004) El estado actual de las poblaciones de orquídeas en la región del Soconusco, Chiapas. *Boletín Amaranto de la Asociación de Jardines Botánicos de México*. Septiembre-Diciembre Año 17 No. 3: 2-16
- Espejo-Serna A, López-Ferrari AR, Jiménez-Machorro R, Sánchez-Saldaña L** (2005) Las orquídeas de los cafetales en México: una opción para el uso sostenible de ecosistemas tropicales. *Rev Biol Trop* 53:73-84
- 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
- Girlanda M, Selosse MA, 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
- Goh CJ, Arditti J, Avadhani PN** (1983) Carbon fixation in orchid aerial roots. *New Phytol* 95:367-374
- Goh CJ, Sim AA, Lim G** (1992) Mycorrhizal associations in some tropical orchids. *Lindleyana* 7:13-17
- Hadley G, Williamson B** (1972) Features of mycorrhizal infection in some Malayan orchids. *New Phytol* 71:1111-1118

- Hietz P** (2005) Conservation of vascular epiphyte diversity in Mexican coffee plantations. *Con Biol* 19:391-399
- Huynh TT**, Mclean CB, Coates F, Lawrie AC (2004) Effect of developmental stage and peloton morphology on success in isolation of mycorrhizal fungi in *Caladenia formosa* (Orchidaceae). *Aust J Bot* 52:231-241
- Julou T**, Burghardt B, Gebauer G, Berveiller D, Damesin C, Selosse MA (2005) Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytol* 166:639-653
- Kasuya MC**, Linhares DO, Meira RM, Pereira OL, Costa MD, Pereira MC (2006) Morphological characterization of *Epidendrum secundum* and *Zygopetalum mackaii* mycorrhizae, native orchids from Brazil. Abstracts of 5th International Conference on Mycorrhiza of Mycorrhiza for Science and Society, 23-27 July, Granada, Spain, pp.130
- Leake JR** (1994) The biology of mycoheterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytol* 127:171-216
- Lesica P**, Antibus RK (1990) The occurrence of mycorrhizae in vascular epiphytes of two Costa Rican rain forests. *Biotropica* 22:250-258
- Markovina AL**, McGee PA (2000) Comparison of symbiotic and asymbiotic seed germination and plantlet development in *Sarcochilus* (Vandaeae: Orchidaceae). *Lindleyana* 15: 68-72
- Miranda F**, Hernández EX (1963) Los tipos de vegetación de México y su clasificación. *Boll Soc Bot Mex* 28:29-179
- Nadkarni NM** (1986) The nutritional effects of epiphytes on host trees with special reference to alteration of precipitation chemistry. *Selbyana* 9:44-51
- Nadkarni NM**, Matelson TJ (1991) Fine litter dynamics within the tree canopy of a tropical cloud forest. *Ecology* 72:2071-2082
- Nadkarni NM**, Schaefer D, Matelson TJ, Solano R (2002) Comparison of arboreal and terrestrial soil characteristic in a lower montane forest, Monteverde, Costa Rica. *Pedobiologia* 46:24-33
- Pereira OL**, Kasuya MCM, Rollemberg CL, Borges AC (2005a) *In Vitro* symbiotic seed germination of *Oncidium flexuosum* (Orchidaceae) by *Rhizoctonia*-like mycorrhizal fungi. *R Bras Ci Solo* 29:199-206

- Pereira OL**, Kasuya MCM, Borges AC, Araújo EF (2005b) Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. *Can J Bot* 83:54-65
- Pridgeon AM** (1982) Diagnostic anatomical characters in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). *Amer J Bot* 69:921-938
- Pridgeon AM**, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN (eds) (1999) *Genera Orchidacearum*. Vol.1 Oxford University Press. Oxford, UK
- Rains KC**, Nadkarni NM, Bledsoe CS (2003) Epiphytic and terrestrial mycorrhizas in a lower montane Costa Rican cloud forest. *Mycorrhiza* 13:257-264
- Rasmussen HN** (1995) Terrestrial orchids: From seed to mycotrophic plants. Cambridge University Press, London, UK, pp:167-172
- Rasmussen HN**, Whigham DF (2002) Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. *New Phytol* 154:797-807
- Rivas RM**, Warner J, Bermúdez M (1998) Presencia de micorrizas en orquídeas de un jardín botánico neotropical. *Rev Biol Trop* 46:211-216
- Smith SE**, Read DJ (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London
- Solis-Montero L**, Flores-Palacios A, Cruz-Angón A (2005) Shade-coffee plantations as refuges for tropical wild orchids in central Veracruz, Mexico. *Con Biol* 19: 908-916
- Sosa V**, Platas T (1998) Extinction and persistence of rare orchids in Veracruz, Mexico. *Con Biol* 12: 451-455
- Suárez JP**, Weib 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
- Zettler LW**, Delaney TW, Sunley JA (1998) Seed propagation of the epiphytic green-fly orchid, *Epidendrum conopseum* R. Brown, using its endophytic fungus. *Selbyana* 19:249-253
- Zettler LW**, Sharma J, Rasmussen FN (2003) Mycorrhizal diversity. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ (eds) *Orchid conservation*. Natural History Publications, Borneo, pp 205-226.
- Zotz G**, Tyree MT (1996) Water stress in the epiphytic orchid, *Dimeranthe emarginata* (G. Meyer) Hoehne. *Oecologia* 107:151-159

Capítulo 4

Hongos micorrízicos asociados a tres orquídeas epífitas neotropicales del Sureste de Chiapas, México

4.1. Resumen

La diversidad de hongos micorrízicos de orquídeas en ecosistemas terrestres, ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo, nada se sabe al respecto sobre las orquídeas de hábitos epífitos en México. Con el propósito de contribuir a la descripción de la diversidad de hongos micorrízicos asociados a *Epidendrum stamfordianum*, *Stelis quadrifida* y la orquídea habitante de las ramitas del café *Erycina crista-galli* en el Sureste de Chiapas, se usaron criterios morfométricos. Se llevaron a cabo aislamientos a partir de pelotones, de los cuales al menos cuatro morfotipos (MT) diferentes fueron reconocidos. Un MT coincidió con las características morfotaxonomías del género *Ceratorhiza* y cuatro más con *Epulorhiza*. Más de un MT fueron aislados de una misma planta. Dos morfotipos (denominados MT-1 y MT-7) fueron aislados de la misma raíz joven de *E. stamfordianum*. MT-7 es un aislado característico de *Epulorhiza*. En *S. quadrifida*, dos aislados estrechamente relacionados fueron aislados de pelotón en diferente edad de raíz. De la misma manera, un mismo morfotipo del hongo afin a *Epulorhiza* fue aislado de pelotón en dos especies de orquídeas recolectadas en el mismo árbol.

Palabras clave: *Rhizoctonia*, *Epulorhiza*, *Ceratorhiza*, micorriza orquídeas, orquídeas epífitas.

Mycorrhizal fungi associated to three Neotropical epiphytic orchids of Southeast Chiapas, México

4.2. Abstract

The diversity of micorrhizal fungi of orchids in terrestrial ecosystems has been widely studied. However no information is available related with epiphytic orchids of Mexico. Morphometric criteria was employed with the objective of contributing towards the description of diversity of mycorrhiza forma-*Rhizoctonia* associated with *Epidendrum stamfordianum*, *Stelis quadrifida* and the orchid inhabitant of branches of coffee *Erycina crista-galli* in the southeast of Chiapas. Out of pelotons isolates at least four different morphotypes (MT) were recognized. One MT coincided with the morphotaxonomic characteristics of *Ceratorhiza* and four more with *Epulorhiza*. More than one MT was isolated from the same plant. MT-1 and MT-7 were isolated from the same young root of *E. stamfordianum*. MT-7 is a characteristic isolate of *Epulorhiza*. In *S. quadrifida*, two strongly related isolates were isolated from pelotons in different root age. A same morphotype of fungi similar to *Epulorhiza* was isolated from pelotons in two species of orchids collected from the same tree.

Key words: *Rhizoctonia*, *Epulorhiza*, *Ceratorhiza*, orchid mycorrhiza, epiphytic orchids.

4.3. Introducción

La familia Orchidaceae se ha caracterizado por su peculiar alimentación micotrófica (Leake 1994). Todos los miembros estudiados de esta familia son colonizados por hongos micorrízicos que forman, en el interior de las células corticales de la raíz, enrollamientos hifales llamados pelotones. Estas estructuras son digeridas completamente por la orquídea, sirviéndole como fuente de carbono principalmente (Rasmussen 1995).

En México, un país megadiverso, de los aproximadamente 144 géneros y 1200 especies de orquídeas que se describen, poco más de 600 especies se encuentran en el estado de Chiapas (Cabrera-Cachón, 1999). Sin embargo, se ha visto una disminución alarmante de sus poblaciones en el país, debido al tráfico y comercialización ilegal de especies atractivas, además de otras actividades humanas. Estas han provocado la modificación drástica de los ecosistemas naturales, lo que ha afectado la distribución y abundancia de las orquídeas, así como de numerosas especies de plantas (Damon y Colín-Martínez, 2005). El sureste de Chiapas no es la excepción; en la región del Soconusco, donde la riqueza natural compuesta por una sucesión de vegetación que va desde los manglares en las zonas bajas, pasando por la selva subcaducifolia y alta perennifolia, existe una severa deforestación. Damon y Colín-Martínez (2004) documentaron la presencia de 122 a 132 especies de orquídeas, de las cuales la mayoría presentan inestabilidad de supervivencia, dado el grado de deterioro de los ecosistemas naturales. De esta riqueza de orquídeas, nada se sabe sobre la diversidad micorrízica con las que se asocian. Debido a que los hongos micorrízicos son necesarios en el inicio de la germinación en la naturaleza y posteriormente como complemento de su alimentación fototrófica durante todo su ciclo de vida (Smith y Read 1997), el conocimiento de esta diversidad fúngica que interactúa con las orquídeas es una piedra angular en cualquier programa de conservación de orquídeas (Batty et al. 2002).

La diversidad de hongos micorrízicos en orquídeas fotosintéticas está principalmente delimitado al género forma-*Rhizoctonia sensu lato* y *sensu stricto* (Basidiomycota: Hymenomycetes). *Rhizoctonia sensu stricto* comprime un grupo bien definido: *Epulorhiza* como anamorfo de *Tulasnella* (Tulasnellales); *Ceratohiza* como anamorfo de *Ceratobasidium* y *Moniliopsis* como anamorfo de *Thanatephorus* (Ceratobasidiales); y el género teleomórfico *Sebacina* (Sebacinales) (Andersen 1996, Kristiansen et al. 2001, Weiss et al. 2004). Sin embargo, orquídeas aclorófilas presentan una alta especialización micotrófica, asociándose

predominantemente con ectomicorrizas Himenomycetes (Thelephoraceae y Cortinaceae, e.g. *Russula*), derivando el carbono necesario de los árboles a su alrededor (Taylor y Bruns 1997, McKendrick et al. 2000, Selosse et al. 2002, Taylor et al. 2003, Julou et al. 2005, Girlanda et al. 2006). Con respecto a la diversidad de hongos micorrízicos presentes en orquídeas epífitas neotropicales, poco se sabe al respecto. Aislados obtenidos de pelotones en orquídeas de Brasil han revelado la presencia de los anamorfos *Epulorhiza repens*, *Epulorhiza epiphytica*, *Epulorhiza* spp. y *Ceratorhiza* spp. (Pereira et al. 2003, 2005a). *Ceratobasidium* y *Tulasnella* han sido los teleomorfos identificados y aislados de fragmentos de raíz en orquídeas epífitas de Puerto Rico y Ecuador, respectivamente (Otero et al. 2002, Suárez et al. 2006), así como *Epulorhiza* sp. ha sido aislado de *Epidendrum conopseum* en Florida (Zettler et al. 1998).

La clasificación taxonómica de los anamorfos forma-*Rhizoctonia* está conformada por tres grupos mayores: Rhizoctonias multinucleadas (teleomorfos *Thanatephorus* y *Waitea*), Rhizoctonias binucleadas (teleomorfos *Ceratobasidium* y *Tulasnella*) y Rhizoctonias uninucleadas (teleomorfo *Ceratobasidium*) (Sharon et al. 2006). Inicialmente Moore (1987) propuso la subdivisión de *Rhizoctonia sensu stricto* en base a la condición nuclear y a la ultraestructura del doliporo. Así separó a *Ceratorhiza* (Teleomorfo *Ceratobasidium*) por presentar hifas jóvenes uni y binucleadas y doliporo del septo con parentesoma perforado. *Epulorhiza* (Teleomorfo *Tulasnella*) con hifas binucleadas y parentesoma imperforado y *Moniliopsis* (Teleomorfo *Thanatephorus* y *Waitea*) con hifas multinucleadas y parentesoma perforado.

A nivel de especie, es extremadamente difícil de separar entre estos grupos (Hadley 1982, Andersen y Rasmussen 1996), he implica el uso combinado de diversos métodos como: parámetros morfológicos, de cultivo, enzimáticos, fusión de hifas, de ultraestructura y filogenia molecular (Sharon et al. 2006). Sin embargo, en trabajos recientes de filogenia molecular se ha evidenciado una correspondencia, al menos de carácter genérico, entre los caracteres morfológicos que se han utilizado y los métodos moleculares (Andersen 1996, Pereira et al. 2005a, Suárez et al. 2006), así como de ultraestructura (Williams y Thilo 1989, Currah y Sherburne 1992, Andersen 1996, Pereira et al. 2003, Suárez et al. 2006).

En el caso particular de México, pocos han sido los trabajos que han documentado los hongos micorrízicos asociados a orquídeas. Rangel-Villafranco y Ortega Larrocea (2007) dan un listado preliminar de algunos géneros forma, aislados de orquídeas terrestres de México

Central. Sin embargo, sobre los hongos asociados a orquídeas epifitas no existe ningún trabajo y el presente constituye el primer registro para especies de epifitas mexicanas en una selva tropical húmeda del sureste de México.

El objetivo del presente estudio fue contribuir a la caracterización morfológica de los hongos micorrízicos asociados a tres orquídeas epifitas de las selvas tropicales del Sureste de México, en el estado de Chiapas.

4.4. Materiales y métodos

4.4.1. Selección de las especies de estudio

De la diversidad de orquídeas descrita para la región del Soconusco, Chiapas, *Epidendrum stamfordianum* Bateman, *Stelis quadrifida* (La Llave & Lex.) Solano & Soto Arenas y *Erycina crista-galli* (Rehb. f.) N.H. Williams & M. W. Chase, fueron seleccionadas para el aislamiento de sus hongos micorrízicos, por presentar densas poblaciones en estadios juveniles en la naturaleza. Lo que nos hacía suponer que estas especies se asociaban más fácilmente con sus simbiontes micorrízicos. Estas poblaciones estaban presentes en parches de vegetación localizados en distintos puntos geográficos en la región de estudio (Damon y Colín-Martínez 2004). De estas tres especies de orquídeas epifitas, solamente *E. crista-galli* esta sujeta a protección especial según la NOM-059-ECOL-2001, que enumera las especies de orquídeas amenazadas o en peligro de extinción. Para la zona geográfica del Soconusco, cuya totalidad de su superficie se caracteriza por pendientes pronunciadas propias de la Sierra Madre de Chiapas, la vegetación original ha sido alterada por el cultivo del café orgánico. Frecuentemente esta especie miniatura es observada creciendo en las ramitas del café, presentando un crecimiento poblacional durante la época de lluvias y una reducción drástica de sus poblaciones por una práctica de manejo cultural del café. Esto es porque durante la limpieza del café, la corteza de las ramas es removida (raspada) para evitar que el peso de la biomasa epifítica venza las frágiles ramas, por lo que cada año se ve una disminución de estas poblaciones. Las características propias de cada especie y los sitios en donde fueron muestreadas, están referidas en el capítulo 3.

4.4.2. Recolecta del material biológico

El muestreo de las especies descritas, se realizó durante los meses de agosto a octubre del 2005. Para el muestreo, se seleccionaron individuos adultos y de cada uno de ellos, se disectaron raíces de diferente edad inferido por su longitud. Raíces de *Epidendrum stamfordianum* fueron recolectadas en Tuzantán e Izapa, *Stelis quadrifida* en Unión Roja e Izapa y *Erycina crista-galli* en Unión Roja y Santo Domingo. Sitios separados aproximadamente por 50 kilómetros, uno de otro.

En campo, las raíces recolectadas fueron trasladadas al laboratorio en bolsas plásticas en una hielera. En el laboratorio, las raíces se lavaron con agua corriente eliminando hasta lo posible, la mayor cantidad de materia orgánica asociada. Las raíces fueron seccionadas para evaluar la intensidad de colonización (capítulo 3). Secciones de raíz con densa colonización de pelotones fueron seleccionadas para el aislamiento de endófitos micorrizicos.

4.4.3. Aislamiento de endófitos micorrizicos

De los explantes previamente seleccionados, se les retiró el velamen bajo un microscopio de disección y sólo se dejó el córtex colonizado. Cada segmento se mantuvo etiquetado en refrigeración a 4 °C en agua destilada, en tubos Eppendorff hasta el aislamiento. El proceso de aislamiento de hongos consistió en la desinfección de los explantes con cloramina T al 2 % en agitación por 5 min, seguida de tres lavados con agua destilada estéril por 1 min y conservadas en una solución de antibiótico estreptomicina 2 % - gentamicina 1 % (p:v). Bajo condiciones de flujo laminar, cada sección del córtex colonizado fue desmembrada en una caja Petri estéril con un poco de agua destilada estéril, bajo un estereoscopio a 30× para observar la liberación de los pelotones (pe) al agua y posteriormente retirarlos con micropipetas (Rasmussen 1995). Los pelotones extraídos fueron sembrados en cajas Petri por el método de vaciado, con el medio de aislamiento fúngico (MAF) descrito por Clements (1986). Posteriormente fueron incubados a 24 °C en una cámara de crecimiento en condiciones de oscuridad. El crecimiento de las hifas provenientes de los pelotones fue revisado bajo un microscopio estereoscópico diariamente, por un periodo de 45 días. Los pelotones que mostraron crecimiento de hifas, fueron resembrados individualmente en medio de papa dextrosa agar (PDA) 39.0 g/L. Sólo los aislados obtenidos por pelotones individuales fueron designados como aislados de pelotón. Pequeñas secciones conteniendo varios pelotones juntos también se observaron y los

aislamientos obtenidos de éstos por hifal, fueron reconocidos como aislados del córtex. Se tomaron registros fotográficos del recrecimiento de las hifas a partir de los pelotones, del crecimiento de las colonias y de la microestructura de las células monilioides y basidiosporas, cuando se obtuvieron.

4.4.4. Determinación taxonómica de los aislados

La determinación taxonómica de los aislados se realizó con base en aspectos morfométricos de crecimiento de las colonias en medio PDA y microestructura de las hifas y/o esporas. Las características de crecimiento de las colonia registradas fueron la tasa de crecimiento, cuantificada cada 48 h por un periodo de 2 semanas, para aquellos aislados de rápido crecimiento y en aproximadamente dos meses para los de muy lento crecimiento en un promedio de tres puntos por caja. Se registró el color y textura o forma de crecimiento del micelio. Los caracteres microscópicos fueron el ancho de las hifas y las dimensiones de las células monilioides en un promedio de 20 observaciones y, en algunos casos de las basidiosporas. El número de núcleos por célula fue observado en células de hifas jóvenes, teñidas con solución de Safranina O (Accustain Sigma HT90-4-32) de acuerdo a lo descrito por Sneh et al. (1991). Una pequeña cantidad de hifas apicales fueron removidas del medio de cultivo y puestas en un portaobjeto, en una solución conteniendo una gota de Safranina O alcalina al 1 % y una gota de KOH 3.0 %. Posteriormente se observaron los núcleos teñidos de rojo en microscopía de luz a 400 x. Para algunos aislados se realizó Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) para determinar su superficie. Para la observación, se procedió a fijar bloques de agar de 0.5 cm conteniendo el hongo en PDA y someterlos a vapores de tetraóxido de osmio al 2 % posteriormente se sumergió en una solución de glutaraldehído al 3 % en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.2 para fijar su estructura tridimensional. Se dejaron reposando por tiempos definidos en soluciones de etanol absoluto de 30, 50, 70, 90 y 100 % (dos cambios de 100 %), con el fin de eliminar el agua contenida. Seguidamente, las muestras deshidratadas fueron secadas al punto crítico con CO₂. Las muestras secas se montaron sobre un portaobjetos de aluminio con cinta de carbón doble adherencia, se cubrieron con una capa de oro-paladio y fueron observadas con un microscopio electrónico de Barrido Topcon SM-510, bajo condiciones de alto vacío. Las descripciones tanto de la morfología microscópica como colonial, fueron realizadas según las descripciones de Currah et al. (1987), Currah et al.

(1990), Zelmer y Currah (1995), Zelmer et al. (1996), Currah et al. (1997) y Pereira et al. (2003).

4.5. Resultados

Se aislaron un total de 31 cepas de hongos del género forma-*Rhizoctonia* (anexo 1a-d), de los cuales 18 produjeron en PDA, células monilioides. Nueve aislados se obtuvieron del recrecimiento de pelotones y el resto provino del recrecimiento del tejido del córtex (Fig. 4.1.).

Seis de los aislados que formaron células monilioides fueron obtenidos de *Epidendrum stamfordianum*, 9 de *Stelis quadrifida* y 4 de *Erycina crista-galli*. Nueve de estos aislados se obtuvieron de raíces maduras, 6 de raíces de edad intermedia y sólo 4 de raíces tiernas. Los aislados provenientes de pelotones únicamente se obtuvieron de *E. stamfordianum* y *S. quadrifida*; de éstos, en su mayoría de raíces adultas. Aislados de pelotón se obtuvieron de Tuzantán y principalmente Izapa (Fig. 4.1.).

Con base en las características morfológicas y de crecimiento en medio de cultivo descritas en el anexo 1a-d, se pudieron identificar siete morfotipos distintos que a continuación se describen:

Morfotipo 1 (MT-1): En PDA, colonia de color amarillo pálido a blanco, textura algodonosa, micelio abundante tipo fieltro. Tasa de crecimiento 2.9 mm/día a 25° C. Hifa corredora hialina, de 4-7.2 µm de diámetro. Células monilioides globosas a subglobosas de 9-14 × 8-12.6 µm, ampliamente unidas, con prominente septo. Las células monilioides no forman conexiones de clamp. Clamidospora terminal globosa de 12-22 × 13.2-17.4 µm. Esclerocios presentes. Teleomorfo ausente. Aislados: 040Rj-03pe-1, 040Rma-02ph, 040Rma-1-01ph provenientes de *Epidendrum stamfordianum* en el sitio Tuzantán; 216Rma-01ph-1, 216Rma-02ph-2, 216Rma-02ph, 215Rm-02ph provenientes de *Erycina crista-galli* del sitio Unión Roja (Fig. 4.2.a, b).

Morfotipo 2 (MT-2) aff. *Ceratorhiza*. En PDA, colonia color blanco cremoso a amarillo pálido, micelio aéreo esparcido, abundante con mechones esparcidos tipo fieltro. Micelio de rápido crecimiento: 8.3 mm/día a 25°C. Hifa corredora hialina, de 3-6.6 µm de diámetro.



Epidendrum stamfordianum

Localidad: Tuzantán
 040Rj¹-03pe²-1 MT-1
 040Rma³-02ph⁴ MT-1
 040Rma-1-01ph MT-1
 040Rj-03pe MT-6

Localidad: Izapa
 205Rma-01pe MT-4
 205Rma-06pe MT-4



Stelis quadrifida

Localidad: Izapa
 203Rma-01pe MT-4
 204Rma-01pe MT-4
 203Rm⁵-01pe MT-5
 203Rm-03pe MT-5
 203Rm-01ph MT-3

Localidad: Unión Roja
 105Rma-03ph MT-2
 105Rma-04ph MT-2
 105Rm-02ph MT-3
 105Rm-01ph MT-7
 105Rm-01cp MT-5*



Erycina crista-galli

Localidad: Unión Roja
 216Rma-01ph-1 MT-1
 216Rma-02ph-2 MT-1*
 216Rma-02ph MT-1*
 215Rm-02-ph MT-1

Localidad: Santo Domingo
 213Rj-01ph MT-4
 213Rj-02ph MT-4

Figura 4.1. Claves de aislados micorrizicos de raíces de orquídeas epifitas adultas, en los distintos sitios de muestreo. Sólo se presentan los aislados que formaron células monilioides, excepto los marcados con asterisco. MT: morfortipos. ¹Rj= Raíz joven, ⁵Rm= Raíz mediana, ³Rma= Raíz madura, ²pe= pelotón, ⁴ph= punta hifal, cp=células pasaje, * micelio estéril.

Células monilioideas largas en forma de barril, ampliamente unidas con prominente septo. Aislados: 105Rma-03ph, 105Rma-04ph provenientes de *Stelis quadrifida* en el sitio Unión Roja (Fig. 4.2.c, d).

Morfotipo 3 (MT-3): En PDA, colonia color blanco cremoso a amarillo pálido; micelio aéreo escaso con pocos mechones blanco algodonosos; de lento crecimiento: 1.7cm en 56 días. Células monilioideas largas en forma de barril, ampliamente unidas con prominente septo. Las células monilioideas no forman conexiones de clamp. Esclerocios ausentes. Teleomorfo ausente. Aislados: 105Rm-02ph, 203Rm-01ph provenientes de plantas de *Stelis quadrifida* en los sitios Unión Roja e Izapa, respectivamente (Fig. 4.2.e, f). Morfotipo similar a MT-1 pero de lento crecimiento.

Morfotipo 4 (MT-4): *Epulorhiza* sp. En PDA, colonia de color gris obscuro a café obscuro; crecimiento con bordes plano, micelio aéreo sebáceo, margen sumergido sebáceo, abrupto e irregular. Colonia de muy lento crecimiento: 0.70 mm/día. Hifa corredora binucleada de 2.1-2.6 μm de diámetro. Células monilioideas globosas a elongadas irregularmente, de 4.8-7.5 x 2.5-4.2 μm , conectadas por un estrechamiento del septo (isthmus) corto y delgado. Aislados: 203Rma-01pe, 204Rma-01pe provenientes de *Stelis quadrifida* del sitio Rosario Izapa, 205Rma-01pe, 205Rma-06pe provenientes de *Epidendrum stamfordianum* del sitio Tuzantán y 213Rj-01ph, 213Rj-02ph provenientes de *Erycina crista-galli* del sitio Santo Domingo en el agroecosistema del café (Fig. 4.2.g, h; 4.3.a, b, c, h). En 205Rma-06pe y 204Rma-01pe, basidiosporas de pared engrosada, 4 x 3.84 μm , globosas

Morfotipo 5 (MT-5): aff. *Epulorhiza* En PDA, colonia café obscuro en el margen y gris claro a obscuro en el centro; micelio aéreo sebáceo con márgenes sumergidos, costroso, irregular, de muy lento crecimiento 0.09 mm/día a 25 °C. Hifa corredora de 3.2-3.5 μm , células monilioideas abundantes, regularmente globosas a elipsoides, algunas elongadas, de 6.5-10.2 x 5-7 μm , de pared gruesa y superficie lisa formando cadenas simples con más de 20 células. Aislados obtenidos de *Stelis quadrifida*: 105Rm-01cp en sitio Unión Roja y 203Rm-01pe, 203Rm-03pe en el sitio Izapa (Fig. 4.3.d, e, f).

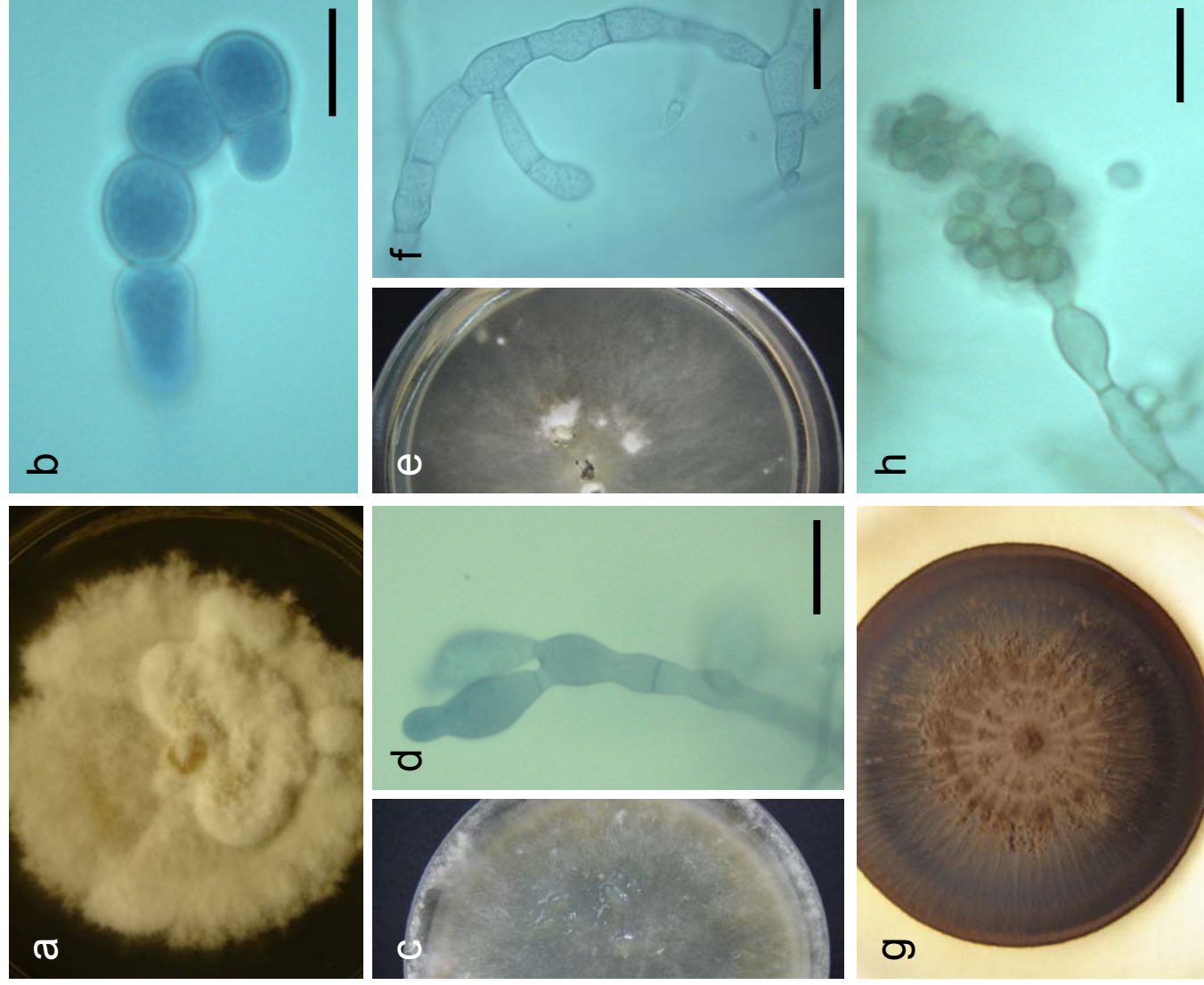


Figura 4.2. Morfología colonial y características de células monilioides en aislados de hongos micorrízicos de orquídeas epifitas. Crecimiento en PDA, Morfotipo 1: micelio de textura algodonosa (a) y células monilioides globosas (b) de 040Rj-03pe-1. Morfotipo 2; micelio aéreo esparcido (c) y células monilioides en forma de barril ampliamente unidas una de otra (d) de 105Rma-03ph. Morfotipo 3; micelio aéreo escaso y laxo con mechones algodonosos (e) y células monilioides en forma de barril con prominentes septos (f) de 105Rm-02ph. Morfotipo 4; micelio café oscuro (g) y basidiosporas globosas (h) en 205Rma-06pe aislado. Las barras de escala representan para b= 11 μm , d=15 μm , f= 14 μm y h= 7 μm .

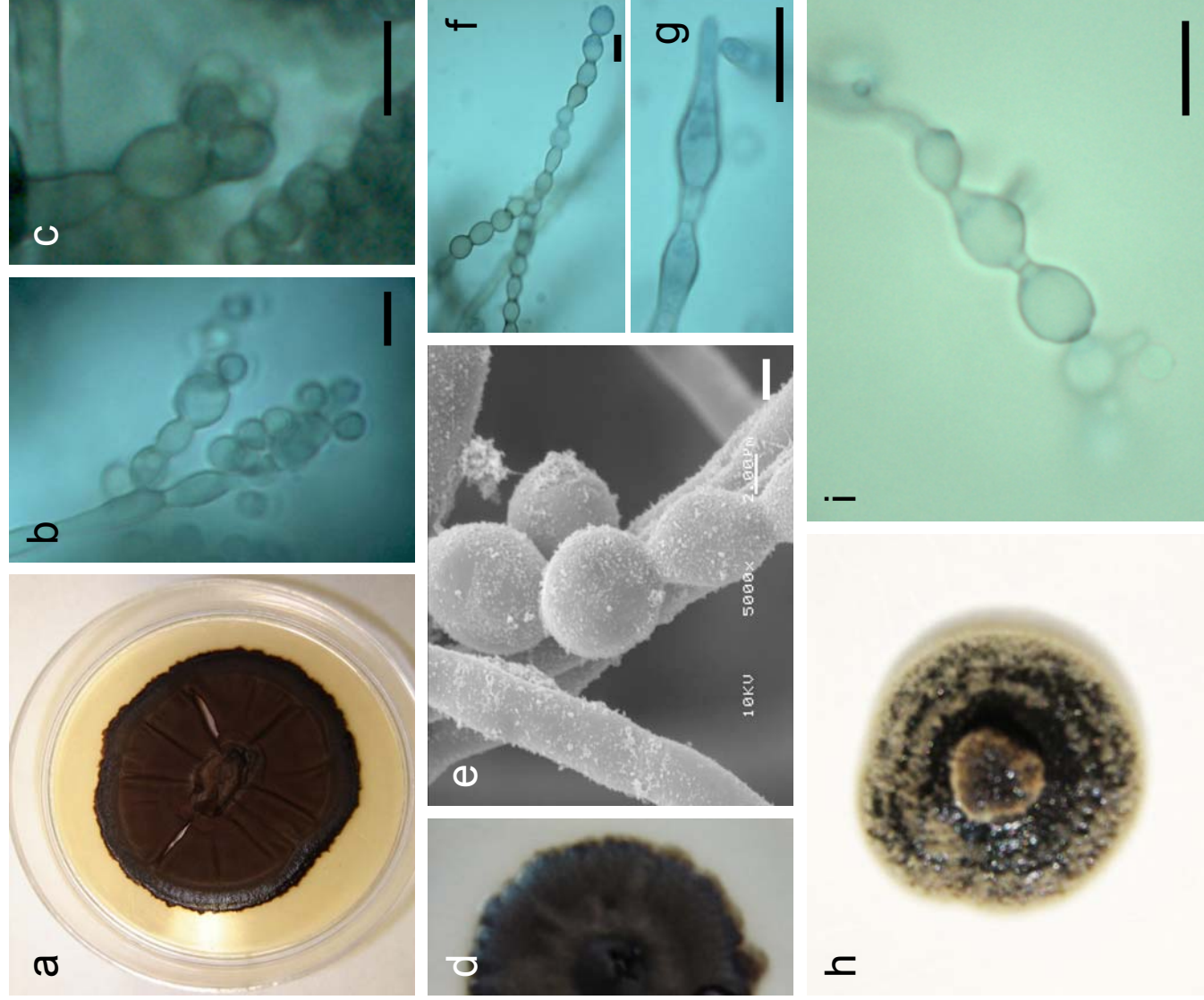


Figura 4.3. Morfología colonial y características de células monilioides en aislados: Morfotipo 4; micelio café obscuro con margen sumergido sebáceo (a) y basidias y basidiosporas globosas (b, c) de 205Rma-06pe. Morfotipo 5; micelio café obscuro sebáceo con margen sumergido (d), células monilioides subglobosas de pared lisa (e) con microscopia electrónica de barrido y cadena simple de células monilioides de 203Rm-01pe (f); Morfotipo 6 células monilioides inmaduras (g) de 040Rj-03pe. Micelio gris a café obscuro sebáceo con margen sumergido (h) de 203Rma-01pe (MT-4). Morfotipo 7; células monilioides globosas a subglobosas conectadas por un estrechamiento del septo (isthmus) tubular, corto y delgado (i) de 105Rm-01ph. Las barras de escala representan para b, c, f = 2 μm y g, i = 8 μm .

Morfotipo 6 (MT-6): aff. *Epulorhiza*. En PDA, colonia blanco a gris claro, micelio algodonoso de lento crecimiento: 0.3 cm después de 56 días a 34°C. Células monilioides, escasas, globosas a subglobosas conectadas por un estrechamiento del septo (isthmus) tubular, corto y delgado. Aislado: 040Rj-03pe proveniente de *Epidendrum stamfordianum* del sitio Tuzantán (Fig. 4.3.g).

Morfotipo 7 (MT-7): aff. *Epulorhiza*. En PDA, colonia café oscuro en el margen y gris obscuro en el centro; micelio aéreo sebáceo con márgenes sumergidos, costroso, irregular de muy lento crecimiento. Células monilioides escasas, globosas a subglobosas conectadas por un estrechamiento del septo (isthmus) tubular, corto y delgado. Aislado: 105Rm-01ph, proveniente de *Stelis quadrifida* del sitio Unión Roja. Similar a MT-6 (Fig. 4.3.i).

Por otro lado, un mismo morfotipo fue aislado de pelotón en dos especies de orquídeas recolectadas en el mismo árbol (Fig. 4.4.a-d). El morfotipo 4, perteneciente a los aislados 205Rma-01pe (Fig. 4.4.e, g) y 205Rma-06pe (Fig. 4.2.h, 4.3.b, c) aislados de *E. stamfordianum* y 203Rma-01pe (Fig. 4.4.f, h) obtenido de *S. quadrifida*, presentaron características morfométricas indivisibles.

4.6. Discusión

El criterio morfotaxonómico, el cual continúa siendo válido, como una primera herramienta de aproximación a los géneros, no siempre es suficientemente exacto para separar entre cepas de hongos del género forma-*Rhizoctonia*, ni mucho menos de las relaciones que guardan entre sí. Sin embargo, la filogenia molecular ha permitido corroborar que estos criterios usados, permiten discernir entre diferentes géneros del complejo *Rhizoctonia sensu stricto* (Andersen 1996, Pereira et al. 2005a, Suárez et al. 2006). Por ejemplo, el género más común, *Epulorhiza* (teleomorfo *Tulasnella*), frecuentemente aislado en orquídeas epífitas, se ha comprobado que es un grupo monofilético. Todos los miembros de éste género presentan características morfológicas bien definidas, que se han mantenido desde que Bernard lo describió en 1909 (Moore 1987, Kristiansen et al. 2001, Suárez et al. 2006, Bonnardeaux et al. 2007). *Epulorhiza* esta típicamente caracterizado por ser un hongo dicariótico, con doliporo del septo con parentesoma imperforado; micelio aéreo sebáceo con margen sumergido, de muy lento

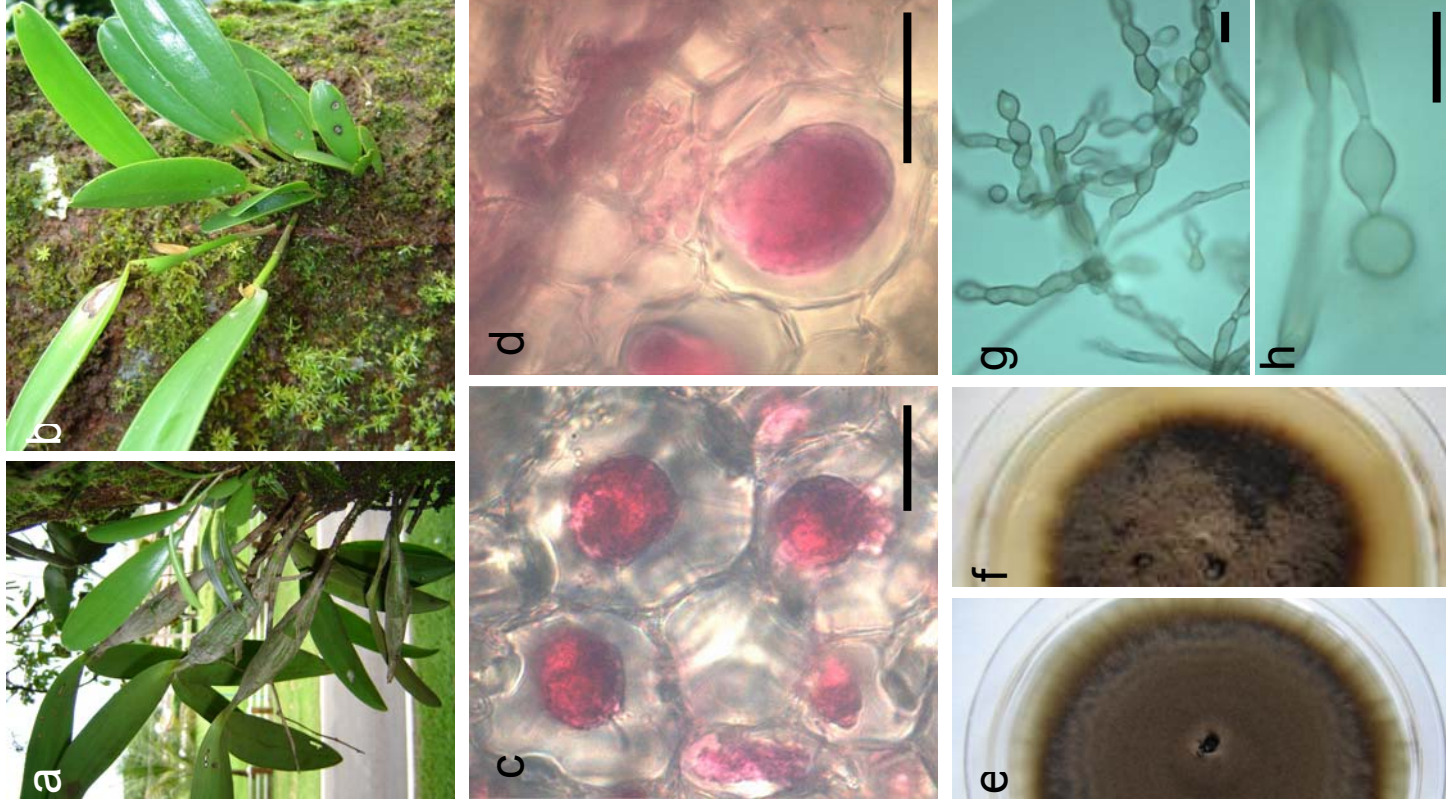


Figura 4.4. Ilustración del mismo morfotipo (MT-4) aislado en diferente especie de orquídea en el mismo árbol en el sitio Izapa. Planta adulta de *Epidendrum stamfordianum* (a) y *Stelis quadrifida* (b). Pelotones en células corticales de *E. stamfordianum* (c) y *S. quadrifida* (d) teñidos con fushina ácida. Morfología colonial de 205Rma-01pe (e) y 203Rma-01pe (f) y células monilioideas obtenidas de petotón en *E. stamfordianum* y *S. quadrifida*, respectivamente. Las barras de escala representan para g = 6 μm , c = 7 μm , d = 60 μm y c = 50 μm .

crecimiento, hifa corredora < 4 µm de diámetro y células monilioides regularmente globosas (Andersen 1996, Currah et al. 1997, Pereira et al. 2003, 2005a, Suárez et al. 2006).

Uno de los trabajos más importantes en la caracterización morfotaxonomía de los distintos hongos asociados a orquídeas, es la de Moore (1987) quien separó en tres géneros anamórficos, el complejo forma-*Rhizoctonia*. Diversos trabajos han comparando caracteres morfológicos y moleculares, confirmando la existencia bien definida de estos tres géneros: *Epulorhiza*, *Ceratorhiza* y *Moniliopsis* (Mordue et al. 1989, Andersen 1996, Currah y Sherburne 1992, Pereira et al. 2005a). Andersen 1996, empleando métodos morfológicos, moleculares y de ultraestructura, realizó el mayor estudio de taxonomía comparada de *Rhizoctonia sensu lato*. El definió que “*Rhizoctonia sensu stricto*”, comprime un grupo bien definido, *Epurorhiza*, que podría ser restringido como anamorfo de *Tulasnella*, ya que los aislados de *Sebacina* presentan una ultraestructura del poro muy distintivo. Las cepas de *Ceratorhiza* son indistinguibles de las *Moniliopsis*, ya que no había diferencias en los resultados de ultraestructura del poro y análisis de RFLP's, indicando una relación muy estrecha. *Ceratorhiza* sólo puede ser separado de *Moniliopsis* en base a su condición nuclear. *Moniliopsis* podría ser restringido como anamorfo de “*Thanatephorus*”. Su trabajo ha sido corroborado por filogenia molecular, años más tarde, por Kristiansen et al. (2001) y recientemente por Bonnardeaux et al. (2007).

En base a esto, es pertinente comentar que existen limitaciones respecto a la identificación definitiva de los hongos estudiados en este trabajo. Sin embargo, se pretende que sea un aporte al conocimiento morfotaxonomico de la diversidad de los hongos forma-*Rhizoctonia* que se asocian a orquídeas epífitas del Sureste de México, ya que hasta antes de este trabajo, era desconocido.

De este modo, tres puntos a discusión son importantes en estos resultados. Primero, que la diversidad depende del éxito en el aislamiento de los pelotones (Kristiansen et al. 2001, Bonnardeaux et al. 2007). Debido a que los pelotones se encuentran en diversos grados de digestión, la posibilidad de que crezcan hifas disminuye cuando éstos se encuentran muy degradados, característica especialmente presentada en época de secas. La condición de que la diversidad se haga con base en aislados obtenidos de pelotón nos permite asegurar que estos hongos están cumpliendo un papel fisiológico en la nutrición de la orquídea y por consiguiente, se pueden considerar que estos hongos son micorrízicos (Bonnardeaux et al.

2007). Una amplia diversidad de hongos forma-*Rhizoctonia*, hongos imperfectos y ascomicetos han sido aislados del velamen e inclusive de tejido del córtex macerado (Richardson et al. 1995, Currah et al. 1997, Otero 2002), pero no todos éstos forman asociaciones simbióticas de tipo micorrízico indicada por la formación del pelotón (Kristiansen et al. 2004). Muchos hongos endófitos sin función aparentemente descrita, proliferan en el velamen de orquídeas epífitas (Richardson et al. 1995, Bayman et al. 2002, Otero 2002). Esto es importante cuando se pretende documentar la diversidad funcional de los hongos micorrízicos (Bonnardeaux et al. 2007).

En el presente trabajo, se lograron obtener únicamente nueve aislados a partir de pelotones por lo que son aislados cuyo análisis resulta interesante. Dentro de éstos, al menos cuatro morfotipos distintos fueron reconocidos: MT-1, MT-4, MT-5 y MT-6. Otros aislados se pudieron obtener a partir del crecimiento de un conjunto de pelotones pero se disectaron de ápices hifales. Algunos morfotipos MT-1 y MT-3 son difíciles de diferenciar entre los géneros forma *Ceratorhiza* o *Moniliopsis*, en base a las características que se presentan en este trabajo y es posible que incluyan más de dos especies. MT-2 coincide con las descripciones morfológicas y de cultivo de *Ceratorhiza*; hongo muy comúnmente aislado entre las orquídeas terrestres y los más abundantes MT-4, MT-5, MT-6 y MT-7 *a priori* se pueden agrupar como afines a *Epulorhiza*. *Tulasnella*, el telomorfo de éste último, es un género ampliamente reportado en orquídeas fotosintéticas y en menor grado en orquídeas micoheterótrofas (Zettler et al. 1998; Ma et al. 2003; Pereira et al. 2003, 2005a; Suárez et al. 2006; Kasuya et al. 2006). Se ha visto que también está ampliamente distribuido en orquídeas epífitas neotropicales (Zettler et al. 1998; Ma et al. 2003; Pereira et al. 2003, 2005a; Suárez et al. 2006; Kasuya et al. 2006) y ahora, con este trabajo, se documenta para México. *Ceratorhiza* ha sido aislado, en orquídeas epífitas, de fragmentos de tejido cortical (Otero et al. 2002) y de pelotones en orquídeas de Brasil (Pereira et al. 2005a, 2005b). Hasta el momento no existen referencias de la presencia de *Moniliopsis* y del género teleomórfico *Sebacina* en orquídeas epífitas. Sin embargo, no descartamos que también estos miembros de *Rhizoctonia sensu stricto*, estén presentes en la corteza de los árboles, asociándose con orquídeas epífitas ya que son todavía muy pocos los estudios que se han realizado describiendo la diversidad fúngica en el hábitat epífitico.

La segunda consideración interesante para discutir en este trabajo es que en el aislamiento de hongos formando pelotones, más de un morfotipo fue aislado de una misma planta, en una misma sección de raíz. Esto ya ha sido descrito por otros autores; por ejemplo, Suárez et al. (2006) describieron que en muchos casos un mismo individuo de orquídea, estuvo asociado con más de un clado de *Tulasnella*, incluso en un mismo segmento de raíz. Kristiansen et al. (2004) secuenciando la subunidad del DNA del ribosoma mitocondrial de los hongos formando pelotones en las raíces de la orquídea terrestre *Neuwiedia veratrifolia* encontró que, en algunos casos, miembros de los clados *Tulasnella* y *Thanatephorus* fueron aislados de la misma planta... Incluso, los mismos reportaron que dos diferentes hongos formadores de un mismo pelotón dentro de la misma célula cortical, estuvieron presentes en la orquídea *Dactylorhiza majalis*. El primer taxón perteneció al género *Tulasnella* y el segundo fue relacionado distantemente con el hongo ectomicorrízico *Laccaria* (Kristiansen et al. 2001). Por otro lado, el caso contrario, de una diversidad reducida ha sido documentado también por Pereira et al. (2005a) en orquídeas epífitas de Brasil, encontrando sólo un único clado, en un mismo individuo de orquídea.

La tercera consideración final es, que un mismo morfotipo fue aislado de pelotón en dos especies de orquídeas recolectadas en el mismo árbol. Pereira et al. (2005a), al analizar por PCR-RFLP siete regiones del ADN ribosómico de aislados provenientes de pelotón, en siete orquídeas epífitas de Brasil, encontraron que dos aislados obtenidos de diferente especie de orquídea del mismo género (*Oncidium flexuosum* y *O. varicosum*) muestreadas en la misma región geográfica, tuvieron la misma secuencia genética confinada a *Ceratorhiza* sp. El mismo autor obtuvo dos aislados de un segundo clado de *Ceratorhiza* sp. con 99 % de identidad genética en *Isochilus linearis* y *Maxillaria marginata*; ambas recolectadas también en la misma región geográfica. Así mismo, en las epífitas *Epidendrum rigidum* y *Polystachya concreta* recolectadas en el mismo sitio, se obtuvieron dos aislados compartiendo 100 % de identidad genética y reconociendo una nueva especie, *Epulorhiza epiphytica* (Pereira et al. 2003, 2005a).

Diversos trabajos han descrito que existe una amplia gama de especificidad en cuanto al hongo que coloniza las células del córtex, dependiendo de la especie, del hábitat en donde crece y del área geográfica (Otero et al. 2004, 2005; Pereira et al. 2005a; Girlanda et al. 2006; Bonnardeaux et al. 2007). Se ha documentado que ciertas orquídeas tienen preferencias por

asociarse con determinados géneros o inclusive especies de hongos. Sin embargo, existe polémica por referirse a estas preferencias como una especificidad hospedero-simbionte, debido 1) a la dificultad de caracterizar la forma perfecta de los hongos y 2) la falta de evidencia sobre esta especificidad en las plantas de amplia distribución de acuerdo a los distintos hábitat. Sin embargo, queda claro lo comentado por Bonnardeaux et al. (2007), sobre la asignación con poca evidencia de un aislado como “hongo micorrízico de orquídea,” aún cuando venga de un explante de raíz. Según éstos últimos autores, “la especificidad debe ser definida como la diversidad de hongos micorrízicos compatible con la orquídea” y en ésta, argumentan que tres procesos de confirmación pueden ser usadas: “(1) aislamiento directamente de estructuras micorrízicas (pelotones); (2) ensayos de germinación simbiótica usando un protocolo de cultivo bien establecido y (3) confirmación molecular de los hongos. Aun con estos tres supuestos, la información puede diferir de la realidad en la naturaleza, debido a la multiplicidad de factores que intervienen. Sin embargo, disminuye en gran medida la posibilidad de generar información errónea sobre los hábitos simbioses de las orquídeas en distintos hábitat y las implicaciones que esto tiene en su gran plasticidad evolutiva. Se sigue haciendo hincapié en que, dado que para los ecosistemas más diversos como los trópicos, se carece de mucha evidencia o simplemente estudios de calidad diagnósticos, se esta a distancia de poder comprender cómo funciona esta simbiosis tan particular, entre las demás micorrizas.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por SEMARNAT-CONACYT bajo el proyecto Restauración y aprovechamiento sustentable de las orquídeas del Soconusco, Chiapas, México. Nuestro agradecimiento a Guadalupe Nieto por su apoyo en la toma de imágenes de microscopía electrónica. A Gabriel Flores del Carpio, Joel Barrios Gerardo, José Antonio Atilano Briscoon y Víctor Manuel Perea Estrada por su apoyo en las salidas a campo.

4.7. Literatura citada

Andersen TF (1996) A comparative taxonomic study of *Rhizoctonia sensu lato* employing morphological, ultrastructural and molecular methods. *Mycological Research* 100:1117-1128

Andersen TF, Rasmussen HN (1996) Mycorrhizal *Rhizoctonia*. Pp 379-391. In: Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijst G (eds.), *Rhizoctonia* species: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and control. Kluwer Academic Publications, Holland. pp:379-391

- Batty AL**, Dixon KW, Brundrett MC, Sivasithamparam K (2002) Orchid conservation and mycorrhizal associations. In: Sivasithamparam K, Dixon KW, Barrett RL (eds), *Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp:195-226
- Bonnardeaux Y**, Brundrett M, Batty A, Dixon K, Koch J, Sivasithamparam K (2007) Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. *Mycological Research* 111:51-61
- Cabrera-Cachón T** (1999) Orquídeas de Chiapas. Instituto de Historia natural y Gobierno del Estado. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas
- Clements MA**, Muir H, Criba PJ (1986) A preliminary reports on the symbiotic germination of European terrestrial orchids. *Kew Bulletin* 41:437-445
- Currah RS**, Sherburne R (1992) Septal ultrastructure of some fungal endophytes from boreal orchid mycorrhizas. *Mycological Research* 96:583-587
- Currah RS**, Sigler L, Hambleton S (1987) New records and new taxa of fungi from the mycorrhizae of terrestrial orchids of Alberta. *Canadian Journal of Botany* 65: 2473-2482
- Currah RS**, Smreciu EA, Hambleton S (1990) Mycorrhizae and mycorrhizal fungi of boreal species of *Platanthera* and *Coeloglossum* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany* 68: 1171-1181
- Currah RS**, Zelmer CD, Hambleton S, Richardson KA (1997) Fungi from orchid mycorrhizas. In: Arditti J, Pridgeon AM (eds.) *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*, VII. Kluwer Academic, Great Britain, pp:117-170
- Damon A**, Colin-Martínez H (2004) El estado actual de las poblaciones de orquídeas en la región del Soconusco, Chiapas. *Boletín Amaranto de la Asociación de Jardines Botánicos de México*. Septiembre-Diciembre Año 17 No. 3: 2-16
- Girlanda M**, Selosse MA, 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. *Molecular Ecology* 15:491-504
- Hadley G** (1982) Orchid Mycorrhiza. In: Arditti (ed), *Orchid Biology: Reviews and Perspectives II*. Cornell University Press, Ithaca, NY, pp. 83-118
- Julou T**, Burghardt B, Gebauer G, Berveiller D, Damesin C, Selosse MA (2005) Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytologist* 166:639-653

- Kasuya MC**, Linhares DO, Meira RM, Pereira OL, Costa MD, Pereira MC (2006) Morphological characterization of *Epidendrum secundum* and *Zygopetalum mackaii* mycorrhizae, native orchids from Brazil. Abstracts of 5th International Conference on Mycorrhiza of Mycorrhiza for Science and Society, 23-27 July, Granada, Spain, pp:130
- Kristiansen KA**, Freudenstein JV, Rasmussen FN, Rasmussen HN (2004) Molecular identification of mycorrhizal fungi in *Newwiedia veratrifolia* (Orchidaceae). Molecular Phylogenetics and Evolution 33: 251-258
- Kristiansen KA**, Taylor DL, Kjoller R, Rasmussen HN, Rosendahl S (2001) Identification of mycorrhizal fungi from single pelotons of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) using single-strand conformation polymorphism and mitochondrial ribosomal large subunit DNA sequences. Molecular Ecology 10: 2089-2093
- Leake JR** (1994) The biology of mycoheterotrophic ('saprophytic') plants. New Phytologist 127:171-216
- Ma M**, Tan TK, Wong SM (2003) Identification and molecular phylogeny of *Epulorhiza* isolates from tropical orchids. Mycological Research 107:1041-1049
- McKendrick SL**, Leake JR, Read DJ (2000) Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plant in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. New Phytologist 145: 539-548
- Moore RT** (1987) The genera of *Rhizoctonia*-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen nov., *Epulorhiza* gen nov., *Moniliopsis*, and *Rhizoctonia*. Mycotaxon 29: 91-99
- Mordue JEM**, Currah RS, Bridge PD (1989) An integrated approach to *Rhizoctonia* taxonomy: cultural, biochemical and numerical techniques. Mycological Research 92: 78-90
- Otero JT**, Ackerman JD, Bayman P (2002) Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. American Journal of Botany 89: 1852-1858
- Otero JT**, Ackerman JD, Bayman P (2004) Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. Molecular Ecology 13: 2393-2404
- Otero JT**, Bayman P, Ackerman JD (2005) Variation in mycorrhizal performance in the epiphytic orchid *Tohumnia variegata in vitro*: the potential for natural selection. Evolutionary Ecology 19: 29-43
- Pereira OL**, Kasuya MCM, Borges AC, Araújo EF (2005a) Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. Canadian Journal of Botany 83: 54-65

- Pereira OL**, Kasuya MCM, Rollemberg CL, Chaer GM (2005b) Isolation and identification of *Rhizoctonia*-like mycorrhizal fungi associated to three neotropical epiphytic orchid species in Brazil. R. Bras. Ci. Solo 29:191-197
- Pereira OL**, Rollemberg CL, Borges AC, Matsuoka K, Kasuya MCM (2003) *Epulorhiza epiphytica* sp.nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. Mycoscience 44: 153-155
- Rasmussen HN** (1995) Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant. Cambridge Press, Cambridge
- Richardson KA**, Currah RS (1995) The fungal community associated with the roots of some rainforest epiphytes of Costa Rica. Selbyana 16: 49-73
- Selosse MA**, Weib M, Jany J-L, Tillier A. 2002. Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. And neighbouring tree ectomycorrhizae. Molecular Ecology 11: 1831-1844
- Sharon M**, Kuninaga S, Hyakumachi M, Sneh B (2006) The advancing identification and classification of *Rhizoctonia* spp. Using molecular and biotechnological methods compared with the classical anatomosis grouping. Mycoscience 47: 299-316
- Smith SE**, Read DJ (1997) Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London
- Sneh B**, Burpee L, Ogoshi A (1991) Identification of *Rhizoctonia* Species. APS Press, USA
- Suárez JP**, Weib M, Abele A, Garnica S, Oberwinkler F, Kottke I (2006) Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. Mycological Research 110: 1257-1270
- Taylor DL**, Bruns TD (1997) Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4510-4515
- Taylor DL**, Bruns TD, Szaro TM, Hodges SA (2003) Divergence in mycorrhizal specialization within *Hexaletris spicata* (Orchidaceae), a nonphotosynthetic desert orchid. American Journal of Botany 90: 1168-1179
- Weiss M**, Selosse MA, Rexer K-H, Urban A, Oberwinkler F (2004) *Sebacinales*: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. Mycological Research 108: 1003-1010
- Williams PG**, Thilo E (1989) Ultrastructural evidence for the identity of some multinucleate rhizoctonias. New Phytologist 112: 513-518
- Zelmer CD**, Currah RS (1995) *Ceratohiza pernacatena* and *Epulorhiza calendulina* spp.nov.: mycorrhizal fungi of terrestrial orchids. Canadian Journal of Botany 73: 1981-1985

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

Zettler LW, Delaney TW, Sunley JA (1998) Seed propagation of the epiphytic green-fly orchid, *Epidendrum conopseum*. *Selbyana* 19: 249-253

Conclusiones generales y consideraciones finales

En conclusión, este trabajo refuerza los resultados de otros investigadores sobre la elevada colonización micorrízica en orquídeas epifitas de varios géneros. Se constató de la misma forma que la edad de las raíces, su diámetro y la presencia de detritus orgánico son factores que influyen en la intensidad de colonización, así como las condiciones del sitio. Dado que no existen reportes que documenten el hábito micótrofo de orquídeas que dominan la canopia de los árboles en las selvas tropicales de México, el presente trabajo también es una aportación en esta área. Los cafetales con sombra de árboles nativos de las selvas funcionan como un refugio para las orquídeas como para sus simbiontes micorrízicos. Es necesario que en próximos trabajos se explore el papel de la estacionalidad en la colonización micorrízica y se profundice en la caracterización de los endofitos con la finalidad de conocer si la transformación del hábitat de selva a cafetal, ha traído implicaciones en la especificidad de las plantas por sus endofitos.

En cuanto a la diversidad de hongos micorrízicos reportados, se pudo observar que a pesar de ser un trabajo basado solo en caracteres morfotaxonómicos, existe una amplia gama de morfotipos del género forma-*Rhizoctonia* presentes en los hábitats estudiados. Los caracteres morfotaxonómicos coinciden con dos de los géneros anamórficos frecuentemente aislados en orquídeas terrestres y epifitas: *Ceratorhiza* y *Epulorhiza*. Es también importante resaltar que más de un morfotipo estuvo presente en una misma sección de raíz, como ha sido reportado por otros autores. Además que, en condiciones donde dos o más especies crecen relativamente cerca una de otra, es posible que compartan los mismos simbiontes fúngicos, esto hace hincapié, que más que una especificidad por especie haya una afinidad según el sitio, como también ha sido documentado.

Es necesario que estas conclusiones preliminares sean corroboradas con estudios de biología molecular, ultraestructura del septo y tinción de núcleos con microscopía de fluorescencia.

Anexo 1a. Características morfológicas de los aislados de hongos micorrizicos de orquídeas epifitas de Chiapas.

Orquídea-Localidad	Aislado	Colonia en PDA			Micelio aéreo en PDA			Células monilioides		Tasa de Crecimiento
		Color	Apariencia	Margen	Apariencia	Diámetro de la hifa (µm)	Condición nuclear	Dimensiones (µm)	Forma	
Es-Tu	040Rj-03pe-1	Amarillo pálido a blanco	Algonodosa	Aéreo	Algodonoso tipo fieltro	4.0-7.2	Células hifales uni y binucleadas	9-13.8 x 8-12.6	Globosas a subglobosas	2.05 mm/día a 25°C
Es-Tu	040Rma-02ph	Amarillo pálido a blanco	Lustrosa con centro algodonosa	Aéreo	Algodonoso tipo fieltro	4.0-7.2	-	9-13.8 x 8-12.6	Globosas a subglobosas	2.9 mm/día a 25°C
Es-Tu	040Rma-1-01ph	Amarillo pálido a blanco	Lustrosa	Aéreo	Algodonoso tipo fieltro	4.0-7.2	-	9-13.8 x 8-12.6	Globosas a subglobosas	2.9 mm/día a 25°C
Es-Tu	040Rj-03pe	Blanco a gris claro	Algodonoso	Aéreo	Algodonoso	-	-	-	Escasas, globosas a subglobosas	0.3 cm después de 56 días a 34°C
Es-Iz	205Rma-01pe	Café oscuro	Cuando joven: Tipo fieltro en crecimiento radial	Sumergido, sebáceo	Cuando maduro: Polvoriento en el centro y sebáceo en el margen	1.8-3.6	-	5.4-7.6 x 3.1-4.2	Elipsoides a cilíndricas	0.61 mm/día a 25°C
Es-Iz	205Rma-06pe	Café oscuro	Polvoriento en el centro y sebáceo en el margen	Sumergido, sebáceo	Polvoriento en el centro y sebáceo en el margen	1.8-2.9	-	4.8-7.5 x 2.5-4.2	Elipsoides a cilíndricas	4.55 mm/día a 25°C
Sq-UR	105Rma-04ph	Blanco cremoso a amarillo pálido	Algodonosa	Crecimiento radial	Esparcido, abundante con mechones algodonosos esparcidos	4.0-6.6	-	-	Largas en forma de barril, ampliamente unidas	9 mm/día a 25°C
Sq-UR	105Rma-03ph	Blanco cremoso a amarillo pálido	Algodonosa	Crecimiento radial	Esparcido, abundante con mechones algodonosos esparcidos	4.0-6.6	-	-	Largas en forma de barril, ampliamente unidas	7.6 mm/día a 25°C

Es= *Epidendrum satmfordianum*, Sq= *Stelis quadrifida*, Ec= *Erycina crista-galli*, Tu = Tuzantàn, Iz = Izapa, UR = Unión Roja, SD = Santo Domingo.

Anexo 1b. Características morfológicas de los aislados de hongos micorrízicos de orquídeas epifitas de Chiapas.

Orquídea-Localidad	Aislado	Colonia en PDA			Micelio aéreo en PDA			Células monilioides		Tasa de Crecimiento
		Color	Apariencia	Margen	Apariencia	Diámetro de la hifa (µm)	Condición nuclear	Dimensiones (µm)	Forma	
Sq-UR	105Rm-02ph	Blanco cremoso a amarillo pálido	Crecimiento extendido sobre el medio	Sin margen definido	Escaso con pocos mechones blanco algodonoso	3.0-6.6	-	-	Largas en forma de barril, ampliamente unidas	1.7 cm después de 56 días a 34°C
Sq-UR	105Rj-01ph-1	Blanco	Algodonosa	Crecimiento radial irregular	Algodonosa	-	-	-	Micelio estéril	1.0 mm/día a 25°C
Sq-UR	105Rj-02ph-3	-	-	-	-	4.8-7.0	-	-	Micelio estéril	1.6 cm después de 56 días a 34°C
Sq-UR	105Rm-01cp	Gris oscuro	Sebáceo	Sumergido, sebáceo, costroso, borde irregular	Sebáceo	3.2-3.5	-	-	Micelio estéril	1.62 mm/día a 25°C
Sq-UR	JCB105Rj-02ph	-	-	-	-	-	-	-	Micelio estéril	1.75 cm después de 56 días a 34°C
Sq-UR	JCB105Rm-01ph	Café oscuro en el margen y gris oscuro en el centro	sebáceo	Sumergidos, costroso e irregular	Sebáceo	1.8-3.2	-	-	Globosas a subglobosas	
Sq-UR	JCB105Rm-02cp	-	-	-	-	-	-	-	-	

Es= *Epidendrum satmfordianum*, Sq= *Stelis quadrifida*, Ec= *Erycina crista-galli*, Tu = Tuzantàn, Iz = Izapa, UR = Unión Roja, SD = Santo Domingo.

Anexo 1c. Características morfológicas de los aislados de hongos micorrízicos de orquídeas epifitas de Chiapas.

Orquídea-Localidad	Aislado	Colonia en PDA			Micelio aéreo en PDA			Células monilioides		Tasa de Crecimiento
		Color	Apariencia	Margen	Apariencia	Diámetro de la hifa (µm)	Condición nuclear	Dimensiones (µm)	Forma	
Sq-Iz	JCB203Rm-01ph	Blanco cremoso	-	Plano, en crecimiento superficial	Escaso con pocos mechones blanco algodonosos	-	-	-	Largas en forma de barril, ampliamente unidas con prominente septo	1.77 cm después de 56 días a 34°C
Sq-Iz	JCB203Rm-01pe	Café oscuro	sebáceo	Sebáceo, sumergido y costroso	Sebáceo	3.1-3.5	-	6.5-11 x 5-7	Abundantes, globosas a oblongas (alongadas). En cadena simple de mas de 20 células	0.18 mm/día a 25°C
Sq-Iz	JCB203Rma-01ph	-	-	-	-	-	-	-	Micelio estéril	1.14 cm después de 56 días a 34°C
Sq-Iz	JCB203Rma-01ph-1	Blanco cremoso	-	Crecimiento superficial	Escaso	-	-	-	Micelio estéril	1.15 cm después de 56 días a 34°C
Sq-Iz	JCB203Rm-03pe	Café oscuro en el margen y gris claro a oscuro en el centro	Sebáceo	Márgenes sebáceos sumergidos. Costroso	Sebáceo	3.0-3.5	-	6.6-10 x 5-7.5	Abundantes, Subglobosas a elipsoides. En cadena simple de más de 20 células	0.09 mm/día a 25°C
Sq-Iz	JCB203Rma-01pe	Café oscuro	Sebáceo	Sumergido, sebáceo, abrupto e irregular	Escaso, sebáceo	1.8-3.2	binucleado	4.8-9.6 x 3.4-10.2	Globosas a oblongas (elongadas)	

Es= *Epidendrum satmfordianum*, Sq= *Stelis quadrifida*, Ec= *Erycina crista-galli*, Tu = Tuzantàn, Iz = Izapa, UR = Unión Roja, SD = Santo Domingo.

Anexo 1d. Características morfológicas de los aislados de hongos micorrízicos de orquídeas epifitas de Chiapas.

Orquídea-Localidad	Aislado	Colonia en PDA			Micelio aéreo en PDA			Células monilioides		Tasa de Crecimiento
		Color	Apariencia	Margen	Apariencia	Diámetro de la hifa (µm)	Condición nuclear	Dimensiones (µm)	Forma	
Sq-Iz	JCB203Rm-01ph-1	-	-	-	-	-	-	-	Micelio estéril	-
Sq-Iz	JCB204Rma-01pe	Gris oscuro a café oscuro	Plano, sebáceo	Sumergido sebáceo, abrupto e irregular	Escaso, sebáceo	2-4	-	4.2-6.6 x 3.1-3.6	Subglobosas, ampliamente elipsoides a elongadas	0.75 mm/día a 25°C
Sq-Iz	JCB204Rma-02pe	Creimoso	Crecimiento	Crece sobre la superficie	ausente	-	-	-	Presenta enrollamientos hifales	1.2 cm después de 56 días a 34°C
Ec-SD	JCB213Rj-02ph	Café oscuro	Plano, sebáceo	Sumergido	Plana	3-3.84	-	-	Monilioides escasas	1.0 cm después de 56 días a 34°C
Ec-SD	JCB213Rj-01ph	Café oscuro	Plano, sebáceo	Sumergido	Plana	3-3.8	-	-	Monilioides escasas	0.88 cm después de 56 días a 34°C
Ec-UR	JCB215Rm-02ph	Blanco cremoso	Algodonosa tipo fieltro	Aéreo	Algodonosa tipo fieltro	3.6-5.0	binucleadas	4.2-9.6 x 4.8-8.16	Globosas a ampliamente elipsoide. Escasas	1.87 mm/día a 25°C
Ec-UR	JCB215Rm-01ph	Blanco cremoso a gris oscuro	Algodonoso	Aéreo	Algodonosa con múltiples esclerocios oscuros	1.56-4.0	-	-	Micelio estéril	2.37 mm/día a 25°C
Ec-UR	JCB216Rma-01ph-1	Blanco cremoso	Algodonoso tipo fieltro	Aéreo	Algodonoso tipo fieltro	4.0-7.2	-	-	Enrollamientos hifales	3.17 mm/día a 25°C
Ec-UR	JCB216Rma-02ph-2	Amarillo pálido a blanco cremoso	Algodonoso tipo fieltro	Aéreo	Algodonoso tipo fieltro	4.0-7.2	-	-	Micelio estéril	2.9 mm/día a 25°C
Ec-UR	JCB216Rma-02ph	Blanco cremoso	Algodonoso tipo fieltro	Aéreo	Algodonoso tipo fieltro	4.0-7.2	-	-	Micelio estéril	4.2 mm/día a 25°C

Es= *Epidendrum satmfordianum*, Sq= *Stelis quadrifida*, Ec= *Erycina crista-galli*, Tu = Tuzantàn, Iz = Izapa, UR = Unión Roja, SD = Santo Domingo.

Anexo 2a. Micario de hongos micorrízicos aislados de orquídeas epifitas del Sureste de Chiapas

Clave Preparación	Clave Personal	Orquídea	Sitio de colecta	UTM	Fecha de Elaboración	Montaje Tinción	Observaciones
MCCMQme0102	JCB105Rj-02ph-3	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	23-May-06	Tripan-PVLG	micelio fúngico: estéril
MCCMQme0103	JCB105Rm-01cp	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	25-Nov-05	Tripan-PVLG	micelio fúngico: moniloides
MCCMQme0104	JCB105Rm-01cp	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	25-Ene-06	Tripan-PVLG	micelio fúngico: moniloides
MCCMQme0105	JCB105Rj-02ph	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	25-Ene-06	Tripan-PVLG	micelio fúngico: estéril
MCCMQme0106	JCB105Rj-02ph	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	23-May-06	Tripan-PVLG	micelio fúngico: estéril
MCCMQme0107	JCB105Rm-01ph	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	25-Nov-05	Tripan-PVLG	micelio fúngico: moniloides
MCCMQme0108	JCB105Rm-01ph	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	25-Ene-06	Tripan-PVLG	micelio fúngico: moniloides
MCCMQme0109	JCB105Rm-01ph	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	23-May-06	Tripan-PVLG	micelio fúngico: moniloides
MCCMQme0110	JCB105Rm-01ph	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	23-May-06	Tripan-PVLG	micelio fúngico: moniloides
MCCMQme0111	JCB105Rm-02cp	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	25-Ene-06	Tripan-PVLG	micelio fúngico: estéril
MCCMQme0112	JCB105Rm-02cp	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	23-May-06	Tripan-PVLG	micelio fúngico: estéril
MCCMQme0113	JCB203Rm-01ph	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	25-Nov-05	Tripan-PVLG	micelio fúngico: moniloides
MCCMQme0115	JCB203Rm-01ph	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	23/05/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: moniloides

Anexo 2b. Micario de hongos género forma-*Rhizoctonia* aislados de orquídeas epifitas del Sureste de Chiapas

Clave Preparación	Clave Personal	Orquídea	Sitio de colecta	UTM	Fecha de Elaboración	Montaje Tinción	Observaciones
MCCMQme0116	JCB203Rm-01pe	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	09/11/2005	Tripan-PVLG	micelio fúngico: monilioides
MCCMQme0117	JCB203Rm-01pe	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	25/01/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: monilioides
MCCMQme0118	JCB203Rm-01pe	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	23/05/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: monilioides
MCCMQme0119	JCB203Rma-01ph	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	25/11/2005	Tripan-PVLG	micelio fúngico: estéril
MCCMQme0120	JCB203Rma-01ph	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	23/05/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: estéril
MCCMQme0121	JCB203Rma-01ph-1	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	25/11/2005	Tripan-PVLG	micelio fúngico: estéril
MCCMQme0122	JCB203Rma-01ph-1	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	25/01/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: estéril
MCCMQme0123	JCB203Rma-01ph-1	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	23/05/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: estéril
MCCMQme0124	JCB203Rm-03pe	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	25/11/2005	Tripan-PVLG	micelio fúngico: monilioides
MCCMQme0125	JCB203Rm-03pe	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	25/01/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: monilioides
MCCMQme0126	JCB203Rm-03pe	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	23/05/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: monilioides
MCCMQme0127	JCB203Rma-01pe	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	09/11/2005	Tripan-PVLG	micelio fúngico: monilioides
MCCMQme0128	JCB203Rma-01pe	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	25/01/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: monilioides

Anexo 2c. Micario de hongos género forma-*Rhizoctonia* aislados de orquídeas epifitas del Sureste de Chiapas

Clave Preparación	Clave Personal	Orquídea	Sitio de colecta	UTM	Fecha de Elaboración	Montaje Tinción	Observaciones
MCCMQme0129	JCB203Rma-01pe	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	23/05/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: monilioides
MCCMQme0130	JCB203Rm-01ph	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	11/11/2005	Tripan-PVLG	micelio fúngico: estéril
MCCMQme0131	JCB203Rm-01ph	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	25/01/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: estéril
MCCMQme0132	JCB203Rm-01ph	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	25/01/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: estéril
MCCMQme0133	JCB204Rma-01pe	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	25/11/2005	Tripan-PVLG	micelio fúngico: monilioides
MCCMQme0134	JCB204Rma-01pe	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	05/12/2005	Tripan-PVLG	micelio fúngico: monilioides
MCCMQme0135	JCB204Rma-01pe	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	25/01/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: monilioides
MCCMQme0136	JCB204Rma-01pe	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	23/05/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: monilioides
MCCMQme0137	JCB204Rma-02pe	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	25/11/2005	Tripan-PVLG	micelio fúngico: estéril
MCCMQme0138	JCB204Rma-02pe	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	25/01/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: estéril
MCCMQme0139	JCB204Rma-02pe	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	23/05/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: estéril
MCCMQme0140	JCB204Rma-02pe	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	23/05/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: estéril
MCCMQme0141	JCB213Rj-02ph	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Santo Domingo, Mpio. Unión Juárez, Edo. Chiapas, México	N15°01'19.2'' W92°07'08.3''	25/11/2005	Tripan-PVLG	micelio fúngico: monilioides

Anexo 2d. Micario de hongos género forma-*Rhizoctonia* aislados de orquídeas epifitas del Sureste de Chiapas

Clave Preparación	Clave Personal	Orquídea	Sitio de colecta	UTM	Fecha de Elaboración	Montaje Tinción	Observaciones
MCCMQme0142	JCB213Rj-02ph	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Santo Domingo, Mpio. Unión Juárez, Edo. Chiapas, México	N15°01'19.2'' W92°07'08.3''	25/01/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: moniloides
MCCMQme0143	JCB213Rj-02ph	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Santo Domingo, Mpio. Unión Juárez, Edo. Chiapas, México	N15°01'19.2'' W92°07'08.3''	23/05/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: moniloides
MCCMQme0144	JCB213Rj-01ph	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Santo Domingo, Mpio. Unión Juárez, Edo. Chiapas, México	N15°01'19.2'' W92°07'08.3''	25/11/2005	Tripan-PVLG	micelio fúngico: moniloides
MCCMQme0145	JCB213Rj-01ph	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Santo Domingo, Mpio. Unión Juárez, Edo. Chiapas, México	N15°01'19.2'' W92°07'08.3''	25/01/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: moniloides
MCCMQme0146	JCB213Rj-01ph	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Santo Domingo, Mpio. Unión Juárez, Edo. Chiapas, México	N15°01'19.2'' W92°07'08.3''	23/05/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: moniloides
MCCMQme0147	JCB213Rj-01ph	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Santo Domingo, Mpio. Unión Juárez, Edo. Chiapas, México	N15°01'19.2'' W92°07'08.3''	23/05/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: moniloides
MCCMQme0148	JCB215Rm-02ph	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	25/11/2005	Tripan-PVLG	micelio fúngico: moniloides
MCCMQme0149	JCB215Rm-02ph	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	25/01/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: moniloides
MCCMQme0150	JCB215Rm-02ph	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	23/05/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: moniloides
MCCMQme0151	JCB215Rm-01ph	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	09/11/2005	Tripan-PVLG	micelio fúngico: moniloides

Anexo 2e. Micario de hongos micorrízicos aislados de orquídeas epifitas del Sureste de Chiapas

Clave Preparación	Clave Personal	Orquídea	Sitio de colecta	UTM	Fecha de Elaboración	Montaje Tinción	Observaciones
MCCMQme0152	JCB215Rm-01ph	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	25/01/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: monilioides
MCCMQme0153	JCB215Rm-01ph	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	23/05/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: monilioides
MCCMQme0154	JCB215Rm-01ph	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	23/05/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: monilioides
MCCMQme0155	JCB216Rma-01ph-1	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	09/11/2005	Tripan-PVLG	micelio fúngico: monilioides
MCCMQme0156	JCB216Rma-01ph-1	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	25/01/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: monilioides
MCCMQme0157	JCB216Rma-01ph-1	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	23/05/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: monilioides
MCCMQme0158	JCB216Rma-02ph-2	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	25/11/2005	Tripan-PVLG	micelio fúngico: estéril
MCCMQme0159	JCB216Rma-02ph-2	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	25/01/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: estéril
MCCMQme0160	JCB216Rma-02ph-2	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	23/05/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: estéril
MCCMQme0161	JCB216Rma-02ph	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	11/11/2005	Tripan-PVLG	micelio fúngico: estéril

Anexo 2f. Micario de hongos micorrízicos aislados de orquídeas epifitas del Sureste de Chiapas

Clave Preparación	Clave Personal	Orquídea	Sitio de colecta	UTM	Fecha de Elaboración	Montaje Tinción	Observaciones
MCCMQme0162	JCB216Rma-02ph	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	25/11/2005	Tripan-PVLG	micelio fúngico: estéril
MCCMQme0163	JCB216Rma-02ph	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	23/05/2006	Tripan-PVLG	micelio fúngico: estéril

Anexo 3a. Micario de secciones transversales de raíz de orquídeas epifitas del Sureste de Chiapas

Clave Preparación	Clave Personal	Orquídea	Sitio de colecta	UTM	Fecha de Elaboración	Tinción/ Montaje	Observaciones
MCCMQr80	JCB037Rma-1	<i>Epidendrum stamfordianum</i> Bateman	Jardín Botánico, Mpio. de Tuzantán, Chiapas, México	N15°06'55.3'' W92°24'47.1''	23/11/2005	Fushina-PVLG	raíz madura
MCCMQr81	JCB037Rma-2	<i>Epidendrum stamfordianum</i> Bateman	Jardín Botánico, Mpio. de Tuzantán, Chiapas, México	N15°06'55.3'' W92°24'47.1''	23/11/2005	Fushina-PVLG	raíz madura
MCCMQr82	JCB037Rma-3	<i>Epidendrum stamfordianum</i> Bateman	Jardín Botánico, Mpio. de Tuzantán, Chiapas, México	N15°06'55.3'' W92°24'47.1''	23/11/2005	Fushina-PVLG	raíz madura
MCCMQr83	JCB039Rj	<i>Epidendrum stamfordianum</i> Bateman	Jardín Botánico, Mpio. de Tuzantán, Chiapas, México	N15°06'55.3'' W92°24'47.1''	07/11/2005	Fushina-PVLG	raíz jòven
MCCMQr84	JCB039Rm-1	<i>Epidendrum stamfordianum</i> Bateman	Jardín Botánico, Mpio. de Tuzantán, Chiapas, México	N15°06'55.3'' W92°24'47.1''	07/11/2005	Fushina-PVLG	raíz mediana
MCCMQr85	JCB039Rm-2	<i>Epidendrum stamfordianum</i> Bateman	Jardín Botánico, Mpio. de Tuzantán, Chiapas, México	N15°06'55.3'' W92°24'47.1''	07/11/2005	Fushina-PVLG	raíz mediana
MCCMQr86	JCB039Rm-3	<i>Epidendrum stamfordianum</i> Bateman	Jardín Botánico, Mpio. de Tuzantán, Chiapas, México	N15°06'55.3'' W92°24'47.1''	07/11/2005	Fushina-PVLG	raíz mediana
MCCMQr87	JCB039Rma-1	<i>Epidendrum stamfordianum</i> Bateman	Jardín Botánico, Mpio. de Tuzantán, Chiapas, México	N15°06'55.3'' W92°24'47.1''	07/11/2005	Fushina-PVLG	raíz madura
MCCMQr88	JCB039Rma-2	<i>Epidendrum stamfordianum</i> Bateman	Jardín Botánico, Mpio. de Tuzantán, Chiapas, México	N15°06'55.3'' W92°24'47.1''	07/11/2005	Fushina-PVLG	raíz madura
MCCMQr89	JCB040Rma-1	<i>Epidendrum stamfordianum</i>	Jardín Botánico, Mpio. de Tuzantán, Chiapas, México	N15°06'55.3'' W92°24'47.1''	10/10/2005	Fushina-PVLG	raíz madura
MCCMQr90	JCB040Rma-2	<i>Epidendrum stamfordianum</i> Bateman	Jardín Botánico, Mpio. de Tuzantán, Chiapas, México	N15°06'55.3'' W92°24'47.1''	10/10/2005	Fushina-PVLG	raíz madura
MCCMQr91	JCB040Rma-3	<i>Epidendrum stamfordianum</i> Bateman	Jardín Botánico, Mpio. de Tuzantán, Chiapas, México	N15°06'55.3'' W92°24'47.1''	10/10/2005	Fushina-PVLG	raíz madura
MCCMQr92	JCB040Rm	<i>Epidendrum stamfordianum</i> Bateman	Jardín Botánico, Mpio. de Tuzantán, Chiapas, México	N15°06'55.3'' W92°24'47.1''	10/10/2005	Fushina-PVLG	raíz mediana

Anexo 3b. Micario de secciones transversales de raíz de orquídeas epifitas del Sureste de Chiapas

Clave Preparación	Clave Personal	Orquídea	Sitio de colecta	UTM	Fecha de Elaboración	Tinción/ Montaje	Observaciones
MCCMQr93	JCB201Rm-1	<i>Epidendrum stamfordianum</i> Bateman	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	17/11/2005	Fushina-PVLG	raíz mediana
MCCMQr94	JCB201Rm-2	<i>Epidendrum stamfordianum</i> Bateman	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	18/11/2005	Fushina-PVLG	raíz mediana
MCCMQr95	JCB203Rma	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	18/10/2005	Fushina-PVLG	raíz madura
MCCMQr96	JCB204Rma	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Izapa, Mpio. de Tuxtla Chico, Edo. Chiapas, México. INIFAP	N14°58'30'' W92°09'16.5''	24/10/2005	Fushina-PVLG	raíz madura
MCCMQr97	JCB105Rm-1	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	05/10/2005	Fushina-PVLG	raíz mediana
MCCMQr98	JCB105Rm-2	<i>Stelis quadrifida</i> (Lex.) Solano & Soto Arenas	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	05/10/2005	Fushina-PVLG	raíz mediana
MCCMQr99	JCB213Rj	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Santo Domingo, Mpio. Unión Juárez, Edo. Chiapas, México	N15°01'19.2'' W92°07'08.3''	05/10/2005	Fushina-PVLG	raíz joven
MCCMQr100	JCB213Rm	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Santo Domingo, Mpio. Unión Juárez, Edo. Chiapas, México	N15°01'19.2'' W92°07'08.3''	06/10/2005	Fushina-PVLG	raíz mediana
MCCMQr101	JCB213Rma-1	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Santo Domingo, Mpio. Unión Juárez, Edo. Chiapas, México	N15°01'19.2'' W92°07'08.3''	06/10/2005	Fushina-PVLG	raíz madura
MCCMQr102	JCB215Rma	<i>Erycina crista-galli</i> (Rchb.f.) N.H. Williams & M.W. Chase	Ejido Unión Roja, Mpio. de Cacahuatán, Edo Chiapas, México	N 15° 04'34.6'', W92°12'52.4''	10/10/2005	Fushina-PVLG	raíz madura