



UNIVERSIDAD VERACRUZANA

CENTRO DE INVESTIGACIONES TROPICALES

Caracterización morfológica y molecular de hongos micorrízicos orquideoides aislados de *Trichocentrum stramineum* (Orquidaceae) en cinco localidades de Veracruz, México.

TESIS

Para obtener el grado de

MAESTRO EN ECOLOGÍA TROPICAL

PRESENTA

Ing. A. Cuauhtémoc Edgar Rendón Lara

Directora: Dra Rebeca A. Menchaca García
Co directora: Dra Ma. Del Pilar Ortega Larrocea

XALAPA, VERACRUZ. MEX.

Marzo 2018

DECLARATORIA

El presente trabajo titulado Caracterización morfológica y molecular de hongos micorrízicos orquideoides aislados de *Trichocentrum stramineum* (Orquidaceae) en cinco localidades de Veracruz, México., como parte de estudio de maestría en el posgrado de Ecología Tropial en el Centro de Investigaciones Tropicales (CITRO) es original, siendo resultado de mi trabajo personal, el cual no he copiado de otro trabajo de investigación, ni utilizado ideas, fórmulas, así como ilustraciones diversas, sacadas de cualquier tesis, obra, artículo, memoria, etc., (en versión digital o impresa). Caso contrario, menciono de forma clara y exacta su origen o autor, tanto en el cuerpo del texto, figuras, cuadros, tablas u otros que tengan derechos de autor.

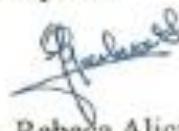
Declaro que el trabajo de investigación que pongo en consideración para evaluación no ha sido presentado anteriormente para obtener algún grado académico o título, ni ha sido publicado en sitio alguno.



Ing. Agr. Cuauhtémoc Edgar Rendón Lara

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

El presente documento titulado Caracterización morfológica y molecular de hongos micorrízicos orquideoides aislados de *Trichocentrum stramineum* (Orchidaceae) en cinco localidades de Veracruz Mexico realizado por Cuauhtémoc Edgar Rendón Lara, ha sido aprobado y aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ecología Tropical.



Tutor-Director: Dra. Rebeca Alicia Menchaca García

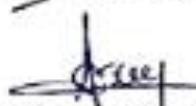


Co-tutor-Director: Dra. Ma. Del Pilar Ortega Larrocea

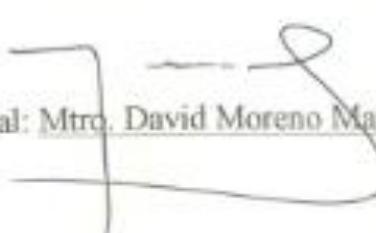
SINODALES



Presidente: Mtro. Miguel Angel Lozano Rodriguez



Secretario: Mtro. Oswaldo Javier Enciso Diaz



Vocal: Mtro. David Moreno Martinez

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis es un trabajo realizado en el Departamento de Edafología del Instituto de Geología de la *UNAM* (*Universidad Nacional Autónoma de México*) y en el orquidario del Centro de Investigaciones Tropicales (CITRO) de la Universidad Veracruzana. Contó con el financiamiento del proyecto PAPIME 108915-DGAPA-UNAM y ap proyecto Mejoramiento genético y manejo integral para el aprovechamiento sustentable de las orquídeas de México, SAGARPA.

A mis padres

Por su apoyo incondicional y amor ya que sin ellos no hubiera podido llegar hasta donde estoy ahora y poder culminar esta etapa de mi vida.

A la Dra. María del Pilar Ortega Larrocea

Por todo su apoyo y darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio Microcosmos Bioedáfico para la realización del trabajo de tesis de maestría.

A la Dra. Rebeca Menchaca García

Gracias por haber formado parte de mi formación académica y proporcionarme equipo e instalaciones de su laboratorio.

A la M. C. Iris Suárez Quijada

Por todo su apoyo en las realización de las pruebas de biología molecular y estar al pendiente de mis avances.

A Abraham Méndez

Por su ayuda en la identificación de la especie y recolecta de raíces en campo.

A Mauricio Moreno

Por ayudarme y a orientarme en la elaboración de los arboles filogeneticos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial al Instituto de Geología
por permitirme ser parte de ustedes y colaborar con un poco de investigación para el país.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres por ayudarme a ser lo que soy, un hombre de bien, cumplido y responsable con mi trabajo.

A la *Dra. Rebeca Menchaca García* por su apoyo durante la realización del posgrado en el Centro de Investigaciones Tropicales.

A la *Dra. María del Pilar Ortega Larrocea* que fue parte fundamental en la elaboración y culminación de mi trabajo de tesis.

¡Gracias!

ÍNDICE

1 Introducción	3
1.1 Marco teórico	5
1.2 Micorrizas	6
1.3 Micorrizas en la naturaleza	7
1.4 Micorrizas en orquídeas	8
1.5 El género <i>Trichocentrum</i>	19
1.6 Descripción de la especie	20
1.7 <i>Trichocentrum stramineum</i> (Bateman 1991 ex. Lindl. 1883).	20
1.8 Antecedentes	23
1.9 Justificación	25
1.10 Hipótesis	26
2 Objetivos	26
2.1 Objetivo general	26
2.2 Objetivos particulares	26
3 Materiales y métodos	27
3.1 Zona de estudio	27
3.2. Clima de la zona	29
3.3. Hidrografía	30
3.4. Geología	30
3.5. Vegetación	30
3.6. Fauna	30
3.7. Recolecta	31
3.7.1. Cuantificación de la colonización micorrízica.	31
3.8. Colonización micorrízica	32
3.9. <i>Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos micorrízicos orquideoídeos.</i>	34
3.9.1. Desinfestación de los segmentos	34
3.10. Crecimiento de hifas	35
3.11. Elaboración de micario y análisis de morfometría	37

3.12.	Subcultivo en ácido tánico	38
3.13.	Caracterización del número de núcleos con tinción DAPI	39
3.14.	Extracción y amplificación del DNA	39
3.14.1.	Recrecimiento de micelio en medio de cultivo líquido	39
3.15.	Edición de secuencias y análisis filogenéticos	41
4	Resultados	42
4.1.	Colonización micorrízica <i>in situ</i> de <i>Trichocentrum stramineum</i>	42
4.2.	Hongos micorrízicos de <i>Trichocentrum stramineum</i>	46
4.3.	Caracterización morfológica de las colonias de HMO	48
4.4.	Caracterización molecular de las colonias de HMO	54
4.5.	Caracterización molecular de los aislados	55
5.	Discusión	59
6.	Conclusiones generales	64

FIGURAS

Figura 1. Esquema que muestra el parentosoma imperforado en el género anamórfico <i>Epulorhiza</i>	16
Figura 2. Foto de <i>Trichocentrum stramineum</i>	21
Figura 3. Disección de una flor de <i>Trichocentrum stramineum</i>	23
Figura 4. Ubicación de las poblaciones de la orquídea epifita <i>Trichocentrum stramineum</i> en el estado de Veracruz, México.	23
Figura 5. Ubicación de cinco poblaciones de la orquídea epifita <i>Trichocentrum stramineum</i> recolectadas en el estado de Veracruz, México.	29
Figura 6. Aspecto de las raíces de <i>Trichocentrum stramineum</i> recolectadas en diferentes localidades del estado de Veracruz:	33
Figura 7. Cortes transversales de raíces con colonización micorrízica	34
Figura 8. Fotografías del crecimiento de hifas y subcultivo de los aislados de la orquídea epifita <i>Trichocentrum stramineum</i>	36
Figura 9. Aspecto de las colonias de hongos micorrízicos orquideoídeos aislados	37
Figura 10. Microfotografías de las hifas de los hongos micorrízicos orquideoídeos aislados	38
Figura 11. Crecimiento del anamorfo <i>Ceratorhiza</i> aislado de la orquídea epifita <i>Trichocentrum stramineum</i> creciendo sobre forofito de café.	39
Figura 12. Colonización micorrízica total de <i>Trichocentrum stramineum</i>	43
Figura 13. Plantas de la orquídea epifita <i>Trichocentrum stramineum</i> en diferentes forofitos y localidades ..	44
Figura 14. segmentos de raíces de la orquídea epifita <i>Trichocentrum stramineum</i> :	45
Figura 15. Siembras y crecimiento de hifas de la orquídea epifita <i>Trichocentrum stramineum</i>	47
Figura 16. Aislados de hongos de la orquídea epifita <i>Trichocentrum stramineum</i>	48
Figura 17. Aislados de la planta epifita <i>Trichocentrum stramineum</i>	49
Figura 18. Hifas con característica de una <i>Ceratorhiza</i> ,	49
Figura 19. Aislados del género- forma <i>Rhizoctonia</i> subcultivados en ácido tánico.....	49
Figura 20. Largo y ancho de monillias	50
Figura 21. Cuantificación de núcleos por tinción DAP	50
Figura 22. Gel de agarosa que muestra las amplificaciones por PCR	54
Figura 23. <i>Trichocentrum stramineum</i> : izquierda foto de la flor, derecha esquema de la planta. imagen tomadas de ficha técnica de <i>T. stramineum</i>	67

TABLAS

<i>Tabla 1. Plantas localizadas en diversos forofitos y en distintos estadios</i>	68
<i>Tabla 2. Largo y ancho de monilias</i>	53
<i>Tabla 3. Cuadro tasa de crecimiento y apariencia de las colonias</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
<i>Tabla 4. Cuadro característica de las hifas</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
<i>Tabla 5. Cuadro de tasa de crecimiento</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>

Resumen

Trichocentrum stramineum Lindl. es una orquídea epífita endémica de los bosques de encino de la zona centro de Veracruz que se encuentra en peligro de extinción debido a la destrucción de su hábitat y la sobrerecolecta. Esta especie estuvo anteriormente clasificada en el género *Oncidium*, dentro de la subtribu Oncidiinae. No hay muchos estudios sobre su estatus micorrízico en la naturaleza y actualmente se le encuentra asociada a distintos forofitos a los que antes se tenía en su hábitat natural que es el encino. Con el objeto de saber si las poblaciones registradas que se encuentran en diferentes localidades del estado de Veracruz tienen alguna asociación particular con sus hongos micorrízicos y los forofitos con los donde crecen, se realizó un muestreo de raíces en cinco localidades con distinto grado de perturbación y en cinco forofitos distintos así como en suelo. Se realizó el aislamiento de los hongos micorrízicos y su caracterización molecular. La colonización micorrízica *in situ* fue heterogénea, menor al 30 % en todos los casos y no dependió ni de la especie de forofito ni del tamaño de las raíces. No se encontró un patrón de colonización en el córtex y ésta fue predominantemente situada en la base de las raíces en la región proximal al pseudobulbo. Se pudieron obtener aislados de cada forofito e inclusive de protocormos germinados *in situ*. La identidad molecular de los aislados obtenida a partir de sus secuencias, corroboró que las especies pertenecen al teleomorfo *Ceratobasidium*, algunas de ellas aisladas de especies filogenéticamente relacionadas en la misma tribu Oncidinae. Es posible que la colonización de nuevos forofitos se vea favorecida debido a su especificidad micorrízica con clados dentro de la familia Ceratobasidiaceae y esto le permita abarcar nuevos hábitats con cierto grado de disturbio en donde no se encontraba anteriormente.

Palabras clave: Ceratobasidiaceae, *Ceratobasidium*, *Oncidium*, epífita, colonización micorrízica.

1 Introducción

El surgimiento de la familia Orchidaceae se remonta desde hace aproximadamente 100 a 110 millones de años donde se postula que desde su inicio se dieron interacciones simbióticas entre ellas y otros organismos de diferentes especies como parte de su adecuación (González-Tamayo, 2006). Esta familia es la más grande y diversa del Reino Vegetal, con aproximadamente 30 000 especies registradas en el mundo entre especies epifitas, terrestres y litofíticas (Cronquist, 1981; Dressler, 1993, Dressler, 2005). Las orquídeas son una de las plantas más hermosas del mundo y por tanto una de las que presentan mayor amenaza a nivel mundial.

En México, podemos encontrar una gran variedad de especies de orquídeas (destacando las epifitas) esto debido al tipo de clima y vegetación que se encuentra en México, siendo un país mega diverso con altos niveles de recambio entre especies (Halffter y Moreno 2005; Rodríguez *et al.*, 2003), condiciones ambientales y microambientes aumentando así la variedad de hábitats (Rzendowski, 1978; Sarukhán *et al.*, 1996; Vovides 1981). En el país se han descrito aproximadamente 1270 especies y 170 géneros de orquídeas (Hágsater *et al.*, 2005; Soto-Arenas y Solano-Gómez, 2007), razón por la que ocupa el tercer lugar en riqueza entre las plantas mexicanas (Hágsater *et al.*, 2005). En México, la familia Orchidaceae posee el segundo lugar de las especies con mayor número de plantas en peligro de extinción (Flores-Palacios y Valencia-Díaz, 2007). Veracruz es uno de los estados con mayor diversidad biológica del país pues se calcula que más de 8 000 especies de plantas habitan en él (Krömer *et al.*, 2010) El estado de Veracruz alberga alrededor de 400 especies de orquídeas (Castañeda-Zárate *et al.*, 2012) y es poseedor de una extraordinaria vegetación que lo distingue de los demás estados de la República Mexicana ya que tiene selvas, bosques, lagos,

lagunas, etc. (Rendón-Lara, 2014). Esta gran gama es resultado de la amplia variedad de condiciones fisiográficas y climáticas por lo que México se considera centro de la evolución de la flora (Rzendorfki, 2006). Lamentablemente existen diversos factores que alteran y modifican sus ecosistemas de manera irreversible, como por ejemplo, la tala inmoderada, el tráfico de maderas preciosas y sobre todo, la manipulación de animales y plantas exóticas que son utilizados para su venta ilegal (Rendón-Lara, 2014).

Aproximadamente el 10 % de la vegetación vascular está representada por plantas epifitas marcadas en las regiones del trópico (Neto *et al.*, 2009). Los hábitats más ricos no sólo en orquídeas sino para varios grupos de plantas epifitas son los bosques de niebla que únicamente ocupan el 1 % del territorio nacional y alberga a casi la mitad de especies de orquídeas registradas para el país (Flores-Palacios y García-Franco, 2008; Solís-Montero *et al.*, 2005).

La familia Orchidaceae es una de las más amenazadas en el mundo y en el país, con un aproximado de 200 especies registradas en la lista oficial de especies protegidas (Flores-Palacios y Valencia-Díaz, 2007); en la actualidad existe una Norma Oficial Mexicana la NOM-059-SEMARNAT-ECOL-2010 desarrollada por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Esta norma identifica a las especies ya sea de animales o plantas que se encuentran en riesgo en la República Mexicana y con base a algunos criterios se clasifican de acuerdo a algunas de las categorías que las conforman (Solórzano, 2009).

La región central del estado de Veracruz, al igual que en sus alrededores, entre los que se localizan la localidad de Chavarrillo municipio de Emiliano Zapata, Las Juntas situada en el municipio de Teocelo, el Campanario en el municipio de Tlaltetela, el Espinal en el municipio de Naolinco y Coatepec, han estado sujetos a diferentes regímenes de disturbio, lo que originó que se haya perdido un 85% de la vegetación original; este caso incluye a la selva mediana subperennifolia, selva baja caducifolia y encinar tropical considerada previamente el tipo de vegetación más abundante del estado (Bojorges-Baños y López-Mata, 2005). Por lo que es

importante proteger las áreas que aún se encuentran y restaurar los ecosistemas que lamentablemente están en peligro de desaparecer (Krömer, 2010).

Los recursos naturales en los municipios de Emiliano Zapata, Tlaltetela, Naolinco, Coatepec y Teocelo son apreciados por su exuberancia, belleza escénica y grado de conservación, ya que el 40% de la superficie aún conserva fragmentos de vegetación natural (Contreras *et al.*, 2008). No obstante la amenaza principal es el cambio de uso de suelo, el impacto de crecimiento urbano de la ciudad de Xalapa, alrededores y el abandono de las ciudades agropecuarias (Castro *et al.*, 2010).

1.1. Marco teórico

En México se reconocen actualmente más de 1 200 especies y subespecies de orquídeas. Las orquídeas se ubican en todo en altitudes que pueden rebasar hasta los 3 500 msnm (Espejo y López-Ferrari, 1998; Hágster *et al.*, 2005; Soto-Arenas, 1998). Una de las características más interesantes de esta familia es su alta proporción de especies endémicas. Se han registrado 444 especies o subespecies que corresponden aproximadamente al 40% de la taxa total en el país (Espejo *et al.*, 2002). Lo anterior convierte a la familia Orchidaceae en una de las más ricas en endemismos entre los países de América tropical. Sin embargo, la alteración y destrucción del hábitat, así como la extracción ilegal de orquídeas silvestres para su comercio, hace que varias especies de orquídeas estén consideradas en peligro de extinción (Hágster *et al.*, 2005). En los dos últimos siglos se han extinguido varias especies de orquídeas en México y a partir de 1998 han desaparecido al menos 22 (Hágster *et al.*, 2005).

La Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010 incluye a la familia Orchidaceae como amenazadas y en peligro de extinción (SEMARNAT, 2010). Por otro lado, las orquídeas presentan problemas serios para su propagación en forma natural

debido a que la mayor parte de las semillas están escasamente diferenciadas por lo que no se les distinguen los cotiledones ni las radículas y carecen de endospermo (Pierik, 1990). Tradicionalmente, las orquídeas se han propagado asexualmente mediante división de plantas. Sin embargo, se ha demostrado que es posible obtener un gran número de plantas a partir de la germinación de semillas utilizando métodos de cultivo *in vitro* (Arditti, 1993). Diversos factores se han estudiado en la industria para la propagación de las orquídeas, entre ellos el uso mínimo de medios de cultivo, adición de fitohormonas y otros aditivos como peptona, carbón activado, puré de plátano, entre otros (Dhamankar, 1992; Góes-Junghams *et al.*, 2009; Ouyang *et al.*, 2006; Pierik, 1990; Prakash *et al.*, 2004; Tiz-Arias, 2010). Sin embargo, muchos protocolos no han podido ser exitosamente aplicados en algunas orquídeas por lo que el cultivo con organismos asociados a ellas en la naturaleza como las micorrizas, puede representar una alternativa prometedora.

1.2. *Micorrizas*

El término micorriza se refiere a la relación simbiótica entre un tipo de hongo y las raíces de una planta vascular. En la mayoría de las asociaciones micorrízicas con plantas que no son orquídeas, el hongo que coloniza la raíz se beneficia con los productos de la fotosíntesis mientras que la planta incrementa la absorción de agua y nutrientes, principalmente fósforo (Smith y Read, 2008). En las orquídeas, este beneficio se da de manera inversa, es decir, las plantas se benefician digiriendo el hongo y aprovechando sus productos obtenidos, principalmente una fuente de carbono adicional a la fotosíntesis en plantas adultas (Smith y Red, 2008, Rasmussen, 2009).

De acuerdo con la localización de las hifas con respecto a las células, las micorrizas se clasifican en ectomicorrizas y endomicorrizas. Existen dos tipos de endomicorrizas, el grupo más común se distingue por presentar hifas aseptadas,

vesículas y estructuras ramificadas que le confieren el nombre de micorrizas vesícula-arbusculares. Estos hongos son probablemente taxones primitivos relacionados en el phylum Glomeromycota. Aproximadamente 90% de las dicotiledóneas y la mayoría de las monocotiledóneas presentan este tipo de micorriza (Currah, 1991).

El segundo grupo está constituido por hongos con hifas septadas que invaden las células de la raíz sin romper la membrana plasmática y crecen dentro de la célula formando estructuras globosas conocidas como pelotones (Richardson *et al.*, 1993). Este tipo de micorriza es menos común y se encuentra solamente en las familias Ericaceae y Orchidaceae (Hadley, 1982). Los cultivos puros aislados de orquídeas han permitido identificar hongos basidiomicetes casi todos miembros del complejo *Rhizoctonia*.

1.3 *Micorrizas en la naturaleza*

Existen en la naturaleza organismos que se benefician de manera mutua al vivir juntos, esta asociación se denomina simbiosis. Dentro de estas simbiosis están catalogadas las micorrizas, término que procede del griego *mykes* que significa hongo y del latín *rhiza* que significa raíz. Las micorrizas fueron descritas por vez primera por el botánico Alemán Albert Bernard Frank en 1885 (Frank, 2005). En esa simbiosis las micorrizas obtienen hidratos de carbono y las plantas obtienen minerales, agua, entre otras (Travieso, 2012). Otra de las cualidades de esta asociación es la absorción de nutrientes y elementos disponibles en la naturaleza de los cuales es careciente la planta y de esta manera dar azúcares y refugio al hongo para evitar ser invadidas por agentes patógenos (Rasmussen, 1995). Una de las ventajas de que las raíces de las orquídeas estén micorrizadas es que aumenta su superficie de absorción, asimilando agua y minerales beneficiando con ello, como se mencionó, su nutrición mineral y balance hídrico (Smith y Read, 2008).

Se postula que las micorrizas tuvieron un papel importante en la colonización de las plantas al medio terrestre, ya que hace miles de años los suelos carecían de nutrientes por lo que se dice que los hongos pudieron haber convertido el amonio en nitratos y de cierta manera facilitar la absorción de elementos como el fósforo (Zettler *et al.*, 2005; 2013). Este proceso ecológico evolutivo se caracteriza por la interacción de las hifas y las raíces secundarias de plantas en la cual conforman estructuras a través de las cuales se realiza un intercambio de nutrientes, agua y reguladores de crecimiento.

En otras palabras, las hifas actúan como una extensión de la raíz aumentando la superficie de absorción (Antonio-Andrade, 2010). Por tanto, la micorriza no es sólo el hongo si no que es un proceso importante el cual conforma una estructura que permite el cambio mutuo mediante la interacción de unas estructuras especializadas de, al menos, dos individuos. Sin embargo, existen diferentes niveles de beneficios, uno de ellas es de beneficio doble (+,+) donde ambos simbiontes se ven beneficiados, el beneficio individual (+,-) esto representa que para alguno de ellos esta interacción representa más un “costo” que un “beneficio” (Antonio-Andrade, 2010). Entre este último, posiblemente se encuentren las micorrizas que forman simbiosis con las orquídeas dado que los beneficios hacia los hongos no han sido establecidos ecológicamente (Brundrett, 2002; Bayman y Otero, 2006; Otero *et al.*, 2002, 2004, 2005, 2007).

1.4 Micorrizas en orquídeas

Los Hongos Micorrízicos Orquideoides (HMO) son en extremo importantes para la germinación y desarrollo óptimo de las orquídeas. En el mundo, las orquídeas que predominan son las epifitas con más de un 80% del total de las especies

sobreviviendo en ramas y cortezas de árboles exponiendo sus raíces al aire (Atwood, 1986). Este subgrupo de endomicorizas se describió hace más de 100 años y como se mencionó en esta simbiosis particular, se observa a los hongos que invaginan las células corticales de la raíz y forman estructuras llamadas pelotones, se diferencia de las demás endomicorizas ya que sólo se forma con la familia de las orquídeas y está conformada por hongos del grupo Basidiomycota. Los pelotones se consideran como la característica más distintiva de las micorizas orquideoides, son digeridos por la planta de una manera controlada, esto permite que los hidratos de carbono atados dentro de las hifas, se liberen y se absorban (Athipunyakom *et al.*, 2004).

En este tipo de asociación se cree que la planta es totalmente dependiente del hongo en su fase germinativa (Antonio-Andrade, 2010; Sturz *et al.*, 2000). Aún con ello, es probable que las semillas de orquídeas epifitas no tengan una asociación micorrízica tan obligada como en las especies terrestres (Smith y Read, 2008; Valadares *et al.*, 2012). Las orquídeas epifitas al crecer en árboles necesitan en menor medida la presencia de HMO en una etapa temprana, debido a que los sustratos que se encuentran en la copa de los árboles son más ricos en materia orgánica, teniendo más disponibilidad de nutrientes en el ecosistema (Benzing y Seeman, 1978). Principalmente los nutrientes como el NO_3 , NH_4 y PO_4 ; a diferencia de su limitación en algunos suelos (Lesica y Antibus 1990; Nadkarni y Matelson, 1991; Nadkarni *et al.*, 2002). Probablemente la colonización micorrízica en orquídeas epifitas sea menor que en las terrestres (Otero *et al.*, 2002). La adaptabilidad de las raíces aéreas de las orquídeas epifitas tiene como resultado la presencia de una rizodermis pluriestratificada, que en algunas raíces de orquídeas terrestres también se encuentra y que cumple la función de absorber, retener agua y ejercer una protección mecánica. Esta rizodermis se denomina velamen y se han distinguido diez tipos según el número de capas y el tamaño de las células que lo constituyen (Porembski y Barthlott, 1988).

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, sin embargo en la última década han aumentado los estudios relacionados con hongos micorrízicos de orquídeas epífitas tropicales (Otero y Bayman, 2009; Otero *et al.*, 2002, 2004, 2005; Pereira *et al.*, 2003b, 2005a, 2005b; Suárez *et al.*, 2006). El grupo mejor estudiado es el de las orquídeas terrestres, particularmente las especies nativas de Norteamérica (Ortega-Larrocea, 2008; Dearnaley y Le Brocque, 2006; McCormick *et al.*, 2004, 2012), Europa (Bougoure *et al.*, 2009), parte de Asia (Roy *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2010, Shimura *et al.*, 2009) y Australia (Dearnaley, 2007; Dearnaley y Le Brocque, 2006; Smith *et al.*, 2010). La mayoría de las especies de zonas templadas están siempre colonizadas con micorrizas, pero los estudios hechos con orquídeas tropicales han mostrado grandes variables de asociación (Alexander, 1987). Algunos autores han escrito que la colonización de micorrizas en zonas tropicales es esporádica o menos común que en orquídeas terrestres de zonas templadas (Hadley, 1986; Lesica y Antibus, 1990). Estos hongos son microorganismos que se encuentran en las raíces de las plantas adultas como endofitos (Bayman y Otero, 2006; Bayman *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2009) produciendo una asociación que le aporta nutrientes y de este modo ser complementada en su alimentación al recibir carbono orgánico adicional al que capturan vía fotosíntesis.

Uno de los mayores problemas en el manejo y propagación de orquídeas *in situ* radica en la escasa capacidad de germinación de sus semillas, debido a la pequeña reserva de nutrientes para el embrión, por lo que dependen de los HMO para su germinación en condiciones naturales (Durán *et al.*, 2007). Por esta razón, las semillas y plántulas de orquídeas son micotrofias obligadas, generalmente con hongos pertenecientes al género-forma *Rhizoctonia*, ya que depende del suministro de nutrientes esenciales para germinar y crecer durante las primeras etapas, mientras que las plantas adultas se pueden considerar como micotrofias facultativas, que se aprovechan de las hifas para obtener nutrientes y compuestos en el proceso de digestión de las mismas (Rivas *et al.*, 1998, Rasmussen, 2002).

El aislamiento y uso de micorrizas constituye una herramienta biológica eficaz para el mantenimiento, conservación y preservación de orquídeas, especialmente en poblaciones afectadas. En la última década han aumentado los estudios relacionados con hongos micorrízicos de orquídeas epifitas tropicales (Otero y Bayman, 2009). Las raíces o rizoides de las plantas adultas generalmente están colonizadas por HMO que se reconocen taxonómicamente dentro del género-forma *Rhizoctonia*. Dado que muchos de los hongos que forman este grupo artificial son parásitos de muchos cultivos agronómicos pero no así con las orquídeas, se ha postulado que la estabilidad simbiótica está dada por el balance en la producción de fitoalexinas y la inactivación patogénica del hongo (Noval *et al.*, 1999, Rasmussen, 2002).

Las asociaciones con los HMO son determinantes para el desarrollo óptimo de las semillas de las orquídeas en el proceso de la germinación para formar estadios previos a las plántulas denominados protocormos. La asociación se prolonga en la mayoría de los casos en todo el desarrollo general de la planta, hasta la floración y fructificación (Guerrero *et al.*, 1992). Algunas orquídeas dependen completamente de la nutrición proporcionada por los hongos endomicorrízicos como las aclarofílicas, denominadas plantas micoheterótrofas.

La gran mayoría de las plantas que crecen en la naturaleza se propagan asociándose con otros organismos los cuales algunos de ellos se encuentran colonizando algunos de sus tejidos de manera interna por lo que son considerados endófitos. Por tanto, una de las técnicas de propagación es usar hongos micorrízicos para llevar a cabo la germinación simbiótica y generar plántulas vigorosas con una mayor posibilidad de sobrevivir en condiciones naturales al ser reintroducidas a su hábitat (Ortega-Larrocea, 2008; Otero *et al.*, 2013). La inoculación micorrízica produce cambios notorios en la absorción y traslación de N, P, K, S y Mg, entre otros (Otero *et al.*, 2013). Para esto, se debe previamente

conocer la condición micorrízica de las plantas en la naturaleza, con la finalidad de poder aislar hongos micorrízicos que puedan promover la germinación.

Es importante conocer la identidad taxonómica de las especies que forman asociaciones micorrízicas con orquídeas, ya que no todas las especies de orquídeas pueden ser micorrizadas por estos hongos. Hasta mediados de 1980, la clasificación estuvo basada en caracteres morfológicos, bioquímicos, número de núcleos por célula vegetativa, patogenicidad y anastomosis hifal, este último era el método más utilizado hasta los años 70 (Parmerter, 1970; Parmerter *et al.*, 1967). El microscopio electrónico de barrido también se ha utilizado para observar los detalles estructurales de las hifas y del aparato septal (Andersen, 1996; Moore, 1996). Sin embargo, la carencia de caracteres morfológicos específicos trajo como consecuencia la identificación dentro de los hongos formadores del complejo *Rhizoctonia* spp. de una serie de aislamientos no relacionados filogenéticamente o taxonómicamente entre sí (Moore, 1987; Parmerter y Whitney, 1970). Las técnicas para la identificación de taxones similares a *Rhizoctonia* se han basado en estudios de las hifas vegetativas. Varios resultados experimentales han mostrado que, aunque los estudios basados en la morfología y características culturales del micelio son útiles para realizar una caracterización preliminar, es necesaria la incorporación de otros caracteres (Sneh *et al.*, 1991). A pesar de que se emplean nuevos métodos y técnicas en los análisis taxonómicos fúngicos, la clasificación de especies de *Rhizoctonia* se considera aún en desarrollo. Una limitante lo constituye el hecho de que la mayoría de los estudios se efectúan en cultivos *in vitro*, en los cuales las estructuras sexuales no suelen observarse. El análisis de la fase sexual constituye una valiosa herramienta para esclarecer y correlacionar la taxonomía de este grupo; pero son muy pocas las ocasiones en que se ha logrado la inducción del estado perfecto bajo condiciones de laboratorio (González *et al.*, 2002; Ogoshi *et al.*, 1983). Los enfoques recientes para caracterizar los distintos aislamientos incorporan caracteres que se obtienen a través de técnicas moleculares como amplificación de DNA y polimorfismo de la longitud de los

fragmentos de restricción y la secuenciación directa de genes (Carling y Kuninaga, 1990; Vilgalys y González, 1990).

Rhizoctonia es un grupo heterogéneo de hongos filamentosos que no producen esporas asexuales y comparten caracteres morfológicos generales como la formación de micelios y esclerocios de coloración parda en medios sintéticos, los organismos pertenecientes a este género están distribuidos por el mundo, muchos son patógenos de plantas de interés agrícola. Mientras que algunos tienen un comportamiento saprobio y viven en materia orgánica en descomposición, a la vez pueden establecer relaciones simbióticas con determinadas especies de orquídeas y musgos (Cubeta y Vilgalys, 2000). La identificación de especies dentro del grupo se hace difícil, ya que tienen pocos caracteres morfológicos y los rasgos fisiológicos y patogénicos varían de un organismo a otro (González, 2008). El género-forma *Rhizoctonia* corresponde a la fase asexual (anamorfo) con varios géneros incluídos (Athipunyakom *et al.*, 2004). Los aislados por lo general, presentan células largas y ramificaciones con ángulos de 90° con respecto a la hifa principal en ocasiones una estrecha constricción a nivel de la bifurcación (clamp) y posee un septo cerca a ellas.

Los aislados del género-forma *Rhizoctonia* se pueden asignar a diferentes grupos de anastomosis (perfecta, imperfecta y fusión de contacto), si los pares aislados que se examinan son capaces de crecer y fusionarse hifalmente. Se denomina anastomosis a la función de dos hifas por disolución de sus paredes con intercomunicación de sus contenidos, favoreciendo el transporte e intercambio de sustancias nutritivas. La fusión perfecta incluye, fusión de las células de las paredes y citoplasmas, generándose una continuidad en el citoplasma. La fusión imperfecta suele ser una plasmolisis o fusión de células mientras que la de contacto se origina sin lisis de las paredes únicamente una superposición (Cilliers *et al.*, 2000; Glass *et al.*, 2000; Larkin *et al.*, 1990, Mosquera *et al.*, 2010).

Según Volk y Leonard (1990) y Pilz y col. (2007), muchos aislados de *Rhizoctonia solani* y *Rhizoctonia* spp. son binucleados producen cadenas simples o

ramificadas (células monilioides); cuya longitud con respecto al radio es de 1-3:1. Estas células pueden ser hialinas o marrones y varían en su forma: lobadas, piriformes, irregulares y en forma de barril. Las células monilioides también son llamadas células en formas de barril, células cortas, clamidiosporas, células diliformes y células escleróticas. La formación de nuevas células monilioides ocurre en diferentes partes de la hifa vegetativa: surgen de brotes en los finales de las células preexistentes al producirse una constricción en los septos entre células monilioides. Sus tamaños varían de 10 x 20 a 25 x 4 μm . Las cadenas de las células monilioides pueden surgir en varios lugares, principalmente de manera extramatrical a la asociación con el hospedante en el sustrato aunque también se han encontrado de manera intramatrical en los tejidos del hospedante. Éstas estructuras pueden ser escasas y dispersas, formando masas semicompactas de diversos tamaños, que se pueden agregar formando esclerocios. Los esclerocios se componen usualmente de masas compactas de células monilioides.

El número de núcleos en las especies de HMO puede variar, siendo mononucleadas, binucleadas o multinucleadas. La mayoría de las especies (*Rhizoctonia repens*, *Epulorhiza anaticula* y *Ceratocystis* spp.), contienen dos núcleos celulares. El número de núcleos en las células viejas es bajo probablemente por la formación de septos secundarios. El número de núcleos en las células monilioides es similar al de las células hifales jóvenes. Las formas del núcleo son ovales y los nucleolos se pueden observar con claridad en un microscopio de contraste (Agrios, 2002; Carling *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2000).

Los caracteres comunes de los hongos aislados en cultivo, se caracterizan por presentar un micelio estéril incoloro, que se torna de color café claro a medida que se va envejeciendo (Currah y Zelmer, 1992). Estos estudios se logran usando medios de cultivo adecuados que no son más que combinaciones de sustancias o soluciones que permiten el crecimiento de uno o más organismos; pueden ser sólidos o líquidos, se utilizan para aislar y mantener a los microorganismos, para su estudio y conservación. Los medios líquidos se utilizan para aumentar la biomasa ya sea en condiciones estáticas o de agitación permitiendo un

crecimiento uniforme y útil para determinar sus condiciones fisiológicas (Gilchist *et al.*, 2005). Para diagnosticar a los principales grupos anamórficos aislados de las orquídeas, se usan medios inicialmente pobres en nutrientes para no favorecer el crecimiento de saprobios asociados de difícil erradicación, pasando luego a medios enriquecidos (papa dextrosa agar) donde se determinan condiciones como aspecto y velocidad de crecimiento de la colonia, coloración, etc. (Ortega-Larrocea, 2008).

Dos géneros anamórficos son los más representativos en las simbiosis micorrícas orquideoideas:

Ceratrorhiza: presenta características microscópicas de hifas alargadas, delgadas y gruesas (generalmente mayores a 4 micras) (Currah y Zelmer, 1992), de coloración café cuando maduran por la gran cantidad de compuestos orgánicos que exhudan (de ahí que pueden crecer en medios con compuestos orgánicos complejos degradándolos con sus enzimas para crecer), con células binucleadas y parentosoma perforado o anastomosis perfecta, característica del género. Generalmente crecen formando anillos concéntricos, presentan micelio aéreo abundante, su tasa de crecimiento es acelerada a comparación con las *Epulorhizas*, células monilioides alargadas en forma digitiforme.

Epulorhiza: diferentes en el aspecto de la colonia, número de nucleos y diámetro de las hifas vegetativas (Currah y Zelmer, 1992), presenta hifas generalmente delgadas menores a 4 μm y claviformes, con células monilioides de forma regular en forma de un rosario. Micelio sumergido, poco aéreo, de coloración cremosa cuando jóvenes que se oscurece cuando madura ligeramente a café, con olor a frutas, crecimiento ceroso, tasa de crecimiento lenta (Currah *et al.* 1987, 1997) y presenta septo dolipórico con parateosoma imperforado (Pereira *et al.*, 2003a) (Figura 1).

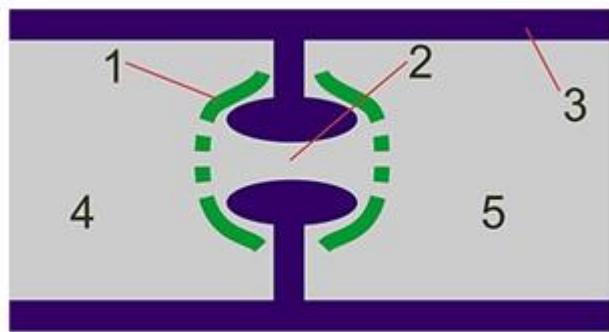


Figura 1. Esquema que muestra el parentosoma imperforado en el género anamórfico *Epulorhiza*. 1. Parentosoma. 2. Doliporo en septo que separa las dos células. 3. Pared celular. 4 y 5. Citoplasma (células de las hifas del hongo). Imagen tomada de <https://gl.wikipedia.org/wiki/Parentosoma>.

Los hongos perfectos involucrados generalmente en las micorrizas de orquídeas identificados por técnicas moleculares pertenecen a los géneros *Thanatephorus*, *Ceratobasidium*, *Sebacina* y *Tulasnella*. Cabe mencionar que también se han identificado otros géneros endofitos de orquídeas tales como: *Marasmius*, *Xerotus*, *Hymenochaete*, *Armillaria*, *Fomes*, *Favolaschia*, *Coriolus*, *Telephora* y *Tomentella* que normalmente están asociados a orquídeas micoheterotrofas y en algunas epifitas no se ha comprobado su síntesis *in vitro* (Antonio- Andrade, 2010).

La acumulación en la base de datos en las secuencias de DNA tiene un gran potencial para la identificación y clasificación de organismos (Blaxter, 2003; Herbert *et al.*, 2003) por lo que constituye una gran ventaja para mejorar la investigación ecológica y de la biodiversidad (Gregory, 2005; Savolainen *et al.*, 2005). Una aplicación importante de la identificación genética es que ayuda a determinar y asignar una clasificación a especímenes desconocidos en aquellos casos en que la morfología no es suficiente o en todo caso dudosa como en especies que presentan dimorfismo sexual. Aunado a esto, está el uso de los códigos de barras que ayudan a describir especies crípticas (Herbert *et al.*, 2004, Monaghan *et al.*, 2005, Schindel y Miller, 2005), a delimitar especies (Schindel y

Miller, 2005) y a realizar identificaciones en grandes grupos taxonómicos (Savolainen *et al.*, 2005).

Los estudios que se han realizado en hongos micorrízicos orquideoides con datos moleculares han sido obtenidos a partir de la secuenciación de raíces de orquídeas y a partir de cultivos aislados de las mismas (Pereira *et al.*, 2003b, 2005). Las regiones más usadas en análisis filogenéticos son ITS-5.8S y 28S de rDNA por considerarse regiones que aportan suficiente información para distinguir especies (Kottke *et al.*, 2010; Suárez *et al.*, 2006; Shefferson *et al.*, 2007). Estudios previos han demostrado la diversidad filogenética de los hongos asociados las orquídeas (Taylor *et al.*, 2002) y con ello, la sistemática molecular ha avanzado sustancialmente en la taxonomía de los anamorfos de *Rhizoctonia* spp. (González *et al.*, 2001). Se han tenido avances con las secuencias ITS de *Rhizoctonia solani* AGs, incluyendo las micorrizas de orquídeas australianas (Pope y Carter, 2001).

En el año 2005 (a) Pereira y colaboradores aislaron siete cepas de hongos de *Rhizoctonia* a partir de raíces neotropicales de orquídeas. Los estudios taxonómicos revelaron que los aislados pertenecieron a los géneros *Ceratrorhiza* y *Epulorrhiza*. Identificando los aislados como *Epulorrhiza repens* y *Epulorrhiza epiphytica*. El análisis Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) mostró un mayor polimorfismo entre *Epulorrhiza epiphytica* y *Epulorrhiza repens* que la encontrada con el análisis de PCR-RFLP. RAPD y análisis morfológicos indicaron un grado de relación entre los aislados de *Ceratrorhiza* obtenidos a partir de las raíces de varias especies de *Oncidium*.

Kristiansen y colaboradores en el año 2004 aplicaron un método para la identificación de micorrizas únicamente en pelotón a un grupo clave de la orquídea terrestre *Neuwiedia veratrifolia* (Orchidaceae). Amplificaron y secuenciaron el DNA de la subunidad grande del ribosoma mitocondrial de los hongos en las raíces de *N. veratrifolia*. Se analizaron las secuencias de hongos cultivados a partir de raíces *Neuwiedia* a partir de pelotón amplificando cladísticamente. Los hongos de

Neuwiedia pertenecieron a las órdenes heterobasidiomycetous, Tulasnellales y Ceratobasidiales.

Sin embargo, las relaciones filogenéticas de los hongos micorrízicos orquideoídes del trópico siguen siendo en su mayoría, desconocidas (Otero *et al.*, 2002b). Estudios realizados en orquídeas epífitas de Puerto Rico han demostrado que existen variaciones en la especificidad de las orquídeas con algunos grupos de hongos del género *Ceratobasidium* (Otero *et al.*, 2002, 2004, 2005, 2007). Otras especies andinas de Ecuador presentan asociaciones con hongos micorrízicos pertenecientes a los géneros teleomórficos *Tulasnella* y *Sebacina* (Suárez *et al.*, 2006).

En Colombia, como en el resto del mundo, se presentan mayormente los géneros *Epulorhiza* y *Cerathoriza* que son las expresiones anamorfás de los géneros *Ceratobasidium* y *Tulasnella* (Pereira *et al.*, 2003a). Mosquera y col. (2010) afirmaron que el género *Ceratobasidium* predomina como hongo micorrízico en las orquídeas del neotrópico y sugieren que además del género *Ceratobasidium*, *Epulorhiza* también tiene una gran presencia en las zonas templadas del neotrópico y de las zonas tropicales de Hong Kong (Shan *et al.*, 2002). El hecho de que especies de orquídeas de todo el mundo muestren asociaciones con los mismos grupos de HMO, se debe a un fenómeno de ubicuidad del simbionte, que localmente, tiene a su vez, procesos de adaptación y especificidad a nivel de especies moleculares (Agrios, 2002, Otero y Bayman, 2009). Por ejemplo, se han aislado hongos del Teleomorfo *Tulasnella* en especies de Pleurothallidinae (Suárez *et al.*, 2006) así como en miembros del género *Vanilla* en Puerto Rico (Porras-Alfaro y Bayman, 2007).

En estudios realizados con anterioridad en orquídeas epífitas tropicales en la subfamilia Oncidiinae, se ha demostrado que tienen tendencia a asociarse preferentemente a determinados clados de *Ceratobasidium* spp. (Otero *et al.*, 2002, 2004, 2007). Se han reportado cuatro clados distintos de *Ceratobasidium* asociados a orquídeas de esta subfamilia en plantas epífitas de Puerto Rico (Otero

et al., 2002, 2004, 2005); tres clados más en las orquídeas *Coppensia doniana* (Bateman) (correctamente denominada *Gomesa doniana* (Bateman), (Valadares *et al.*, 2012). Otro clado más, se ha registrado en *Notylia*, orquídea de la misma subfamilia pero que también está representado en *Habenaria* (Orchidinae), *Cranichis* (Cranichidinae), *Vanilla* (Vanillinae), *Epidendrum xanthinum* Lindl. (Laeliinae), *Trizeuxis falcata* Lindl. (Oncidiinae), *Maxillaria* (Maxillariinae) y *Dichaea* (Dichaeinae) (Mosquera *et al.*, 2010). Sin embargo, estos clados del género *Ceratobasidium* no son demasiado distantes, y también se encuentran relacionados con *Pterostylis* (Pterostylidinae) en las zonas templadas del sureste de Australia (Otero *et al.*, 2011).

1.5 *El género Trichocentrum*

Trichocentrum es un género de orquídeas epifitas reconocido recientemente a partir de especies antes incluidas en el género *Oncidium* (Williams *et al.*, 2001). El género *Trichocentrum*, originario de América tropical, comprende alrededor de 69 especies que se distribuyen desde las regiones tropicales de México a la América tropical.

Trichocentrum stramineum debe haber tenido una distribución casi continua en las estribaciones de la sierra del centro de Veracruz, en la zona seca y cálida que va desde el sur de Xalapa hasta cerca de Córdoba (Soto-Arenas y Solano- Goméz, 2007). Actualmente su hábitat está muy fragmentado y las poblaciones seguramente son mucho menores que antaño, pero no parece ser una orquídea tan rara como lo sugirió Dickinson en 1965. Aún existen grandes poblaciones de *T. stramineum* en el campo y la estrategia de conservación a seguir debe ser *in situ*. Los sitios señalados como refugios albergan poblaciones densas de muchos miles de individuos (Flores *et al.*, 2008; Soto-Arenas y Solano-Gómez, 2007). Actualmente se han hecho nuevos registros para las especies de *Trichocentrum*

cosymbephorum, *Trichocenrum luridum* y *Trichocentrum ascendens*, desarrollándose en nuevos forofitos en especial en *Ficus mexicana* en la región de Amecatipa, Benito Juarez, Veracruz (De la Cruz- Cristobal, 2017).

Trichocentrum stramineum es una especie con interés hortícola y es cultivada en pequeña escala. Es fácil de mantener en cultivo, en invernadero templado-cálido y no presenta problemas especiales de mantenimiento. Se recomienda su propagación a partir de semillas para frenar la comercialización de plantas extraídas del medio silvestre. Probablemente no existen en el comercio plantas propagadas de esta especie, por lo que, hasta los viveros han exportado plantas silvestres en los últimos años (Flores *et al.*, 2008).

Dado lo anterior, en esta especie, las semillas constituyen el material de propagación más adecuado para poder conservar la mayor diversidad genética posible de sus poblaciones. Las técnicas de cultivo *in vitro* pueden contribuir a propagar plantas masivamente obtenidas a partir de la germinación de semillas de cápsulas obtenidas en campo. Esta metodología se ha utilizado principalmente para especies e híbridos de interés comercial (v. gr. Arditti, 2008; Billard *et al.*, 2014); sin embargo, existen pocos trabajos donde se ha empleado con especies silvestres.

1.6 Descripción de la especie

1.7 *Trichocentrum stramineum* (Bateman 1991 ex Lindl 1883) M.W.Chase & N.H.Williams.



Figura 2. Foto de *Trichocentrum stramineum* tomada de:
<https://listadeorquideasmexicanas.blogspot.mx/2012/09/trichocentrum-stramineum.html>

La orquídea *Trichocentrum stramineum* ha sido clasificada anteriormente en *Lophiaris straminea* y *Oncidium stramineum* y se denomina comúnmente "oreja de burro blanca" (Flores *et al.*, 2008). La especie se encuentra catalogada como endémica y además en peligro de extinción. Es una planta epífita, de crecimiento simpodial, su tamaño va entre los 15 y 20 cm sin contar las inflorescencias. El nombre genérico, *Trichocentrum*, proviene del griego *thrix*, *thricós*, "pelo" o "cabello" y *kentron*, "centro", en alusión a la estructura central delgada de la flor. El nombre de la especie deriva del latín *stramineum*, entendido como color paja, aplicado a esta especie el color de las flor (Cruz-Paredes y Cruzado-Cardiel, 2009). Sobre su reproducción, no se tiene información precisa, pero observaciones en plantas cultivadas sugieren que las plantas son alógamas y que probablemente atraen a sus polinizadores por medio de glándulas secretoras, situadas en la base y el istmo del labelo. Otras especies mexicanas de *Trichocentrum* (e.g. *T. warfordiae*) son polinizadas por abejas del género *Centris* (Soto-Arenas, M. A. y Solano-Gómez, 2007). Dressler (1993) señaló que abejas hembra de *Centris* colectan aceite de los labelos de algunas especies *Oncidium* (incluyendo *Trichocentrum*), que simulan flores que ofrecen aceites (otros *Oncidium* y flores de enredaderas malpighiáceas). El "fruit set" de *T. stramineum* parece ser muy bajo aproximadamente 10 % (Arenas y Solano, 2007).

Es una hierba perenne, iterópara, epífita, con crecimiento simpodial (ANEXO 1) que posiblemente sea tolerante al disturbio y comparada con otras orquídeas puede tener ciclos de vida algo más cortos. Se distribuye en los estados de Puebla y Veracruz (Bechtel *et al.*, 1981; Wiard, 1987) en los bosques de encino, bosque cálidos de encinos con *Quercus conspersa* y *Q. Peduncularis* y sobre otras

especies latifoliadas en las regiones periurbanas así como en las selvas bajas caducifolias compuestas por *Brahea dulcis*, *Bursera simaruba*, *Casearia corymbosa*, *Comocladia engleriana*, *Diospyros veracrucis*, *D. oaxacana*, *Lysiloma demostachya*, *Pistacia mexicana*, *Plumeria rubra*, *Pseudobombax ellipticum*, entre otras especies arbóreas; encinares tropicales, a veces en acahuales de selva alta perennifolia, áreas de transición de bosque de pino-encino a encinar tropical y actualmente en cultivos de café (Bechtel *et al.*, 1981; Wiard, 1987). Se localiza en zonas de altitud medias, creciendo en ramas de encinos (*Quercus*) o izote (*Yucca*) principalmente, a menudo sobre lianas, en sitios bien iluminados pero con humedad atmosférica relativamente alta. Se le encuentra frecuentemente en cañadas, pero tal vez es porque ahora las mesetas de la zona están deforestadas (Soto- Arenas, 2007).

La especie se establece en climas cálidos subhúmedos como el de Chavarrillo, Veracruz (clima Aw1(i')gw" cálido subhúmedo, con invierno seco, canícula, isotermal y el mes más caliente antes del solsticio de verano), con temperatura media anual de 24.5 °C y la precipitación acumula 1106 mm al año. Se puede presentar en otras localidades con un clima similar o ligeramente más seco (Aw0(w)(i)gw"). Su rango altitudinal se da entre 500 y 1000 m.s.n.m.

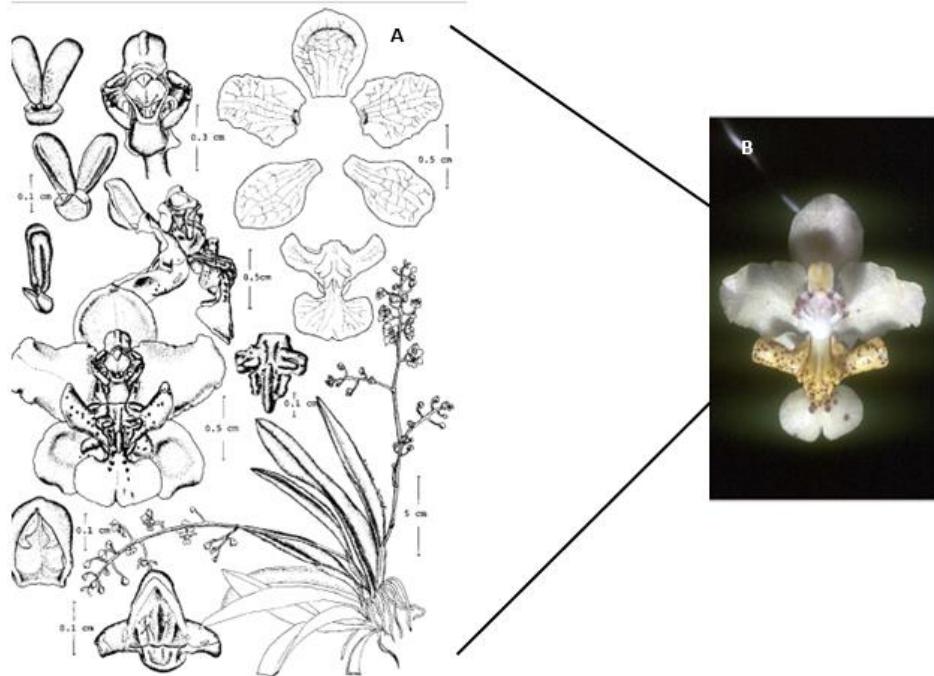


Figura 3. Dibujo de la disección de una flor de *Trichocentrum stramineum*. Foto, imagen tomada de ficha técnica de *T. stramineum*. Foto tomada de <https://drive.google.com/file/d/0B6OrT6oUtDwjX1JsYzhEaUwyWDA/edit>

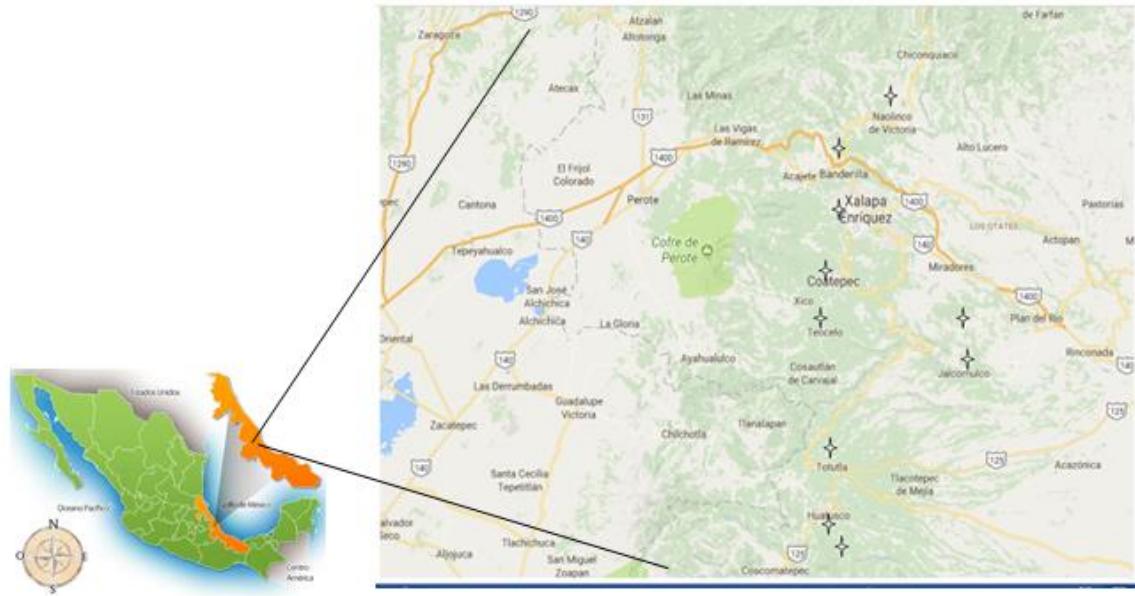


Figura 4. Ubicación (estrellas) de las poblaciones de la orquídea epífita *Trichocentrum stramineum* en el estado de Veracruz, México. Imágenes tomadas de Google maps, Rendón 2015.

1.8 Antecedentes

Existen un solo antecedente sobre el cultivo o propagación de esta especie más realizado por Flores-Escobar y colaboradores en el 2008 quienes determinaron el medio de cultivo más apropiado para la propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* (*T. stramineum*), utilizando para su desarrollo medio MS (Murashige &

Skoog) adicionado con diferentes extractos orgánicos. Los autores obtuvieron cerca del 48 % de germinación observando siete etapas fenológicas mostrando diferencias significativas en el número de brotes, longitud de hoja, número de raíces y altura de plántula. El comportamiento de las variables evaluadas en función del tiempo mostró que el medio de cultivo enriquecido con los extractos orgánicos (agua de coco, peptona y polivinil pirrolidona) influyeron de manera positiva en el desarrollo de las plántulas, mejorando el tamaño de las hojas y su altura.

Relacionado con los hongos micorrízicos, los estudios más relacionados son con especies del género *Oncidium*. Pereira y colaboradores (2005b) inocularon semillas de *Oncidium flexuosum* usando diez aislados micorrízicos, de ellos solo una cepa pertenecía a la especie y fue la única capaz de promover la germinación y el desarrollo de las semillas, mientras que las semillas incubadas en ausencia de hongo fallaron en la germinación. Montaño-Samaniego (2011) aisló hongos presentes en las raíces de la orquídea epífita *Oncidium sphacelatum* subtribu Oncidiinae y los inoculó en plántulas producidas *in vitro* con diferentes sustratos, notando que las micorrizas juegan un papel positivo durante la aclimatación. Crespo-Santander y Ortega-Guaricela (2015) aislaron hongos de *Cyrtochilum macranthum*, *Dendrobium* sp., *Epidendrum* sp. y los inocularon en *Oncidium* sp. y en *Oncidium "cucullatum"* encontrando un desarrollo del 20 al 25 % hasta el estadio cinco (elongación de la hoja verdadera y formación de la primera raíz verdadera). Chávez y colaboradores (2014) germinaron semillas de la orquídea *Comparettia falcata* (de la subtribu Oncidiinae) de forma simbiótica y asimbiótica, usando para la simbiótica dos hongos micorrízicos de dos orquídeas diferentes *Epidendrum melinanthum* Schltr y *Maxillaria* sp. y también un aislado de *Rhizoctonia solani* obtenido de arroz. Para la germinación asimbiótica emplearon medio Knudson y MS, encontraron que el mejor método asimbiótico fue el Knudson y el simbiótico con *Rhizoctonia solani*.

1.9 Justificación

Debido a que en México y en el mundo, las orquídeas son de las plantas más cotizadas en el mercado, esto ha ocasionado el saqueo de poblaciones silvestres para ser vendidas en el comercio ilegal lo que causa un daño irreversible sobre todo en aquellas especies que no son fáciles de reproducir afectando de manera importante a las especies endémicas de Veracruz, México. La mayoría de las especies endémicas de esta región, tienen tasas de reproducción *in situ* muy bajas por los pocos individuos adultos que ahí quedan. *Trichocentrum stramineum* es una especie bien conocida en horticultura, introducida en Europa desde la primera mitad del siglo XIX y ha tenido ya una merma poblacional gravísima ya que se exportaron ilegalmente muchas plantas durante el siglo XIX y aún hoy en día es recolectada para satisfacer la demanda del mercado local. Ocasionalmente aparecen plantas en los mercados de Xalapa, Córdoba y en el de Jamaica en la Cd. de México. Las zonas de distribución de *T. stramineum* no están incluidas dentro de ninguna área natural protegida quedando al parecer, al menos algunos sitios incluidos en la región prioritaria "Encinares Tropicales de Veracruz". La Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 considera esta especie en peligro y endémica de México.

Es preocupante que los protocolos para la propagación de esta especie consten de un solo estudio que se realizó de manera asimbiótica, aunado a que, no hay estudios de micorrizas asociadas a orquídeas de esta especie ni de otras cercanas a esta subtribu por lo menos en México, siendo la simbiosis fundamental para la supervivencia en campo de las orquídeas propagadas. Por tanto, se desconoce si la orquídea puede o no ser específica de sus simbiontes micorrízicos en la naturaleza. Mucho menos se sabe, si requiere o no de los hongos para realizar su germinación. Por ello, es urgente llevar a cabo estudios diagnósticos en donde se conozca su estatus micorrízico así como los simbiontes asociados a las poblaciones nativas, con el objeto de llevar a cabo protocolos de propagación

simbiótica y de la conservación de germoplasma nativo tanto de orquídeas como de hongos.

1.10 Hipótesis

Exploraciones en campo permiten constatar que la distribución de *Trichocentrum stramineum* abarca hábitats con cierto grado de disturbio en donde no se encontraba anteriormente. La colonización de nuevos forofitos puede verse favorecida debido a que su especificidad micorrízica sea muy baja y es posible adelantar que diferentes poblaciones de la especie *Trichocentrum stramineum* del estado de Veracruz, estén asociadas a clados dentro de la familia Ceratobasidiaceae como se ha reportado para varias especies de orquídeas emparentadas como *Oncidium* que se asocian naturalmente con el anamorfo *Ceratorhiza*.

2 Objetivos

2.1 OBJETIVO GENERAL

Conocer la especificidad micorrízica de cinco poblaciones de *Trichocentrum stramineum* con distinto grado de perturbación distribuidas en el estado de Veracruz, México, y los clados de HMO a los que se asocia la especie.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Cuantificar la colonización micorrízica *in situ* de *Trichocentrum stramineum* a partir de raíces de distintos forofitos y suelo.

2. Aislar y caracterizar morfológicamente los hongos micorrízicos de *Trichocentrum stramineum* a partir de raíces de distintos forofitos y suelo.
3. Identificar por medios moleculares a los hongos micorrízicos aislados para conocer su especificidad.

3 Materiales y métodos

3.1. Zona de estudio

Se seleccionaron cinco poblaciones localizadas en el estado de Veracruz en diferentes tipos de vegetación y grados de perturbación: Chavarrillo (cafetal sin manejo), El Campanario (selva baja poco perturbada), Espinal (acahual transformado de pino-encino muy perturbado), Las Juntas (selva baja) y Coatepec (bosque mesófilo sin perturbación). Todas las localidades se encuentran a una altura que va de los 700 a 1500 metros sobre el nivel del mar (Cuadro 1, figura 5).

Cuadro 1. Descripción de las localidades de estudio.

Localidad	Municipio	Ubicación o Coordenadas	Temperatura °C	Precipitación media anual mm.	Msnm
Chavarrillo	Emiliano zapata	Longitud- 96.7913 Latitud 19.4252	25.2	2779	850

La Juntas	Teocelo	Longitud- 96.8808 Latitud 19.3702	18.4	1797	840
Espinal	Naolinco	Longitud- 96.6262 Latitud 19.8726	16	1476	760
Campanario	Tlaltetela	Longitud- 96.8980 Latitud 19.3197	26	514	700
Coatepec	Coatepec	Longitud- 96.57 Latitud 19.27	21	1798	1200

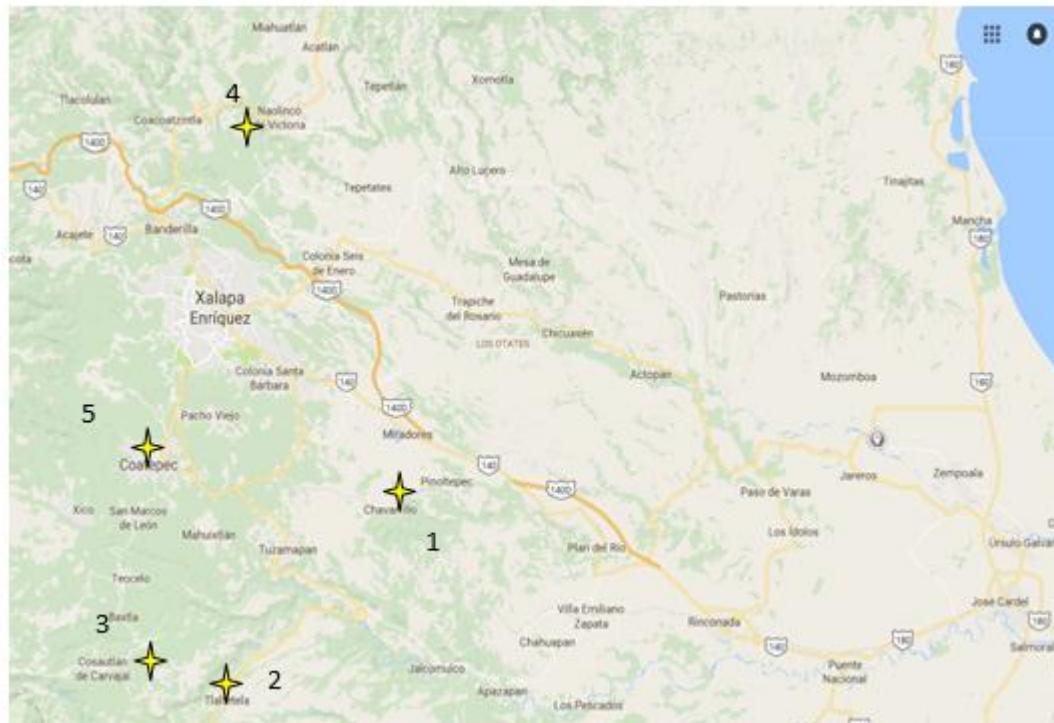


Figura 5. Ubicación de cinco poblaciones de la orquídea epífita *Trichocentrum stramineum* recolectadas en el estado de Veracruz, México, 1. Chavarrillo, 2. Tlaltetela, 3. La Juntas, 4. Espinal, 5. Coatepec. Figura modificada por Rendón 2017.

3.2. Clima de la zona

La estación climática de Rancho Viejo Municipio de Emiliano Zapata, es la estación más cercana, registra un clima cálido sub-húmedo, con vientos provenientes del sureste y una precipitación pluvial media anual de 1 041 mm. La temperatura mínima promedio es de 15.1 °C y la máxima de 24.8 °C; la época de lluvias va de junio a octubre.

3.3. *Hidrografía*

Los municipio de Coatepec, Tlaltetela y Tecelo pertenecen a la antigua y Espinal y Chavarrillo a la cuenca del río Actopan

3.4. *Geología*

Estas localidades se encuentran dentro de la provincia del eje neovolcánico transversal, subprovincia Chiconquiaco que comprende lomeríos suaves con cañadas, constituidas esencialmente por arenisca de Eoceno y rocas calizas del cretácico que se depositaron durante el mesozoico (Ruiz, 1997).

3.5. *Vegetación*

Vegetación dominante, selva baja caducifolia y subcaducifolia, sus elementos característicos en el dosel son: *Brosimum alicastrum*, *Pimenta dioica*, *Manilkara zapota*, *Alphanante monoica*, *Bursera simaruba*. El estrato medio suele estar dominado por *Alchornea latifoliada*, *Cupania spp.*, *Pimenta dioica*, *Protium copal*, *Trichilia havanensis* y *Zuelania guidonia*. Aunque las especies dominantes en este estrato varían dependiendo de las condiciones locales (Contreras *et al.*, 2008).

3.6. *Fauna*

La fauna de mamíferos incluye mapaches (*Procion lotor*), conejo (*Sylvilagus sp.*), armadillo (*Dasypus novemcinctus*), zorrillo (*Conepatus sp.*), tlacuache (*Dilechphis marcupialis*), coyote (*Canis latrans*). Entre los reptiles se pueden encontrar la víbora de cascabel (*Crotalus sp.*) y la nauyaca (*Bothrops sp.*), (Morales, 2003). El listado de aves comprende 50 familias y 267 especies, este grupo es de suma importancia en esta región debido a que se encuentra en una de las zonas migratorias más importantes del país (Contreras *et al.*, 2008).

3.7. *Recolecta*

3.7.1. Cuantificación de la colonización micorrízica.

La recolecta de las raíces de *Trichocentrum stramineum* se realizó en el periodo de lluvias y secas del año 2015-6. El muestreo se llevó a cabo recolectando diez individuos por localidad, independientemente de su fenología (plantas adultas en floración, con o sin cápsulas, etc.) dado el estado de vulnerabilidad que conservan las poblaciones. En algunas localidades, algunas plantas se encontraron en floración y muchas otras con cápsulas cerradas (Cuadro 2). De acuerdo a la localidad y grado de perturbación, las plantas fueron encontradas en los distintos forofitos. Se recolectaron tres raíces por individuo, con un total de 120 raíces en todo el muestreo (19 plantas adultas, 21 en estado juvenil y 10 protocormos). Las raíces recolectadas estuvieron adheridas al forofito en todo caso y sin aparente daño mecánico o senescencia. El corte de cada una se hizo desde la base del pseudobulbo hasta el ápice de la raíz; posteriormente fueron colocadas en papel aluminio con parte del sustrato donde crecían asociadas marcando la orientación base-ápice. Las muestras fueron recolocadas en una hielera con bloques de gel congelados para conservarlas frescas hasta su procesamiento en el laboratorio de Microcosmos Bioedáfico del Instituto de Geología de la UNAM.

Cada raíz se documentó fotográficamente *in situ* y en el laboratorio se fotografiaron nuevamente y se midieron para calcular el número de segmentos en el que se realizarían los cortes (Figura 6). Las raíces fueron lavadas con agua corriente y con ayuda de un pincel o cepillo de cerda suave, se eliminó la materia orgánica adherida.

3.8. Colonización micorrízica

De manera manual se realizaron los cortes transversales milimétricos de las raíces de dos a cuatro cm con orientación base-ápice; se procesaron en frío para mantener la viabilidad de los pelotones. Cada corte fue montado sin perder la orientación en una preparación semipermanente con el alcohol polivinílico, ácido láctico y glicerol (PVLG) y teñidas con fucsina ácida (ácido láctico y glicerol) al 0.01%. Se evaluó semi-cuantitativamente (del 0 al 100%) la colonización micorrízica de los segmentos en un microscopio óptico a 100 x (Rasmussen y Whigham, 2002) (Figura 7 A-C). Se seleccionaron aquellos segmentos que presentaron una colonización de por lo menos el 10 % y en donde los pelotones se apreciaran con la menor degradación del citoplasma. Los segmentos seleccionados se guardaron en frío hasta el aislamiento de los hongos. Posteriormente a cada segmento se le retiró manualmente el velamen con un bisturí bajo el microscopio estereoscópico dejando sólo el córtex para su desinfestación superficial.

Cuadro 2. Muestreo de raíces de la orquídea epifita *Trichocentrum stramineum* (n=10 por localidad) en Veracruz, México.

Localidad	Época de recolecta	Fenología	Forofito
			Nombre común y científico
Chavarrillo, Emiliano Zapata	Lluvias, secas	8 adultos (1 con fruto), 2 juveniles	Café (<i>Coffea arabica</i> L.)
Campanario, Tlaltetela	Lluvias, secas	6 adultos (2 en formación de escapo floral), 4 juveniles	Izote (<i>Yucca elephantipes</i>), ficus (<i>Ficus</i> sp.), suelo
La Juntas , Teocelo	Lluvias, secas	3 adultos (2 con flor), 7 juveniles	Ficus (<i>Ficus</i> sp.), suelo, encino (<i>Quercus</i> sp.), café

Espinal, Naolinco	Secas	4 adultos, 6 juveniles	Encino (<i>Quercus</i> sp.), suelo, café (<i>Coffea arabica</i> L.), limón (<i>Citrus limón</i> L.)
Coatepec	Lluvias	10 protocormos	Izote (<i>Yucca elephantipes</i>)



Figura 6. Aspecto de las raíces de *Trichocentrum stramineum* recolectadas en diferentes localidades del estado de Veracruz: A, raíces recolectadas en café en Chavarrillo; B, planta recolectada en Campanario

(ejemplar completo por la poca cantidad de raíces); C-D, raíces con parte del sustrato donde se encontró la planta. Escala 1 cm. Fotos: Rendón, 2015.

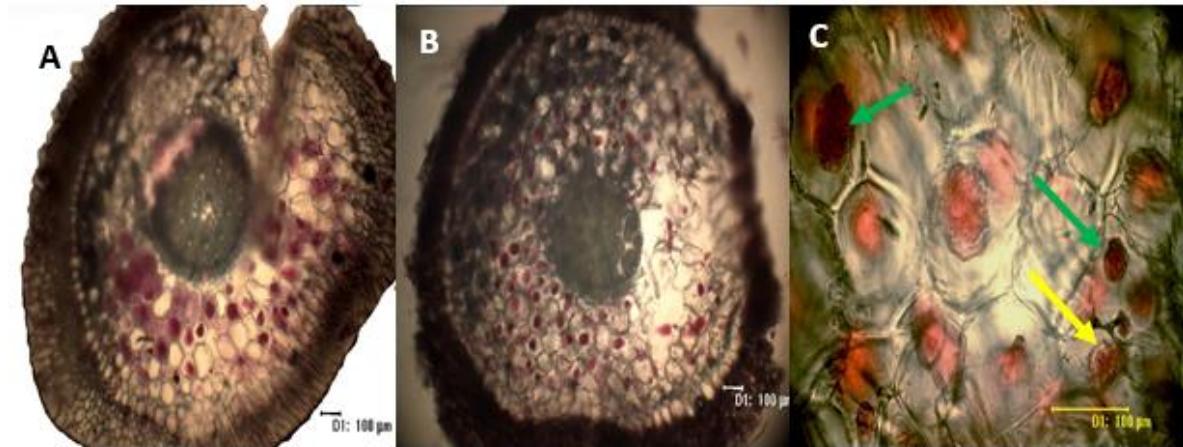


Figura 7. Cortes transversales de raíces con colonización micorrízica teñida con fucsina de la orquídea epífita *Trichocentrum stramineum* del estado de Veracruz, creciendo sobre forofito de café. A-C, segmentos cercanos a la base del pseudobulbo. Flechas amarillas indican pelotones degradados, flechas verdes, sin degradación. Fotos: Rendón, 2015.

3.9. Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos micorrízicos orquideoides.

3.9.1. Desinfestación de los segmentos

Los segmentos que presentaron colonización micorrízica fueron utilizados para el aislamiento de los HMO en condiciones asépticas en una campana de flujo laminar; este proceso se realizó a no más de 24 h después de su recolecta en campo. La desinfestación de los segmentos colonizados se hizo posterior al retiro del velamen el cual se eliminó con pinzas y bisturí sobre un bloque de gel congelado para mantener los pelotones viables. La desinfestación fue de siete minutos (concentración comercial del 5%) ya que pruebas realizadas con anterioridad demostraron que los explantes que se mantuvieron por más de ocho

minutos en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 10 % no presentaron crecimiento de hifas en la siembra en medios de aislamiento. Los segmentos se colocaron en hipoclorito de sodio en tubos Eppendorf que se agitaron con un vórtex. Esta técnica fue apropiada para todas las raíces procedentes de las plantas adultas y juveniles y tres minutos para los protocormos. Posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces. Todo el proceso se hizo en frío. Los segmentos desinfestados se colocaron en una caja de Petri estéril con unas o dos gotas de agua destilada estéril para su mejor manipulación. El aislamiento de los hogos micorrízicos se realizó por los métodos de pelotón y explante (Ortega-Larrocea, 2008).

- a) Aislamiento a partir de pelotón: El córtex de la raíz de cada segmento por separado, se despedazó con agujas de insulina bajo el microscopio estereoscópico para poder dispersar los pelotones u ovillos contenidos en las células. Se procedió a recolectar los pelotones con una punta de micropipeta estéril y se colocaron en el centro de una caja Petri con Medio de Aislamiento Fúngico (MAF) dispersándolos por toda la caja (Clements, 1988).
- b) Aislamiento a partir de explante: el segmento colonizado se colocó en una caja Petri estéril agregando unas gotas de agua estéril desgarrando el córtex en pequeños fragmentos y se sembró enterrándolo ligeramente en el medio MAF (Clements, 1988).

3.10. . Crecimiento de hifas

Las siembras se revisaron bajo el microscopio estereoscópico para determinar el crecimiento de las hifas a partir de los pelotones o explantes (esto se realizó 3 días

seguidos más) pasadas 24 h y a lo largo de 3 días consecutivos. Se seleccionaron los ápices en condiciones de esterilidad y se subcultivaron en cajas Petri chicas de 60 mm con medio de Papa Dextrosa Agar (PDA) (Moore, 1987; Andersen, 1996; Rasmussen, 1995) (Figura 8). Las colonias con apariencia de *Rhizoctonia* fueron subcultivadas a cajas de Petri estándar y registradas fotográficamente para caracterizar su apariencia (color, forma de crecimiento micelial, tasa de crecimiento) (Figura 9). Todos los medios fueron incubados en oscuridad a 25 ± 1 °C.

La tasa de crecimiento fue evaluada diariamente en el frente de crecimiento de las hifas (mm por día) en cuatro puntos de cada caja Petri. Cuando la colonia alcanzó el crecimiento completo, se determinó la forma de crecimiento y el color con ayuda de Tablas Munsell.

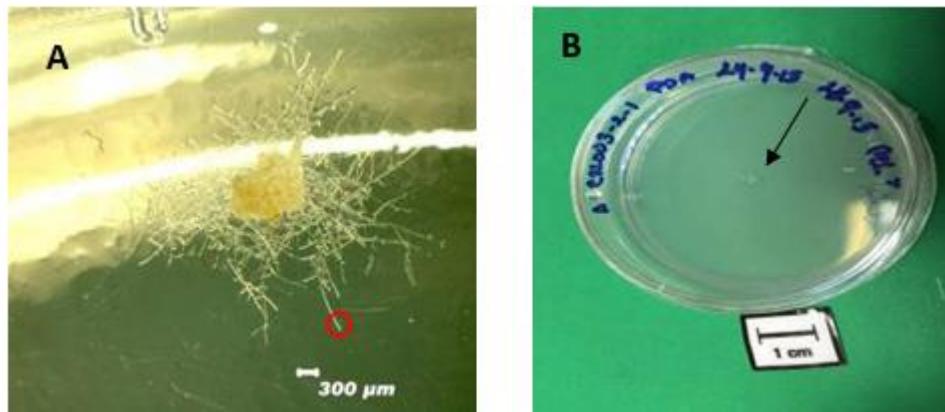


Figura 8. Fotografías del crecimiento de hifas y subcultivo de los aislados de la orquídea epífita *Trichocentrum stramineum*. A, crecimiento de hifas en medio de aislamiento a partir de explante, en el círculo rojo se indica el ápice que se subcultiva; B, subcultivo de ápice (flecha) en medio de papa detrosa. Fotos: Rendón, 2015.

3.11 . Elaboración de micario y análisis de morfometría

Para la identificación de los hongos aislados se procedió a observar en el microscopio óptico, pequeñas muestras de micelio extraídas en campana de flujo laminar con una aguja de insulina mediante raspado. El micelio colectado fue montado en alcohol polivinílico - ácido láctico – glicerol (PVLG) y teñido con fucsina ácida 0.01 % en ácido láctico + glicerol. Cada aislado fue etiquetado con un número de acceso para conservarlo en el Banco de Germoplasma de Hongos Orquideoídes del Laboratorio Microcosmos Bioedáfico del Departamento de Edafología del Instituto de Geología de la UNAM (Figura 10). El micelio de los aislados purificados fue inoculado por duplicado en tubos de ensayo que contenían 15 mL de medio PDA. El micelio se dejó crecer durante unos días en incubación a una temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y fue cubierto con aceite mineral estéril.

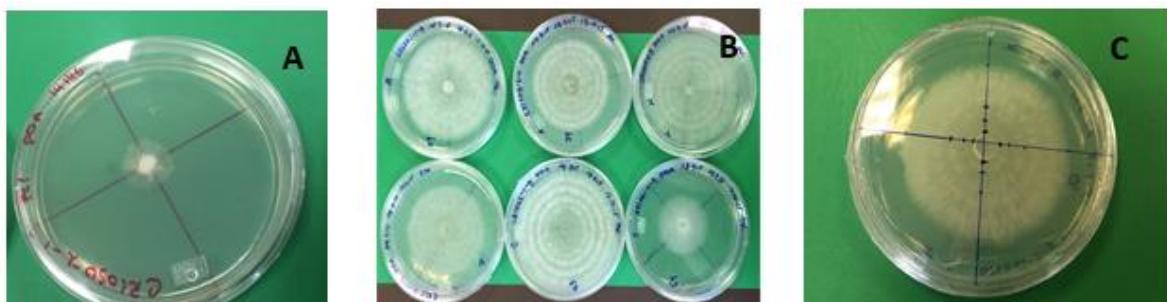


Figura 9. Aspecto de las colonias de hongos micorrízicos orquideoídes aislados de la orquídea epífita *Trichocentrum stramineum*: A, medición de la tasa de crecimiento diario (mm); B, formas de crecimiento del micelio del anamorfo *Ceratrorhiza* creciendo en medio de papa-dextrosa; C, crecimiento de la colonia a los dos días después de la siembra donde se aprecia la formación de anillos concéntricos. Fotos: Rendón, 2016.

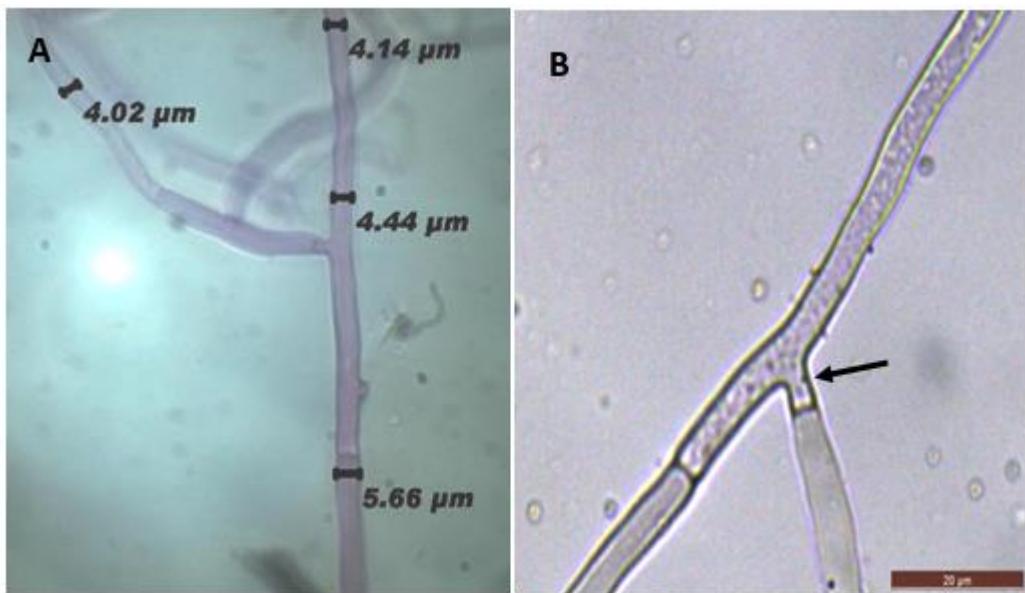


Figura 10. Microfotografías de las hifas de los hongos micorrízicos orquideoides aislados de la orquídea epífita *Trichocentrum stramineum*: A, hifas teñidas con fucsina ácida aisladas de raíces de plantas crecidas sobre forofito de café; B, hifa donde se aprecia el septo basal (flecha) aislada de una planta crecida en forofito de ficus sp. Fotos: Rendón, 2015.

3.12. Subcultivo en ácido tánico

Los aislados con características afines a *Rhizoctonia* fueron subcultivados en medio de ácido tánico para verificar si los anamorfos pertenecían a *Ceratostoma*. Las cajas se incubaron en oscuridad a 25 ± 1 °C, revisando cada tres días en la parte superior el recrecimiento de micelio y en la parte trasera de la caja un halo oscuro que representa las enzimas degradando los fenoles (Figura 11).

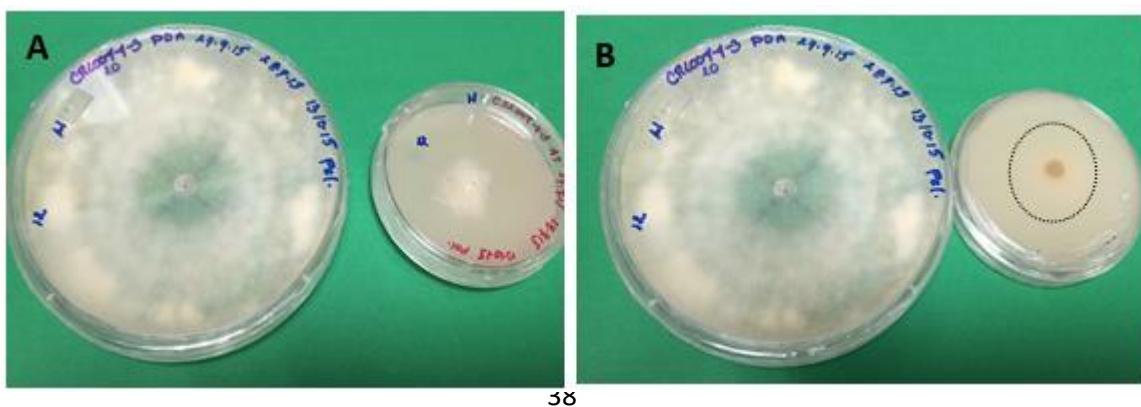


Figura 11. Crecimiento del anamorfo *Ceratohiza* aislado de la orquídea epifita *Trichocentrum stramineum* creciendo sobre forofito de café. En ambas imágenes se observa en la caja de Petri izquierda el crecimiento típico algodonosa de anillos concéntricos de este anamorfo en papa-dextrosa. En las cajas de Petri derechas, su crecimiento en medio de ácido tánico. Fotos: Rendón, 2016.

3.13. Caracterización del número de núcleos con tinción DAPI

Los HMO aislados se subcultivaron a medio líquido papa–dextrosa–broth (PDB) en tubos de ensayo y se incubaron ocho días en agitación constante a 120 rpm a 25 ± 1 °C. En campana de flujo laminar se extrajo una pequeña porción de micelio y se colocó en un tubo Eppendorf de 2 mL con agua destilada, posteriormente se agitó con un vórtex durante 30 segundos para retirar el excedente de medio líquido. Este proceso se repitió tres veces para ser disgregado el micelio en una caja Petri con agujas de insulina y un poco de agua para evitar su desecación. El micelio se recuperó con una micropipeta y se vació el contenido en un filtro de nitrocelulosa de 1.2 µm y se filtro al vacío en un equipo Manifold Millipore 1225®. Los núcleos conteidos en las hifas sobre los filtros fueron fijados con 200 µL de formaldehído en una caja Petri que se incubaron por 20 min en oscuridad. Posteriormente se agregaron 200 µL de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) incubando 30 min en oscuridad. Se retiró la membrana y se filtró al vacío, enjuagando tres veces con agua destilada. Finalmente se colocó en un portaobjetos con glicerol-agua 1:1 (v:v) al resguardo de la luz para observar el micelio en un microscopio de epifluorescencia en UV a 365 nm.

3.14. . Extracción y amplificación del DNA

3.14.1. Recrecimiento de micelio en medio de cultivo líquido

El micelio de los aislados recrecido en medio líquido (PDB) fue extraído en condiciones asépticas en campana de flujo laminar donde se tomó una pequeña

muestra y se colocó en un tubo Eppendorf con agua destilada estéril. Éste se agitó en un vórtex durante un minuto para quitar el excedente de medio realizando dos enjuagues más y finalmente se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, quitando la mayor cantidad de agua con una micropipeta. A las muestras se les agregó 2 μ L de solución de extracción y se colocaron en el termociclador por 20 minutos, 10 minutos a 65 °C y 10 minutos a 95 °C, transcurridos 20 minutos se sacaron las muestras, se agregaron 30 μ L de disolución y se dejaron a temperatura ambiente por una hora (la extracción de DNA se realizó bajo el protocolo descrito en el kit Sigma Red extract-N-amp-x-NAT-100RXN®). Para la amplificación se realizó un master mix de PCR para el número de muestras trabajadas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Contenido de la muestra para amplificación por PCR.

1 muestra (25 μ L)
5 μ L Gotaq mix (incluye taq+DNTs+buffer)
0.25 μ L ITS1F (50 μ M)
0.25 μ L ITS4F (50 μ M)
3.0 μ L DNA dilución 1:10
16.5 μ L agua libre de nucleasas

Para la amplificación del DNA se emplearon los cebadores ITS1F/ITS4F (White *et al.*, 1990) en un termociclador bajo las siguientes condiciones: predesnaturalización a 95 °C por dos minutos, desnaturalización a 95 °C por un minuto, alineación a 55 °C por un minuto, extensión a 72 °C por un minuto. La

verificación de los productos de la PCR se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con Midori Green®. Posteriormente el gel se colocó en un transiluminador de luz ultra violeta a una intensidad de 260 nanómetros en oscuridad absoluta para su documentación.

3.15. Edición de secuencias y análisis filogenéticos

La edición de secuencias se realizó mediante el programa Geneious (versión 10) para la obtención de secuencias consenso y posteriormente comparadas con secuencias procedentes del Genbank. El alineamiento se realizó en línea MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>). Para el análisis filogenético se seleccionaron secuencias que presentaron similitudes desde el 89% hasta el 99% en cada uno de los aislados. Los árboles filogenéticos se generaron con el programa Geneious con 1000 bootstraps.

4 Resultados

4.1. Colonización micorrízica *in situ* de *Trichocentrum stramineum*

Se recolectaron un total de 120 raíces de 40 plantas en estado adulto y juvenil (Cuadro 2); las raíces recolectadas fueron de muy diversos tamaños que iban desde los cinco hasta los 40 cm de longitud (Cuadro 4). Se encontraron 19 plantas adultas algunas con formación de frutos, aun con rastros del escapo floral y frutos de la floración pasada; 21 en estado juvenil y diez protocormos (Anexo 1). Las plantas se localizaron en cinco forofitos distintos: ficus, café, izote, limón y encino y algunas con crecimiento en el suelo (Figura 12).

Cuadro 4. Longitud promedio (\pm d. e.) de las raíces de plantas adultas y juveniles de la orquídea epífita *Trichocentrum stramineum* de cinco poblaciones en el estado de Veracruz, México.

Localidad	Longitud (cm) (n=30)		Colonización	
	Juvenil	Adulto	Juvenil	Adulto
Chavarrillo	13.28 \pm 7.12	15.26 \pm 13.29	9.8 \pm 10.6	17.0 \pm 7.2
Campanario	16.72 \pm 9.20	17.78 \pm 8.66	12.1 \pm 16.1	12.1 \pm 14.8
La Juntas	14.25 \pm 7.41	15.89 \pm 10.11	19.7 \pm 22.6	12.5 \pm 10.5
Espinal	13.86 \pm 7.33	17.18 \pm 8.15	19.6 \pm 19.3	10.8 \pm 11.3

Los cortes transversales vistos al microscopio presentaron colonización micorrízica en al menos uno de los segmentos aunque no en todas las plantas

(Figura 13). La colonización varió de 0 al 100 % con pelotones presentes en diferentes estados de degradación. La colonización micorrízica no presentó algún patrón, observándose pelotones en la parte basal, media y apical de las raíces, así como en la parte basal del córtex adherido al forofio o en la parte superior (Figura 14). El velamen de las raíces presentó de cinco a seis estratos celulares en relación al espesor del córtex, a pesar de que se analizó un número considerable de individuos, menos de la mitad del total de las raíces presentó colonización micorrízica.

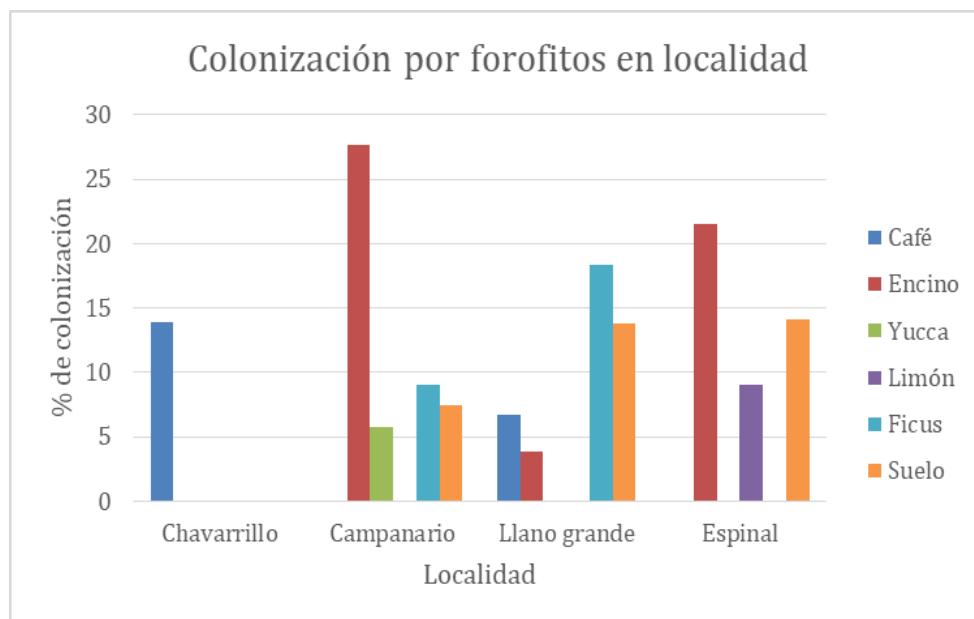


Figura 12. Gráfica de la colonización micorrízica total de la orquídea epífita *Trichocentrum stramineum* en cinco localidades del estado de Veracruz, México creciendo en distintos forofitos.



Figura 13. A-F) Plantas de la orquídea epífita *Trichocentrum stramineum* en diferentes forofitos y localidades, A) planta en forofito de café en la localidad de Chavarrillo, B) planta en forofito ficus en la localidad de Campanario, C) planta en forofito izote ubicado en la localidad de Coatepec, D) planta con crecimiento en el suelo, E) planta con crecimiento en el forofito encino en la localidad de La Juntas, F) planta en forofito de limón en la localidad del Espinal. Fotos: Rendón 2015-6.

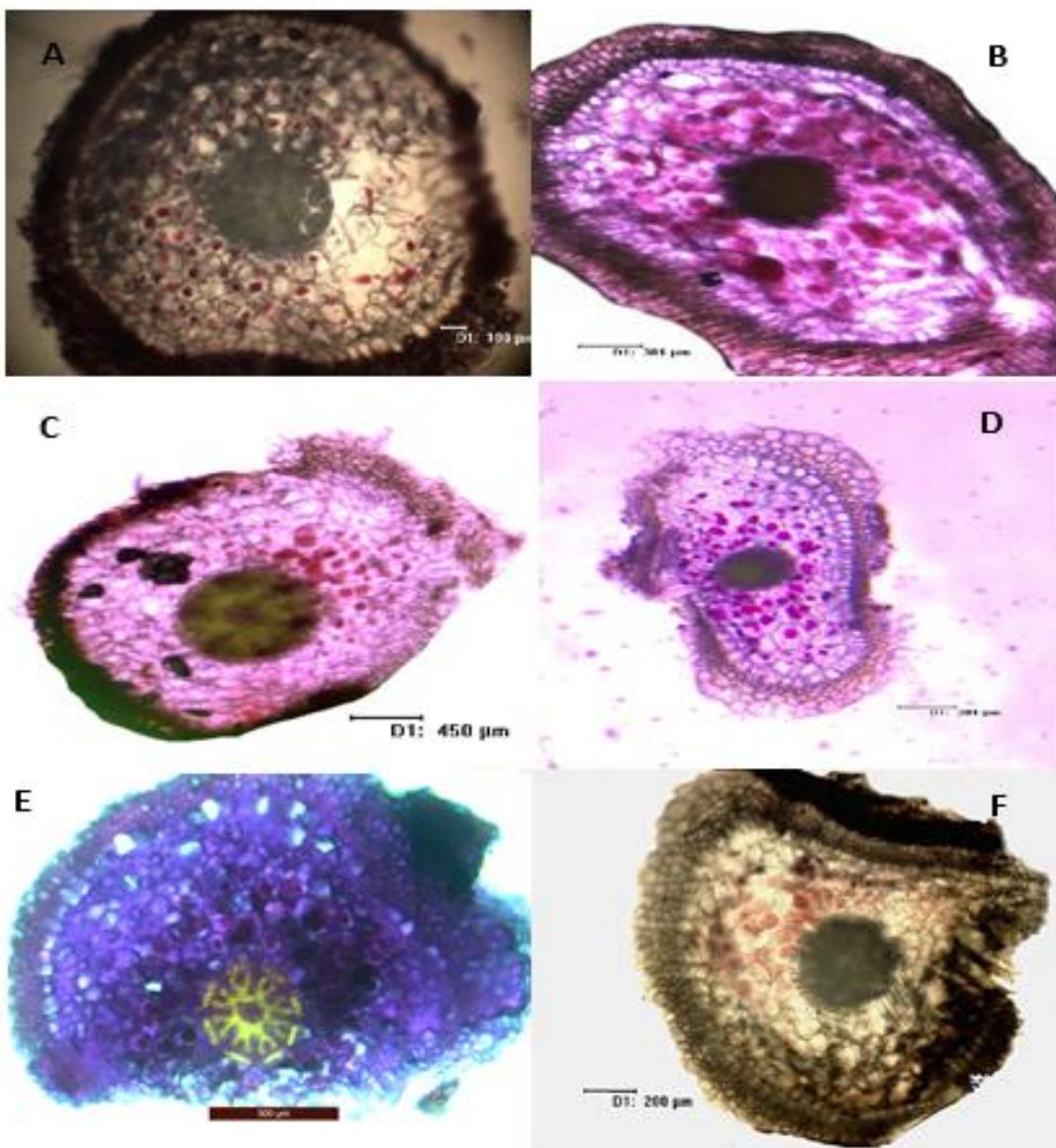


Figura 14. A-F) segmentos de raíces de la orquídea epífita *Trichocentrum stramineum*: A) segmento cercano a la base del pseudobulbo en una raíz creciendo sobre forofito de café en Chavarrillo con colonización micorrízica en casi todo el área del córtex, con pelotones degradados; B) segmento cercano al ápice creciendo sobre forofito de encino en Campanario con colonización en todo el córtex y pelotones con distinto estado de degradación; C) segmento basal de raíz creciendo en suelo en la localidad de Las Juntas con colonización micorrízica localizada; D) segmento basal de raíz creciendo sobre forofito *ficus* sp., córtex con colonización micorrízica en todo el córtex y pelotones en diferentes estados de degradación; E) segmento basal de raíz creciendo sobre forofito izote en Campanario; F) segmento basal de raíz creciendo sobre forofito de limón en El espinal donde la colonización micorrízica está localizada en la parte adherida al sustrato. Fotos: Rendón, 2015-16.

4.2. *Hongos micorrízicos de Trichocentrum stramineum*

La eficiencia de aislamiento de los HMO dependió del explante utilizado, obteniendo 17 aislados a partir de crecimientos de acuerdo al método de explante (figura 15) el cual tuvo una gran cantidad de desarrollo de endofitos no micorrízicos y 116 aislados obtenidos a partir de la técnica de la siembra de pelotones que, aunque más lenta, garantizó aislados puros de HMO (figura 15C). Aunque hubo presencia de pelotones sin aparente degradación, algunos de éstos no se desarrollaron en el medio de aislamiento fúngico (Figura 15D). De los 133 aislados micorrízicos (Fig. 16A), a 13 aislados no pudieron eliminárseles las bacterias (Fig. 16B) aún en medio con antibiótico. Además se obtuvieron un total de 37 aislados no micorrízicos (Figura 16C). De todas las localidades muestreadas se obtuvieron HMO (Cuadro 5) así como de los cinco forofitos y suelo muestreado. Sin embargo, no se lograron obtener aislados de todos los forofitos de cada lugar y además, el número de aislados obtenidos fue muy distinto. Del forofito del que se obtuvieron el 50 % de los aislados fue de café casi todos de la localidad de Chavarrillo en donde solamente se muestreó este forofito. A éstos, el 24 % se obtuvieron de suelo de tres localidades y al menos de dos plantas distintas por localidad, siguiendo el encino con el 11 % de cinco plantas de El Espinal y 8 % de ficus de dos plantas en dos localidades. Cuatro aislados se obtuvieron de cuatro protocormos creciendo en Izote y sólo un aislado de limón.

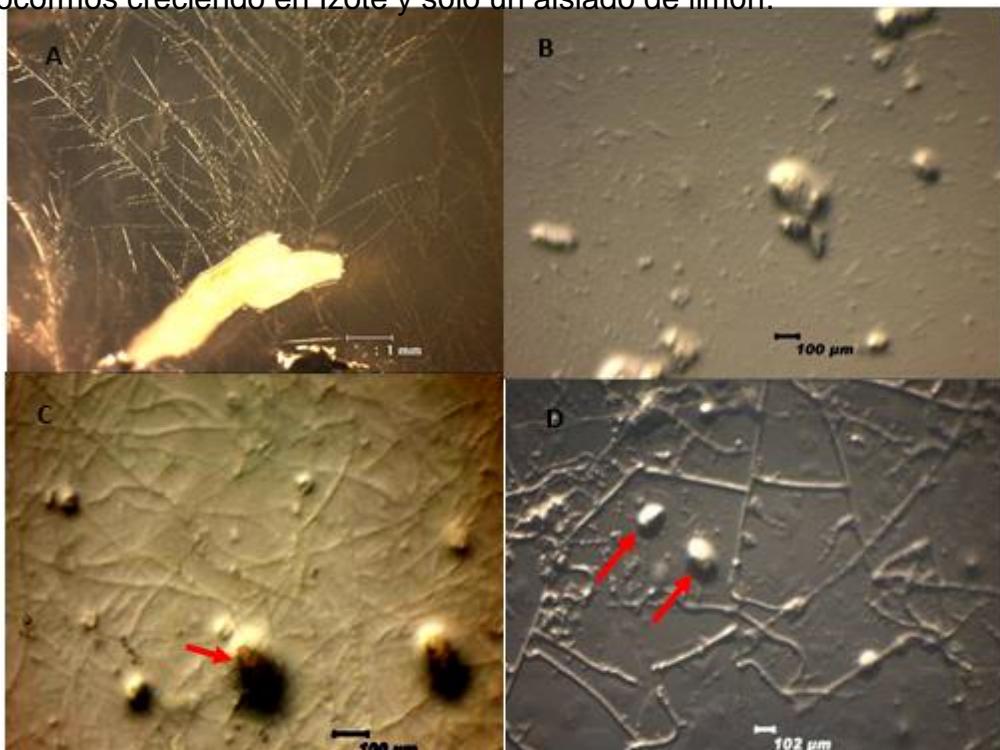


Figura 15. Siembras y crecimiento de hifas de la orquídea epífita *Trichocentrum stramineum*, A, Crecimiento multipunto de hifas de hongos endofitos no micorrízicos a partir de un explante con colonización micorrízica de una raíz. B, pelotones sin apariencia visible de degradación que no presenta crecimiento de hifas. C-D, crecimiento de hifas a partir de pelotones: C, recrecimiento rápido (24 h) de hifas a partir de pelotones (flecha roja) en medio de aislamiento fúngico; D, hifas con características de *Rhizoctonia*, algunos pelotones no recrecieron (flecha roja). Fotos: Rendón, 2015-6.

Cuadro 5. Aislados de hongos micorrízicos orquideoídes (HMO) de la orquídea epífita *Trichocentrum stramineum* obtenidos a partir de distintos forofitos de cinco localidades de Veracruz.

Localidad	Forofito	No. de aislados por Planta	HMO
Campanario	<i>Ficus</i> sp.	1, 2	3
	Suelo	5, 1	6
La Juntas	<i>Ficus</i> sp .	2, 5	7
	<i>Coffea arabica</i>	4	4
Chavarillo	Suelo	5, 5	10
	<i>Coffea arabica</i>	12, 2, 13, 5, 6, 27	66 (50%)
Coatepec	<i>Yucca elephantipes</i>	4 (protocormo)	4
El Espinal	<i>Quercus</i> sp.	1, 3, 3, 7, 1	15
	<i>Citrus limon</i>	1	1
	Suelo	3, 6, 7	15

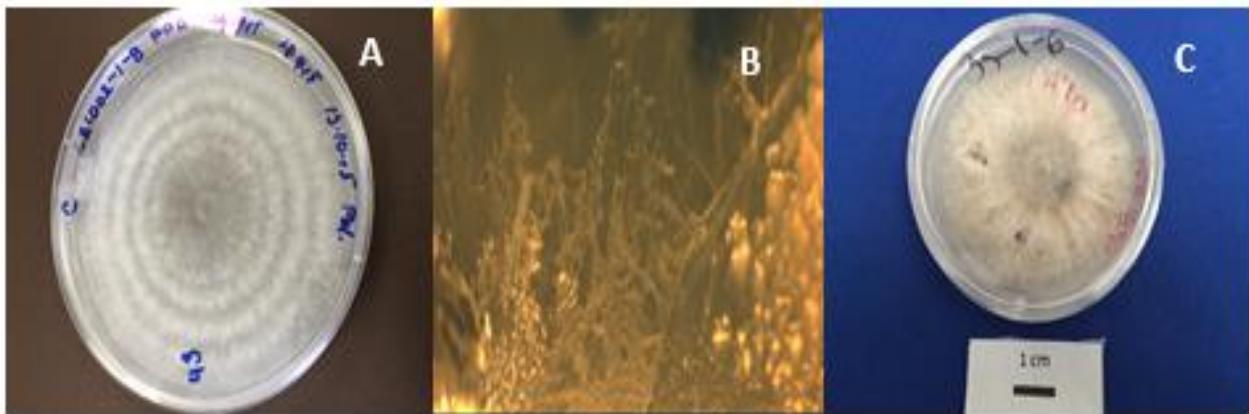


Figura 16. Aislados de hongos de la orquídea epífita *Trichocentrum stramineum*: A) endófito micorrízico obtenido a partir de un planta en forofito de café, perteneciente al anamorfo *Ceratorhiza* con crecimiento de anillos concéntricos; B) hifas en medio de cultivo PDA contaminadas con bacterias; C) endófito no micorrízico con apariencia algodonosa de color café clara recrecido en PDA aislado de una planta en forofito de ficus. Fotos: Rendón, 2015.

4.3. Caracterización morfológica de las colonias de HMO

Todos los aislados obtenidos pertenecieron al anamorfo *Ceratorhiza* (Cuadro 6). Las características morfológicas de las colonias correspondieron a micelios algodonosos de color blanco hialino a amarillos claros cuando maduros, con anillos concéntricos laxos a cerrados (Figura 17); hifas de 4.0-8.3 μm con septos basales de 3.0 a 4.5 μm (Figura 18); tasas de crecimiento de 2.8 a 6.1 mm por día (Cuadro 6), reacción ligeramente positiva de las polifenoloxidases (Figura 19), monilias digitiformes en sólo tres aislados de 11.7 a 25.4 μm de largo por 7.9 a 20.0 μm de ancho (Figura 20) (Cuadro 6), dos núcleos por célula (Figura 21).



Figura 17. Aislados de la planta epifita *Trichocentrum stramineum*. A) colonia joven con ocho días de color blanca-hialina, obtenido a partir de una planta con crecimiento en el suelo, B) colonia madura con 30 días de coloración café clara, obtenida en forofito de café. Fotos: Rendón 2015-6.

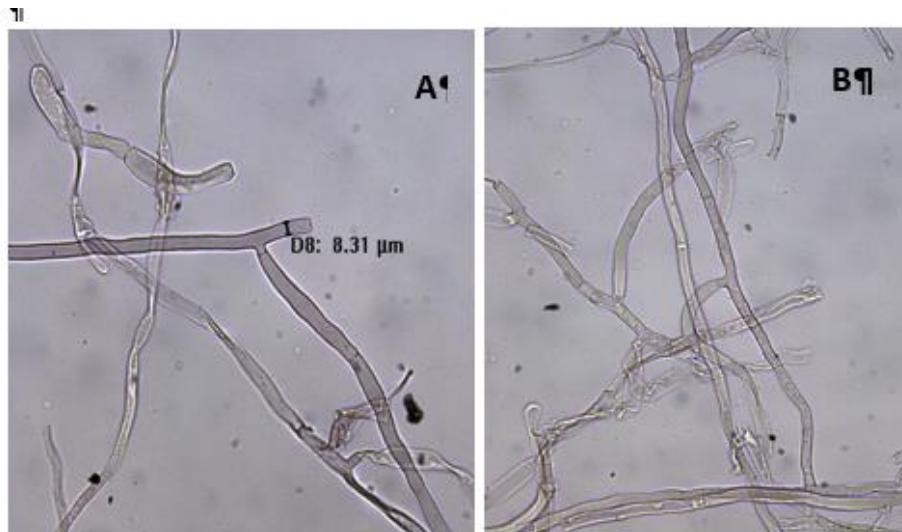


Figura 18. A) Microfotografías de los aislados obtenidos de la orquídea epifita *Trichocentrum stramineum*. Hifas con característica de una *Ceratrorhiza*, A) diámetro mayor a 4 μm , septos marcados, la flecha muestra que el septo tiene un ángulo a 90° aislado obtenido de una planta con crecimiento en ficus, B) aislado obtenido de una planta con crecimiento en suelo. Fotos: Rendón, 2015.

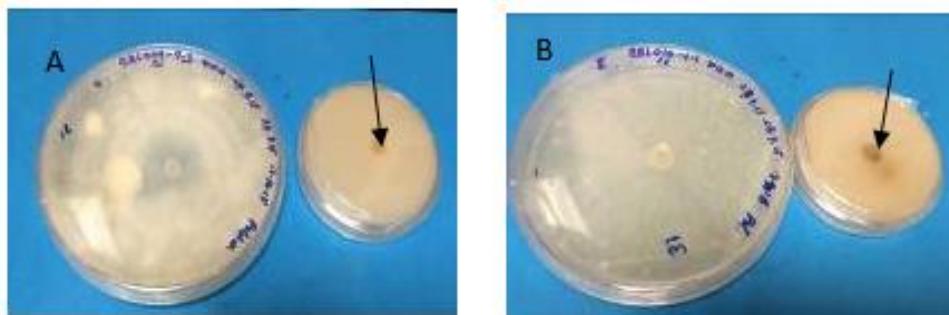


Figura 19. Aislados del género- forma *Rhizoctonia* subcultivados en ácido tánico. A-B) parte trasera de los medios de ácido tánico sin reacción positiva al medio aún siendo aislados del anamorfo *Ceratrorhiza*. Fotos: Rendón, 2015. Aislados: CRL017, CRL025.

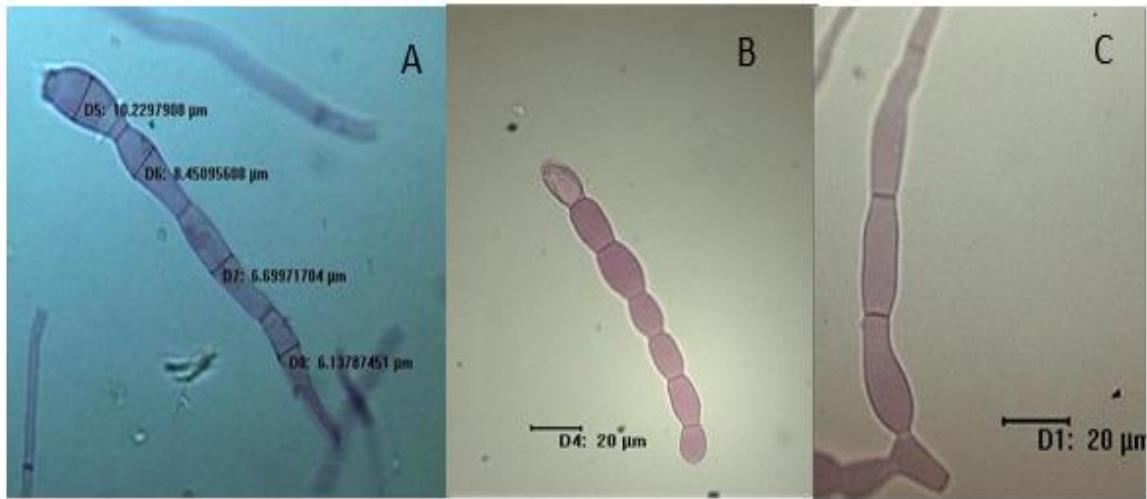


Figura 20. Largo y ancho de monilias de la planta epifita *Trichocentrum stramineum*. A-B) monilias obtenidas a partir de aislados de plantas en café en la localidad de Chavarillo, C) monilias obtenidas a partir de aislados procedentes de ficus en la localidad del Campanario. Fotos: Rendón 2015-6. Aislados: CRL020-4-3, CRL026-1-1, CRL036-2-5.

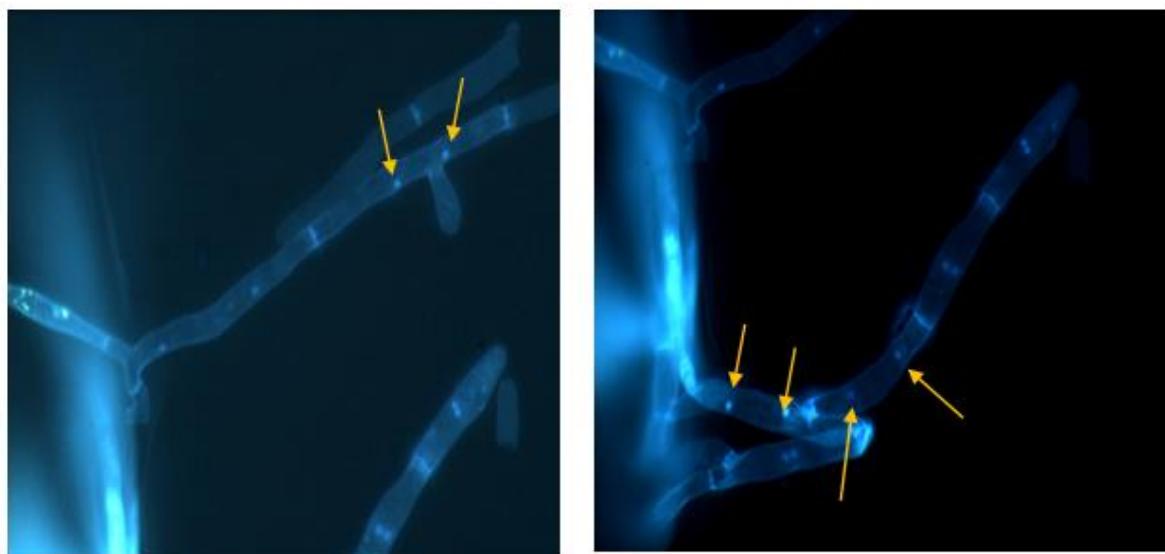


Figura 21. Cuantificación de núcleos por tinción DAPI de los hongos micorrízicos orquideoídeos aislados de la orquídea epifita *Trichocentrum stramineum*. A-B. Todas las hifas teñidas presentaron células binucleadas, las flechas muestran los núcleos. Fotos: Rendón, 2015. CRL024-3-4 A, CRL020-4-3 A.

Cuadro 6. Caracterización morfológica de las colonias de hongos micorrízicos orquideoides aislados de *Trichocentrum stramineum*, de orquídeas epifitas del estado de Veracruz. dds = días después de la siembra.

Código personal	Forofito	Localidad	Tasa de crecimiento diaria (mm)	Textura	Color colonia joven	Color colonia 20 dds	Color Tablas Munsell	Diámetro de las hifas (μm)	Distancia al septo basal (μm)	Largo de monilias	Ancho de monilias
CRL017-1-9	Café	Chavarrillo	4.4 ± 1.3	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Amarilla clara	10 YR 2	5.5 ± 1.0	4.5 ± 0.9	25.4 ± 4.4/	7.9 ± 1.9
CRL017-3-5	Café	Chavarrillo	3.9 ± 1.5	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Amarilla clara	10 YR 8	6.0 ± 1.9	3.6 ± 0.8		
CRL018-1-8	Café	Chavarrillo	4.6 ± 1.9	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Amarilla clara	10 YR 2	4.9 ± 0.8	3.6 ± 0.7		
CRL020-4-3 A	Café	Chavarrillo	4.1 ± 2.1	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Amarilla clara	10 YR 1	5.5 ± 0.7	3.5 ± 0.8	21.4 ± 8.8	14.1 ± 3.3
CRL020-4-3 G	Café	Chavarrillo	4.9 ± 2.4	Sumergida	Blanca hialina	Blanca lechosa	2.5 Y 8 White	7.1 ± 3.3	3.3 ± 0.8		
CRL020-4-3 H	Café	Chavarrillo	4.6 ± 1.9	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Blanca lechosa	2.5 Y 8 White	6.6 ± 2.5	3.2 ± 0.5		
CRL024-3-4	Café	Chavarrillo	3.7 ± 1.6	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Blanca lechosa	2.5 Y 8 White	5.7 ± 1.6	3.7 ± 0.5		
CRL026-1-1	Café	Chavarrillo	3.6 ± 1.6	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Blanca lechosa	2.5 Y 8 White	7.5 ± 2.0	3.4 ± 0.6		
CRL026-1-12	Café	Chavarrillo	3.6 ± 1.5	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Blanca lechosa	2.5 Y 8 White	8.3 ± 2.7	3.4 ± 0.5		
CRL029-1-1 A	Suelo	Campanario	4.2 ± 1.7	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Blanca lechosa	2.5 Y 8 White	6.0 ± 2.3	3.3 ± 0.7		
CRL029-1-1 D	Suelo	Campanario	4.0 ± 1.6	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Blanca lechosa	2.5 Y 8 White	7.7 ± 2.4	3.6 ± 0.6		
CRL029-1-1 E	Suelo	Campanario	4.3 ± 0.9	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Blanca lechosa	2.5 Y 8 White	7.0 ± 2.5	4.0 ± 0.8		
CRL031-3-2 B	Suelo	Campanario	3.4 ± 1.2	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Café clara	10 YI 2	6.5 ± 2.4	3.1 ± 0.8		
CRL036-	Ficus	Campanario	4.5 ± 1.4	Aérea	Blanca	Amarilla	5 YR 4	5.0 ± 0.9	3.4 ± 0.7	11.7 ± 1.4	20.0 ± 2.6

2-5 E				algodonosa	hialina	paja					
CRL037-3-2 A	Ficus	La Juntas	4.0 ± 0.9	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Amarilla paja	5 YR 4	6.7 ± 2.7	3.0 ± 1.0		
CRL038-2-5 B	Suelo	La Juntas	4.2 ± 1.0	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Amarilla paja	5 YR 4	7.2 ± 2.7	3.6 ± 0.5		
CRL038-2-5 D	Suelo	La Juntas	4.4 ± 1.3	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Amarilla paja	5 YR 4	6.9 ± 2.8	3.8 ± 0.7		
CRL039-1-1 A	Suelo	La Juntas	4.0 ± 1.4	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Amarilla paja	5 YR 4	5.8 ± 1.8	3.4 ± 0.8		
CRL039-1-2 B	Suelo	La Juntas	4.1 ± 1.1	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Amarilla paja	5 YR 4	6.1 ± 1.6	3.5 ± 0.9		
CRL039-1-4 A	Suelo	La Juntas	6.1 ± 1.9	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Amarilla paja	5 YR 4				
CRL042-1-1 A	Ficus	La Juntas	4.5 ± 0.9	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Amarilla paja	5 YR 4	6.9 ± 2.6	3.8 ± 0.9		
CRL042-1-1 C	Ficus	La Juntas	4.0 ± 1.4	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Blanca lechosa	2.5 Y 8 White	7.3 ± 2.6	3.1 ± 1.0		
CRL042-2-2 B*	Ficus	La Juntas	5.1 ± 1.1	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Blanca lechosa	2.5 Y 8 White	6.2 ± 2.4	3.0 ± 0.9		
CRL042-3-2 A	Café	La Juntas	5.0 ± 1.2	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Blanca lechosa	2.5 Y 8 White	6.1 ± 1.6	3.5 ± 0.9		
CRL044-2-2 B	Encino	Espinal	3.7 ± 1.0	Sumergida	Blanca hialina	Café clara	10 YI 2	5.6 ± 1.4	3.1 ± 0.7		
CRL047-3-2	Suelo	Espinal	4.0 ± 1.1	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Amarilla paja	5 YR 4	6.0 ± 1.7	3.3 ± 0.8		
CRL050-2-1	Encino	Espinal	4.3 ± 1.6	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Amarilla paja	5 YR 4	6.2 ± 1.5	3.6 ± 1.1		
CRL051-1-7	Suelo	Espinal	4.6 ± 1.2	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Amarilla paja	5 YR 1	5.6 ± 1.7	3.2 ± 1.0		
CRL052-1-1	Suelo	Espinal	4.0 ± 1.1	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Amarilla paja	5 YR 4	5.4 ± 1.6	3.7 ± 0.9		
CRL053-	Encino	Espinal	4.0 ± 1.1	Aérea	Blanca	Amarilla	5 YR 3	5.5 ± 1.1	3.6 ± 0.6		

3-2				algodonosa	hialina	paja					
CRL054-3-4	Encino	Espinal	2.9 ± 1.2	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Amarilla paja	5 YR 4	6.0 ± 1.7	3.2 ± 1.0		
CRL055-2-3 A	Encino	Espinal	2.9 ± 1.1	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Amarilla paja	5 YR 4	6.3 ± 1.7	3.1 ± 0.7		
CRL056-2-3 B	Limón	Espinal	3.9 ± 1.2	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Amarilla paja	5 YR 4	5.5 ± 1.3	3.6 ± 0.6		
CRL057 PR	Izote	Coatepec	3.4 ± 0.9	Sumergido	Blanca hialina	Amarilla paja	5 YR 1	5.6 ± 1.4	3.4 ± 0.8		
CRL059 PR	Izote	Coatepec	3.3 ± 1.4	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Amarilla paja	5YR 1	6.2 ± 1.9	3.2 ± 0.6		
CRL062 PR	Izote	Coatepec	4.1 ± 1.0	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Amarilla paja	5YR 1	5.5 ± 1.2	2.4 ± 0.3		
CRL064 PR	Izote	Coatepec	3.2 ± 1.1	Aérea algodonosa	Blanca hialina	Café clara	10 YR 3	5.4 ± 1.1	3.1 ± 1.0		

4.4. Caracterización molecular de las colonias de HMO

Con base en el número de aislados por forofito y localidad, se seleccionaron 33 aislados para la identificación molecular en los que se tuvo un representante de cada forofito y localidad, así como aquellos de individuos distintos y además de algunos aislados de la misma planta que presentaran caracteres morfológicos distintos (por ejemplo, los morfotipos 39-1-1 A y 39-1-2 B de crecimiento en suelo). Todas las muestras amplificaron positivamente con los cebadores seleccionados (figura 22).

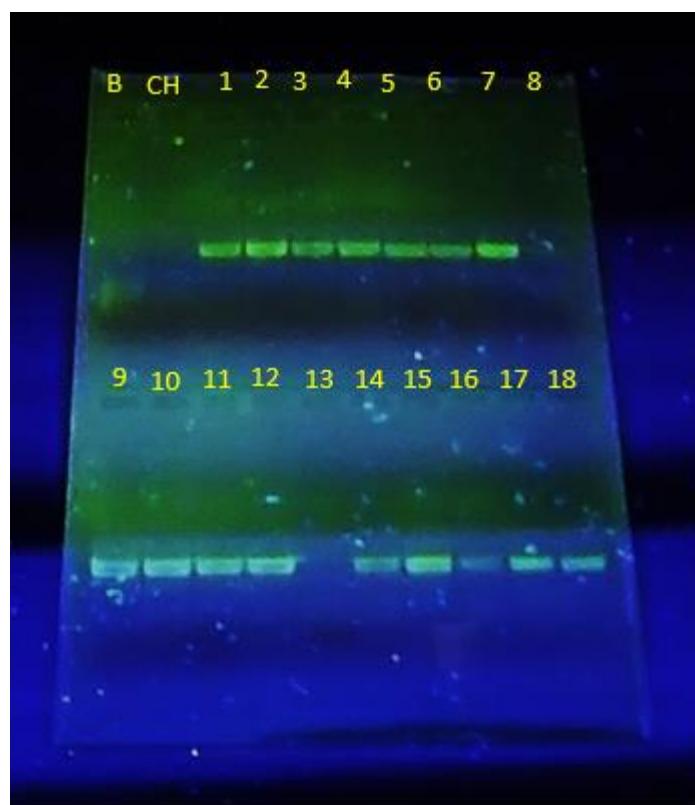


Figura 22. Gel de agarosa que muestra las amplificaciones por PCR con los primers ITS-1F de aislados de hongos micorrízicos orquideoídeos provenientes de orquídeas epífitas de *Trichocentrum stramineum* de Veracruz, México. B = blanco sin DNA (control negativo), CH = *Agaricus* sp. (un hongo comercial) (control positivo), 1-4 = hongos micorrízicos de aislados de otras orquídeas (segundo control positivo), 5-18 diversos aislados, CRL010, CRL012, CRL014, CRL015, CRL022, CRL017, CRL018, CRL019, CRL021, CRL023, CRL024, CRL025, descritos en el cuadro 6. Foto: Rendón, 2017.

4.5. Caracterización molecular de los aislados

De las 54 secuencias obtenidas, cuatro de ellas tuvieron menos de 100 pares de bases y el resto tuvieron entre 600 a 700 pb (Cuadro 7). El porcentaje de identidad fue de 98 al 88 %. Doce aislados tuvieron una identidad superior al 96 % con *Ceratobasidium* aislado de distintas orquídeas; seis relacionados con orquídeas australianas de la Subtribu Pterostylidinae y seis con orquídeas e Puerto Rico emparentadas filogenéticamente. El resto de las secuencias, se relacionaron con hongos aislados de la materia orgánica y de varias orquídeas terrestres de distintas partes del mundo como USA, Italia y México. En la fig. 23 se muestra la relación filogenética de los aislados en donde se observa que el contig 1 y 3 se agrupan en un clado y el contig 2 en otro. Las secuencias que forman cada uno de los clados, no está relacionada con su similitud en el Genbank ni claramente con alguna de las propiedades merísticas cuantificadas (Cuadros 6 y 7, respectivamente).

Cuadro 7. Identidad taxonómica de los hongos micorrízicos orquideoídes aislados de la orquídea epífita *Trichocentrum stramineum* de diferentes localidades y forofitos del Estado de Veracruz, México. El número entre paréntesis forma parte del número de contig de la filogenia del la Fig. 23.

Clave del aislado, forofito y localidad	Acceso	identidad (%)	Organismo	País	Hospedero
CRL001 (1) Suelo, Campanario	DQ028824.1	98 %	vouchered mycorrhizae (<i>Ceratobasidium</i>)	Australia	<i>Pterostylidinae</i>
CRL014 (2) Ficus, La Juntas					

CRL020 (3) Suelo, Espinal					
CRL003 (1) Suelo, Campanario	GQ405535.1	98 %	<i>Ceratobasidium</i> sp. (JTO-2010 ^a)	Australia	
CRL021 (3) Encino, Espinal					
CRL023 (2) Limón, Espinal					
CRL004 (1) Suelo, Campanario	AF504008.1	98 %	<i>Ceratobasidium</i> sp. (JTO161)		
CRL024 (1) Izote, Coatepec					
CRL005 (1) Ficus, Campanario	AF503973.1	98 %	<i>Ceratobasidium</i> sp. (JTO041)		
CRL006 (1) Ficus, La Juntas	AF503960.1	97 %	<i>Ceratobasidium</i> sp. (JTO014)		
CRL008 (1) Suelo, La Juntas	AF472303.1	97 %	<i>Ceratobasidium</i> sp. (JTO163)	Puerto Rico	<i>Oncidium</i> <i>altissimum</i>
CRL009 (1) Suelo, La Juntas	AF472302.1	96 %	<i>Ceratobasidium</i> sp. (JTO162)	Puerto Rico	<i>Tolumnia</i> <i>variegata</i>
CRL018 (2) Encino, Espinal	FJ515884.1	89 %	<i>Ceratobasidium</i> sp.	China	<i>Materia</i> <i>orgánica</i>
CL015 (3) Café, La Juntas	EU273525.1	88 %	<i>Ceratobasidium</i> <i>cornigerum</i>	China	<i>Materia</i> <i>orgánica</i>
CRL022 (1) Encino, Espinal	HM141010.1	89 %	uncultured <i>Ceratobasidiace</i>	USA: High Ledges,	<i>Goodyera</i> <i>tesselata</i>

			ae	Massachu setts	
CRL011 (3) Suelo, La Juntas	KJ789941.1	89 %	uncultured <i>Ceratobasidium</i>	Italy	<i>Anacamptis</i> <i>morio</i>
CRL010 (3) Suelo, La Juntas	KJ789945.1				
CRL025 (1) Izote, Coatepec	KP715582.1	89 %	<i>Ceratobasidium</i> sp.	Mexico: Estado de Mexico	<i>Dichromanthus</i> <i>cinnabarinus</i> subsp. <i>cinnabarinus</i> (Orchidaceae)
CRL019 (2) Suelo, Espinal	KP715598.1	89 %	<i>Ceratobasidium</i> sp.	Mexico: Mexico	<i>Dichromanthus</i> <i>michuacanus</i> (Orchidaceae)
CRL016 (3) Encino, Espinal	KP715583.1	88 %	<i>Ceratobasidium</i> sp.	Cd. Mx., México	<i>Dichromanthus</i> <i>cinnabarinus</i>
CRL017 (2) Suelo, Espinal	KP715584.1			Estado de México, México	subsp. <i>cinnabarinus</i> (Orchidaceae)
CRLC22 (1) Encino, Espinal	KP715605.1	88 %	<i>Ceratobasidium</i> sp.	Oaxaca, México	<i>Dichromanthus</i> <i>cinnabarinus</i>
CRL014 (2) Ficus, La Juntas	KP715606.1				subsp. <i>galeottianus</i> (Orchidaceae)
CRL026 (1) Izote, Coatepec	KP715609.1	88 %	<i>Ceratobasidium</i> sp.	Cd. Mx., Mexico	<i>Deiregyne</i> sp.
CRL027 (1) Izote, Coatepec					(Orchidaceae)

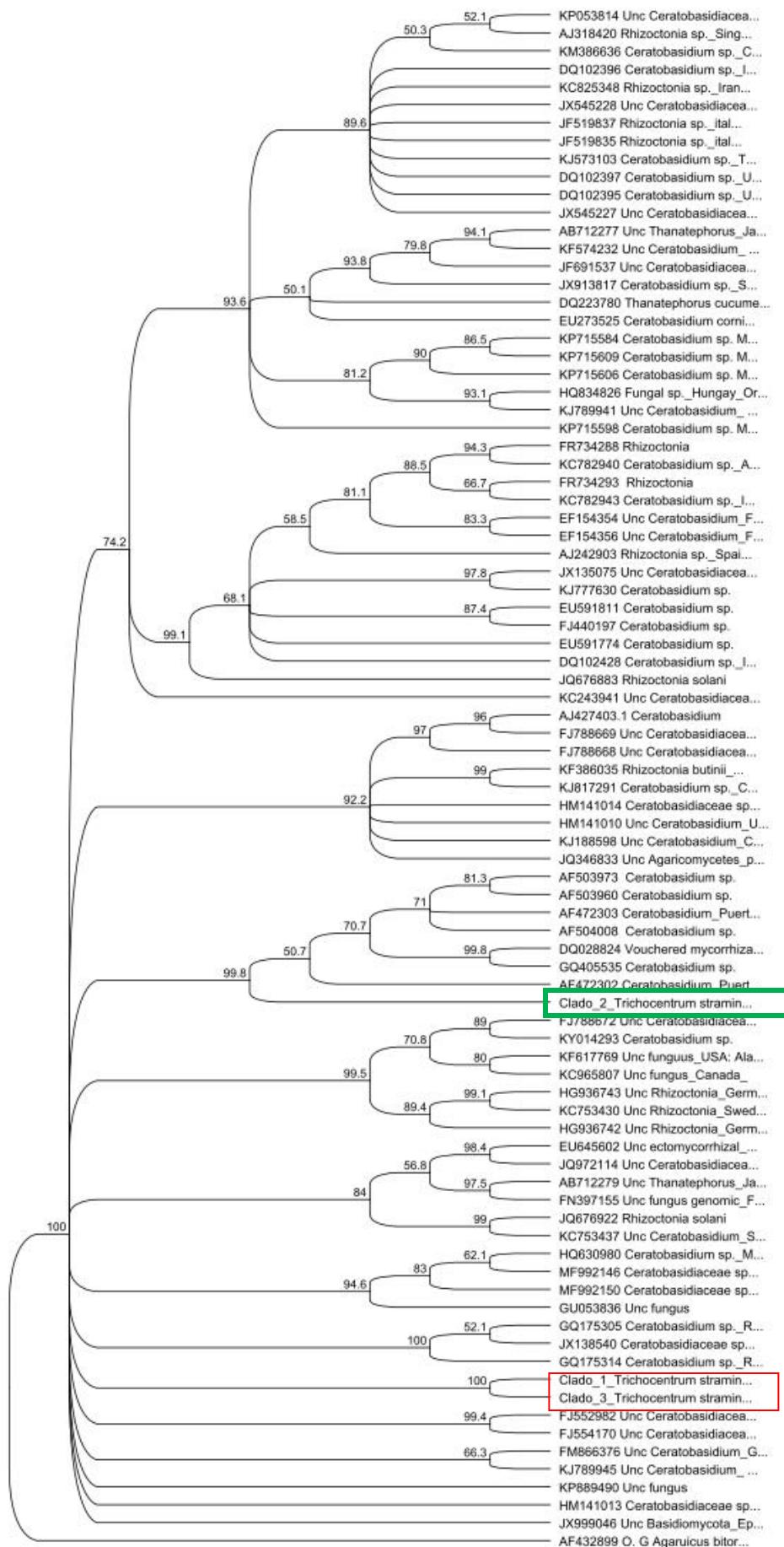


Figura 23...A nuclear de los hongos micorrízicos aislados de *Trichocentrum stramineum* de distintas localidades de Veracruz, México: contig 1 (secuencias CRL029-1-1, 29-1-1-A, 31-3-2, 36-2-5, 37-3-2-A, 38-2-5, 55-2-3, 57, 59, 62, 64), contig 2 (secuencias CRL029-1-1E, 42-1-1, 42-3-2, 50-2-1, 51-1-7, 52-1-1, 56-2-3), contig 3 (secuencias CRL039-1-4, 39-1-2, 44-2-2, 47-3-2, 53-3-2, 54-3-4). 1000 botstraps.

5. Discusión

Trichocentrum stramineum posee raíces largas mayores de 15 cm fijadas a la corteza del forofito, llegando algunas a extenderse hasta el suelo; son gruesas con un velamen que en relación al diámetro del córtex es casi de una tercera parte (de espesor medio comparado con orquídeas relacionadas como *Oncidium* u otras epifitas tropicales). Aún cuando el velamen sea delgado con relación al diámetro de la raíz, las paredes celulares son considerablemente grandes en la parte superficial en relación al volumen celular del córtex. Esto le permite absorver una gran cantidad de agua durante los meses de lluvias de junio a octubre ya que alrededor de entre siete y ocho meses se encuentra en temporada de sequía con temperaturas de entre los 28-30 °C (Soto-Arenas, M. A. y Solano-Gómez, 2007). Estudios anteriores realizados en orquídeas epifitas tropicales muestran que la cantidad de estratos celulares varía mucho de acuerdo a la especies (Otero, 2002). El crecimiento de *Trichocentrum* ha sido caracterizado en árboles de encino en altitudes de 500 a 1200 msnm. La transformación de hábitat ha hecho que colonice nuevos forofitos que son de cortezas similarmente rugosas donde las

raíces tienen cierta dificultad para crecer como en *Yucca* sp. Sin embargo, también se le encontró en forofitos de corteza lisa como limón, ficus y café.

La colonización micorrízica en las raíces recolectadas no llegó ni siquiera al 50 % independientemente del forofito. Esto se pudo deber a que se encontraron varios segmentos sin colonización dada la longitud de las raíces, así como raíces completas de algunas plantas que no estaban micorrizadas. A diferencia de otras especies de orquídeas epifitas en el trópico como *Stanhopea oculata*, no se observó ningún patrón de colonización siendo discontinua a lo largo de las raíces y donde la mayor parte de los segmentos colonizados se encontraban en la base de la planta como lo encontrado por Moreno-Martínez (2011). En un estudio de colonización de orquídeas epifitas del Soconusco (Cruz-Blasí, 2006) se encontró que a mayor diámetro del córtex, menor era el porcentaje de colonización. La presencia de velamen grueso en las orquídeas epifitas puede ser una determinante para que pueda o no haber colonización micorrízica ya que funciona como un reservorio de nutrientes y agua, además de actuar como una barrera para que los hongos o agentes patógenos se establezcan en el córtex (Bayman *et al.*, 1997). Estudios realizados por Oliveira (2006) demostraron que el porcentaje de colonización varió de entre el 47 y 100 % en dos orquídeas epifitas tropicales de bosques húmedos de Sud-América.

Sin embargo las raíces más cortas si presentaron colonización en la parte cercana al ápice. En cuanto a las raíces de las plantas adultas y jóvenes no hubo mucha diferencia respecto al nivel de colonización. Algunos estudios han verificado que las raíces jóvenes presentan mayor colonización que las de las plantas adultas (Crespo-Santander y Ortega-Guaricela, 2015) y que los parches de colonización se encuentran en la parte adherida al sustrato (Benzing *et al.*, 1982; Nontachaiyapoom *et al.*, 2010; Oliveira, 2006; Porras y Bayman, 2007; Rivas *et al.*, 1998; Suárez *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha documentado que las orquídeas epifitas presentan porcentajes de colonización menores que las terrestres dado que éstas últimas son más micotrofas (Rasmussen y Rasmussen, 2007). Se ha

explicado esta disminución en la micotrofia debido a que evolutivamente, las orquídeas epifitas son de más reciente aparición y los mecanismos que han presentado para colonizar el estrato arbóreo, como el desarrollo del velamen, la presencia de raíces fotosintéticas, la falta de sustrato edáfico, las vuelven menos dependientes hacia su nutrición de C por parte de los hongos.

Sin embargo, ninguna de las raíces menores a los cinco cm presentó colonización micorrízica, lo que coincide con lo descrito por Pereira y col. (2005b) y Oliveira (2006) quienes describen que la micorrización en las orquídeas epifitas ocurre cuando las hifas de los hongos micorrízicos hacen contacto con los pelos radicales y así de esta manera colonizan el córtex. La colonización se va desarrollando a medida que la raíz crece como lo descrito por Cruz-Blasí (2007). Las raíces analizadas en este trabajo fueron jóvenes y maduras, teniendo variabilidad en ambas con el aislamiento de hongos potencialmente micorrízicos, lo cual contrasta un poco con estudios anteriores que demuestran que es más factible realizar aislamientos en las raíces jóvenes porque ahí se encuentra una mayor cantidad (Zettler *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2008). En este trabajo fueron analizadas 120 raíces de las cuales muy pocas presentaron colonización micorrízica en la parte del ápice, seguido de la parte intermedia y las zonas con mayor colonización fueron aquellas en la parte cercana a la base del pseudobulbo, lo cual contrasta con lo reportado por Quintero-Torres en el 2012 que mencionó que las partes más colonizadas de las raíces de orquídeas es en el ápice, ya que presentan mayor absorción de agua y nutrientes. Sin embargo, los estudios sobre la ubicación de la colonización en orquídeas epifitas no precisan sobre qué parte de la raíz se presenta la mayor colonización micorrízica (Ordoñez *et al.*, 2016; Suárez *et al.*, 2016; Zettler *et al.*, 2013).

La colonización en las diferentes localidades varió considerablemente teniendo en siendo en algunas plantas que crecieron en los mismos forofitos, casi nula. La colonización fue mayor en las plantas muestreadas en la localidad de Chavarrillo y en el forofito de café debido a que el número de muestras procesadas en la misma fue mayor, mientras que en otras localidades presentó muy baja colonización. Las

plantas que se encontraron con crecimiento en el suelo presentaron del 7 al 14 % de colonización micorrízica, las plantas con mayor colonización fueron las que se encontraron en el forofito de *Quercus* sp. que varió entre el 22 y 26 % en las localidades del Campanario y el Espinal.

A pesar de que se analizó un número considerable de individuos, la cantidad de aislados obtenidos por planta fue baja lográndose el aislamiento de la mitad de las plantas muestreadas (25 de un total de 50) y en algunas plantas que se encontraron en forofitos diferentes en distintas localidades no se pudo obtener un solo aislado, posiblemente por la baja colonización micorrízica que presentaron aunada a la viabilidad de los pelotones y a la época del año en que fueron recolectadas. Se implementaron protocolos modificados para lograr una buena eficiencia de aislamiento bajando el tiempo de desinfestación en una solución de NaOCl al 10 % por ocho minutos máximo ya que pruebas realizadas con anterioridad demostraron que aquellos segmentos que fueron desinfestados con tiempos entre los 9 y 10 minutos no presentaron recrecimiento de hifas en los medios de aislamiento (Ortega-Larrocea, 2008). Es común que los hongos micorrízicos no crezcan a partir de los pelotones aislados aún cuando su aspecto sea aparentemente sin degradación del citoplasma ya que la morfología de los pelotones no es directamente proporcional con su actividad fisiológica y no es un indicativo para poder llevar a cabo el aislamiento a partir de estructuras aparentemente bien conservadas (Rangel-Villafranco, 2003). Posiblemente esto se deba a que las raíces de las plantas generan compuestos de defensa que pueden inhibir el crecimiento de las hifas (Rasmussen y Whigham, 2002); a que algunos hongos no son capaces de crecer en medios de cultivo convencionales, y/o a las condiciones de incubación (Porras-Alfaro y Bayman, 2007).

Con relación a las localidades, todas ellas presentaron clima, nivel altitudinal y tipo de vegetación o manejo diferentes. Es por ello que, la comparación entre sitios y forofitos es difícil debido a que no se tiene la presencia completa de todos ellos en cada sitio. Sin embargo, esta misma variabilidad permite constatar que

Trichocentrum se asocia independientemente del forofito, vegetación, clima, altitud y grado de desarrollo de la planta o inclusive de protocormos germinados *in situ*, a hongos de la familia Ceratobasidiaceae sin excepción. Guzmán y Moreno (2014) encontraron una gran diversidad de especies moleculares de hongos micorrízicos de las familias Tulasnellaceae, Ceratobasidiaceae, Sebacinaceae y Ascomicetos en dos especies de orquídeas epifitas de bosques ecuatorianos, en donde no pudieron encontrar efectos en la diversidad atribuidos a la altitud sino más bien al tipo de forofitos donde se encontraban. En orquídeas tropicales de países como Puerto Rico, Cuba, Brasil y Colombia se ha evidenciado una mayor presencia de hongos pertenecientes al género *Ceratobasidium* (Mosquera *et al.*, 2010, Suárez *et al.*, 2016). *Ceratobasidium* ha sido aislada de especies del género *Oncidium* en Costa Rica y Colombia (Cando-Naula y Cárdenas, 2017, Otero, 2002) que están relacionadas con *Trichocentrum* ya que estas especie anteriormente estaba clasificada en este género lo que demuestra que su parentezco filogenético y la especificidad micorrízica puedan darse en estas orquídeas en América (Otero *et al.* 2011). La identidad molecular corrobora esto ya que algunas de las secuencias tienen una similitud del 97 % con hongos aislados de orquídeas emparentadas filogenéticamente como *Oncidium altissimum* y *Tolumnia variegata* (Otero *et al.*, sin publicar) y de otras orquídeas australianas de la Familia Pterostylidinae. Es de destacar que las secuencias que se agrupan en los mismos contig, provienen de aislados de distintas localidades de Veracruz, lo que indica que esta especie tiene una especificidad hacia los mismos hongos del género *Ceratobasidium*. Las identidades moleculares menores al 97 %, se asocian con hongos aislados de orquídeas terrestres de varios lugares del mundo, entre los que destacan algunas especies mexicanas del género *Dichromanthus* (Reyes *et al.*, sin publicar). Por otro lado, la mayor parte de estas secuencias fueron de hongos aislados del forofito encino y las secuencias con una similitud casi idéntica a los hongos de Puerto Rico y Australia se aislaron de suelo o de otros forofitos. Esto podría indicar que las especies moleculares de los hongos aislados de las orquídeas que crecen en los encinos mexicanos de este hábitat son distintas a aquellas a las que se asocia esta orquídea cuando hay transformación de su hábitat. Sin embargo, se

deben obtener más secuencias que puedan corroborar esta apreciación. Si bien la caracterización morfológica es una herramienta importante para poder discriminar entre los endófitos micorrízicos de los no micorrízicos, en este estudio, no se encontraron caracteres morfológicos que soportaran diferencias entre las especies moleculares.

6. Conclusiones

Todas las plantas muestradas de la orquídea epífita *Trichocentrum stramineum* de cinco poblaciones con distinto grado de perturbación distribuidas en el estado de Veracruz, México se asocian con hongos micorrízicos de la familia Ceratobasidiaceae.

La colonización micorrízica *in situ* de *Trichocentrum stramineum* fue heterogénea, menor al 30 % en todos los caso y no dependió ni de la especie de forofito ni del tamaño de las raíces. No se encontró un patrón de colonización en el córtex y ésta fue predominantemente situada en la base de las raíces en la región proximal al pseudobulbo.

Se pudieron obtener aislados de los hongos micorrízicos de *Trichocentrum stramineum* a partir de las raíces de todos los forofitos donde se encontró e inclusive de protocormos germinados *in situ* en la localidad de Coatepec. El 50% de los aislados fueron obtenidos de café debido a que en la localidad de Chavarrillo sólo se encontraba este forofito. Esto no se pudo relacionar con el grado de colonización micorrízica ni tampoco con el estado de conservación de los pelotones, ya que se presentó cierta dificultad en el momento de ajustar los protocolos de desinfestación.

Las características morfológicas de las colonias correspondieron a anamorfos del género *Ceratorhiza* en donde todas fueron algodonosas, blancas hialinas con anillos de crecimiento, tasas mayores a 2.9 mm por día y longitudes de las hifas mayores a 4 micras, binucleadas y con reacción positiva en medio de ácido tánico. La identidad molecular de los aislados obtenida a partir de sus secuencias, corroboró el teleomorfo *Ceratobasidium* en donde las especies identificadas se emparentaron con un 97-99 % de similitud con orquídeas filogenéticamente relacionadas (*Oncidium altissimum* y *Tolumnia variegata*) y aquellas con identidades menores al 90 % con hongos del mismo género asociados a orquídeas terrestres mexicanas y de otras partes del mundo.

Las evidencias encontradas en este estudio permiten inferir que la colonización de nuevos forofitos de *Trichocentrum stramineum* le permite abarcar nuevos hábitats con cierto grado de disturbio en donde no se encontraba anteriormente, viéndose de esta manera favorecida debido a su especificidad micorrízica con clados dentro de la familia Ceratobasidiaceae. Este estudio contribuye a reforzar la evidencia de que las asociaciones con esta familia de hongos micorrízicos saprobios generalistas y con una gran capacidad degradadora, favorece el establecimiento de varias orquídeas.

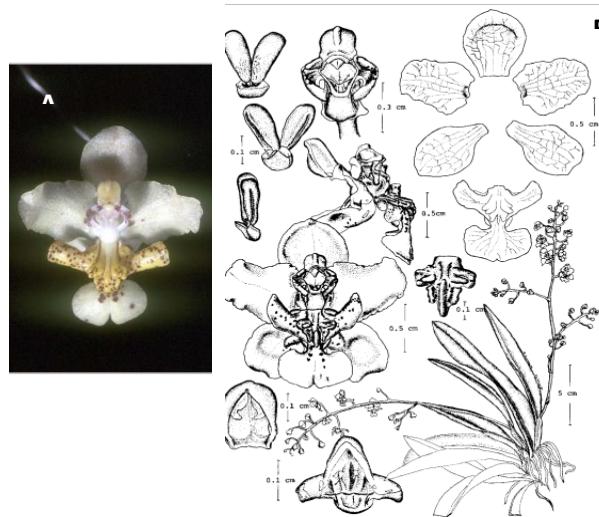
Anexos

Anexo 1. Descripción de *Trichocentrum stramineum* anexo 1

Hierba epifita, de 15-25 cm de alto sin la inflorescencia. Raíces carnosas, de 2-5 mm de grosor, pseudobulbos agrupados, subcilíndricos, muy reducidos, unifoliados, de 8-13 x 5-7 mm; cubiertos por 4 vainas triangulares, acuminadas, escarioso-papiráceas. Hoja elíptica a obovado-elíptica, aguda, coriáceo-suculenta, verde o verde-rojiza con puntos rojos, de 11-20 x 3-5 cm. Inflorescencia basal, paniculada (con 2-3 ramas sencillas y cortas) o en ocasiones racimosa, erecto-árqueada, densa, de 15-30 cm de largo, con 30-50 flores; pedúnculo provisto de brácteas triangulares, escariosas, papiráceas, agudas, de 5-10 x 4-7 mm. Brácteas florales angostamente triangulares, agudas, herbáceo-papiráceas, de 2-5 x 2-3.5 mm. Flores vistosas, carnosas, de ca. 15 mm de diámetro; sépalos y pétalos Blanca crema o marfil con una mancha amarilla en la base, labelo con los lóbulos laterales Amarillas con puntos rojos y lóbulo medio Blanca con puntos rojos en la base. Sépalo dorsal ligeramente reflexo, cortamente unguiculado, obovado a suborbicular, obtuso, cóncavo, de 8-9 x 6-7 mm. Sépalos laterales ligeramente reflexos, unguiculados, obovados a elípticos, obtusos, ligeramente cóncavos, de 8.5-10 x 5-6 mm. Pétalos extendidos, sésiles, oblongo-ovados, obtusos, con márgenes sinuosos y ligeramente ondulados, de 7-8 x 5-6 mm. Labelo trilobado, esencialmente plano, de 8-10 mm de largo y 7-10 mm de ancho entre los lóbulos laterales; lóbulos laterales oblongos, algo retrorsos, con márgenes revolutos, frecuentemente incurvados, con los ápices dirigidos hacia la base del labelo, de 2.7-3.5 x 1.4-2.7 mm; istmo breve, angosto, de 2 mm de ancho; lóbulo medio reniforme, emarginado, de 3.5-4 x 6-8 mm. Callo extendiéndose cerca de la mitad del labelo, Amarilla con puntos rojos, formado por 4 tubérculos, dos basales truncados y dos distales lateralmente aplanados, redondeados; entre estos últimos hay en ocasiones una quilla longitudinal. Columna gruesa, corta, de ca. 5 mm de largo, blanca con manchas rojas hacia el

ápice, alada, con tábula infraestigmática prominente, redondeada, subcuadrada, blanca, brillante; alas oblicuamente triangulares, descendentes, gruesas, carnosas, blancas con manchas y puntos rojos. Antera oblonga, bilocular, blanca, de ca. 2.5 x 1.8 mm. Polinario con 2 polinios oblongo-obovoides, dorsiventralmente comprimidos; estípite laminar, en forma de casco de caballo; viscidio triangular. Estigma obovado o subtriangular, plano, brillante, Blanca con venas rojas. Rostelo muy corto, laminar, redondeado (Naturalista, visto 23 noviembre 2015). Época de floración, marzo a mayo. Usos, Ornamental (figura 1 A-B) (Cruz-Paredes y Cruzado-Cardiel, 2009).

Figura 24. *Trichocentrum stramineum*: izquierda foto de la flor, derecha esquema de la planta. imagen tomadas de ficha técnica de *T. stramineum*. Foto tomada de <https://drive.google.com/file/d/0B6OrT6oUtDwjX1JsYzhEaUwyWDA/edit>



ANEXO 2.

Cuadro 8. Individuos de *Trichocentrum stramineum* localizados en diversos forofitos de cinco poblaciones en el estado de Veracruz, México.

Numero de planta	Código personal	Estadio de la planta	Forofito
001	CRL017	Adulto	Café
002	CRL018	Adulto	Café
003	CRL019	Juvenil	Café
004	CRL020	Juvenil	Café
005	CRL021	Adulto	Café
006	CRL022	Adulto	Café
007	CRL023	Adulto	Café
008	CRL024	adulto	Café
009	CRL025	Adulto	Café
010	CRL026	adulto	Café
011	CRL027	Adulto	Izote
012	CRL028	Adulto	Ficus
013	CRL029	Juvenil	Liana (suelo)
014	CRL030	Juvenil	Liana Suelo
015	CRL031	Adulto	Tronco Suelo
016	CRL032	Juvenil	Suelo
017	CRL033	Adulto	Izote seco
018	CRL034	Juvenil	Tronco seco
019	CRL035	Adulto	Ficus
020	CRL036	Adulto	Ficus
021	CRL037	Juvenil	Ficus
022	CRL038	Juvenil	Suelo
023	CRL039	Adulto	Suelo
024	CRL040	Juvenil	Tronco podrido
025	CRL041	Juvenil	Tronco seco
026	CRL042	Juvenil	Ficus
027	CRL043	Juvenil	Ficus
028	CRL044	Adulto	Café
029	CRL045	Juvenil	Quercus
030	CRL046	Adulto	Café
031	CRL047	Juvenil	Quercus seco
032	CRL048	Adulto	Suelo
033	CRL049	Juvenil	Café
034	CRL050	Adulto	Suelo
035	CRL051	Juvenil	Quercus
036	CRL052	Juvenil	Suelo

037	CRL053	Juvenil	Suelo
038	CRL054	Juvenil	<i>Quercus</i> suelo
039	CRL055	Juvenil	<i>Quercus</i> suelo
040	CRL056	Juvenil	Limón
041	CRL057	Protocormo	Izote
042	CRL058	Protocormo	Izote
043	CRL059	Protocormo	Izote
044	CRL060	Protocormo	Izote
045	CRL061	Protocormo	Izote
046	CRL062	Protocormo	Izote
047	CRL063	Protocormo	Izote
048	CRL064	Protocormo	Izote
049	CRL065	Protocormo	Izote
050	CRL066	Protocormo	Izote

LITERATURA CITADA

- Agrios**, N. G. 2002. Fitopatología. Editorial Limusa, S. A., 2da. Ed., México. 830 p.
- Alexander**, C. E. 1987. Mycorrhizal infection in adult orchids. Pp. 324-327. En: O. M. Sylvia, I. Hung y J. H. Gmham (eds.). Mycorrhizae in the Next Decade, Practical Applications and Research Priorities. University of Florida, Gainsville.
- Altschul**, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403 - 410.
- Andersen**, T. F. 1996. A Comparative Taxonomy Study of *Rhizoctonia* *sensu lato* Employing Morphological, Ultrastructural and Molecular Methods. *Mycol. Res.* 100: 1117-1128.
- Antonio-Andrade**, T. 2010. Micorrizas: antigua interacción entre plantas y honos. Comunicaciones libres. *Ciencia*: 84-88.
- Arditti**, J. 1993. Micropropagación of orchids. Ed. John Wiley and Sons, New York. 949 p.
- Arditti**, J. 2008. Micropropagation of Orchids. 2nd. Edition. Volumen I y II. Blackwell Publishing, PAIS. 1523 p.
- Athipunyakom**, P., Manoch, I. y Piluek, C. 2004. Isolation and identification of mycorrhizal fungi for eleven terrestrial orchids. *Kasetstart J. Nat. Sci.* 216-228.
- Atwood**, J. T. 1986. The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. *Selbyana* 9: 171-186.
- Bayman**, P., Lebrón, L. L., Tremblay, R .L. y Lodge, D. J. 1997. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). *New Phytol.* 135: 143-149.
- Bayman**, P., Mosquera-Espinosa, A. T. y Porras-Alfaro, A. 2011. Mycorrhizal Relationships of *Vanilla* and Prospects for Biocontrol of Root Rots. Pp. 266-280. En: D. Havkin Frenkel y F. Belanger (Eds.). *Handbook of Vanilla. Science and Technology*, Blackwell Publishing, UK.

Bayman, P. y Otero, J. T. 2006. Microbial endophytes of orchid roots. Pp. 153-178. En: B. Schulz, C.J. Boyle y T. N. Sieber (Eds.). Microbial root endophytes. Vol 9, Springer, Berlin, Heidelberg.

Bechtel, H., Cribb, P. y Luanert. E. 1981. The Manual of cultivated orchids species. Ed. Eugen Ulmer GmbH and Co. West Germany. 444 p.

Benzing, D. H., D. W. Ott y Friedman, W. E. 1982. Roots of *Sobralia macrantha* (Orchidaceae): structure and function of the velamen-exodermis complex. Amer. J. Bot. 69: 608-614.

Benzing, D. y Seeman, J. 1978. Nutritional piracy y host decline: a new perspective on the epiphyte-host relationship. Selbyana 2: 133-148.

Billard, C. E., Dalzotto, C. A. y Lallana, V. H. 2014. Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*. Polibotánica (38): 145-157.

Blaxter, M. 2003. Couting angels whith DNA. *Nature* 421: 121-124.

Bojorges Baños, J. C y López-Mata iniciales. 2005. Riqueza y diversidad de especies de aves en una selva mediana subperennifolia en el estado de Veracruz, México. *Acta Zongolica Mex.* 21(1): 1-20.

Bougoure, J. J., Bougoure, D. S., Cairney, J. W. y Dearnaley, J. W. 2005. ITS-RFLP and sequence analysis of endophytes from *Acianthus*, *Caladenia* and *Pterostylis* (Orchidaceae) in southeastern Queensland. *Mycol. Res.* 109(4): 452-460.

Bougore, J., Ludwig, M., Brundrett, M. y Grierson, P. 2009. Identify and specificity of the fungi forming mycorrhizas with the rare mycoheterotrophic orchid *Rhizanthella gardneri*. *Mycol. Res.* 113: 1097-1106.

Brundrett, M. C. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol.* 154: 275-304.

Cando-Naula. M. P. y Cárdenas Pugo. M. V. 2017. Determinación mediante aislamiento y purificación de hongos potencialmente micorrízicos en las raíces de seis especies de orquídeas en el cantón Gualaceo, provincia del Azuay. Tesis de licenciatura.

Carling D. E. y Kuninaga S. 1990. DNA Base Sequence Homology in *Rhizoctonia solani* Kuhn: inter and Intragroup Relatedness of Anastomosis Group-9, *Phytopathology* 80:1362-1364, EE.UU.

Carling, D., Pope, E., Brainard, K., y Carter, D. 1999. Characterization of mycorrhizal isolates of *Rhizoctonia solani* from an orchid, including AG-12, a new anastomosis group. *Phytopath.* 64: 492-496.

Castañeda-Zárate, M., Vicón-Esquivel, J., Ramos-Castro, S. E y Solano-Gómez, R. 2012. Registros nuevos de orquidaceae para Veracruz, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83: 281-284.

Castro, A., Sánchez S. y A. Allen. 2010. Diagnóstico rural participativo del ejido de Chavarrillo Veracruz. Reporte del taller participativo. Instituto de Ecología A. C.

Chávez, K. H., Mosquera, Espinosa. A. T y Otero, Ospina. J. T. 2014. Propagación *in vitro* de la semillas de la orquídea *Comparettia falcata* Poepp. y Endl. (Orchidaceae) mediante técnicas simióticas y asimbióticas.

Cilliers, A. J., Herselman, L. y Pretorius, Z. A. 2000. Genetic variability within and among mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* in South Africa. *Phytopathology* 90: 1026-1031.

Clements, M. A., Muir, H. y Cribb, P. J. 1986. A preliminary report on the symbiotic germination of European terrestrial orchids. *Kew Bull.* 41: 437-445.

Clements, M. A. 1988. Orchid mycorrhizal associations. *Lindleyana* 3: 73-86.

Contreras, A., Osorio, M. L., Brewster, P., Franco, P. F., Salomón, O., Moreno Y. y Ramos, A. L. 2008. *Estudio de la biodiversidad de La Barranquilla, Chavarrillo, municipio de Emiliano Zapata, Veracruz*. Proyecto CONAFOR S20073003515.

Crespo-Santander, A. P. y Ortega-Guaricela. M. B. 2015. Aislamiento de Micorrizas y Evaluación de la Germinación Simbiótica de las Semillas de las Orquídeas en el orquideario de la Universidad de la Cuenca. Tesis de licencatura

Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. New York, Columbia University Press. 1262 p.

Cruz-Paredes, L. y Cruzado-Cardiel, M. 2009. Conociendo las plantas de mi localidad. Manual de alumnos y profesores. Centro de Investigaciones Tropicales, Universidad Veracruzana. Sitio oficial: <http://reservaeleden.org/plantasloc/>.

Cruz-Blasí, J. 2007. Colonización micorrízica y diversidad de hongos micorrízicos en algunas especies de orquídeas epífitas tropicales del sureste de Chiapas, México. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. Montecillos, México. 77 p.

Cubeta, M. A. y Vilgalys, R. 2000. *Rhizoctonia*, En: pp. 109-117, Encyclopedia of Microbiology, Academic Press 4, EE.UU.

Currah, R. S. 1991. Taxonomic and developmental aspects of the fungal endophytes of terrestrial orchid mycorrhizae. *Lindleyana* 6: 211-213.

Currah, R. S., Singl, L y Hambleton, S. 1987. New records and taxa of fungi from the mycorrhizae of terrestrial orchids of Alberta. *Canad. J. Bot.* 65: 2473-2482.

Currah, R. S. y Zelmer, C. D. A. 1992. Key and notes for the genera of fungi with orchids and a new species in the genus *Epulorhiza*. *Reports Tottori Mycol. Inst.*, 30: 43-59.

Currah, R. S., Zettler, L. W. y Mcinnis, T. M. 1997. *Epulorhiza inquilina* sp. nov. from *Platanthera* (Orchidaceae) and a key to *Epulorhiza* species. *Mycotaxon* 61: 338-342.

De la Cruz-Cristobal, G. 2017. Diversidad de orquídeas riparias en Amecatipa, Benito Juarez, Veracruz. Poster presentado en el IV Encuentro Mexicano de Orquideología. México CDMX.

Dearnaley, J. 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza* 17: 475–486.

Dearnaley, J. W. D. y Le Brocq, A. F. 2006. Molecular identification of the primary roots fungal endophytes of *Dipodium hamiltonianum* (ochdaceae). *Aust. J. Bot.* 54: 487-491.

Dhamankar, V. S. 1992. Molasses, a source of nutrients for *in vitro* sugar cane culture. *Sugar Cane* 4: 14-15.

Dickinson, S. 1965. *Trichocentrum stramineum*- Mexicos's Rarest Orchid. Am. Orch. Soc. Bull. 3 (11): 969-970.

Dressler, R. L. 1993. Phylogeny and classification of the Orchid Family. Cambridge University Press, Cambridge. 314 p.

Dressler, R. L. 2005. How many orchid species? Selbyana 26: 155-158.

Durán, C., Rivero, M. y Seeman, P. 2007. Identificación de endomicorizas en la orquídea nativa *Gavilea araucana* (Phil) correa. Agro sur 35(2): 68.

Eccardi, F. y Becerra, R. 2003. Las orquídeas en la CITES, entrevista A Eric Hágster. CONABIO. Biodiversitas 49: 12-15.

Espejo, S. A. J., García, C. A. R., López, F. R., Jiménez, M. L. y Sánchez, S. 2002. Orquídeas del Estado de Morelos. Herbario AMO. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D. F. México. 332 p.

Espejo, S. A. y López-Ferrari, A. R. 1998. Las monocotiledóneas mexicanas una sinopsis florística 1. Lista de referencia Parte VII. Orchidaceae I. Consejo Nacional de la Flora de México, A. C., Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Consejo Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, DF. 90 p.

Flores-Palacios, A. y García-Franco, J. G. 2008. Habitat isolation change the beta diversity of the bascular epiphyte community in lower montane forest, Veracruz, México.

Flores-Palacios, A. y Valencia-Díaz, S. 2007. Local illegal trade reveals unknow diversity and involves a high species richness of wild vascular epiphytes. Biol. Cons. 136: 372-387.

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

Frank, B. 2005. "On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an English translation of A.B. Frank's classic paper of 1885)" (PDF). *Mycorrhiza*. 15 (4): 267–275. doi:10.1007/s00572-004-0329-y.

Gilchist, L., Fuentes, C., Marínez, R., López, R., Singh, M. y García, A. 2005. *Guía practica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada*. México: CIMMYT.

Glass, N .L., Jacobson, D. J., y Shiu, P. K. T. 2000. The genetic of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *An. Rev. of Gen.* 34: 165-186.

Góes-Junghams, T., da Silva Souza, A., dos Santos-Serejo, J. y Vidigal, F. 2009. Reducao de custos na Micropopragaçao. En: Cap. 6. Aspectos Práticos da Micropopragaçao de Plantas. Góes-Junghams. T. y da Silva Souza, A. (Eds.). Editorial: EMBRAPA Cruz das Almas. Brasil.

González, M. 2008. Aspectos de sistemática y biología del género *Rhizoctonia*. *Fitosanidad* 12(3): 148.

González, D., Carling, D. E., Kininaga, S., Vilgalys, R. y Cubeta. 2001. Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. *Mycologia* 93: 1138–1150.

González, V., Salazar, O., Julián, M. C., Acero, J., Portal, M. A., Muñoz, R., López, H., Gómez, E., López, P. y Rubio, V. 2002. *Ceratobasidium albasitensis*, a New *Rhizoctonia*-Like Fungus Isolated in Spain. *Persoonia* 17: 601-614.

González-Tamayo, R. 2006. Reseña de "Las orquídeas de México". *Acta Botánica Mexicana* : 101-103.

Gravendeel, B., A. Smithson, Slik, F.J.W. y A. Schuiteman. 2004. Epiphytism and pollinator specialization: drivers for orchid diversity? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*.

Gregory, T. R. 2005. DNA barcoding does not compete with taxonomy. *Nature* 434:1067.

Guerrero, E., Azcón-Aguilar, C., Barea, J. M., Moyerson, B., Orozco, C., Saavedra, C., Mejía, D., Mayer, J., Rivillas, C. y Rivera de Busto, E. 1992. Micorrizas. Recurso biológico del suelo. Cali: Universidad Javeriana de Colombia.

Guzmán, S. N. A. y Moreno, C. B. J. 2014. Efecto de la altitud en la composición y riqueza de hongos Micorrízicos de orquídeas epífitas en bosques montano altos del sur del Ecuador.

Hadley, G. 1982. Orchid mycorrhizae. p. 83-118. En: J. Arditti (ed.). *Orchid Biology: reviews and perspectives II*. Comell University, Ithaca, Nueva York.

Hadley, G. 1986. Mycorrhiza in tropical orchids, p.154- 159. En: A. N. Rao (ed.). Proceeding of the 5th Asian Orchid Congress Seminar, Singapur. Park and Recreation Deparment, Ministry of National Development, Singapur.

Hágsater, E., Soto Arenas, M. A., Salazar Chávez, G. A., Jiménez Machorro, R., López Rosas, M. A. y Dressler, R. L. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México,.

Halffter, G. y Moreno, C. E. 2005. Significado biológico de las diversidades alfa, beta y gamma. Pp. 518. En: Halffter,

Herbert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. y deWaard, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Prc. R. Soc. Lond. B* 270: 313-321.

Herbert, P. D. D., Penton E. H., Burns. J. M., Janzen. D. H. y Hallwachs, W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. of the Nat. Acad. of Sc.* 101: 14812-14817.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) consultado 23 agosto 2017, Mapa interactivo <http://www.beta.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=702825263485>

Kottke, I., Suárez, J. P., Herrera, P., Cruz, D., Bauer, R., Ingerbrg, H. y Garnica, S. 2010. Atractiellomycetes belonging to the 'rust' lineage (*Pucciniomycotina*) form mycorrhizae with terrestrial and epiphytic neotropical orchids. *Proceedings of the Royal Society, B, Biol. Sc.* 277: 1289–1298.

Kristiansen, K. A., Freudenstein, J. V., Rasmussen, F. N. y Rasmussen, H. N. 2004. Molecular identification of mycorrhizal fungi in *Neuwiedia veratrifolia* (Orchidaceae). Mol. Phyl. and Evol. www.elsevier.com/locate/ympev.

Krömer, T., Acebey, A. y Gómez Pompa, A. 2010. Atlas de la flora de Veracruz, un patrimonio natural en peligro. En: A. Gómez-Pompa, T. Krömer y R. Castro-Cortés (eds.). Gobierno del Estado de Veracruz: Comisión del estado de Veracruz para la Conmemoración de la Independencia Nacional y la Revolución Mexicana: Universidad Veracruzana, México.

Larkin, R. P., Hopkins, D. L. y Martin, F. N. 1990. Vegetative compatibility within *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and its relationship to virulence, aggressiveness, and race. Can. J. of Microb. 36: 352-358.

Lesica, P. y Antibus, R. K. 1990. The occurrence of mycorrhizae in vascular epiphytes of two Costa Rican rain forests. Biotropica 22: 250-258.

Marchisimo, V. P., Berta, G., Fontana, A., y Mannina, P. M. 1985. Endophytes of wild orchids native to Italy: their morphology, caryology, ultrastructure and cytochemical characterization. New Phytol. 100: 623-64.

McCormick, M. K., Whigham. D. F. y O'Neill. J. P. 2004. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. New Phytol. 163: 425-438.

McCormick, M. K., Taylor, D. I., Juhaszova, K., Burnett, R. K., Whigham, D. F. y O'Neill, J. P. 2012. Limitation on orchid recruitment: not a simple picture. Mol. Ecol. 21: 1511-1523.

Monaghan, M. T., Balke, M T. R. y Vogler, A. P. 2005. DNA- based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear marker. *Philosophical Trans. of Royal Society B*. 360: 1925-1933.

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

Moore, R. T. 1987. The Genera of *Rhizoctonia*-Like Fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen. Nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Moniliopsis*, and *Rhizoctonia*, Mycotaxon 29:91-99, EE.UU.

Moore, R. T. 1996. The Genera of *Rhizoctonia*-Like Fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen. Nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Moniliopsis*, and *Rhizoctonia*, Mycotaxon 29: 91-99.

Morales, R. V. 2003. Plantas medicinales silvestres de ChaVarrillo, *Municipio de Emiliano Zapata*. Tesis de licenciatura, Facultad de Biología, Universidad Veracruzana, México. 61 p.

Moreno-Martínez, D. 2011. Estudios de germinación *in vitro* e *in situ* de *Epidendrum parkinsonianum* Hook. y *Acineta barkeri* (Bateman) Lindl. (Orchidaceae). Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Tropicales, Universidad Veracruzna, México.112 p.

Mosquera, A., Bayman, P. y Otero, J. 2010. *Ceratobasidium* como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia. Red de revistas científicas de América Latina y el Caribe 59(3): 317.

Nadkarni, N. M. y Matelson, T. J. 1991. Fine litter dynamics within the tree canopy of a tropical cloud forest. Ecology 72: 2071-2082.

Nadkarni, N. M., Schaefer, D., Matelson, T. J. y Solano, R. 2002. Comparison of arboreal and terrestrial soil characteristic in a lower montane forest, Monteverde, Costa Rica. Pedobiologia 46: 24-33.

Neto, L. M., Forzza, R. C. y Zappi, D. 2009. Angiosperm epiphytes as conservation indicators in forest fragments: A case study from southeastern Minas Gerais, Brazil. Biod. and Con. 18: 3785-3807.

NOM-059-ECOL-2010. 2010. Protección ambiental. Especies nativas de México de flora y fauna silvestres. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario oficial de la federación 2da edición.

Nontachaiyapoom, S. S., Sawitree y Manoch, L. 2010. Isolation and identification of *Rhizoctonia*-like fungi from roots of three orchid genera, *Paphiopedilum*,

Dendrobium, and *Cymbidium*, collected in Chiang Rai and Chiang Mai provinces of Thailand. Mycorrhiza 20: 459-471.

Noval, B. M., Oria, A., Casadesus, L. y Gómez, M. 1999. Aislamiento, caracterización e inoculación con endomicorizas orquídeales en especies de orquídeas. Revista Chapingo serie horticultura 5(1): 151-154.

Ogoshi, A., Oniki, M., Araki, T. y Ui, T. 1983. Studies of the Anastomosis Groups of Binucleate *Rhizoctonia* and Their Perfect States. J. of the Faculty of Agriculture 61(2): 244-260, Japón.

Oliveira, L. D. 2006. Caracterizaçao morfologica de micorrizas de *Epidendrum secundum* e *Zygotepetalum mackaii* nativas do Parque estadual da Serra do brigadeiro (MG). Tesis de Posgrado, Universidad Federal de Vicoso, Minas Gerais Brazil. 46 p.

Ordoñez, S. L., Zhunio, P., Priscila, D., Salazar, J. M. y Peña Tapia, D. F. 2016. Especificidad del hongo micorrízico (*Rhizoctonia* sp.) en *Phalaenopsis* sp., *Cymbidium* sp., *Trichoceros antenifer*, *Oncidium excavatum* y *Cyrtochilum* sp.

Ortega-Larrocea, M. P. 2008. Propagación simbiótica de orquídeas terrestres con fines de restauración edafocoológica. Pp. 85-96. En: Alvarez-Sánchez, J. y Monroy-Ata, A. (Comp.). Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración, Facultad de Ciencias, UNAM. México. D. F.

Otero, J. T., Ackerman, J. y Bayman, P. 2002. Diversity and host Specificity of mycorrhizal fungi from tropical orchids. Am. J. of Bot. 89(11): 1852- 1858.

Otero, T., Ackerman, J. y Bayman, P. 2004. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. Mol. Ecol. 10: 207-212.

Otero, O. J. T. y Bayman, P. 2009. Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epifitas. Acta Agronómica 58 (4):

Otero, J. T., Bayman, P. y Ackerman, J. D. 2005. Variation in mycorrhizal performance in the epiphytic orchid *Tolumnia variegata* *in vitro*: the potential for natural selection. Evol. Ecol. 19: 29-43.

Otero, J. T., Flanagan, N., Herre, E. A., Ackerman, J. y Bayman, P. 2007. Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid, *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). Am. J. Bot. 94: 1944-1950.

Otero, J. T., Mosquera, A. T. y Flanagan, N. S. 2013. Tropical orchid mycorrhizae: potential applications in orchid conservation, commercialization, and beyond. In Fourth Scientific Conference on Andean Orchids. *Lankesteriana* 13(1-2): 57-63.

Otero, J. T., Thrall, P. H., Clements, M. A., Miller, J. T. y Burdon, J. J. 2011. Co-diversification of orchids (Pterostylidinae) and their associated mycorrhizal fungi. Austral. J. Bot. 59: 480-497.

Ouyang, T., Chen, S., Wang, F. S. 2006. Key Technology study on *Oncidium* industrial propagation by tissue culture. Forest Research 19(5): 606-611.

Parmerter, J. R. 1970. *Rhizoctonia solani*: Biology and Pathology. University of California Press, Berkeley, CA, EE.UU.

Parmerter, J. R. y Whitney, H. S. 1970. Taxonomy and Nomenclature of the Imperfect State. *Rhizoctonia solani*: Biology and Pathology, University of California Press. Berkeley, CA, EE.UU.

Pereira, O., Kasuya, M., Borges, A., y Fernandes de Araujo, E. 2005a. Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. Can. J. Bot. 83: 54 - 65.

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

Pereira, O. L., Kasuya, M. C. M., Rollemburg, C. D. y Chaer, G. M. 2005b. Isolation and identification of *Rhizoctonia-like* mycorrhizal fungi associated with three species of neotropical epiphytic orchids in Brazil. Rev. Bras. Ciencia do Solo 29: 191-197.

Pereira, O. L., Rollemburg, C. L., Borges, A. C., Matsuoka, K. y Kasuya, M .C. M. 2003b. *Epulorhiza epiphytica* sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. Mycoscience 44: 153-155.

Pereira, O. L., Rollemburg, C. L y Kasuya, M. C. M. 2003a. Association des mycorhizes dans les orchidées –perspectives d'util.

Pierik, R. L. 1990. Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Ed. MundiPrensa. Madrid, España. 326 p.

Pilz, D., McLain, R., Alexander, S., Villarreal-Ruiz, L., Berch, S., Wurtz, T. L., Parks, C. G., McFarlane, E., Baker, B., Molina, R y Smith, J. E. 2007. Ecology and management of morels harvested from the forests of western North America. Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-710. Portland, OR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station.

Pope, E. J. y Carter, A. 2001. Phylogenetic placement and host specificity of mycorrhizal isolates AG-6 and AG-12 in the *Rhizoctonia solani* species complex. Mycologia 93: 712–719.

Porembski, S. y Barthlott, W. 1988. Velamen radicum micromorphology and classification of Orchidaceae. Nordic J. Bot. 8: 117-137.

Porras-Alfaro, A. y Bayman, P. 2007. Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. Mycologia 99(4): 510-525.

Prakash, S., Hoque, M. y Brinks, T. 2004. Incorporation of low cost options. In: International Atomic Energy Agency. Low cost options for tissue culture technology in developing countries.

Quintero-Torres. 2012. Caracterización molecular de micorrizas de orquídeas del género *Teagueia* spp. (Trabajo de Titulación de Bioquímico farmacéutico). UTPL, Loja.

Ramsay, R. R., Sivasithamparam, K. y. Dixon, K. W. 1987. Anastomosis groups among *Rhizoctonia* like endophytic fungi in southwestern Australian Pterostylis species (Orchidaceae). Lindleyana 2: 161-166.

Rangel-Villafranco, M. 2003. Aislamiento de hongos micorrízicos de orquídeas terrestres de la Reserva “El Pedregal” de San Ángel, México. D. F. Tesis de

Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores, Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 114 p.

Rasmussen, H. N. 1995. Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plants. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 444 p.

Rasmussen, H. N. y Whigham, D. F. 2002. Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. *New phytologist* 145 (3): 797-807.

Rasmussen, H. N. y Rasmussen, F. N. 2007. Trophic relationships in orchid mycorrhiza – diversity and implications for conservation. *Lankesteriana* 7(1-2): 334-341.

Rendón-Lara, C. E. 2014. Germinación asimbiótica y simbiótica de *Chysis bractescens* y aislamiento de hongos micorrízicos de *Cynoches ventricosum*. Tesis de licenciatura, Universidad Veracruzana, México. 87 p.

Richardson, K. A., Currah, R. S. y Hambleton, S. 1993. Basidiomycetous endophytes from the roots of Neotropical epiphytic Orchidaceae. *Lindleyana* 8: 127-137.

Rivas, M., Warner, J. y Bermúdez, M. 1998. Presencia de micorrizas de orquídeas de un jardín botánico neotropical, revista de Biología Tropical 46 (2): 211-216.

Rodríguez, P., Soberón, J. y Arita, H. T. 2003. El componente beta de la diversidad de mamíferos de México. *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.) 89: 241-259.

Roy, M., Watthana, S., Stier, A., Richard, F., Vessaburt, S. y Selossé, M. A. 2009. Two mycoheterotrophic orchids from Thailand tropical dip-terocarpaceae forest associate with a broad diversity of ectomycorrhizal fungi. *BCM Biology* 7: 51.

Ruiz, G. E. 1997. Diagnóstico nutrimental y validación en los resultados del cultivo del limón (*Citrus latifolia* tan.) en la región de Chavarrillo, Ver. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo. Departamento de suelos. 96 p.

Rubio, V., González, V., Portal, M., Acero, J., Salazar, O. y Sneh, B. 2000. Molecular phylogeny of *Ceratobasidium* spp. (BNR) based on rDNA-ITS sequences. Third international symposium Rhizoctonia. National Chung Hsing University. p. 12 - 13.

Rzendorfki, J. 1978. Vegetación de México. Limusa. México. 432 p.

Rzendowski, J. 2006. Vegetación de México Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 1^{ra}. edición, México. 504 p.

Saitou, N. y Nei, M. 1987. The neighbor-Joining method: A new method for reconstructing phylogenetics trees. Mol. Biol. and Evol. 4: 406-425.

Sarukhán, J., Soberón, J. y Larson-Guerra, J. 1996. Biological conservation in a high beta-diversity country. 246-263 pp. En: Di Castri, F. y T. Younès (eds.). Biodiversity science and development: towards a new partnership. CAB International.

Savolainen, V., Crowan, R. S., Vogler, A. P., Roderick, G. K. y Lane, R. 2005. Towars writing the encyclopedia of life: and introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transaction of the Royal Society B*. 360: 1805-1811.

Schindel, D. E. y Miller, S. E. 2005. DNA barcoding a useful tool taxonomists. Nature 435: 17.

SEMARNAT, 2003. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. 6 de marzo del 2002.

Shan, X., Liew, E., Weatherhead, M y Hodgkiss, I. 2002. Characterization and taxonomic placement of *Rhizoctonia-like* endophytes from orchid roots. Mycologia 94 (2): 230239.

Sharon, M., Kuninaga, S., Hyakumachi, M. y Sneh, B. 2006. The advancing identification and classification of *Rhizoctonia* spp. using molecular and biotechnological methods compared.

Shefferson, R. P., Taylor, D. L., Weiss, M., Garnica, S., McCormick, M. K., Adams S y Gray, H. M. 2007. The evolutionary history of mycorrhizal specific city among lady's slipper orchids. Evolution 61: 1380–1390.

Shimura, H., Sadamoto, M., Matsuura, M, Kwahara, T., Naito, S y Koda, Y. 2009. Characterization of mycorrhizal fungi isolate from the threatened *Cypripedium Macranthos* in a northern island of Japan: two phylogenetically distinct associated with the orchid. Mycorizza 19: 525-534.

Smith, S. y Read, D. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3era. Ed. Academic Press. 800 p.

Smith, Z. F., James, E. A. y McLean, C. B. 2010. Mycorrhizal specificity of *Diuris fragrantissima* (Orchidaceae) and persistence in a reintroduced population. *Austral. J. of Bot.* 58: 97–106.

Sneh, B. L., Burpee y Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. The American Phytopathological Society, APS Press, EE.UU.

Solís-Montero, L., Flores-Palacios, A. Y. y Cruz- Angó. A. 2005. Shade- coffee plantations as refuges for tropical wild orchids in central Veracruz, México. *Con. Biol.*

Solórzano, G. B. 2009. La conservación de la vida salvaje. *La ciencia y el Hombre* 22: 4.

Soto-Arenas, M. A. 1988. Listado Actualizado de las orquídeas de México. *Orquídea* (Méx.) 11: 233-276.

Soto-Arenas, M. A. y Solano-Gómez, A. R. 2007. Ficha técnica de *Trichocentrum stramineum*. En: SotoArenas, M. A. (compilador). Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM- 059-ECOL-2000. Instituto Chinoín A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029. México. D. F.

Sturz, A. V., Christie, B. R., Nowak, J. 2000. Bacterial Endophytes: Potential Role in Developing Sustainable Systems of Crop Production Critical Reviews in Plant Sciences 19(1):1–30.

Suárez, J. P., M. Weib, Abele, A., S. Garnica, Oberwinkler, F. e I. Kottke. 2006. Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycological Research* 110: 1257–1270.

Suárez, J. P. y Kottke, I. 2016. Main fungal partners and different levels of specificity of orchid mycorrhizae in the tropical mountain forests of Ecuador. *Lankesteriana* 16:

Taylor, D. L, Bruns T. D, Leake, J. R y Read, D. J. 2002. Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. 375–413 pp. En: Sanders, I., van der Hinden M. (Eds.). Mycorrhizal Ecology. Vol. 157. Springer, Berlin.

Tavieso, R. 2012. Producción de hongos ectomicorrízicos *Suillus huteus* (Linnaeusex Fries) Gray en Reactor Agitado. Tesis Universidad de San Sebastian, Chile.

Tiz-Arias, G. 2010. Propagación *in vitro* de las orquídeas *Dendrobium*, *Laelia anceps*, *Phalaenopsis* y *Sobralia xantholeuca*. Tesis de Ciencias Químicas. Universidad Veracruzana, México.

Tsutsui, K. y Tomita, M. 1986. Symbiotic germination of *Spiranthes sinensis* Ames associated with some orchid endophytes. J. Fac. Agric. Hokkaido Univ. 62: 440-452.

Uetake, Y., Kobayashi K. y Ogoishi, A. 1992. Ultrastructural changes during the symbiotic development of *Spiranthes sinensis* (Orchidaceae) protocorrens associated with binucleate *Rhizoctonia* anastomosis group C. Mycol. Res. 96: 199-209.

Valadares, R. B. S., Pereira, M. C., Otero, J. T y Cardoso. E. J. 2012. Narrow fungal Mycorrhizal Diversity in *Coppensia doniana*. Biotropica 44: 114–122.

Vilgalys, R. y González, D. 1990. Organization of Ribosomal DNA in the Basidiomycete *Thanatephorus praticola*, Curr. Genet. 18: 277-280, Alemania.

Volk, T. J. y Leonard, T. J. 1990. Cytology of the life-cycle of *Morchella*. Mycol. Res. 94: 399-406.

Vovides, A. P. 1981. Lista preliminar de plantas mexicanas raras o en peligro de extinción. Biótica 6: 219-228.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 315–322 pp. En: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (Eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press Inc., New York.

Wiard, L. 1987. An introduction to the Orchids of Mexico. Comstock. Pub. Assoc. Hardcover. 239 p.

Williams, N. H. et al., 2001. Molecular systematics of the Oncidiinae based on evidence from four DNA sequence regions: expanded circumscriptions of *Cyrtochilum*, *Erycina*, *Otoglossum*, and *Trichocentrum* and a new genus (Orchidaceae).

Yuan, Z. L, Chen, Y. C. y Yang, Y. 2009. Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting an epiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*): estimation and characterization. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25: 295-303.

Yuan, L., Yang, Z. L., Li, S. Y., Hu, H. y Huang, J. L. 2010. Mycorrhizal specificity, preference, and plasticity of six slipper orchids from South Western China. *Mycorrhiza* 202 (8): 559-556.

Zettler, L. W., Piskin, K. A., Stewart, S. L., Hartsock, J. J., Bowles, M. L. y Bell, T. J. 2005. Protocorms mycobionts of the federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea* (Nutt.) Lindley, and technique to prompt leaf elongation in seedlings. *Mycology* 53: 163-171.

Zettler, L. W.; Wilson D. T., Sunley, J. A. 2013. Seed propagation of the epiphytic green-fly orchid, *Epidendrum conopseum* R. Brown, using it is endophytic fungus. *Selbyana* 19(2): 249-253.

Zhu, G. S., Yu, Z. N., Gui, Y. y Liu, Z. Y. 2008. A novel technique for isolating orchid mycorrhizal fungi. *Fungal Divers.* 33: 123-137.