

## Hongos endófitos en raíces de orquídeas del estado de Morelos

Luis Israel Tapia Serrano, Rosa Cerros Tlatilpa, César Gallegos Vázquez

Laboratorio de Sistemática y Morfología Vegetal, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad  
Autónoma del Estado de Morelos

### INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae es una de las más grandes y diversas de plantas con flores, comprende 800 géneros y alrededor de 30,000 especies en el mundo (Dressler, 1993; Dressler, 2005). En México, consiste en 170 géneros y 1270 especies (Soto-Arenas et al., 2007). En el estado de Morelos se registran 47 géneros y 143 especies (Espejo-Serna et al., 2002), aunque esta cifra puede incrementarse debido a la falta de actualización.

El 73 % de orquídeas en el mundo son epífitas (Dressler, 1993), es decir, crecen sobre otras plantas y las utilizan como soporte, esto les ofrece mayor disponibilidad de luz solar, sin embargo, también les adjudica desventajas, como la competencia por agua y nutrientes (Rudolph et al., 1998), es por esto, que sus raíces se han adaptado para desempeñar varias funciones tales como: dar soporte a la planta, permitir la absorción de agua y nutrientes, y ser el lugar de simbiosis con los hongos micorrízicos (Figueroa et al., 2008). Es importante destacar que todas las orquídeas epífitas, son plantas fotosintéticas en la etapa adulta, por lo tanto, son capaces de realizar fotosíntesis (Leaker, 1994).

Los miembros de la familia Orchidaceae se caracterizan por sus asociaciones simbióticas con hongos micorrízicos (Rasmussen y Whigham 2002) pertenecientes al género *Rhizoctonia*. Durante la germinación de las semillas, la mayoría de las simbiosis micorrízicas se dan con hongos de este grupo (Vij et al., 2002). Estos hongos son fundamentales para su crecimiento, debido a que en la naturaleza las semillas no pueden germinar, ya que carecen de una reserva de nutrientes

(endospermo), por lo que los hongos proporcionan los elementos necesarios (nutrientes, minerales, agua y carbono), para que las semillas pueden desarrollarse, las cuales posteriormente en su etapa adulta, le proporcionarían nutrientes al hongo (Kuga et al., 2014; Sathiyadash et al., 2020).

La obtención de nutrientes se genera por los procesos de colonización y degradación, y la más común es la tolipofagia y consiste en dos fases. La primera fase consiste en la formación de enrollamientos hifales (pelotones) en las células del córtex, en esta fase el hongo invade los tejidos vivos. La segunda fase consiste en la destrucción del micelio por autólisis o por parte del huésped para poder digerirlo. El menos común es la ptiofagia, la cual consiste en el colapso de células individuales por autólisis o por parte del huésped, en el cual se desintegra la punta de la hifa para liberar citoplasma y la pared celular queda formando masas (tisoma) para después ser digerido (Burges, 1939; Leaker, 1994).

La relación simbiótica entre los hongos y las orquídeas es muy importante, radica en la posible germinación de las semillas y la toma de nutrientes, alguna alteración negativa de estos puede producir que los procesos físicos de la planta se vean afectados. Por tanto, la distribución de orquídeas se ve influenciada por la presencia de hongos micorrízicos con los que hacen asociaciones (Jacquemyn et al., 2017).

## **OBJETIVO**

El objetivo consiste en comparar la colonización micorrízica en las raíces entre especies obtenidas de invernadero y de cultivo en casa.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## Especies de estudio y procesamiento de las muestras

Se obtuvieron raíces de tres especies de orquídeas: *Encyclia meliosma* (Rchb. f.) Schltr., *Guarianthe aurantiaca* (Bateman) Dressler & W.E. Higgins y *Trichocentrum pachyphyllum* (Hook.) R. Jiménez & Carnevali. *Encyclia meliosma* y *Guarianthe aurantiaca* se obtuvieron de colecta autorizada del orquideario “Olga María Sosa Clavero” de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y *Trichocentrum pachyphyllum* de cultivo personal en casa.

Se colectaron raíces maduras de cada planta y se envolvieron en toallas húmedas hasta su procesamiento en el laboratorio. Posteriormente, se obtuvieron cortes transversales a mano alzada y se fijaron por un día en FPA (etanol 95 %, ácido propiónico, formalina al 37 %, y agua destilada en proporción 10:1:2:7). Las muestras se procesaron de acuerdo con Phillips y Hayman (1970) con las siguientes modificaciones: de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10 % a 20° C a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3.5 % a temperatura ambiente, HCl al 3 % a HCl al 25 % por 5 minutos. Los cortes se aclararon y para ello se sumergieron en KOH al 10 % a 90° C durante 2 horas, luego se lavaron con KOH fresco al 10 %, y se transfirieron a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3.5 % por 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente se acidificó con HCl al 25 % por 5 minutos. Seis secciones de la raíz se montaron en portaobjetos y se elaboraron dos laminillas. En la primera se tiñeron los cortes con el método de Alexander (1980), utilizando 2-3 gotas del colorante y los portaobjetos se flamearon de 4 a 5 veces. En la segunda laminilla se tiñeron los cortes de acuerdo con el método de Jiménez-Peña et al. (2018) con modificaciones de 0.01 % de fucsina ácida al 1 %, de fucsina ácida más 1 g de fenol y se agregaron 2-3 gotas del colorante. Todas las laminillas se observaron en un microscopio Nikon Eclipse 80i y se describieron de forma cualitativa los pelotones, su estado de digestión, se registraron las hifas y los engrosamientos phi. Se empleó la clasificación de Rasmussen y Whigham (2002) para determinar los estados de digestión de los pelotones: intactos (hifas sin digerir, con contenido plasmático completo), en proceso de digestión (hifas digeridas e hifas intactas) y digeridos (hifas no distinguibles). Se

empleó la propuesta de Van der Heijden y Sanders (2003) para la identificación de las células moniloides (propágulos de resistencia asexuales).

## **RESULTADOS**

Las tres especies estudiadas presentaron colonización micorrízica a lo largo de la raíz. Sin embargo, la intensidad de la colonización, el desarrollo de los pelotones y los engrosamientos phi variaron de acuerdo con el lugar de obtención. En *Trichocentrum pachyphyllum* se registró un nivel alto de colonización micorrízica en el córtex y en la exodermis. Así como varios pelotones en proceso de degradación, células moniloides, hifas y engrosamientos phi (Figura 1A), a su vez se observaron hifas, células moniloides y tisoma en el velamen (Figura 1B), de igual manera, se observó pelotones intactos y en proceso de digestión, células moniloides e hifas en la exodermis y en el córtex (Figura 1C), además, se observan hifas penetrando del velamen a la exodermis y del córtex a la exodermis y células moniloides en el córtex (Figura 1D). En *Guarlanthe aurantiaca* se registró nivel medio de colonización micorrízica en el córtex y en el velamen. También se observaron pelotones en proceso de digestión, engrosamientos phi en el córtex, desarrollo de hifas en el velamen (Figura 2 A-B), también se observaron pelotones y engrosamientos phi sin teñir (figura 2C). Por otra parte, se registraron hifas en el velamen intentado en la exodermis, al igual que un trozo de tisoma en el velamen (Figura 2D). En *Encyclia meliosma* se registraron bajos niveles de colonización micorrízica en el córtex con un pelotón digerido y engrosamientos phi más desarrollados que en las otras especies de este estudio. No se observó colonización a simple vista en el velamen (Figura 3 A-B). Sin embargo, se observaron conjuntos de células moniloides y varias hifas septadas, tanto en el córtex, la exodermis y el velamen (Figura 3 C-D).

## **DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN**

Se analizaron tres especies de orquídeas, de las cuales *Trichocentrum pachyphyllum* y *Encyclia meliosma* no tenían registro previo de colonización micorrízica. Las tres especies de orquídeas presentaron tanto tolipofagia, como ptiofagia. Con base en lo propuesto por Idris y Collins (2014), los engrosamientos phi pueden ser producidos por estrés hídrico, por lo que se puede hipotetizar que *Encyclia meliosma*, la especie que tuvo los engrosamientos phi más desarrollados y casi no se observaron pelotones, pero si se observaron células moniloides, las cuales sirven para la preservación del hongo dentro de la raíz de las orquídeas (Van der Heijden y Sanders 2003), tuvo un lapso de sequía, en el cual el hongo por falta de humedad tuvo que recurrir a la formación de células moniloides para su supervivencia.

*Trichocentrum pachyphyllum* es la especie con mayor colonización micorrízica de las especies estudiadas, por lo que se confirma lo observado por Vij et al. (2002), donde indica que las plantas de invernadero, en este caso orquideario, presentan una colonización pobre comparada con las plantas que se desarrollan de forma silvestre (la orquídea de cultivo en casa, expuesta a la intemperie).

Actualmente, la mayoría de las orquídeas enfrentan problemas como la fragmentación de hábitats, la contaminación, la deforestación, entre otros (Ortega-Larrocea y Rangel-Villafranco, 2007). Esto provoca que muchas poblaciones de orquídeas sean cada vez más reducidas e incluso únicas (Espejo-Serna et al., 2002), por tal motivo, es de suma importancia realizar estudios de los organismos que interaccionan con estas, en este caso los hongos, para poder informar a la población y crear programas para su conservación, antes de que sea demasiado tarde.

## **LEYENDA DE FIGURAS**

**Figura 1.** Cortes transversales de raíz de *Trichocentrum pachyphyllum* mostrando la colonización micorrízica. A. zona de colonización en el córtex, B. hifas y células moniloides en el velamen, C.

pelotones y células monilioides en el córtex, D. hifas penetrando la exodermis. Abreviatura: V velamen, EX exodermis, CO córtex, CV cilindro vascular, PI pelotón intacto, PPD pelotón en proceso de digestión, PD pelotón digerido, H hifa, T tisoma, CM células monilioides, EP engrosamientos phi.

**Figura 2.** Cortes transversales de raíz de *Guarlanthe aurantiaca* mostrando la colonización micorrízica. A, B. zona de colonización en el córtex, C. pelotones en el córtex, D. hifas en el velamen. Abreviatura: V velamen, EX exodermis, CO córtex, CV cilindro vascular, PI pelotón intacto, PPD pelotón en proceso de digestión, H hifa, T tisoma, CM células monilioides, EP engrosamientos phi.

**Figura 3.** Cortes transversales de raíz de *Encyclia meliosma* mostrando la colonización micorrízica. A, B. zona de colonización en el córtex, C. células monilioides e hifas septadas en el córtex, D células monilioides e hifas septadas en el córtex, exodermis y velamen. Abreviatura: V velamen, EX exodermis, CO córtex, CV cilindro vascular, PI pelotón intacto, PD pelotón digerido, H hifa, HS hifa septada, CM células monilioides, EP engrosamientos phi.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Ciencias Biológicas por permitir al primer autor el uso de los laboratorios durante el verano de la investigación científica. También a la coordinación del XXV Verano de la Investigación Científica en Morelos por la oportunidad de participar en este proyecto.

## **LITERATURA CITADA**

- Alexander MP. 1980. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. *Stain Technol*, 55(1): 13-18. <https://doi.org/10.3109/10520298009067890>
- Burges A. 1939. The defensive mechanism in orchid mycorrhiza. *New Phytol*, 38(3): 273-283. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1939.tb07105.x>
- Dressler RL. 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Timber Press, Incorporated.
- Dressler RL. 2005. How many orchid species? *Selbyana*, 26(1,2): 155-158. doi:10.2307/41760186
- Espejo-Serna A, García-Cruz J, López-Ferrari AR, Jiménez-Machorro R, Sánchez-Saldaña L. 2002. *Orquídeas del estado de Morelos*. México, D.F: Herbario AMO. 332 p. ISBN: 0300-3107
- Figuroa C, Salazar GA, Zavaleta HA, Engleman EM. 2008. Root character evolution and systematics in cranichidinae, prescottinae, and spiranthinae. *Ann Bot*, 101(4): 509-520. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm328>
- Idris NA, Collings DA. 2014. The life of phi: the development of phi thickening in roots of the orchids of the genus *Miltoniopsis*. *Planta*, 241(2):4 89-506. doi:10.1007/s00425-014-2194-z
- Jacquemyn H, Duffy KJ, Selosse MA. 2017. *Biogeography of mycorrhizal symbiosis*. Cham: Springer International Publishing. *Biogeography of orchid mycorrhizas*. P.159-177 doi:10.1007/978-3-319-56363-3\_8
- Jiménez-Peña N, Sandoval-Villa M, Volke-Haller VH, Pedraza-Santos ME, Fernández-Herrera E. 2018. Colonización micorrízica de *laelia autumnalis* (la llave & lex.) lindl. *Ecosistemas Recur Agropecu*. 5(15):547. <https://doi.org/10.19136/era.a5n15.1756>.

- Kuga Y, Sakamoto N, Yurimoto H. 2014. Stable isotope cellular imaging reveals that both live and degenerating fungal partners transfer carbon and nitrogen to orchid protocorms. *New Phytol*, 202 (2): 594-605. <https://doi.org/10.1111/nph.12700>
- Leaker JR. 1994. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytol*, 127(2): 171-216. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb04272.x>
- Ortega-Larrocea P, Rangel-Villafranco M. 2007. Fungus-assisted reintroduction and long-term survival of two mexican terrestrial orchids in the natural habitat. *Lankesteriana*, 7(1-2): 317-321. <https://doi.org/10.15517/lank.v7i1-2.19558>.
- Phillips JM, Hayman DS. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc*, 55(1): 158-161. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(70)80110-3)
- Rasmussen HN, Whigham DF. 2002. Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. *New Phytol*, 154(3): 797-807. Doi: <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00422.x>.
- Rudolph D, Rauer G, Nieder J, Barthlott W. 1998. Distributional patterns of epiphytes in the canopy and phorophyte characteristics in a western andean rain forest in ecuador. *Selbyana*, 19(1): 27-33. <http://www.jstor.org/stable/41759972>
- Sathiyadash K, Muthukumar T, Karthikeyan V, Rajendran K. 2020. Orchid biology: recent trends & challenges. Singapore: Springer Singapore; [accessed 2023 Aug 7]. Orchid mycorrhizal fungi: structure, function, and diversity, 239-280. [https://doi.org/10.1007/978-981-32-9456-1\\_13](https://doi.org/10.1007/978-981-32-9456-1_13).

Soto-Arenas MA, Hágsater E, Jiménez-Machorro R, Salazar-Chávez G, Solano-Gómez R, Flores R. 2007. Las Orquídeas de México. Catálogo Digital. Instituto Chinoín, A.C., Ciudad de México DVD.

Van der Heijden MG, Sanders IR. 2003. Mycorrhizal ecology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-38364-2>.

Vij SP, Lakhanpal TN, Gupta A. 2002. Techniques in mycorrhizal studies. Dordrecht: Springer Netherlands. Orchidoid mycorrhiza and techniques to investigate, 385-434. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-3209-3\\_21](https://doi.org/10.1007/978-94-017-3209-3_21)

Figura 1.

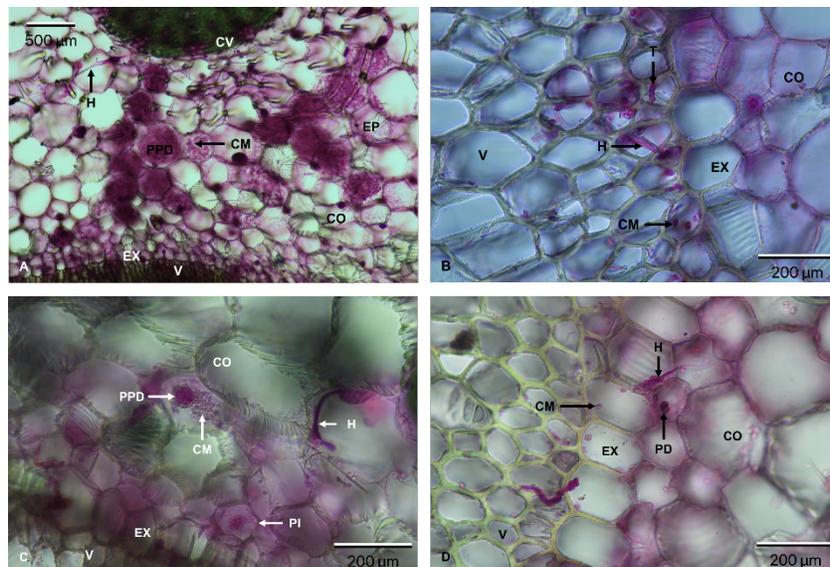


Figura 2.

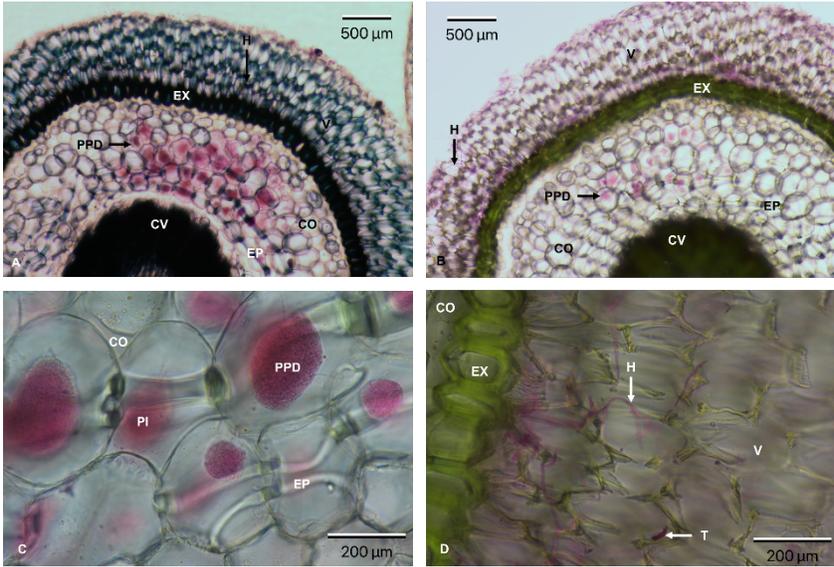


Figura 3.

