

**EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ASOCIACIÓN SIMBIÓTICA DE *Masdevallia*  
*coccinea* LINDEN EX LINDL. (ORCHIDACEAE) Y UN HONGO FORMADOR DE  
MICORRIZA**

NANCY FIORELA ORDÓÑEZ CASTILLO

TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial  
Para optar el título de

Bióloga

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTA DE CIENCIAS  
CARRERA DE BIOLOGÍA  
2006

## NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“ La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajo de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ASOCIACIÓN SIMBIÓTICA EN *Masdevallia coccinea* LINDEN EX LINDL. (ORCHIDACEAE) Y UN HONGO FORMADOR DE MICORRIZA**

NANCY FIORELA ORDÓÑEZ CASTILLO

APROBADO

---

Lucía Ana Díaz Ariza M.Sc  
Directora

---

Joel Tupac Otero Ph.D  
Asesor

---

Claudia Patricia Rosas Mesa  
Jurado

---

María Caridad Cepero de García  
Jurado

**EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ASOCIACIÓN SIMBIÓTICA DE *Masdevallia coccinea* LINDEN EX LINDL. (ORCHIDACEAE) Y UN HONGO FORMADOR DE MICORRIZA**

NANCY FIORELA ORDÓNEZ CASTILLO

APROBADO

---

Angela Umaña Muñoz MPhil  
Decana Académica

---

Andrea Forero BSc.  
Directora Carrera de Biología



## **AGRADECIMIENTOS**

A Lucía Ana Díaz por su guianza constante en este trabajo y sus consejos en las técnicas de laboratorio. Mil gracias.

A Dr. Tupac Otero por el apoyo constante que me brindó en la elaboración de mi trabajo porque aunque lejos siempre pude contar con él. Gracias por Todo.

A Carolina y Dolly por la ayuda que me brindaron en las técnicas y manejo del laboratorio.

A Don Luís Eduardo Álvarez por el suministro de las muestras, por dejarme ingresar en su finca y permitir conocer una parte más de la capacidad de la Madre Tierra. Mil y mil gracias...

A Jorge y Nixon auxiliares de la Unidad por su ayuda en todo: medios, autoclave, cajas, muchas gracias.

A mis amigos de la U: Nhore, Marce, Cami, Andrés, Talu, Andreita, Diana, Toño, Pablo, Bruce, el paisa, Migue, Kika, Lulis, Lex, Gal, porque al igual que yo, saben lo que es ser Biólogo.

A mis amigas del cole: San, Ari, Lili, Silvis y Ednis porque a pesar de todos estos años sé que puedo contar con ellas para todo.

A la Universidad Javeriana en especial a la Unidad de Biotecnología Vegetal por permitirme hacer parte de ellos y a los profesores que de una u otra forma invirtieron un poco de su tiempo para formarme y regalarme un poco de su conocimiento.

Al gremio de los Orquidólogos en especial a Peter Wullner y el Padre Pedro Ortiz Valdivieso por su ayuda y su dedicación en el estudio de las Orquídeas.

En especial a mis papás y a mi hermana por todo...

## TABLA DE CONTENIDO

### Resumen

1. Introducción.....	1
2. Marco teórico y revisión de literatura.....	3
2.1 Clasificación y características de la familia Orchidaceae.....	3
2.2 Generalidades de <i>Masdevallia coccinea</i> .....	5
2.2.1 Clasificación taxonómica.....	5
2.2.2 Sinónimos.....	6
2.2.3 Descripción taxonómica.....	6
2.2.4 Distribución.....	7
2.3 Ecología de la germinación de las semillas de la Familia Orchidaceae.....	8
2.3.1 Características de las semillas.....	8
2.3.2 Germinación.....	9
2.3.2.1 Germinación asimbiótica de semillas de las orquídeas.....	9
2.3.2.2 Germinación simbiótica de semillas de las orquídeas.....	10
2.4 Generalidades de las micorrizas.....	13
2.4.1 El hongo formador de micorriza Orquidioide.....	14
2.4.1.1 Aislamiento de <i>Rhizoctonia</i> sp. ....	14
2.4.1.2 Generalidades de <i>Rhizoctonia</i> sp.....	15
2.4.1.3 Morfología y identificación de <i>Rhizoctonia</i> sp. ....	16
2.4.1.4 Sistemática e identificación de <i>Rhizoctonia</i> sp. ....	17
2.5 Formación de la micorriza Orquidioide.....	19
2.5.1 Anatomía de la colonización .....	19
2.5.2 Fisiología de la colonización.....	21
2.5.2.1 Tolipofagia.....	21
2.5.2.2 Ptyofagia.....	22
2.5.3 Transferencia de nutrientes del hongo a la orquídea.....	22
2.5.4 Viabilidad del micosimbionte.....	24
2.6 Ecología de la micorriza orquidioide.....	25
2.6.1 Especificidad hongo-orquídea.....	25
3. Formulación del problema y justificación.....	30
3.1 Formulación del problema.....	30

3.2	Pregunta de investigación.....	30
3.3	Justificación.....	31
4.	Objetivos.....	32
4.1	Objetivo General.....	32
4.2	Objetivos Específicos.....	32
5.	Materiales y métodos.....	33
5.1	Localización y descripción geográfica del área de estudio.....	33
5.2	Diseño de la investigación .....	33
5.2.1	Población de estudio y muestra.....	34
5.3	Métodos.....	35
5.3.1	Toma de muestras de campo.....	35
5.3.2	Caracterización de la micorriza.....	35
5.3.3	Evaluación de la viabilidad del micosimbionte.....	36
5.3.4	Aislamiento del micosimbionte a partir de raíces y suelo.....	36
5.3.5	Purificación y caracterización de los aislamientos.....	37
5.4	Análisis estadístico.....	37
6.	Resultados y Discusión .....	38
6.1.	Análisis fisicoquímico del suelo.....	39
6.2	Determinación del porcentaje total de micorrización .....	40
6.3	Aislamiento del micosimbionte a partir de raíces y suelo .....	47
6.3.1	Descripción macroscópica del aislamiento.....	48
6.3.2	Descripción microscópica del aislamiento.....	48
6.3.3	Aislamiento del micosimbionte del suelo.....	49
6.4	Determinación de viabilidad del micosimbionte en raíces vivas de <i>M. coccinea</i> de dos edades diferentes .....	50
7.	Conclusiones.....	56
8.	Recomendaciones.....	57
9.	Literatura citada.....	59
10.	Anexos.....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía de raíz de orquídea.....	5
Figura 2. Ilustración de <i>Masdevallia coccinea</i> .....	7
Figura 3A. Pinturas y fotografías de semillas de la familia Orchidaceae.....	8
Figura 3B. Semillas de <i>Masdevallia coccinea</i> .....	8
Figura 4. Micelio estéril de <i>Rhizoctonia solana</i> .....	17
Figura 5. Diagrama de pelotones mostrando la interface entre el hongo y la célula de la raíz.....	22
Figura 6. Interacciones que se presentan en la simbiosis hongo-planta.....	29
Figura 7. Estados juvenil y adulto de las plantas muestreadas.....	34
Figura 8A. Anatomía de la raíz de <i>Masdevallia coccinea</i> .....	39
Figura 8B. Anatomía del estele de <i>Masdevallia coccinea</i> .....	39
Figura 9A. Pelos radicales micorrizados y pelotones en individuos juveniles.....	41
Figura 9B. Pelotones en raíz de individuo edad 1.....	41
Figura 10. Disposición en espiral de pelotones de individuos adultos.....	41
Figura 11. Porcentaje de micorrización para individuos de la edad 1 y edad 2.....	42
Figura 12. Hifas típicas de <i>Rhizoctonia</i> sp.....	43
Figura 13. Corte transversal de raíces de <i>Masdevallia coccinea</i> de individuo juvenil 3 mostrando pelotones en diferentes estados de digestión y de formación.....	44
Figura 14. Aspecto macroscópico de <i>Rhizoctonia</i> sp. a partir de <i>Masdevallia coccinea</i> .....	48
Figura 15A. Aislamientos microbianos obtenidos de suelo de edad 1 en medio PDA.....	49
Figura 15B. Aislamiento de suelo de edad 2 en medios PDA en dilución $10^{-6}$ .....	49
Figura 16. Porcentaje de viabilidad de la micorrización en individuos de la edad 1 y edad 2.....	51
Figura 17. Acumulación de formazán (evidente por la coloración azul en raíces)....	52
Figura 18. Interacción micorrización vs. viabilidad con base en la edad de los individuos . . . . .	53

## TABLAS

Tabla 1. Estados sexuales y asexuales del hongo <i>Rhizoctonia</i> sp.....	15
--	----

## ANEXOS

Anexo 1. Técnica de aclarado y tinción de raíces (Método de Phillips & Hayman, 1970). .....	66
Anexo 2. Protocolo de tinción vital de la enzima Succinato Dehidrogenasa (SDH) (Método de Guianinazzi, 1991) .....	67
Anexo 3. Estimación de la actividad micorrícica en raíces vivas (Método de Trouvelot <i>et al.</i> , 1986) .....	68
Anexo 4. Promedios de porcentajes de micorrización y viabilidad del micosimbionte.....	71
Anexo 5. Resultados análisis estadísticos.....	72
Anexo 6. Análisis fisicoquímico del suelo. ....	77

## RESUMEN

En este trabajo se estableció la presencia de micorriza orquidioide formada entre *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl y un hongo formador de micorriza, como parte de la evaluación de la asociación simbiótica entre la orquídea y el hongo. Se caracterizó la micorriza en raíces de plantas de dos edades para determinar la frecuencia de micorrización, intensidad y abundancia de pelotones. Se evaluó la viabilidad del micosimbionte y se realizó el aislamiento para la caracterización macro y microscópica del mismo a partir de raíces y de suelo asociado. Se escogieron raíces de 5 individuos juveniles, localizados en el Municipio de Guatavita-Cundinamarca, establecidos en 2003 y 5 individuos adultos establecidos en 1998. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en cuanto a los porcentajes de micorrización, frecuencia (F%), intensidad (M%) y abundancia (A%) de pelotones entre las dos edades. Fue posible observar la viabilidad del micosimbionte a través de la acumulación de formazan en las raíces, para esta variable no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en cuanto a la abundancia de pelotones (A%) y la intensidad de micorrización (M%), en contraste, solo se encontraron diferencias en la frecuencia de viabilidad del hongo. La caracterización microscópica y macroscópica del aislado a partir de raíces correspondió al género *Rhizoctonia* binucleada caracterizada por la presencia de hifas con ramificaciones en ángulo recto y presencia de septos. Estos resultados indican que a pesar de la actividad fotosintética de las plantas se presentó actividad fúngica en las raíces en las etapas evaluadas confiriéndoles la característica de plantas mixótrofas además que no existe diferencia en las características morfológicas de los micosimbiontes aislados ni en los porcentajes de colonización respecto a la edad.

Palabras claves: Orquídeas, *Masdevallia coccinea*, Micorriza, *Rhizoctonia* sp. Simbiosis.

## ABSTRACT

The present review established the orchid mycorrhiza occurrence formed between *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl and a mycorrhiza maker fungus, as part of the evaluation of the symbiotic association among these. The mycorrhiza was characterized with two ages plants roots to determinate the mycorrhization frequency, intensity and pelotons abundance. The mycosymbiont viability was assessed, and starting with the isolation from roots and associated soil, the macro and microscopical characterization was made. Five young individuals, established in 2003, and five adult individual, established in 1998, were chosen; both placed in Guatavita municipality. No significant differences ( $p>0.05$ ) were founded between the two ages, about the percentage of mycorrhization: frequency (% F), intensity (% M), and pelotons abundance (% A). It was possible to observe the mycosymbiont viability through the accumulation of formazan within the roots; for this variable, no significant differences ( $p>0.05$ ) were found about the pelotons abundance (% A) and the micorrization intensity (% M). However, statistical differences were established for the fungus viability frequency. The macro and microscopical isolation characterization from roots matched to binucleated *Rhizoctonia* defined by the presence of septos and hyphae with branches arose at acute angles ( $45^\circ$ ). Theses results reveal that despite the photosynthetic plant activity, fungical activity occurred within the evaluated ages roots granting them mixotrophic qualities. Besides, there are no differences neither the morphologic features between the isolated mycosymbionts or the colonization percentages with respect to the age.

Key words: Orchids, *Masdevallia coccinea*, Mycorrhiza, *Rhizoctonia* sp., Symbiosis.

## 1. INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae cuenta con aproximadamente 25.000 especies en todo el mundo, representadas en Colombia por aproximadamente 3.500, ocupando así el segundo puesto después de Ecuador. En la naturaleza las orquídeas se encuentran asociadas con hongos formadores de micorrizas que favorecen la germinación de sus semillas y el posterior establecimiento de las plántulas en diferentes sustratos, por lo menos en los estados más tempranos de su desarrollo. La reproducción de las plantas de la familia Orchidaceae se lleva a cabo mediante la producción de millares de semillas diminutas carentes de endospermo localizadas en una cápsula dehiscente. Las orquídeas presentan un largo periodo de plántulas durante el cual son incapaces de fotosintetizar y dependen de una fuente externa de carbohidratos, provista naturalmente por un hongo formador de micorriza.

La asociación formada por macrosimbiontes de la familia Orchidaceae y micosimbiontes de la clase Basidiomycetes, se denomina micorriza orquidioide. El hongo pertenece principalmente a las especies de la forma - género *Rhizoctonia*. En las semillas, las hifas penetran en el embrión y forman estructuras celulares globulares llamadas pelotones que luego son digeridas suministrando así nutrientes y otros materiales necesarios a la planta como: azúcares, vitaminas, aminoácidos, hormonas, proteínas, ácidos nucleicos y minerales; además movilizan las reservas tanto lipídicas como de almidón, confiriéndole a la familia el carácter de micótrofa. A lo largo del ciclo de vida de la planta se ha visto que, aunque son fotosintéticamente activas, siempre existe una relación de simbiosis con el hongo, relación de la cual se discute el grado de especificidad.

Resulta de gran importancia conocer y comprender las asociaciones de micorriza para entender el papel que cumple el hongo como simbionte en el comportamiento fisiológico y ecológico de la especie. Hasta el momento las investigaciones acerca de la asociación simbiótica entre hongos y orquídeas tropicales han sido pocas y no existen antecedentes en especies del género *Masdevallia* en cuanto a su asociación con hongos ni en su fenología en el desarrollo; incluso en Colombia, donde es una especie nativa.

Con el presente estudio se pretende describir la presencia de micorriza en *Masdevallia coccinea*, especie reportada en los apéndices II de CITES como una especie que no esta necesariamente amenazada de extinción pero que podría llegar a estarlo. Así mismo, se busca caracterizar el micosimbionte asociado, como primer paso en el conocimiento de las relaciones simbióticas para posteriores planes de propagación y como posible herramienta en cultivo y comercialización de la especie.

## 2. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA

La siguiente revisión se divide en dos grandes temas: como primera medida la familia Orchidaceae donde se tratan temas como generalidades de esta familia, *Masdevallia coccinea* como especie de estudio, la biología de las semillas y su germinación simbiótica y asimbiótica.

Por otra parte se desarrollan los temas sobre las generalidades de las micorrizas donde se incluye específicamente la formación de la micorriza orquidíode, el micosimbionte asociado, su clasificación, anatomía y fisiología de la micorriza, además de la transferencia de nutrientes y la viabilidad del endófito. Finalmente se trata la ecología de la micorriza orquidíode y la especificidad hongo-orquídea.

### 2.1 Clasificación y características de la familia Orchidaceae

Según la clasificación de Judd *et al.*, (1999), la familia Orchidaceae pertenece a la clase de las monocotiledóneas, orden Asparagales, muy emparentadas con las Liliales, que se diferencian por la presencia de nectarios en los tépalos y septos de los ovarios, además de la ausencia de endospermo. El orden consta de 30 familias donde Orchidaceae es la más rica en especies. Está considerada dentro del grupo de las Asparagales inferiores, con un origen parafilético que incluye familias más estrechamente emparentadas entre sí, con microesporogénesis simultánea como característica principal. Según la clasificación de Heywood (1993), la familia Orchidaceae se encuentra dentro del orden de las Liliales, emparentadas especialmente con las familias Burmanniaceae, Liliaceae, Amaryllidaceae y especialmente con el género *Hypoxis*.

Es una familia cosmopolita que cuenta con alrededor de 20.000 a 25.000 especies en todo el mundo (Dressler, 1981; Escobar, 1991) ocupando el segundo lugar dentro de las familias más numerosas luego de Asteraceae. En Colombia, la familia cuenta con 3.459 especies ocupando el segundo puesto luego de Ecuador (Com. Pers. Peter Wullner, 2005).

La familia Orchidaceae está compuesta por hierbas terrestres o epífitas, ocasionalmente enredaderas, con rizomas, cormos o raíces tuberoides. Sus tallos a menudo se presentan engrosados basalmente formando pseudobulbos. Sus hojas son usualmente alternas, plicadas, basales o a lo largo del tallo, algunas veces reducidas, simples, enteras, con venación generalmente paralela. Las flores son usualmente bisexuales, bilaterales, por lo general resupinadas (giro de 180° durante el desarrollo), 3 sépalos y 3 pétalos con el del medio modificado para formar un labio (labelo). Estambres usualmente 1 ó 2, unidos al estilo y estigma para formar la columna. Frutos en cápsulas con diminutas semillas de embrión pequeño y carentes de endospermo (Ortiz, 1995; Judd *et al.*, 1999).

Las raíces de las orquídeas se encuentran modificadas en relación a las demás plantas con flor, aparentemente como una adaptación para la vida aérea o epífita.

Muchas orquídeas poseen raíces envueltas por una capa de células velamen, un tejido destinado a la absorción de agua. Es una capa externa esponjosa con células provistas de numerosos poros de gran tamaño, que mueren muy pronto. En estado seco aparece de color gris blanquecino debido a que está lleno de aire, y transparente cuando se encuentra lleno de agua. Es una estructura de capas múltiple que protege a la raíz de daños mecánicos y actúa como una barrera contra la pérdida de agua (Arditti, 1992).

En la anatomía de las raíces de orquídeas terrestres su epidermis funciona como una capa protectora y consiste en células rectangulares con paredes lignificadas. Seguido de ésta, se encuentra la corteza con una función de tejido de almacenamiento y transporte, estas células son de paredes delgadas y parenquimatosas y contiene algunos granos de almidón, mucílago y oxalato de calcio. En estas dos primeras capas de células se ubica el micosimbionte formador de micorriza. La endodermis está compuesta por distintas bandas de Caspari y son rectangulares u oblongas. Los vasos vasculares consisten en el xilema y floema encontrados dentro del estele. El xilema está compuesto por traqueidas y funcionan como una estructura de transporte de agua y minerales. Las sustancias orgánicas son transportadas por el floema (Arditti, 1992) (Figura 1).

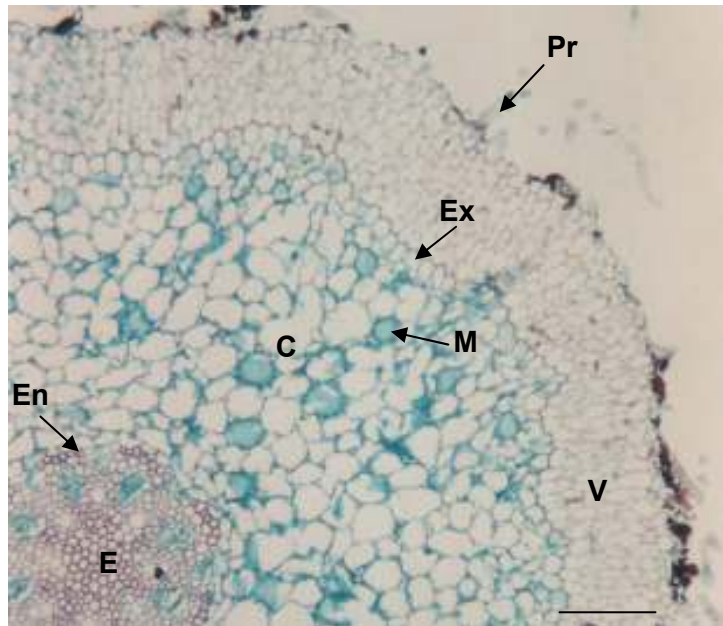


Figura 1. Anatomía de raíz de orquídea. Corte transversal de *Masdevallia coccinea* de individuo adulto. C, Corteza; Ex, Exodermis; Pr, Pelo radical; V, Velamen; E, estele; En, Endodermis M, Mucílago. Barra: 20  $\mu$ m (Ordoñez, 2006)

## 2.2 Generalidades de *Masdevallia coccinea*

### 2.2.1 Clasificación Taxonómica

Phylum: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Asparagales (Judd *et al.*, 1999).

Liliales (Heywood, 1993)

Familia: Orchidaceae

Subfamilia: Epidendroideae (Dressler, 1981)

Tribu: Epidendreae

Subtribu: Pleurothallidinae

Género: *Masdevallia*

Especie: *Masdevallia coccinea*

Publicada en: *Orchidaceae Lindenianae* 5, n. 26. 1846.

### 2.2.2 Sinónimos:

*Masdevallia approviata* hort. ex Woolward

*Masdevallia armeniaca* B.S.Williams

*Masdevallia atosanguinea* B.S.Williams

*Masdevallia cinnabarina* Linden ex

*Masdevallia coerulescens* B.S.Williams

*Masdevallia denisonii* Dombrain

*Masdevallia harryana* Rchb.f.

*Masdevallia laeta* Rchb.f.

*Masdevallia lateritia* hort. nom.nud.

*Masdevallia lindonii* André

*Masdevallia longiflora* Cogn.

*Masdevallia militaris* Rchb.f.& Warsz.

*Masdevallia miniata* B.S.Williams

*Masdevallia musaica* E Morr.

*Masdevallia tricolor* hort. non Rchb.

*Masdevallia versicolor* hort.

*Masdevallia venusta* Schltr.

### 2.2.3 Descripción taxonómica

Plantas largas, terrestres; raíces ásperas. Ramicaule sólido, erecto, 2-8 cm de largo, vaina tubular. Hojas erectas, coriáceas, pecíolos largos, 8-20 cm de largo incluido el pecíolo de 2-9 cm de largo, hoja elíptica oblongada, subagudo, 2-4 cm ancho, delgadamente cuneado. Inflorescencia solitaria, flores vistosas nacidas de una vara erecta, pedúnculo delgado 18-32 cm de largo, con una bráctea debajo en la mitad, bráctea floral tubular, 1-2 cm de largo; pedicelo 2.5-4 cm de largo, ovario 6-8 mm de largo, sépalos brillantes fucsias con una vena oscura, sépalo dorsal abobado, 25 cm de largo, 9mm de ancho, sépalos laterales connados de 14mm, arqueados, cilíndricos, sépalo lateral ovado-falcado, 5 cm de largo, 2 cm de ancho, lámina bífida extendida a través del tubo, pétalos con una vena en la mitad púrpura, cartilagosos, oblongas, obtuso, 8mm de largo, 2.5-3 mm de ancho. Columna blanca, semirrecta, 6mm de largo (Ortiz, 1995; Luer, 2003) (Figura 2).



Figura 2. Ilustración *Masdevallia coccinea*. De: *La Belgique horticole, journal des jardins et des vergers* encontrada por Charles François Antoine Morren editada por Charles Jacques Édouard Morren. Liège [Luik], La dirección general, 1873, volumen 23 (Lámina 21). Textos por Charles Jacques Édouard Morren.

#### 2.2.4 Distribución

El género *Masdevallia* cuenta con alrededor de 500 especies, de las cuales aproximadamente 160 se encuentran en Colombia. Se distribuye en América del Sur y América Central, desde el sur de México hasta el sur de Brasil con las concentraciones más altas de especies en las partes altas de Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia.

*Masdevallia coccinea* se encuentra naturalmente en Colombia sobre la Cordillera Oriental, en Ocaña (Norte de Santander), principalmente en el páramo de Cachirí a 2800 m.s.n.m (Luer, 2003). A partir de estas poblaciones naturales se han emprendido acciones de propagación por parte de cultivadores de orquídeas, generando nuevas poblaciones no naturales pero con buen establecimiento y generación de nuevos individuos de esta especie.

## 2.3 Ecología de la germinación de las semillas de la familia Orchidaceae

### 2.3.1 Características de las semillas

Las semillas de las orquídeas son extremadamente pequeñas. Consisten de un diminuto embrión suspendido en el interior y una testa reticulada rodeada por un gran volumen de aire. El peso es aproximado de 3 a 4  $\mu\text{g}$  y pueden ser de 0.4 – 1.25 mm de largo y 0.08-0.27 mm de ancho (Figura 3). Muchas especies producen aproximadamente 400 semillas por cápsula como en el caso de *Listera cordata* (L.) R. Br., mientras que otras pueden contener hasta 4 millones como en *Cycnoches ventricosum* var. *chlorochilon* (Arditti, 1992; Baskin & Baskin, 1998).



Figura 3. A. Pinturas y fotografías de semillas de la familia Orchidaceae. (Arditti & Ghani, 2000) B. Semillas de *Masdevallia coccinea*. Em, embrión; T, Testa. Barra: 100 $\mu\text{m}$  (Ordoñez, 2006).

Todas las orquídeas carecen de endospermo y de cotiledones. Los embriones son muy pequeños y se encuentran rodeados de un gran espacio de aire, confiriéndoles la estrategia de flotar en el ambiente por largos periodos de tiempo y dispersarse por el viento a través de largas distancias (Arditti, 1992; Dressler, 1981). Las diminutas semillas contienen pocas proteínas, lípidos y una reducida cantidad de azúcares, aunque hay pocas especies que contienen en su interior unos pocos granos de almidón (Smith & Read, 1997).

### 2.3.2 Germinación

La germinación de las semillas empieza con la toma de agua, luego de esto empiezan los procesos de división celular, cuando el embrión rompe la cubierta seminal, es en este momento cuando comienza la germinación. A continuación se forma una agregación de células llamada protocormo, sobre el que se puede distinguir un meristemo del vástago o rhizoides. Tan pronto como se inicia la diferenciación de órganos, comienza un período de crecimiento intenso (Pierik, 1990).

Es poca la información disponible sobre la germinación de las semillas de las orquídeas bajo condiciones naturales (Batty *et al.*, 2001; Brundret *et al.*, 2003; Rasmussen & Whigham 1993). Sin embargo, una aproximación se puede llevar a cabo sobre la observación de las semillas cultivadas *in vitro*.

A partir de este acercamiento, se pueden determinar dos tipos de germinación: asimbiótica, donde se suministra a las semillas todos los nutrientes y factores de crecimiento necesarios exógenamente, y la germinación simbiótica, donde las semillas son cultivadas con hongos que suministran los nutrientes necesarios para su germinación y establecimiento.

#### 2.3.2.1 Germinación asimbiótica de semillas de orquídeas

Todas las orquídeas, pasan a través de una fase donde no son fotosintéticamente activas. Las vitaminas y factores de crecimiento exógenos son requeridos para que los embriones se desarrollen asimbióticamente. Así mismo, el suplemento de azúcar (glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa), es suministrado artificialmente y aunque el crecimiento es lento, se pueden obtener plantas maduras a partir de semillas (Smith & Read, 1997; Zettler, 1997).

Knudson (1922), encontró que las orquídeas podrían germinar asimbióticamente sobre medios especiales que contuvieran minerales y azúcares, en este estudio se demostró que las semillas de géneros como *Cattleya*, *Laelia*, *Epidendrum* y de otras orquídeas eran capaces de germinar asimbióticamente bajo condiciones *in vitro*. A pesar de los estudios realizados pronto se comprobó que no siempre era posible la

germinación de semillas en el mismo medio de nutritivo, de esta forma, hasta el momento se han descrito varios medios nutritivos para muchos géneros y especies de orquídeas en particular (Arditti & Ernst, 1993).

#### 2.3.2.2 Germinación simbiótica de semillas de orquídeas

Los estudios de micorrizas en orquídeas comenzaron hace más de 100 años. A finales del siglo XIX, Noel Bernand describió el rol de la micorriza en la germinación de las semillas, realizó el primer experimento que se concentraba en la identificación y aislamiento del micosimbionte y el estudio de la germinación simbiótica y asimbiótica. Hans Buergeff trabajó con micorriza en orquídeas en la primera parte del siglo XX. Estos trabajos mostraron que las micorrizas con orquídeas son específicas y que las semillas no pueden germinar en ausencia del simbiote bajo condiciones naturales (Arditti, 1992).

Así pues, la colonización del hongo es requerida para el inicio de la gluconeogénesis, la movilización de reservas y el abastecimiento de un sustento continuo de nutrientes, en los estadios no fotosintéticos de la planta (Smith & Read, 1997). En las micorrizas de las orquídeas el micosimbionte provee a la orquídea de nutrientes entre los que se incluyen azúcares, vitaminas y aminoácidos (Arditti, 1992; Batty *et al.*, 2002; Peterson & Massicotte, 2004; Zettler, 1997; Zettler *et al.*, 2001) confirniéndoles la características de plantas micótrofas, en contraste la planta puede suministrar vitaminas o aminoácidos al hongo en muchos casos, sin embargo, no hay una evidencia real de que el hongo reciba compuestos sintetizados por la planta durante su asociación éstas (Batty *et al.*, 2002; Peterson & Massicotte, 2004). Por otra parte el término mixotrofia fue propuesto por Selosse *et al.*, (2004 citado por Girlanda *et al.*, 2006) para indicar una dualidad en cuanto a la obtención de nutrientes, una estrategia fotosintética y otra micótrofa.

Las células micorrizadas aumentan la tasa de la respiración y la toma de oxígeno. Así mismo, incrementan en la actividad de la polifenol oxidasa, enzima que participa en los procesos de síntesis de lignina, en la oxidación del ácido indol acético (AIA) y en los mecanismos relacionados con la resistencia a enfermedades (Salomé & Barroso, 1983). En el momento de la digestión de las hifas de hongo se aumenta la

producción de la ácido ascórbico oxidasa y de la catalasa (Arditti, 1992). Estos procesos indican la forma como los nutrientes son tomados en las células vegetales.

La inducción de la germinación simbiótica de orquídeas se ha utilizado con éxito como alternativa a los métodos asimbióticos. Clements (1986, citado por Watkinson, 2002), encontró que especies de *Orchis* y *Dactylorhiza* germinaron mejor en presencia de hongos aunque la sobrevivencia en medios naturales era muy reducida. Smreciu & Currah (1989), encontraron algo similar en especies norteamericanas y europeas. Se ha reportado que varias especies, incluyendo dos del género *Corallorhiza*, no pudieron germinar en medio asimbióticos y que *Cypripedium calceolus* L. y *Calypso bulbosa* (L.) Oakes tenían porcentajes bajos de germinación. Zettler en 1997 indujo la germinación de varias especies con buenos resultados (80% de germinación) sobre medios de cultivo axénicos pero el establecimiento en el suelo fue pobre, posiblemente por una incompatibilidad del simbionte en el suelo o por los periodos de aclimatación. Zetter & Hoffer en 1998, demostraron que mientras que los medios asimbióticos favorecieron la germinación, la supervivencia durante el trasplante era mayor si la semilla era inoculada con un simbionte fúngico. Knudson (1922), probó que aunque las orquídeas podrían ser germinadas asimbióticamente, la inoculación de hongos y de una especie bacteriana, aumentaron los porcentajes de germinación en un 70 % y el crecimiento de los protocormos se llevó a cabo en periodos cortos. Es importante observar que aunque las etapas iniciales de la germinación (toma de agua y el rompimiento de la testa) pueden ocurrir sin un simbionte, el crecimiento y subsecuente desarrollo de la planta en sustratos naturales como suelo y cortezas requiere de la formación de la micorriza. Así, la técnica de inoculación de hongos formadores de micorriza al medio de germinación está reportada como germinación simbiótica.

El etileno y las auxinas son producidas por algunos hongos formadores de micorriza de orquídeas y funcionan como hormonas para algunas semillas en cultivos simbióticos. La adición externa de quinetina rompe a menudo la dormancia de las semillas en cultivos *in vitro*. Pero la producción de citoquininas no se ha detectado en los hongos de las orquídeas (Rasmussen, 2002).

Así mismo, la manipulación de las condiciones de cultivo como la composición y concentración de macro y micronutrientes, especialmente nitrógeno y carbono, puede alterar la proporciones y el crecimiento de los protocormos; estas respuestas a la composición de medio pueden ser usadas para analizar las interacciones, sin embargo, las condiciones ambientales manejadas *in vitro* (temperatura, fotoperiodo) no necesariamente se igualan a las condiciones naturales generando esta variabilidad un cambio en la respuesta de la germinación y crecimiento (Rasmussen, 2002; Smith & Read, 1997).

La siembra de paquetes de semillas en sustratos como madera o suelo, demostró que la madera orgánica en descomposición es importante en la germinación y en el establecimiento de las micorrizas. En sustratos como la madera se ha observado un aumento en la germinación, por lo tanto semillas de estas especies parecen haber desarrollado la capacidad de reaccionar positivamente a un sustrato que sea apropiado para el micosimbionte (Batty *et al.*, 2001; Brundrett *et al.*, 2003; Rasmussen & Whigham 1993; Rasmussen, 2002).

Los sustratos inadecuados pueden ser la razón por la que la proximidad de las plantas adultas y sus micosimbiontes no parece ser siempre conveniente para la germinación de las semillas. Masuhara & Katsuya (1994) no encontraron ninguna conexión entre la proximidad de plantas adultas de *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames y el éxito en la germinación de semillas, estos resultados indican que a pesar de la existencia de plantas adultas de la especie, el requerimiento en medios naturales de micosimbionte es esencial para llevar a cabo la germinación de semillas con éxito.

Plantas jóvenes de *Tipularia discolor* Nutt. fueron encontradas constantemente en troncos pero éstas desaparecían eventualmente mientras que las plantas adultas ya en estados de floración fueron siempre encontradas en el piso del bosque. La razón de ésto puede ser que el sustrato suelo, la materia en descomposición u hojarasca albergue el micosimbionte adecuado para llevar a cabo el establecimiento y el subsecuente desarrollo. (Rasmussen, 2002).

Esto podría ser un punto de partida en el estudio de los requerimientos de C, P y N orgánico para el desarrollo inicial del hongo en los estadios presimbióticos y para el conocimiento de la dependencia micorrizal de diferentes especies de orquídeas.

La dependencia de la planta por los hongos formadores de micorriza cambia incuestionablemente sobre el curso de la vida en las orquídeas; en muchas orquídeas el decrecimiento en la dependencia del hongo es evidente de los estados juveniles hasta los estados adultos. Aunque en ciertas especies sigue habiendo una dependencia sobresaliente en estados adultos a pesar de la capacidad fotosintética de las hojas (Rasmussen, 2002).

#### 2.4 Generalidades de las micorrizas

El término micorriza fue propuesto por el botánico alemán Albert Bernard Frank en 1885 (Trappe, 2005), y se deriva de los vocablos griegos “mikes” que significa hongo y “rhiza” raíz. La micorriza es una simbiosis mutualista que se establece entre ciertos hongos del suelo y las raíces de muchas plantas (Smith & Read, 1997). Los organismos asociados pertenecen al reino Fungi (Basidiomycetes, Ascomycetes y Zygomycetes) y a la mayor parte de las plantas vasculares. Según Peterson & Massicotte (2004) estas asociaciones micorrízicas involucran interacciones entre los hongos, la planta y los factores del suelo. Esta asociación ha resultado ser importante debido al papel que desempeña tanto en ecosistemas naturales, como en los sistemas biológicos creados por el hombre.

La función principal de esta asociación, en términos de desarrollo y crecimiento vegetal, es aumentar la superficie de absorción de la raíz de tal forma que esta absorba y asimile más agua y minerales respecto a una no micorrizada. En consecuencia, es una asociación biológica que favorece a las plantas en su nutrición mineral, balance hídrico y desarrollo (Smith & Read, 1997).

El carácter de asociación simbiótica supone interacciones íntimas. Hay simbiosis donde el beneficio es mutuo y otras donde uno de los simbiosiontes es parasitado. En las relaciones de beneficio mutuo el hongo obtiene de la planta compuestos

orgánicos y un hábitat protegido. La micorriza favorece en particular la absorción de compuestos poco móviles como  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , Zn, Cu, entre otros, gracias a la elongación del micelio externo más allá de la zona de agotamiento de nutrientes alrededor de la raíz (Smith & Read, 1997).

Harley & Smith (1983 citados por Smith & Read, 1997), proponen una clasificación de las micorrizas que se basa en las características morfológicas de la infección y en los taxones de los simbiontes, distinguiendo siete tipos: ectomicorrizas, arbusculares, ectendomicorrizas, arbutoides, monotropoides, ericoides y orquidioides (Smith & Read, 1997).

#### 2.4.1 El hongo formador de micorriza orquidioides

Se han aislado y cultivado *in vitro* hongos a partir de raíces de orquídeas adultas. Estos hongos pueden metabolizar un amplio rango de fuentes de carbono incluyendo sacarosa, glucosa, fructuosa, maltosa, manosa, galactosa, xilosa, rafinosa, celulosa, lignina y pectina. Producen enzimas hidrolíticas, incluyendo, protopectinasa y endopoligalacturonasa, celulasa y otras hidrolasas que rompen las macromoléculas, lo que posibilita el crecimiento del hongo como saprófito en suelos con desechos orgánicos o como parásito en diferentes especies vegetales (Hadley, 1969; Smith & Read, 1997). Muchos hongos de micorriza orquidioides pueden utilizar amonio, nitrato o ambos como fuente de nitrógeno, mientras que otros pueden crecer mejor utilizando nitrógeno orgánico en compuestos como urea, algunos aminoácidos simples, peptonas y proteínas (Smith & Read, 1997).

Mucho de los hongos endofitos conocidos de la micorriza orquidioides pertenecen a la clase Basidiomycetes y muchos pertenecen a la forma-genero *Rhizoctonia* (Ceratobasidiales, Exidiales, Tulasnellales) (Shen *et al.*, 1998).

##### 2.4.1.1 Aislamiento de *Rhizoctonia* sp.

No se requieren técnicas especiales para aislar *Rhizoctonia* a partir de tejidos vegetales, ya que gracias a la metodología universalmente empleada (fracciones infectadas o porciones de raíces previamente desinfectadas, que se transfieren medios de cultivo) se obtienen colonias en condiciones axénicas. Para aislar el

hongo a partir de plantas colonizadas se recomienda emplear inicialmente el medio general Agar Agua Alcalina, debido a que permite un crecimiento rápido del hongo, el cual puede ser observado desde las 24 horas de siembra; el repique para el mantenimiento de la cepa puede realizarse en medio PDA con un crecimiento de 0.18-0.26 mm/h a 25°C (Zettler, 1997; Zettler *et al.*, 2001) y en Agar Avena (Chou & Chang, 2004).

#### 2.4.1.2 Generalidades de *Rhizoctonia* sp.

Para la familia Orchidaceae un extenso número de hongos han sido referidos del género *Rhizoctonia* como hongo formador de micorrizas, entre ellos se incluyen *Rhizoctonia repens*, *R. goodyera-repentis* y *R. solani*. Un primer estudio realizado por Bernard en 1904 registró el aislamiento de un hongo del género *Rhizoctonia* como principal agente formador de micorrizas en *Tulasnella calospora* (Smith & Read, 1997).

El género *Rhizoctonia* descrito por primera vez por DeCandolle en 1815, comprende un grupo complejo y diverso de más de 100 especies reportadas de hongos anamorfos de la subdivisión Deuteromycota, que se encuentran asociados con tres estados teleomorfos de la subdivisión Basidiomycota (hongos con reproducción sexual) (Tabla 1).

Tabla 1. Estados sexuales y asexuales del hongo *Rhizoctonia* sp.

<b>Estado Teleomorfo (Sexual)</b>	<b>Estado Anamorfo (Asexual)</b>
<i>Thanatephorus cucumeris</i> Donk	<i>Rhizoctonia</i> multinucleados
<i>Ceratobasidium</i> sp. Rogers	<i>Rhizoctonia</i> binucleados
<i>Waitea</i> sp. Warcup and Talbot	<i>R. zeae</i> y <i>R. oryzae</i>

Fuente: Sneh *et al.*, 1998.

*Rhizoctonia* spp. es un patógeno de distribución mundial que ocasiona pérdidas importantes en la mayoría de las plantas anuales y perennes incluyendo casi todos los cultivos hortícolas que se desarrollan dentro o sobre el suelo. Entre las enfermedades comúnmente causadas por este patógeno está el llamado *damping-*

off de las plántulas y la podredumbre de las raíces. En contraste, para la familia Orchidaceae, *Rhizoctonia* sp. se ha reportado como un agente formador de micorriza (Moore, 1987 Citado por Rodríguez & Julia, 2002).

La clasificación de Alexopoulos *et al.*, 1996 es:

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase Basidiomycetes

Orden: Ceratobasidiales

Familia: Ceratobasidiaceae

Especie: *Thanatephorus cucumeris* (teleomorfo)

Clasificación de la forma anamorfo de Basidiomycetes

Clase Deuteromycetes

Género *Rhizoctonia*

Especie: *Rhizoctonia solani*

*Rhizoctonia repens*

*Rhizoctonia goodyerae-repentis*

#### 2.4.1.3 Morfología e identificación de *Rhizoctonia* sp.

Forma un micelio estéril blanco en colonias jóvenes (1-10 días) y se torna amarillo o de color café claro en colonias de más de 20 días. El micelio consta de células largas y produce ramificaciones que crecen en ángulo recto con respecto a la hifa principal (Figura 4). El micelio consiste en hifas divididas en células individuales por un septo doliporo. Este septo permite el movimiento del citoplasma, las mitocondrias y el núcleo de célula a célula (Shen *et al.*, 1998; Warcup & Talbot, 1967, 1980).

Las características de la ramificación, la anatomía de poro septal y el número de núcleos por célula comúnmente son los criterios morfológicos disponibles para identificar al hongo como *Rhizoctonia* sp. aislado a partir de pelotones de orquídeas. En condiciones ambientales adversas (baja disponibilidad de nutrientes, temperatura, etc), el hongo produce ramilletes de células cortas, anchas de forma oval o triangular que se asemejan a esclerocios, las cuales funcionan como clamidosporas o estructuras de protección. Dichos ramilletes pueden desarrollarse

en pequeños esclerocios de color café a negro y dispuestos en forma laxa, los cuales son comunes en algunos hospederos (Warcup & Talbot, 1967, 1980). Sin embargo, el micelio generalmente no presenta caracteres diferenciales suficientes que permitan la identificación de los simbiontes a nivel específico (Moore, 1987 citado por Rodríguez & Julia, 2002).

El hongo hiberna casi siempre en forma de micelio o esclerocios en el suelo, en plantas perennes infectadas o en órganos de propagación tales como tubérculos de papa, aunque también ataca otros hospederos como frijol, berenjena, pimentón y tomates (Rodríguez & Julia, 2002).

*Rhizoctonia* spp. se disemina con la lluvia o el riego, y la temperatura óptima para que se produzca la infección del hospedero se encuentra cerca de 15 a 18°C y en algunos casos a más de 35°C (Rodríguez & Julia, 2002).

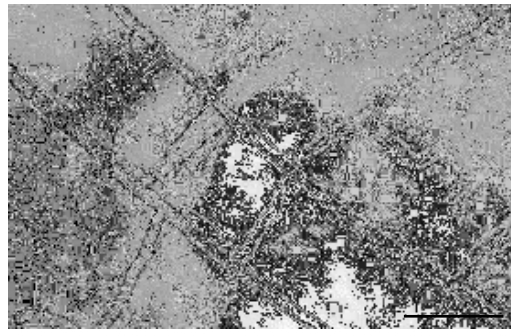


Fig. 4. Micelio estéril de *Rhizoctonia solani*. Barra = 50  $\mu$ m (Arditti, 1992).

#### 2.4.1.4 Sistemática y clasificación de *Rhizoctonia* sp.

La sistemática de *Rhizoctonia* sp. es difícil debido a la carencia de esporas asexuales, y a que las estructuras de las etapas sexuales se encuentran raramente en el campo o bajo condiciones de laboratorio. Por lo tanto, los amplios criterios vegetativos para la identificación han dado lugar a taxonomía polifilética. *Rhizoctonia* se ha dividido en los géneros anamórficos *Ceratorhiza*, *Epulorhiza* y *Moniliopsis*, basado en caracteres tales como el número de núcleos de las hifas y la ultraestructura del septo doliporo (Moore, 1987 citado por Otero *et al.*, 2005).

Más recientemente, Roberts (1999), reconoció algunos de los teleomorfos siguientes: *Ceratobasidium* (Ceratobasidiales, anamorfo *Ceratorhiza*); *Thanatephorus* (Ceratobasidiales, anamorfo *Rhizoctonia*); *Tulasnella* (anamorfo de Tulasnellales. *Epulorhiza*); *Oliveonia* (Exisidiales, anamorfo *Oliveorhiza*); y *Serendipita* (Exisidiales, anamorfo sin clasificar).

Una manera alternativa de categorizar *Rhizoctonia* spp. es la capacidad de los aislamientos para la anastomosis, o la fusión de sus hifas, capacidad que poseen las hifas de diversos aislados para fusionarse y formar hifas heterocariontes estando estrechamente relacionados. Por ejemplo, *Rhizoctonias* multinucleadas como *R. solani* se ha dividido en 13 grupos de Anastomosis (AGs), mientras que *Rhizoctonias* binucleadas se dividen en 21 AG (Sneh *et al.*, 1998).

Con el avance de la biología molecular se ha logrado abordar el estudio de los hongos de micorriza orquidioide utilizando el DNA del simbionte para su identificación como una aproximación en diversidad microbiana y en patrones de especificidad con el hospedero. Algunos de estas metodologías se basan en la utilización de primers universales para hongos como las secuencias intergénicas de transcripción (ITS) (Otero, *et al.*, 2002, 2004; Shan *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2005). Además de la identificación, la utilización de marcadores moleculares como RAPDS (*Random Amplified Polymorphic DNA - DNA polimórfico amplificado al azar*) y CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence - Secuencias Polimórficas Amplificadas y Cortadas*) permitiendo aproximaciones a la filogenia de los aislamientos de *Rhizoctonia* obtenidos a partir de diferentes especies de orquídeas (Taylor & Bruns, 1999; Otero *et al.*, 2002; Giralanda *et al.*, 2006; Rasmussen, 2002; Pereira *et al.*, 2005).

A partir de estudios filogenéticos a nivel molecular se establecen las relaciones entre dos organismos usando igualmente secuencias del DNA y distancias genéticas para la construcción de árboles filogenéticos (Rasmussen, 2002; Otero *et al.*, 2004).

Dentro de los reportes realizados hasta la fecha se encuentran el de Pereira *et al.*, (2005), quienes obtuvieron siete aislamientos de *Rhizoctonia* sp. de raíces de siete especies neotropicales de orquídeas. Los estudios morfológicos y moleculares revelaron que los aislados pertenecen a los géneros *Ceratorhiza* y *Epulorhiza*. Los aislados de *Epulorhiza* fueron identificados como *E. repens* (N. Bernard) R.T. Moore y *E. epiphytica* Pereira, Rollemberg et Kasuya. En estas dos especies se observó alto polimorfismo a través de RAPD, mientras que los aislamientos de *Ceratorhiza* obtenidos a partir de raíces de diferentes especies de *Oncidium* presentan alto grado de relación.

Shan *et al.*, (2002), aislaron 21 colonias de *Rhizoctonia* sp. de las raíces de cuatro especies terrestres de orquídeas de varias localizaciones en Hong-Kong: *Eulophia flava*, *Goodyera procera*, *Habenaria dentata* y *Spiranthes hongkongensis*. La morfología del cultivo, el número de núcleos por hifa, la ultraestructura del poro, y los análisis de RAPD y de los CAPS de los fragmentos del rDNA revelaron que la mayoría de estos aislamientos correspondían a los géneros *Ceratorhiza* y *Epulorhiza*. Los análisis de RAPD mostraron diversidad genética entre los aislados obtenidos a partir de diferentes hospederos.

Todos estos estudios corresponderían a aproximaciones en la evaluación de la especificidad entre el hongo y la orquídea hospedera.

De otra parte, la posibilidad que otros grupos funcionales de hongos pudieran estar asociados con orquídeas ha despertado recientemente un interés. Los análisis ecológicos moleculares han demostrado que varias especies fotosintéticas de orquídeas forman micorizas con los hongos pertenecientes al complejo *Rhizoctonia* y que simultáneamente se encuentran asociados con hongos que forman ectomicorrizas con raíces de árboles cercanos (Bidartondo *et al.*, 2004). De esta forma, Gebauer & Meyer (2003), postularon que las orquídeas fotosintéticamente activas se encuentran conectadas con los hongos típicos de las orquídeas y con los basidiomicetos que forman ectomicorrizas con los árboles.

Bidartondo *et al.* (2004) demostraron que por lo menos tres géneros evaluados de orquídeas (*Cephalanthera*, *Neottia* y *Corallorhiza*) eran colonizadas con hongos formadores de ectomicorriza como *Cortinarius*, *Hymenogaster*, *Inocybe*, *thelephora*, *tomentella*.

## 2.5 Formación de la micorriza orquidioide

### 2.5.1. Anatomía de la colonización

Los embriones embebidos e hinchados son rápidamente colonizados por las hifas presentes en el sustrato. Una apertura en la testa puede facilitar la entrada del hongo al interior de la semilla. La penetración del hongo ocurre a través de las células del suspensor (base) al final de la semilla, la entrada también ocurre a través de las células epidermales. El hongo cubre las células adyacentes por medio de una hifa simple, de esta forma la región basal puede presentar una colonización abundante. El crecimiento y anastomosis de la hifa intracelular resultan en la formación de una red tridimensional llamada pelotón. En esta estructura es donde se incrementa el área interfacial entre los simbiositos como veremos más adelante. En las hifas que son colonizadoras se observan pocas vacuolas, en contraste, en los ensortijados maduros el citoplasma del hongo presenta mayor vacuolización, contiene núcleos, mitocondrias, ribosomas, lípidos y glicógeno, y muy poco retículo endoplasmático. Algunas capas de células de la corteza de la raíz de las plantas pueden llegar a estar muy colonizadas, sin embargo, muchas porciones de la planta joven permanecen libres del hongo (Smith & Read, 1997; Harley & Williamson, 1971,1972; Rasmussen, 1990).

La membrana vegetal se invagina alrededor de la célula fúngica con la posterior formación de la matriz interfacial. En este punto, las células de la planta se muestran fisiológicamente activas conteniendo gran número de mitocondrias y retículo endoplasmático bien desarrollado, aparatos de Golgi y vacuolas de varios tamaños (Hadley & Williamson, 1971,1972; Smith & Read, 1997). Los núcleos de células colonizadas y no colonizadas del protocormo sufren un fenómeno llamado hipertrofia nuclear asociado con el incremento en los niveles de DNA (Arditti, 1992; Smith & Read, 1997; Rasmussen, 1990).

Otro cambio fisiológico importante es la desaparición de los granos de almidón de las células colonizadas y frecuentemente de otras células del protocormo micorrizado. Esto está claramente asociado con la presencia del hongo, ya que no ocurre en protocormos no infectados (Hardley & Williamson, 1972; Smith & Read, 1997).

Las raíces de especies terrestres están por lo general muy colonizadas (Rasmussen, 2002; Smith & Read, 1997; Batty *et al.*, 2002). Mientras que en orquídeas epífitas llegan a estar infectadas sólo después de entrar en contacto con el sustrato. Esto sugiere que el hongo no se transmite verticalmente en el material vegetal y que es necesaria su inoculación para el establecimiento de la simbiosis.

Los pelotones intracelulares tienen un periodo de vida limitado en la interacción de la micorriza. Estudios en microscopía electrónica han revelado que durante la lisis (algunas veces llamada digestión) la hifa se convierte en una estructura desorganizada y sus paredes empiezan a adelgazarse. En el estado final las paredes del hongo forman una masa irregular, la membrana plasmática de la planta se mantiene intacta y es separada de la masa fúngica por una capa electro-luciente que contiene callosa, pectinas y pequeñas cantidades de celulosa (Harley & Williamson, 1971; Pierik, 1990). Durante este proceso las células de la planta se mantienen vivas y activas y pueden ser recolonizadas por hifas que aparentemente sobrevivieron a los procesos de lisis o son colonizadas de nuevo por hifas de células adyacentes (Breddy, 1991).

En consecuencia de la colonización, lisis y la transferencia de nutrientes se produce el crecimiento de la planta (Arditti, 1992; Smith & Read, 1997).

### 2.5.2 Fisiología de la colonización

Tradicionalmente han sido reconocidas dos tipos de colonización para la micorriza orquidíode: la tolipofagia, encontrada en la mayoría de las especies y la ptyofagia, sólo encontrada en algunas especies de orquídeas micotróficas tropicales (Rasmussen, 2002). Esta clasificación está basada en los eventos fisiológicos que ocurren para la transferencia de nutrientes.

2.5.2.1 Tolipofagia. En este modelo, el hongo coloniza las raíces de la orquídea penetrando a través de las células epidérmicas y desarrollando el micelio por una capa de células conocidas como células hospederas, ubicadas en la corteza de las raíces. Es dentro de estas células, que los pelotones se desarrollan, ocupando el espacio intracelular con el desplazamiento de los organelos. No hay penetración de la membrana plasmática vegetal. Se plantea que los pelotones son estructuras dehiscentes al igual que los arbusculos de los glomerales. Rasmussen (1990), reporta una viabilidad de pelotones de 24 horas siendo estructuras de corta duración.

Pese a que los estudios de estructuras funcionales de la micorriza orquidioide están relacionados con la presencia de pelotones y la formación de una matriz interfacial (Breddy, 1991 y Rasmussen, 2002) (Figura 5) y que hasta el momento se ha planteado la transferencia de nutrientes del hongo a la planta una vez las hifas se han lisado (Digestión de pelotones), no se conoce con certeza la fisiología del intercambio de nutrientes bidireccional. Lo planteado por los anteriores autores sugiere una estructura funcional como la de la micorriza arbuscular con un intercambio activo de nutrientes (Gianinnazzi-Pearson *et al.*, 1994).

Se ha propuesto otra forma de colonización en donde el hongo no se desarrolla dentro de la célula vegetal y no hay formación de pelotones, la colonización ptyofagia.

2.5.2.2 Ptyofagia. La hifa entra a la raíz de la planta por crecimiento apical sin ramificaciones ni anastomosis. Una vez dentro coloniza las células de la corteza creciendo intracelularmente y desplazando los organelos. Una vez la hifa esta en cercanía al núcleo, experimenta plasmolisis influenciada por el protoplasma del hospedero. El contenido hifal se distribuye en la célula vegetal, los organelos del hongo quedan libres en el citoplasma dando lugar a cuerpos fúngicos libres conocidos como ptyomas. Estos sufren un proceso de digestión suministrando así nutrientes a la planta (Breddy, 1991; Rasmussen, 2002).

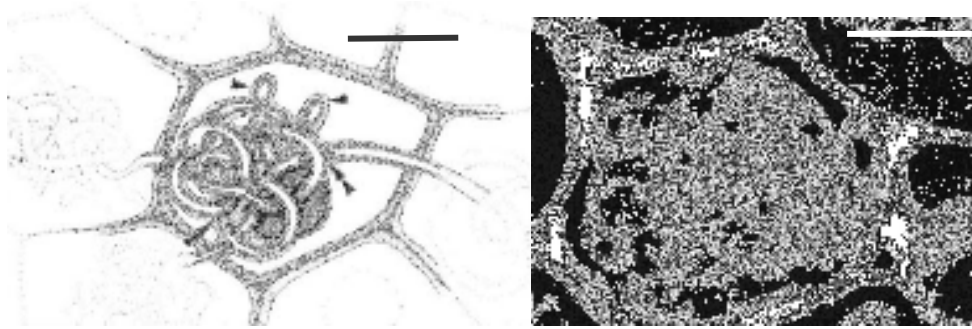


Figura. 5. Diagrama de pelotón mostrando la interfase entre el hongo y la célula de la raíz. El hongo es separado del citoplasma de la raíz por una membrana perifúngica (flecha simple), y la matriz interfacial (flecha doble). Barra = 50  $\mu$ m. Pelotón en las raíces de *Paphiopedilum sanderianum*. Barra = 50  $\mu$ m. (Peterson *et al.*, 2004)

### 2.5.3 Transferencia de nutrientes del hongo a la orquídea

El incremento en el crecimiento de los protocormos está basado en la cantidad de carbono orgánico que le suministra el hongo a éstos. La capacidad de muchos hongos de hidrolizar carbohidratos insolubles quiere decir que el micelio externo tiene acceso a abundantes fuentes en el suelo que pueden ser transportados a la orquídea. El hongo formador de micorriza puede obtener un suministro continuo de fotosintatos a partir de la asociación existente con otras plantas del sistema debido a las conexiones del micelio externo, de esta forma pueden ser entregados nutrientes a las orquídeas gracias a la actividad fotosintética de otras plantas y a esta conexión existente (Smith & Read, 1997).

Los trabajos sobre el crecimiento asimbiótico de los protocormos de orquídeas han empleado azúcares solubles en el medio que pueden ser usados tanto por el hongo como por los protocormos. Así, al igual que con otros sistemas de micorrizas, la translocación de nutrientes es un prerequisite para una eficiencia de la simbiosis (Smith & Read, 1997).

La capacidad de traslocación del hongo y la entrega de azúcares a los protocormos de *Dactylorhiza purpurella* (T. Stephenson & T.A. Stephenson) Soó y *Goodyera*

*repens* (L.) R. Br. ha sido confirmada usando Glucosa -C<sup>14</sup> adicionado a los medios de cultivo del hongo simbiote. Las cantidad de azúcares solubles y su distribución en los tejidos vegetales y en los fúngicos se determinaron por análisis de centelleo. Los cambios en los patrones de marcaje indicaron que la trealosa, azúcar predominante en el tejido fúngico y formada por el hongo a partir de la -C<sup>14</sup> glucosa hongo, era más abundante en los primeros días del análisis y que con el tiempo éste iba desapareciendo, mientras que la sacarosa fuente de carbono para la planta era más abundante en los últimos días de la prueba. Los análisis de centelleo se realizaron con diferentes fracciones extraídas en etanol. Estos resultados confirmaron que los carbohidratos son translocados en el hongo, y que durante la transferencia a la orquídea estos son convertidos a sacarosa como una fuente asimilable de carbono para la planta (Smith & Read, 1997).

Aunque la lisis del hongo en la micorriza de orquídeas es generalmente considerada como una manifestación de defensa de la planta, esto quizás ha sido asumido como un paso crucial en la transferencia de nutrientes. No hay evidencia clara de estas hipótesis, excepto que la respuesta del crecimiento a la colonización aparece después de la lisis de los pelotones. Esto sugiere más claramente que los nutrientes son transferidos a través de la membrana de la orquídea, con un potencial por parte de ésta para controlar el movimiento de diferentes nutrientes hacia el interior celular (Smith & Read, 1997; Rasmussen, 1990; Hadley & William, 1971, 1972).

#### 2.5.4 Viabilidad del micosimbionte

Los ensayos histoquímicos de viabilidad, pueden ser exitosos en la determinación de la cantidad de hifas activas presenten en las raíces colonizadas de la planta. La succinato deshidrogenasa es una enzima que tiene la capacidad de remover hidrogeniones de un sustrato (Succinato) y trasferirlos a otros (sales de azul de tetrazolio). La coloración púrpura obtenida en las estructuras fúngicas durante la tinción vital es debido a la precipitación de las sales reducidas del azul de nitro tetrazolio cuando gotas de formazán se acumulan en este (Rivetta & Miller, 2003).

Este ensayo enzimático es específico para la succinato deshidrogenasa, Sin embargo existen otros como la indonitrotetrazolio (INT) y el diacetato de fluoresceína (FDS) que son menos específicos (Hamel *et al.*, 1990). El método azul de nitrotetrazolio comparado con los otros dos métodos sólo determina la presencia de la succinato deshidrogenasa mientras que los otros dos métodos son más generales para la actividad metabólica como es la determinación de las esterasas y las NADH diaforasas (Hamel *et al.*, 1990).

El uso de enzimas para la determinación de análisis histoquímicos exactos requieren del control de todas las variables que pueden causar un error en la reacción, afectando el proceso de hidrólisis y subsecuente tinción. Los factores más importantes al momento de realizar este tipo de pruebas son: la concentración de enzima, tiempo, temperatura de inoculación, el pH de la solución donde la reacción se lleva a cabo, la presencia de electrolitos, activadores e inhibidores y la estabilidad de la enzima bajo condiciones antes mencionadas (Rivetta & Miller, 2003).

En consecuencia, a lo anteriormente enunciado los ensayos histoquímicos nos proporcionan una herramienta para la cuantificación de la actividad vital de los hongos formadores de micorriza, en este caso, el uso de la tinción vital succinato dehidrogenasa (SDH) suministra una herramienta para la cuantificación de la actividad metabólica del hongo en la planta.

## 2.6 Ecología de la micorriza orquidioide

La gran producción de semillas en orquídeas sugiere que la mortalidad de éstas y de plantas jóvenes puede llegar a ser excesivamente alta (Arditti & Ghani, 2002). La carencia de sustratos disponibles y las condiciones físicas adversas son limitantes ambientales que las semillas viables tienen que superar. Es por esto que se afirma que esta familia ha desarrollado estrategias evolutivas para su supervivencia dentro de las que se encuentra la formación de micorrizas, teniendo estas un impacto directo sobre el éxito reproductivo de las plantas desde estados de germinación hasta los estados adultos. Pero las semillas de orquídeas tienen un problema adicional: encontrar el microsimbionte compatible.

Dependiendo del hongo, de la proximidad de plantas asociadas o la disponibilidad de materia orgánica en descomposición, además de la cantidad y calidad de sustrato apropiado para el hongo, varían en consecuencia el establecimiento y la germinación de las semillas (Rasmussen, 2002).

Aun no se han descrito los mecanismos específicos de la atracción entre los simbioses o la dirección de crecimiento de las hifas antes de la penetración. La ocurrencia de la simbiosis es influenciada por factores como la nutrición de la planta y factores ambientales como suelo, (tipo de suelo, porcentaje de material orgánica) y temperatura (Bredd, 1991; Rasmussen, 2002, Batty *et al.*, 2002).

#### 2.6.1 Especificidad hongo-orquídea

La especificidad está definida como la amplitud filogenética de las asociaciones formadas por una especie en particular, es una cualidad ecológica y evolutiva importante de cualquier relación de simbiosis. Sin embargo, una relación taxonómica simple en las asociaciones encontradas en una especie en particular puede enmascarar una complejidad significativa en la especificidad entre o dentro de las poblaciones. La especificidad se encuentra potencialmente influenciada por factores extrínsecos tales como la geografía, la estacionalidad y el hábitat y por factores intrínsecos genéticos (Thompson, 1994).

Es necesario distinguir entre las asociaciones que pueden ser viables bajo condiciones controladas, mostrando una compatibilidad fisiológica, y aquellas que se den bajo condiciones naturales más competitivas, es decir una especificidad en contexto ecológico. Idealmente, la especificidad se debe probar *in situ* o bajo condiciones controladas *in vitro* pero semejando las condiciones naturales, con el micosimbionte creciendo en un sustrato natural, y con las semillas completamente viables y no dormantes (Rasmussen, 2002; Masuhara & Katsuya, 1994).

Se ha generado controversia acerca de la especificidad en cuanto a la asociación entre las orquídeas y el hongo formador de micorrizas. Los análisis de especificidad son complicados por diversas razones: los métodos de aislamiento y experimentos

para verificar los potenciales de especificidad del hongo se han basado en las hipótesis de que estas asociaciones en estados de adultez y con protocormos son los mismos y que los hongos aislados de la raíces de una especie en particular podrían no formar micorrizas con otras especies (Smith & Read, 1997; Otero *et al.*, 2002).

Una especificidad estrecha entre la orquídea y el hongo de micorriza podría ser una razón de la rareza y de la vulnerabilidad de una especie de la planta, siendo esto una razón más para abordar estudios en conservación. Un ejemplo es *Corallorhiza mertensiana* Bong., una especie rara vulnerable a la extinción, que fue encontrada asociada a una gama muy estrecha de micosimbiontes. En contraste, *C. maculata* (Raf.) Raf. presentaba un mayor rango de asociaciones y de esta forma su distribución es más amplia (Taylor & Bruns, 1999). Sin embargo, muy poco se sabe actualmente sobre cómo la simbiosis con los hongos afecta la competencia, la supervivencia y la distribución de las orquídeas (Rasmussen, 2002).

Por otra parte, trabajos realizados con germinación simbiótica indican que las interacciones fúngicas no son altamente específicas, sin embargo Arditti *et al.*, (1990, citados por Watkinson 2002), sugieren que esto sólo se cumple para ciertas especies. Zettler & McInnis (1993), encontraron que los aislamientos fúngicos de *Platanthera* sp. promovían la germinación de varias orquídeas norteamericanas. Smreciu & Currah (1989), también encontraron que aunque 15 especies de orquídeas norteamericanas y europeas poseían una asociación con diversos hongos, varios de éstos indujeron el crecimiento y desarrollo de orquídeas no relacionadas, cuando se incubaba bajo condiciones *in vitro*.

Zelmer *et al.*, (1996 citado por Smith & Read 1997) encontraron que las plantas jóvenes se encontraban asociadas a una gama más amplia de hongos que las plantas adultas. Esto pudo indicar un cambio del micosimbionte durante el desarrollo de la planta; sin embargo, puede ser que también refleje una germinación no específica.

Recientemente, el uso de técnicas moleculares para la identificación de hongos micorrícicos de orquídeas ha mostrado que las orquídeas tienden a ser específicas en sus interacciones micorrícicas (Taylor & Bruns 1999; Otero *et al.*, 2002, 2004). Dicha especificidad parece notablemente alta en orquídeas tropicales (Otero *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2005, Ma *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2005, 2003) y en Australia (Otero & Clements 2006).

Se conoce poco sobre la evolución de las simbiosis de la orquídea y la coevolución de estos dos organismos. La extensa distribución de las micorrizas en orquídeas sobre un amplio rango de condiciones es un claro indicador que el fenómeno es muy exitoso. Todas las orquídeas se encuentran asociadas a un tipo de *Rhizoctonia* sp., sugiriendo que este es el hongo ancestral. Asociaciones con otros hongos y su evolución probablemente ocurrieron después (Arditti, 1992).

La germinación se puede estimular por diferentes géneros de hongos y las plantas adultas también pueden ser colonizadas y contener varios hongos. Por lo tanto, la fase micoheterotrófica de la planta joven aparece como la etapa de cuello de botella en la cual la tolerancia hacia simbiosis es más baja (Leake, 1994). Es también la etapa en la cual la mortalidad es probablemente la más alta. Un balance en el desarrollo de plantas jóvenes puede ser el mejor criterio para determinar la compatibilidad entre semilla y hongo (Rasmussen, 2002)

Las interacciones reportadas hasta el momento son: 1. No infección, 2. Destrucción del hongo por parte de la orquídea, 3. Establecimiento de la simbiosis con la posterior formación de pelotones y 4. Una interacción parasítica, en donde las células de las orquídeas son invadidas por las hifas del hongo de una forma desordenada produciendo la muerte del protocormo (Figura 6)(Arditti, 1992).

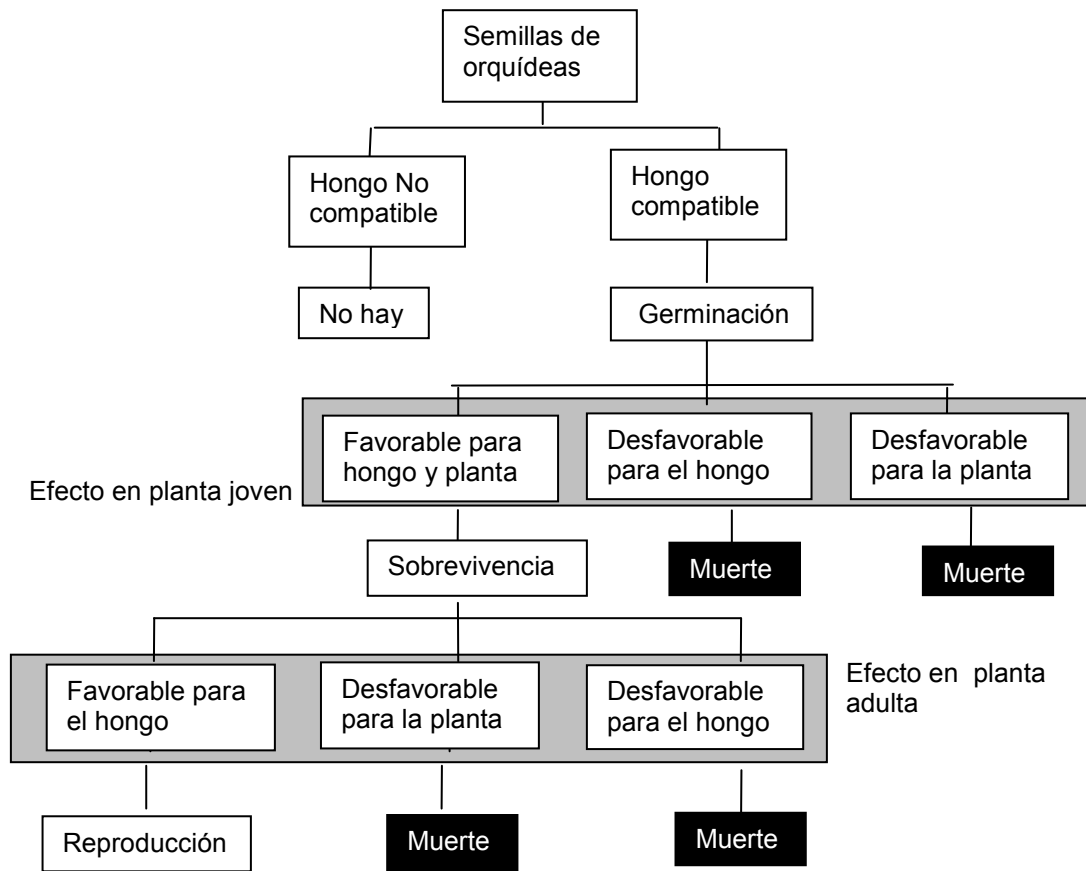


Figura. 6. Interacciones que se presentan en la simbiosis hongo-planta (Batty *et al.*, 2002)

### **3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

#### **3.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

La creciente transformación de los hábitats naturales ha dado lugar a procesos de deforestación o fragmentación, modificando así las condiciones climáticas regionales y globales y la posterior pérdida de la diversidad biológica.

Las especies vegetales, en este caso las orquídeas, que funcionan como bioindicadoras de las condiciones ambientales están desapareciendo de sus hábitats naturales. Sumado a esto, la creciente explotación o extracción de los bosques de especies nativas maderables para el comercio ha dejado a algunas especies de orquídeas en vía de extinción por la destrucción de su entorno.

*Masdevallia coccinea* se encuentra reportada en los apéndices CITES número II en el cual figuran especies que no están necesariamente amenazadas de extinción pero que podrían llegar a estarlo a menos que se controle estrictamente su comercio (CITES, 2006). Sumado a esto, el desconocimiento en sus relaciones simbióticas con hongos micorrícicos limita los procesos de recolonización o reforestación con esta especie. Si partimos de la premisa que la familia Orchidaceae es micótrofa por lo menos en los primeros estadios de desarrollo, es necesario entonces abordar estudios que permitan conocer las condiciones de la formación de micorrizas bajo medios naturales y el potencial micótrofo de la especie, así, como el conocimiento de la fisiología del micosimbionte y sus relaciones específicas con su hospedero.

#### **3.2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

Existe formación de micorriza en plantas de *Masdevallia coccinea* establecidas bajo condiciones naturales? De ser así, cuales son las características de la colonización y viabilidad del micosimbionte en diferentes etapas de desarrollo de la planta?.

### **3.3 JUSTIFICACIÓN**

Los ecosistemas tropicales tienen vital importancia por su riqueza y amplia biodiversidad ya que en ellos están ubicadas la gran mayoría de especies con un potencial aún sin determinar en aspectos tales como el alimenticio, medicinal y ecológicos, entre otros.

En específico para Colombia, la conservación de los ecosistemas de páramo representa uno de sus mayores desafíos, pues como reserva de los recursos hídricos, balanza ecológica de las zonas productivas más bajas, refugio de multitud de especies, e inexplorado potencial turístico, constituyen un valor ecológico y económico incalculable.

El estudio de las especies que conforman estos hábitats y los procesos que determinan su efectiva distribución, permitirá el desarrollo de estrategias biotecnológicas tendientes a la obtención de material vegetal tanto para programas de propagación y reintroducción como para el uso sostenible de éstas.

La caracterización de las asociaciones de esta familia y las posibles especializaciones en cuanto a hongos micorrizicos es el primer paso para el entendimiento de las interacciones y una herramienta importante para el desarrollo de cultivos simbióticos que podrían generar beneficios en cuanto a tiempos de germinación de estas semillas y a la producción masiva de material vegetal, parámetros fundamentales para la repoblación en medios naturales o para la uso de ésta en la industria de la floricultura.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

- Establecer la presencia de micorriza orquidioide en *Masdevallia coccinea* bajo condiciones naturales.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar la micorriza en plantas de *Masdevallia coccinea* de dos edades diferentes establecidas en el Municipio de Guatavita.
- Evaluar la viabilidad del micosimbionte en raíces de *Masdevallia coccinea* de dos edades diferentes establecidas en campo.
- Caracterizar macro y microscópicamente los aislamientos fúngicos obtenidos a partir de raíces y suelo asociado a *Masdevallia coccinea*.
- Evaluar el efecto de algunas propiedades fisicoquímicas del suelo sobre la población del micosimbionte y sobre la asociación estudiada.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Localización y descripción geográfica del área de estudio.

El presente estudio se llevó a cabo en la finca Villa Rosa ubicada en el municipio de Guatavita, Cundinamarca ubicado a 04° 50' 20.8'' latitud norte y 73° 46'45.6'' longitud oeste, con una altitud de 2780 m.s.n.m. El municipio de Guatavita colinda al norte con el municipio de Sesquilé, al sur con el municipio de Guasca, al oriente con el municipio de Gachetá y al occidente con Tocancipá y Gachancipá.

El clima es característico de la alta montaña tropical con temperaturas entre 4.5 y 21.4°C, con heladas periódicas, generalmente en febrero y diciembre. Presenta un régimen de lluvias unimodal-biestacional con precipitación promedio anual de 2400 mm y mayor intensidad de Abril a Septiembre, calificándose como zona húmeda (Rangel, 2000).

La zona de estudio se localiza en la región del subpáramo constituyéndose como una región de abundante matorral formando una zona de transición entre bosque alto andino y el páramo propiamente dicho dominado por arbustos y salpicado por arbolitos (Cuatrecasas, 1989). *Masdevallia coccinea* se encuentra asociada a plantas típicas de esta región como: *Hypochaeris radicata* (Asteraceae), *Alnus acuminata* (Betulaceae), *Baccharis latifolia* (Asteraceae), *Macleania ruperstris* (Ericaceae), *Tibouchina lepidota* (Melastomataceae), *Oxalis stricta* (Oxalidaceae) *Piper* sp. (Piperaceae) *Chusquea scandens* (Poaceae), *Rubus floribundus* (Rosaceae), *Galium hypocarpium* (Rubiaceae), al igual que especies de helecho (*Pteridium aquilium*) y musgos como *Shagnum* spp. y *Breutelia elongata* (Bartramiaceae)

### 5.2 Diseño de investigación

En este proyecto se maneja una investigación de tipo comparativa donde se busca establecer la presencia de micorriza en *Masdevallia coccinea* bajo condiciones naturales en dos edades diferentes. Para esto hallaron porcentajes de micorrización del hongo y porcentaje de viabilidad del micosimbionte en las raíces.

### 5.2.1 Población de estudio y Muestra

El muestreo se llevó a cabo durante los meses de Agosto y Octubre de 2006 periodo que comprendió la estación de lluvias. Se realizaron 3 muestreos en donde se hizo un reconocimiento de la zona, se recogieron muestras de raíz y de suelo asociado para aislamiento del micosimbionte y finalmente muestra de raíz para cuantificación de la viabilidad y micorrización.

Las plantas se encuentran establecidas a una distancia de 10 cm aprox. Se tomaron muestras de plantas de dos edades: Edad 1, establecidas en el año 2003 con un tamaño no mayor a 10cm de largo, con presencia de tres hojas bien desarrolladas (Fig. 7A) estas plantas se establecieron a partir de semillas bajo condiciones naturales *in situ* y edad 2, establecidas en 1998 con un tamaño de 20cm de largo y con 10 hojas mínimo (Fig. 7B). Estas plantas se obtuvieron a partir de reproducción asexual o vegetativa. Se tomaron las muestras de individuos que se encontraron en floración para mayor certeza de la especie.

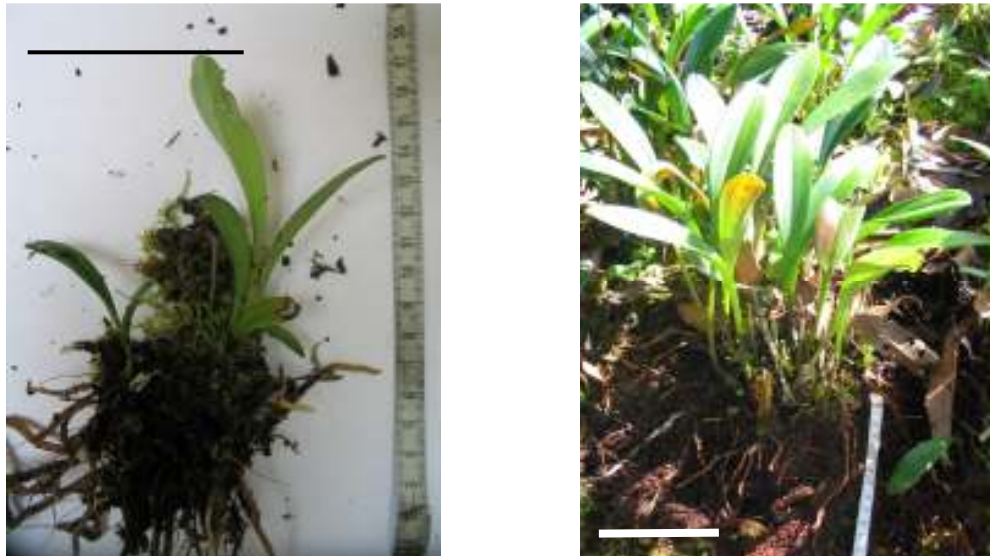


Fig. 7. A. Planta juvenil establecida aprox. en el 2003 con tres hojas bien desarrolladas. Barra: 10cm B. Planta adulta establecida aprox. en 1998 con presencia de 10 hojas mínimo. Barra: 10cm

### 5.3. Métodos

#### 5.3.1 Toma de muestras de raíces y suelo en campo

##### Raíces

Se tomaron muestras de raíces de cinco individuos de cada edad que se encontraban en estado de floración para tener certeza de la especie. Para la edad 1, se tomaron todas las raíces de cada individuo. Para la edad 2, se cortaron cinco fragmentos de 7cm para aislamiento del hongo, cinco raíces de 7cm para realizar viabilidad y cinco raíces de 7cm para realizar porcentaje de micorrización.

Las raíces así colectadas se almacenaron en bolsas de plástico, con el suelo adheridas a ellas, a temperatura de 4°C. Se procesaron en un periodo no mayor a 24 horas en el caso de aislamiento del hongo y determinación de su viabilidad dentro de la raíz, y 8 días en el caso de determinación del porcentaje de micorrización.

##### Suelo

Las muestras de suelo fueron tomadas directamente de donde se encontraba el individuo y se tomaron 10 gramos de muestras a una profundidad de 5 cm. Adicionalmente, se tomó 1 Kg de suelo donde están establecidas las plantas y se enviaron al Laboratorio de Suelos del Instituto Geográfico Agustín Codazzi para su análisis (caracterización, determinación de nitrógeno total, fósforo y carbono orgánico).

#### 5.3.2 Caracterización de la Micorriza

##### Determinación del porcentaje total de micorrización

Las raíces colectadas se colocaron en tubos de ensayo con hidróxido de potasio a una concentración del 15% por un periodo de 2 horas y media y se siguió el protocolo de aclarado y tinción de Phillips & Hayman (1970). Se realizó el montaje de cinco láminas por individuo adulto para un total de 25 láminas. Cada lámina contenía 7 fragmentos de raíz. Para los individuos jóvenes se realizó el montaje de todo el sistema radical y el número de láminas dependió de la disponibilidad del material. El porcentaje de micorrización se determinó con la metodología propuesta

por Trouvelot *et al.*, (1986), donde se reemplazó la abundancia de arbusculos por abundancia de pelotones.

Para la observación más detallada de la colonización se realizaron cortes con micrótomo de un grosor de 10  $\mu\text{m}$  en el laboratorio de Histotecnica de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá. Se realizó el método de fijación, deshidratación, corte y tinción, usado en tejidos vegetales con una tinción de raíces con safranina fast green y azul de tripano (Roth, 1964).

### 5.3.3. Evaluación de la viabilidad del micosimbionte

#### Determinación de la actividad succinato deshidrogenasa en hongos que colonizan la raíz

Para detectar la actividad metabólica de los hongos micorrizogénicos dentro de la raíz, se tomaron 5 individuos adultos y 5 individuos juveniles, las raíces fueron procesadas a las 24 horas de la colecta y durante ese tiempo fueron mantenidas en hielo.

Se utilizó la metodología propuesta por Gianinazzi-Pearson *et al.*, (1994) (Ver Anexo 1) donde las raíces colectadas se colocaron en tubos de ensayo en una solución de celulasa y pectinasa por 2 horas a una concentración de 15 U/ml y finalmente incubadas en la solución azul de nitro tetrazolio por 20 horas a temperatura ambiente ( $19\pm 2^\circ\text{C}$ ) en total oscuridad.

El porcentaje de hongo activo se determinó según la metodología de Trouvelot *et al.*, (1986) y el número de láminas fue igual al descrito en el numeral anterior.

### 5.3.4. Aislamiento de *Rhizoctonia* sp. a partir de raíces y suelo

Para el aislamiento del micosimbionte se emplearon las metodologías de macerado y siembra directa.

Para las dos metodologías se realizó una desinfección superficial de las raíces de cada individuo de la siguiente forma: se lavaron durante 2min con agua del grifo y

0.1% de Tween 20, luego fueron lavadas con etanol al 70% por 1min, en seguida fueron lavadas por 30seg en hipoclorito de sodio al 2.5%, y finalmente enjuagadas tres veces con agua destilada estéril (Otero *et al.*, 2002). Todas las siembras para aislamiento se realizaron sobre medio PDA (Difco 39g/L).

Para la metodología de macerado se tomaron 2 fragmentos de raíz de 1cm previamente desinfectadas de cada individuo y se realizó un macerado de éstas en 5ml de agua destilada estéril, finalmente se sembraron 100µl de esta solución sobre el medio de aislamiento (Escobar, 2006).

Para la metodología de siembra directa, después de la desinfección superficial de las raíces se cortaron en fragmentos de 1cm y se colocaron 4 fragmentos sobre el medio de cultivo (PDA). Se sembraron 10 cajas para individuos adultos y 10 cajas para individuos juveniles en total 40 fragmentos de raíz para cada edad incluyendo zona apical, zona de elongación y zona basal. La temperatura de incubación fue  $19\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

En el caso del aislamiento a partir de muestras de suelo, se usó un caldo de extracto de suelo para realizar un preenriquecimiento de la solución. Se tomaron 10g del suelo y 90ml de agua destilada, se autoclavó por 20min a 20 lb y se filtro en papel Whatman No. 4. En 99 ml de este caldo se adicionó 1g de suelo y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 24 horas. A partir de esta dilución ( $10^{-2}$ ) se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-6}$  en NaCl al 0.85%, se sembró en superficie 100µl en PDA por duplicado.

#### 5.3.5 Purificación y caracterización de los aislamientos

A partir de las colonias obtenidas se realizaron pases sucesivos en el medio inicial en el medio inicial de aislamiento, hasta obtener colonias puras. Una vez obtenidas se caracterizaron macro y microscópicamente. Se describió el tipo y tasas de crecimiento de la colonia y la pigmentación del micelio. La descripción microscópica se realizó a partir de láminas montadas por el método de impronta con azul de lactofenol, la caracterización se realizó a través de un microscopio de luz Olympus

BO71 donde se describió la morfología del micelio, presencia y número de núcleos, septación, forma de división y diámetro de hifas.

#### 5.4 Análisis de la información

Los porcentajes de micorrización y la cuantificación de la viabilidad se determinaron en el programa MycoCalc (<http://www.dijon.inra.fr/mychintec/MycoCalc-prg/download.html>)

Con los datos obtenidos se realizaron pruebas de normalidad y homocedasticidad. En el caso de los datos de viabilidad que no se ajustaban a los supuestos de normalidad se realizó una transformación  $\log_{10}$  y se realizó ANOVA de una vía para determinar diferencias entre las medias de las variables según la edad de los individuos.

Los datos se analizaron en el programa Statistix V.7 para Windows.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*M. coccinea* presenta macroscópicamente unas raíces densas de aprox. 30cm las más largas y 5mm de diámetro. Las raíces jóvenes presentan un color blanco y son visibles pelos radicales mientras que en las raíces maduras el color es café oscuro y no se observan estas estructuras.

En cuanto a la anatomía de las raíces estas cuentan con una primer tejido de aproximadamente 5 capas de células hexagonales que se identificó como velamen de 17.5  $\mu\text{m}$ . Luego de éste, se encuentra la corteza y en medio de estas dos capas se encuentra la exodermis como una sola fila de células juntas. La corteza con 142.5  $\mu\text{m}$  cuenta con células amorfas de forma redonda, al final de esta capa y junto al estele se encuentra la endodermis como una capa de células juntas, redondas (Figura 8A). Finalmente se encuentra en la parte central el estele, (Figura 8B) compuesta por el xilema y el floema. Microscópicamente las células corticales de las plantas colectadas presentan una alta colonización por hifas de hongos formando densos ovillos (pelotones) intracelulares.

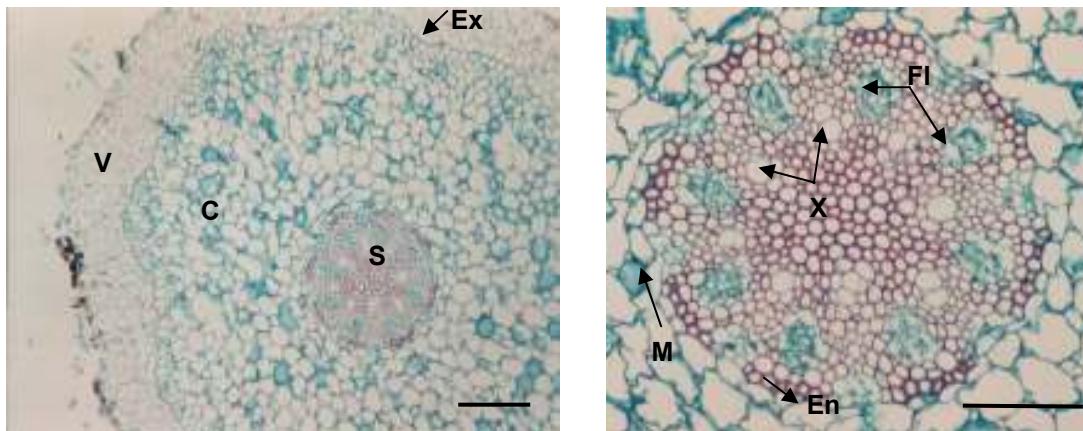


Figura 8A. Anatomía de raíz de *M. coccinea*. V, Velamen; C, Corteza; S, Estele; Ex, Exodermis. Barra: 20  $\mu$ m. B. Anatomía del estele. M, Mucilago; X, Xilema; FI, Floema; En, Endodermis; Hv, Haces vasculares. Barra: 10  $\mu$ m

#### 6.1 Análisis fisicoquímico del suelo

El suelo presenta un pH extremadamente ácido (3.5) y un porcentaje de materia orgánica alto. La capacidad de intercambio catiónico es alta al igual que la concentración de potasio, mientras que el magnesio, el sodio y calcio presentan valores bajos. Respecto a los aniones no fueron detectados carbonatos ni bicarbonatos. Las bases totales al igual que el porcentaje de saturación de bases presentan valores bajos. Por último la saturación de aluminio presenta un valor alto y valor de fósforo disponible es alto (Anexo 5).

El suelo de establecimiento de las plantas presentaba una capa de hojarasca de aproximada 10cm de profundidad, compuesta principalmente por hojas de árboles dominantes y hojas de *M. coccinea*. El contenido de materia orgánica y de nitrógeno total junto con el pH extremadamente ácido nos indica tasa de descomposición de hojarasca bajos limitados por clima y la altitud. Sin embargo la presencia de heterótrofos totales y de hongos miceliales en el sustrato indica procesos de mineralización de nutrientes, favoreciendo un aporte constante de C, N y P a los organismos presentes en este.

Se encontró una concentración alta de fósforo en el suelo a pesar de la ausencia de procesos de fertilización en el área de estudio, esto puede deberse a la actividad microbiana y a un alto grado de descomposición de la hojarasca, además el pH bajo y la presencia de aluminio indican la formación de fosfato de aluminio dejando al fósforo no disponible para las plantas. El valor del fósforo en solución (0.26%ppm) sustenta la importancia de la micorriza en la nutrición fosfatada de la planta de esta forma, los altos porcentajes de micorrización encontrados tanto en individuos de la edad 1 como de la 2, pueden deberse a los requerimientos de este nutriente, siendo el hongo la fuente de suministro.

El hecho de que la muestra no disperse nos indica que el suelo está compuesto en su mayor parte por una capa de hojarasca extensa además de materia orgánica en proceso de descomposición, confiriéndole la característica de un suelo orgánico.

#### 6.1 Determinación del porcentaje total de micorrización

Edad 1.

La micorrización que se presenta en los fragmentos de raíz de los individuos juveniles es abundante, los pelos radicales se encuentran casi siempre micorrizados (Figura 9A) y hay presencia de pelotones (Figura 9B).

En la mayoría de los fragmentos que comprendían los ápices de las raíces no se observa micorrización y por ende tampoco la presencia de pelotones. En algunas sí se presenta micorrización pero en un porcentaje bajo (<10%).

En cuanto a los porcentajes de colonización la frecuencia de micorrización fue del 100% para todos los individuos, la intensidad se encuentra entre 62-83% y la riqueza de pelotones en el sistema radical está entre el 44-65%, excepto en el individuo 5 (16.72%) (Anexo 4).

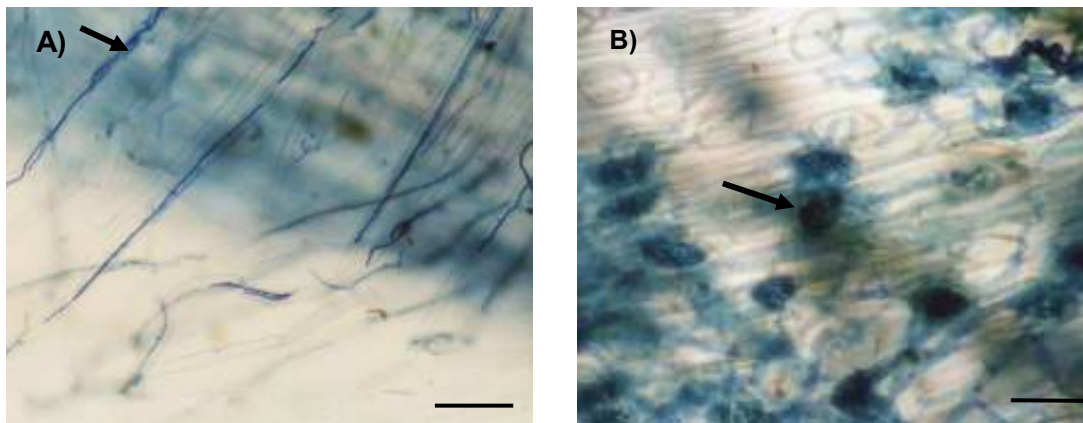


Figura 9. A) Pelos radicales micorrizados de individuo de la edad 1. La flecha indica la formación del ángulo recto característico de *Rhizoctonia* sp. (Barra =50  $\mu$ m) B) Pelotones de individuo de edad 1 (Disposición longitudinal de la raíz) (Barra =50  $\mu$ m).

## Edad 2

La micorrización que se presenta en los fragmentos de raíz de los individuos adultos es abundante en la mayoría de los fragmentos, desde >50% hasta >90%. Hay presencia de pelotones en casi todos los fragmentos y estos tienen morfología de espiral (Figura 10A) o ensortijados (Figura 10B), disposición típica de organismos parásitos.

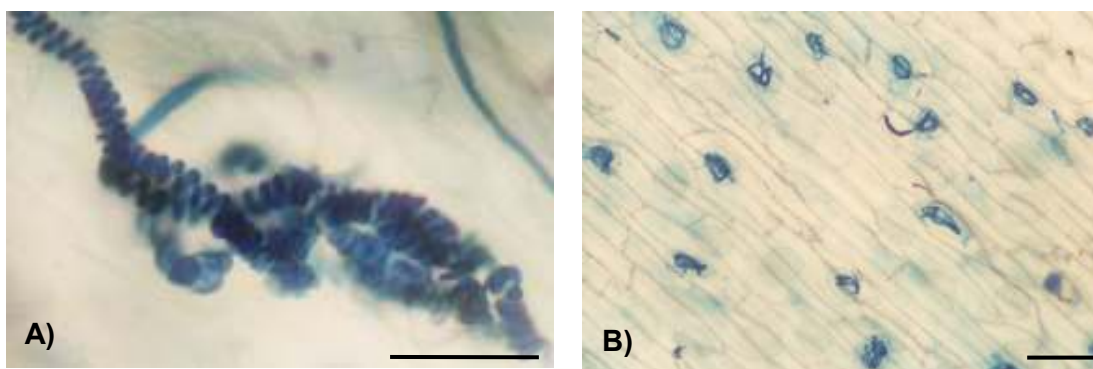


Figura 10 A) Disposición en espiral de pelotón de individuo adulto 3 (Barra: 50  $\mu$ m); B) Ensortijados, disposición de los pelotones de individuo adulto 1 (Barra: 50 $\mu$ m).

En la edad 2 al igual que en la edad 1, los ápices tampoco presentaban micorrización con un grado de colonización <10% en el fragmento evaluado. Los datos de colonización de los ápices no se analizan independientemente, para los análisis se determina la colonización total del fragmento montado en la placa (2cm de largo).

En la Figura 11 se presentan los porcentajes de micorrización para los individuos juveniles (Edad 1) y los adultos (Edad 2) de *M. coccinea*. Aunque el análisis de varianza no mostró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las edades para ninguna de las variables (Anexo 5), se observa para los individuos de la edad 1 una tendencia mayor en la presencia de pelotones que en los individuos adultos (A% Edad 1: 66.05%; Edad 2: 53.52%)

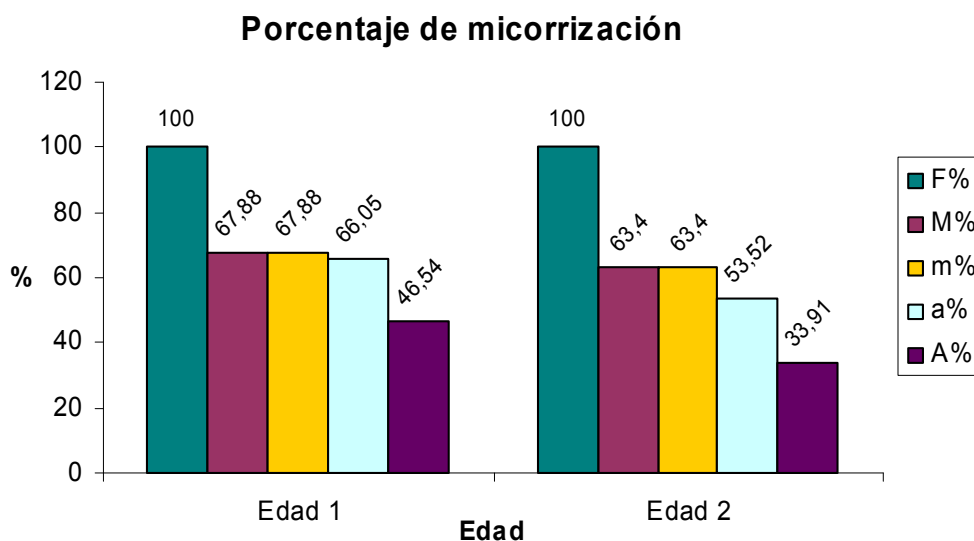


Figura 11. Porcentaje de micorrización para individuos de la edad 1 y edad 2. F% Frecuencia de micorrización, M% intensidad global de la micorrización, m% intensidad de la micorrización en los fragmentos infectados, a% riqueza de pelotones de la parte micorrizada, A% Riqueza de pelotones del sistema radicular (Anexo 3).

En los adultos no se observan los pelos radicales micorrizados mientras que en los individuos de la edad 1 sí. En general el hongo que se observa presenta las características típicas de *Rhizoctonia* spp. como los septos, y los ángulos en 45 y 90 grados (Figura 12).

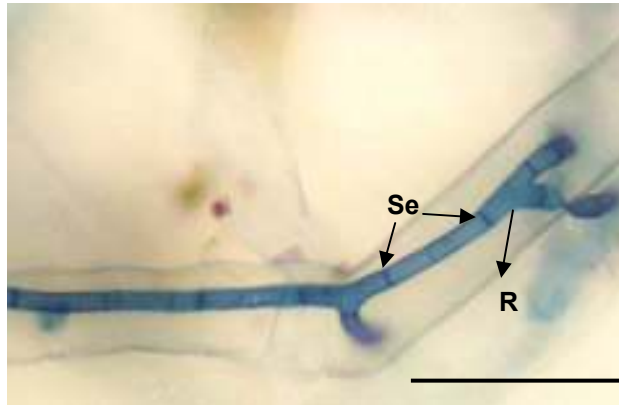


Figura 12. Hifas típicas de *Rhizoctonia* en pelo radical de individuo de edad 1. Se observan septos (Se) y ramificación (R) de la hifa en un ángulo de 45 grados. (Barra =50  $\mu$ m)

Tanto en los individuos adultos como en los jóvenes se observaron pelotones en lisis, estos se localizaban a lo largo de la corteza de la raíz y en el velamen y se presentaban como una masa amorfa contenida dentro de las células de las raíces (Figura 13). Al mismo tiempo, en la corteza de la raíz fue posible la identificación de pelotones en formación o intactos localizados tanto en la periferia de la corteza, como a lo largo de ésta.

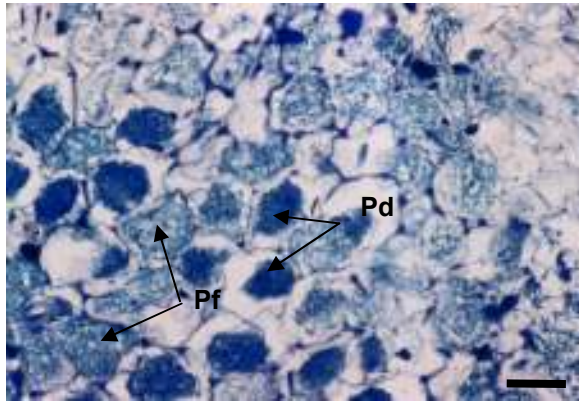


Figura 13. Corte transversal de raíces de *M. coccinea* individuo 3 de la edad 1. Pelotones en diferentes estados de digestión y de formación. Tinción con azul de tripano. Pd, Pelotones en digestión; Pf, Pelotones en formación. (Barra:50  $\mu$ m)

Estos resultados concuerdan con los reportados por Masuhara & Katsuya (1994) donde se observan pelotones en diferentes estados, tanto de formación como de lisis (Figura 13). La digestión de pelotones contribuye a la transferencia de vitaminas, azúcares y aminoácidos y a la obtención de energía por parte de la planta (Batty *et al.*, 2002; Peterson & Massicotte, 2004; Zettler, 1997; Zettler *et al.*, 2001).

Así mismo, Pereira *et al.*, (2005), reportan pelotones intactos en las capas más externas de la zona cortical. Estos pelotones probablemente sirven como una fuente de inóculo para la recolonización de células en capas más profundas de la corteza de la raíz. La propagación del hongo se hace a través de micelio intacto resaltado esto por los altos porcentajes de colonización obtenidos.

Cuando se presentan ensortijados ya sea en protocormos o bajo condiciones *in situ* Masuhara y Katsuya (1994), sugieren una relación de especificidad ecológica. Cuando se considera especificidad entre hongos y orquídeas las técnicas de aislamiento de micosimbionte son muy importantes. Muchos hongos que no forman asociaciones de micorrizas pueden existir sobre la superficie de las raíces, dentro del velamen o como microorganismos endófitos en las capas de la corteza de las raíces (Masuhara & Katsuya 1994). Esto puede incluir especies de *Rhizoctonia* que se encuentran en el medio y especies potenciales para formar micorrizas, pero que

no necesariamente sea específica para esta especie, es decir, que no se encuentran formando una relación de micorriza funcional.

Así, el hecho de observar estas estructuras y además aislar *Rhizoctonia* sp. a partir de la raíz indica la presencia de micorriza orquidioide en plantas jóvenes y adultas de *M. coccinea*.

Por otra parte, el aislamiento del hongo a partir de pelotones formados en la corteza de la raíz, es una técnica de las más confiables para la obtención de los micosimbiontes que forman la especialización ecológica. Sin embargo, estos aislados también pueden contener contaminantes como bacterias o esporas de otros hongos del suelo. Muchas especies de *Rhizoctonia* son encontradas en diversos hábitats incluyendo pastizales y bosques (Shen *et al.*, 1991) y muchas de éstas aunque se encuentre en el suelo no necesariamente se encuentran formando una asociación de micorriza.

Las técnicas usadas para el aislamiento del micosimbionte y para la determinación de la especificidad deben ser cuidadosamente consideradas cuando se pretende examinar una especificidad ecológica de la asociación en los medios naturales, ya que en muchas especies puede existir una especificidad potencial referida a las asociaciones que se presentan bajo otras condiciones que no son las naturales, por ejemplo, condiciones *in vitro* (Masuhara & Katsuya 1994).

Al igual que los resultados reportados en este trabajo, Masuhara & Katsuya (1994) muestran que el hongo formador de micorrizas de la familia Orchidaceae se encuentra tanto en individuos juveniles como en individuos adultos. Shagufta *et al.*, (1993 citado por Rasmussen 2001), reportan que la micorriza orquidioide se encuentra presente a través de todo el año en especies tropicales con mucha más actividad micotrófica en los periodos de más actividad de crecimiento de la planta.

En la figura 11 se observa que existe un porcentaje alto de micorrización tanto en los individuos de la edad 1 como en los individuos de la edad 2, además la abundancia de pelotones (A%) refleja una actividad de transferencia de nutrientes

en los dos estados de desarrollo. Así, el tipo de colonización que se observa en las raíces de *M. coccinea* pertenece al tipo tolipofagia evidenciado por la presencia de pelotones tanto en formación como en lisis (Breddy, 1991; Rasmussen, 2002).

Los altos porcentajes de micorrización pueden deberse a que el sitio donde se llevó a cabo el estudio se encuentra rodeado de una gran diversidad de especies vegetales nativas. En relación a esto Smith y Read (1997), mencionan que la mayor intensidad de colonización de micorrizas se encuentra asociada en lugares donde existe una mayor diversidad vegetal, además de la existencia de una vegetación nativa fortaleciendo asociaciones ecológicas que favorecen la permanencia de organismos y el ciclaje de nutrientes.

El genero *Rhizoctonia* se asocia como un fitopatógeno causando pudriciones tanto en partes aéreas como terrestres (Rodríguez & Julia, 2002). Sin embargo, Sepúlveda (2005) aisló *Rhizoctonia* a partir de segmentos de hoja en *Thrinax morrisii*, por otra parte, Cubillo (2005) reporta *Rhizoctonia* como una especie endófito de hojas y segmentos nodales en *Ilex guayusa* encontrando una frecuencia relativa de 0.19 y reportando a este como un hongo endófito de partes aéreas donde la planta es una hospedera asintomática. De esta forma, la hojarasca asociada a *Masdevallia coccinea* aportada por plantas asociada pueden contener *Rhizoctonia* como endófito de hojas y estar contribuyendo de esta forma como una fuente de inóculo.

Peterson & Massiccotte (2004), señalan que los niveles más bajos de colonización se encuentran asociados a suelos con algún tipo de erosión o remoción de la capa superficial y que el reflejo de su insostenibilidad puede estar relacionado tanto por el crecimiento de la planta, como por el número de propágulos o micelio disponible de los hongos micosimbiontes. En el sitio en el que se realizó el estudio, la remoción de materia orgánica o procesos de erosión son inexistentes contribuyendo esto a la minimización de impacto y al mantenimiento de la microflora del suelo que fortalece las asociaciones de micorriza que se presentan, sin embargo, como veremos más adelante en este trabajo el aislamiento de *Rhizoctonia* partir de suelo no fue posible.

### 6.3 Aislamiento de *Rhizoctonia* sp. a partir de raíces y suelo

Para la metodología de macerado no se obtuvieron aislamientos de *Rhizoctonia* spp. sólo fue posible la observación de contaminantes como *Penicillium* sp. y de bacterias.

Para la metodología de siembra directa se aisló y purificó el micosimbionte, a partir de muestras de individuos de las dos edades. Para la edad 1 se obtuvo crecimiento a partir de 21 fragmentos (52.5%), mientras que para raíces de plantas de la edad 2 se presentó un 15% de crecimiento. En algunos de los fragmentos donde no se encontró crecimiento de *Rhizoctonia* sp. solo se observó crecimiento bacteriano, esto puede deberse a las tasas de crecimiento mayor en bacterias en comparación con *Rhizoctonia* sp. Igualmente, esto podría indicar la presencia de bacterias endófitas en las raíces de las orquídeas lo que concuerda con los reportes de Wilkinson *et al.*, (1989) quienes aislaron *Pseudomonas fluorescens-putida* una bacteria endotrófica de los tejidos que formaban micorriza en 9 orquídeas australianas de 12 estudiadas.

El micosimbionte aislado a partir de raíces de individuos de la edad 1, plantas generadas de semillas, corresponde morfológicamente al mismo hongo aislado de raíces de la edad 2, plantas generadas por reproducción asexual o vegetativa. Estos resultados indican que el hongo no solo se encuentra a lo largo de las diferentes etapas estudiadas de *M. coccinea* si no que dicha asociación simbiótica se establece con el mismo micosimbionte.

#### 6.3.1 Descripción macroscópica del aislamiento

Las colonias presentan color amarillo crema con un crecimiento radial en el medio PDA. Su tamaño es de 1.5 cm luego de 8 días de siembra con una tasa de crecimiento de 0.1875 cm/día. Con el tiempo, el micelio se oscurece hasta que a los 22 días de cultivo se observa un color café oscuro (Sneh *et al.*,. 1991) al cabo de este tiempo la caja de petri se encuentra cubierta por hongo con un diámetro de 15 cm (Figura 14).



Figura 14. Aspecto macroscópico del aislamiento de *Rhizoctonia* sp. a partir de *Masdevallia coccinea*. PDA, cultivo de 5 días ( $19\pm 2^\circ$  C). Barra: 1cm

#### 6.2.2 Descripción microscópica del aislamiento

El aislamiento presentaba las hifas y septos de hongos del complejo *Rhizoctonia*. El ancho de las hifas más jóvenes es de 5.0 micras y de 10.0 micras las hifas más maduras, la distancia entre septos regulares es de 45 micras mientras que solo algunos presentaban una longitud de 50 y 62.2 micras luego de 15 días de siembra. Las ramificaciones de una hifa se entre dos septos, éstas presentaban una constricción en la base y el contenido de las hifas es lipídico. Estas hifas corresponden el genero *Rhizoctonia* sp. (Barnett & Hunter, 1983; Sneh *et al.*, 1998)

No se realizó una metodología específica para la tinción de núcleos pero fue posible la observación a través de la tinción con azul de lactofenol y a partir de una observación en 100X de dos núcleos ubicados entre septos. Estos resultados reflejan que el micosimbionte aislado pertenece al complejo *Rhizoctonia* binucleado (Sneh *et al.*, 1998). Resultados que concuerdan para aislamientos previos en orquídeas tropicales realizados por Otero *et al.*, (2002, 2004, 2005; Pereira, *et al.*, 2004, 2005).

### 6.2.3 Aislamiento de bacterias y hongos de suelo

El aislamiento del micosimbionte a partir de muestras de suelo no fue posible. Se obtuvieron recuentos de colonias bacterianas de  $79 \times 10^6$  UFC/g (Figura 15A). En cuanto a los recuentos de colonias de hongos se obtuvieron  $<10^4$  UFC/g (Figura 15B). Estos recuentos de bacterias y de hongos se encuentran asociados al porcentaje de materia orgánica y nitrógeno disponible en el suelo. A pH bajo la diversidad de hongos se hace mayor como en este caso. Sin embargo, también se encontraron bacterias en el suelo indicando una adaptación de estas a dichas condiciones.

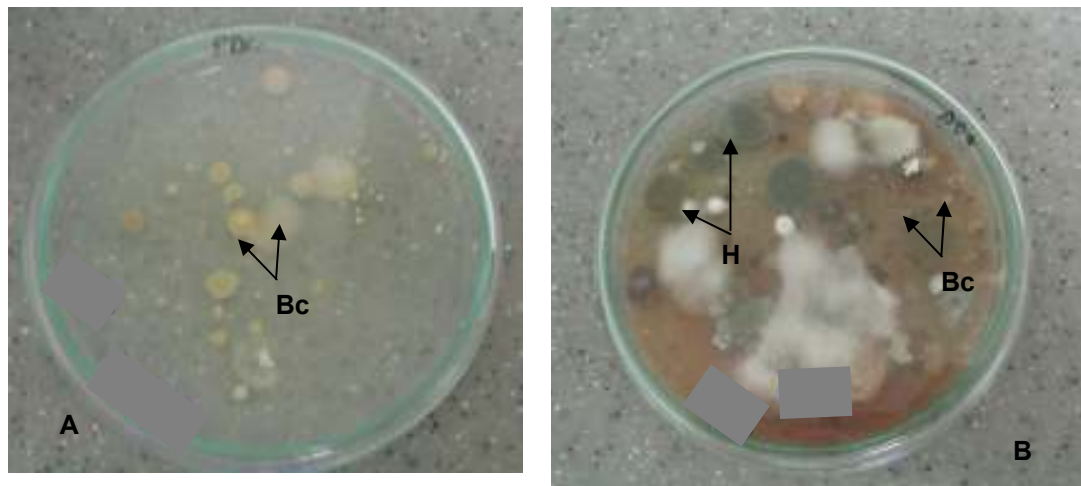


Figura. 15 A. Aislamiento microbianos obtenidos de suelo de edad 1 en medio PDA en dilución  $10^{-4}$  luego de 8 días de siembra. B. Aislamiento de suelo de edad 2 en medio PDA en dilución  $10^{-6}$  luego de 8 días de siembra. Medios bajo una temperatura de  $19 \pm 2^\circ$  C. H, Colonias fúngicas; Bc, Colonias bacterianas.

Posiblemente el aislamiento de *Rhizoctonia* no fue factible debido a las tasas de crecimiento que este hongo presenta, ya que a los 8 días de siembra otros hongos con tasas de crecimiento más aceleradas habían cubierto en su totalidad toda la caja. Hasta el momento no se han encontrado reportes donde se indique el aislamiento a partir de muestras de suelo asociado que correspondan a la forma *Rhizoctonia* en ambientes asociados a orquídeas.

Del mismo modo, los requerimientos por parte del endófito asociado a *M. coccinea* en cuanto a Nitrógeno y fuentes de Carbono puede que sean especiales estando este bien adaptado el terreno de estudio y no siendo el medio PDA el requerido para su crecimiento. Posiblemente la carencia de una fuente de nitrógeno adicional fue la causa de no poder aislar *Rhizoctonia* en suelo siendo este valor alto en los análisis de suelo.

La probabilidad de que plantas o semillas de futuras generaciones formen micorriza, depende de la supervivencia de los propágulos que permanecen en el suelo y de su capacidad para la colonización. Los propágulos de hongos micorrícicos como *Rhizoctonia* spp. incluyen raíces colonizadas y micelio externo en el suelo (Smith & Read, 1997).

Se plantea así la necesidad de cuantificar el micelio total y el micelio viable de este hongo en los sustratos y suelos donde se va a establecer un cultivo de orquídeas para calcular la probabilidad de colonización del hongo.

### 6.3 Determinación de viabilidad del micosimbionte en raíces vivas de *Masdevallia coccinea* de dos edades diferentes

Los resultados muestran que no todas las raíces colonizadas poseen micelio metabólicamente activo. Estos resultados confirman estudios previos realizados por Hamel *et al.*, (1990), donde solo una porción de la raíz (40%) se encontraba con micelio metabolitamente activo.

Los porcentajes de viabilidad del micosimbionte se presentan en la figura 20. Se evidencia un porcentaje alto de viabilidad de hongos, sin embargo, la presencia de pelotones metabólicamente activos es muy baja con porcentajes entre 1.27-6.86%, para los individuos juveniles. En contraste, los porcentajes de viabilidad en los individuos adultos es similar pero la abundancia de pelotones es significativamente mas baja entre 0.71-3.03%.

Aunque se encuentra una frecuencia menor de viabilidad en la edad 2 (54.8%) comparado con los individuos de la edad 1(83.8%), las intensidades globales de

micorrización (m%) presentan valores bajos. El análisis de varianza mostró diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de micorrización viable ( $p=0.0003$ ) y la intensidad global de la micorrización viable ( $p=0.0152$ ) y en cambio, no mostró diferencias en la abundancia de pelotones ( $p=0.1129$ ) (Figura 16). Aunque se presentaron coeficientes de variación altos ( $A\%=75.39$ ) los análisis de varianza no arrojaron diferencias en cuanto a las medias de los tratamientos (Anexo 4).

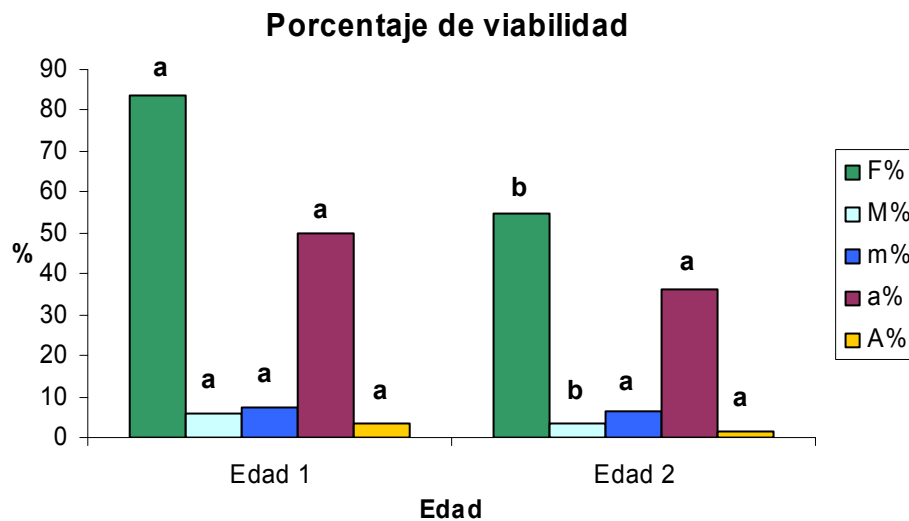


Figura 16. Porcentaje de viabilidad de la micorriza en individuos de la edad 1 y edad 2. F% Frecuencia de micorrización, M% intensidad global de la micorrización, m% intensidad de la micorrización en los fragmentos infectados, a% riqueza de pelotones de la parte micorrizada, A% Riqueza de pelotones del sistema radicular (Anexo 3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre edades en cada variable de micorrización según prueba de Anova de una vía (Anexo 5).

En la figura 18 se presentan las interacciones de las variables para el porcentaje de micorrización y viabilidad. En las graficas IV y V para la viabilidad (riqueza de pelotones de la parte micorrizada y frecuencia de micorrización) se observa una disminución de porcentaje a medida que la edad aumenta. Del mismo modo, la riqueza de pelotones (a% y A%) grafica III y IV también presenta la misma tendencia en cuanto la micorrización total.

Para la intensidad (M%, m%) graficas I y II no se observa variación en cuanto al porcentaje de micorrización y la viabilidad respecto a la edad. Se observa igualmente que no existe una interacción entre la micorrización total y la viabilidad.

En la figura 17 se observan depósitos de formazán caracterizados por una coloración azul-morada. Estos se localizaban dentro de las células de la raíz, indicando micelio metabolitamente activo.

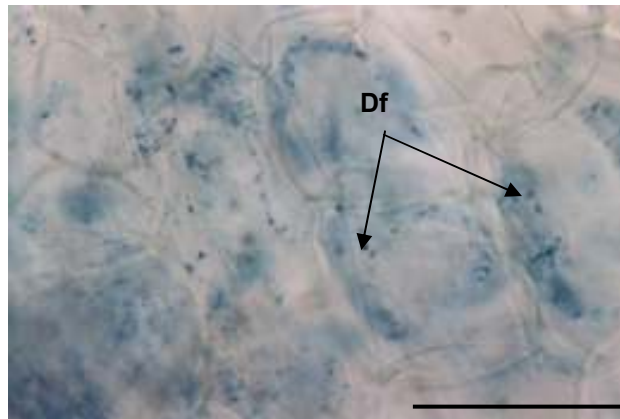


Figura 17. Acumulación de formazán evidente por la coloración azul en raíces de *M. coccinea* en individuo de la edad 1. Df, Depósitos de formazán. Barra=50  $\mu$ m

La mayor acumulación de formazán se observa en los individuos juveniles (Figura 17) aunque en los adultos también se presenta.

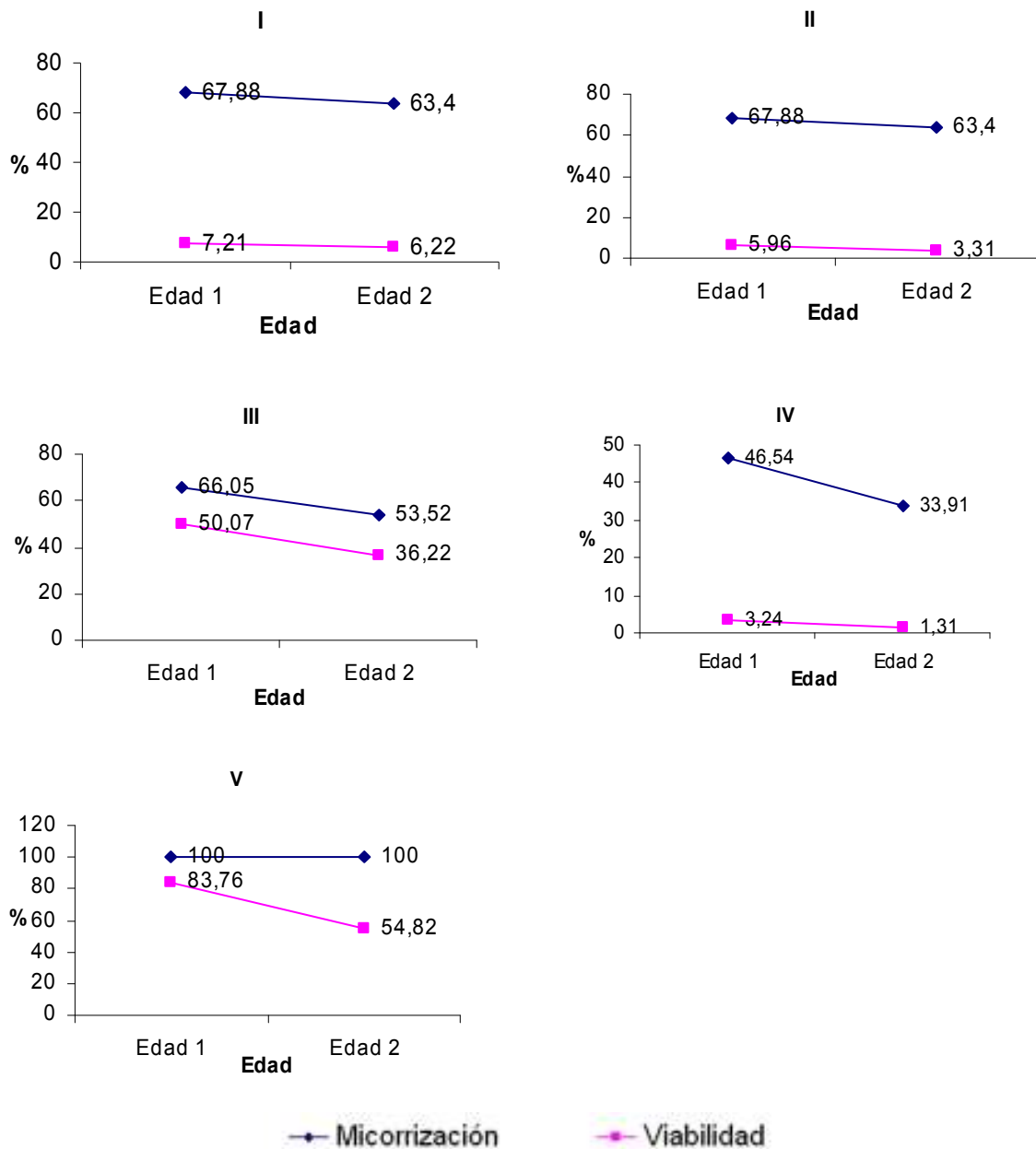


Figura 18. Interacción micorrización vs. viabilidad con base en la edad de los individuos. I. Intensidad global de la micorrización, II. Intensidad de la micorrización en los fragmentos infectados, III. Abundancia de pelotones de la parte micorrizada, IV. Abundancia de pelotones del sistema radical, V. Frecuencia de micorrización

En la determinación del porcentaje de viabilidad, al igual que en el de micorrización, no se encontró actividad metabólica en los ápices de crecimiento de las raíces, ya que no estaba colonizada. La mayoría de la acumulación de formazán se halló en la corteza de las raíces y en el velamen de éstas. En las pruebas de viabilidad, los pelos radicales de individuos de la edad 1 mostraron muy poca actividad.

En diferentes estudios, la importancia de las endomicorrizas de plantas es evaluada a través de la medida del porcentaje de colonización del endófito. Como se muestra en este trabajo, el 5.96% para la edad 1 y 3.36% de la edad 2 en cuanto a la intensidad de micorrización viable del micelio cuantificado se encuentra metabólicamente activo. Sin embargo, diferentes métodos de tinción de actividad enzimática pueden ser usados en la determinación de la viabilidad del micelio dentro de las raíces para tener certeza de la actividad del hongo dentro de su hospedero.

Ensayos enzimáticos como la indonitrotetrazolio (INT) y el diacetato fluoresceína (FDS) son menos específicos y pueden arrojar resultados más generales para la cuantificación de la actividad metabólica como la determinación de esterasas y NADH diaforasas (Hamel *et al.*, 1990).

La supervivencia y disponibilidad de los propágulos que permanecen en el suelo, son los causantes de que exista la probabilidad de la formación de micorriza. La disponibilidad de estos propágulos determina la distribución y de esta forma tienen un impacto directo sobre el éxito reproductivo de la especie. Además de las frecuencias de colonización del 100% tanto para individuos adultos como para individuos juveniles que se presentaron en este trabajo, se observó en el sitio de muestreo la generación de nuevas plántulas a partir de semillas. Estas observaciones indican que aunque no fue posible aislarlo el hongo formador de micorriza para *M. coccinea* a partir de muestras de suelo este se encuentra disponible en el sustrato de establecimiento, constituyendo de esta forma una especificidad ecológica debido a la germinación de nuevas semillas bajo condiciones naturales *in situ*.

No obstante, aunque no se determinaron las fuentes de carbono si se obtuvo un porcentaje de carbono orgánico alto (26.5%) donde las semillas pueden aprovechar esta fuente de energía para el desarrollo en los primeros estadios, existiendo luego una colonización por parte del hongo para suplir a la semilla de nutrientes no disponibles.

Así pues las micorrizas contribuyen a mantener la diversidad de las plantas y la funcionalidad del ecosistema, así como la productividad y la variabilidad de este. Otro factor que influye en la diversidad, abundancia, riqueza y en el mantenimiento de las relaciones ecológicas de suelo, microorganismos y plantas son las labores y el historial de la zona de cultivo. En los sitios no intervenidos las labores que se realizan son mínimas y por ende hay una menor perturbación del suelo, conservando las propiedades biológicas de éste.

## 7. CONCLUSIONES

- Se estableció la presencia de micorriza orquidioide tanto en individuos adultos como individuos juveniles de plantas de *M. coccinea* bajo condiciones naturales.
- La colonización por parte del hongo y la formación de la asociación simbiótica no se encuentra determinada por la edad, presentando *M. coccinea* una asociación con el micosimbionte durante las etapas evaluadas.
- El micosimbionte aislado a partir de plantas juveniles generadas de semillas *in situ* correspondió morfológicamente al mismo micosimbionte de las plantas adultas originadas por reproducción vegetativa indicando esto una especificidad ecológica para *M. coccinea*
- Se obtuvo para este estudio un aislamiento que corresponde a *Rhizoctonia* binucleada asociado a *M. coccinea*.
- La presencia de micosimbiontes disponible en sustratos de establecimiento, en este caso *Rhizoctonia* binucleada, es una característica fundamental para la distribución exitosa de plantas y una influencia para la diversificación de la familia Orchidaceae y que contribuye a la generación de propágulos. Así, podemos afirmar que en este estudio, el principal propágulo lo constituye las raíces micorrizadas.
- El continuo aporte de hojarasca y su descomposición permite al suelo la existencia permanente de fuentes de C, N y P disponibles para el micosimbionte

## 8. RECOMENDACIONES

- Aumentar el tamaño de la muestra incluyendo diferentes procedencias y fuentes de propagación de material.
- Describir en plantas de diferentes edades establecidas en campo el desarrollo de la colonización desde la etapa presimbiótica para cada uno de los simbioses.
- Evaluar el efecto de las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno disponibles en el suelo en cuanto al desarrollo y formación del micosimbionte para describir de esta forma el crecimiento del protocormo y éxito de la colonización.
- Para próximos estudios es recomendable realizar pruebas de germinación con aislamientos de hongos obtenidos de diferentes especies de orquídeas y material (suelo, raíces) para establecer relaciones de especificidad. En este trabajo no se pudieron llevar a cabo ensayo de germinación debido al extenso periodo de maduración de semillas en contraste con el tiempo total del desarrollo del trabajo.
- Una vez obtenidos diferentes aislamientos de *Rhizoctonia* sp. a partir de *Masdevallia coccinea* es recomendable realizar pruebas moleculares para la certeza de la identificación del simbiote y para realizar análisis filogenéticos de éste.
- Se recomienda realizar trabajos *in situ* que determinen porcentajes de germinación bajo condiciones naturales, y como una herramienta alternativa en los trabajos de especificidad en ciclos de vida, y patrones de colonización del micosimbionte.

- Se deben plantear este tipo de estudios para especies que presenten alguna amenaza de extinción ya sea por desaparición de hábitat o requerimientos altos en factores ambientales o de nutrientes, como una herramienta de recolonización.
- La inoculación *in vitro* del simbiote a las semillas puede ser una herramienta útil para la generación de plantas masivamente acortando periodos de germinación, disminución en tasas de mortalidad y produciendo gran número de individuos o para especies de algún potencial comercial o medicinal.

## 9. LITERATURA CITADA

ALEXOPOULOS C. J., C. W. MINS & M. BLACKWELL. 1996. Introduction mycology. Fourth Edition. John Wiley & Sons. Inc. USA. P: 250, 671-672.

ARDITTI J. 1992. Fundamentals of Orchids biology. Jhon Wile & Sons. Inc. USA. 691 p.

ARDITTI J & A. K.A GHANI. 2002. Tansley Review No. 110 Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. New Phytologist. 145: 367-421

ARTITTI J. & R. ERNST.1993. Micropropagation of orchids. Jhon Wiley, cop. New York. 682 p.

BASKIN C. & J. M. BASKIN. 1998. Seed, Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination. Academic Press. Estados Unidos. Pp. 482-489.

BAYMAN P & J. T. OTERO. 2006. Microbial endophytes of orchid roots: diversity and effects on plants. In: Microbial Root Endophytes (Schulz B, Boyle C, Sieber T, eds.). Soil Biology, Vol. 9 Springer-Verlag, Berlin & New York. Pp: 153-178.

BATTY A. L; K.W. DIXON; M. BRUNDRETT & K. SIVASITHAMPARAM. 2001. Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchids seed in Mediterranean bushland. New Phytologist. 152:511-520

BATTY A.; K. DIXON., M. BRUNDRETT & K. SIVASITHAMPARAM. 2002. Orchid conservation and mycorrhizal associations. Pp. 195-226. En: SIVASITHAMPARAM K; K. W.DIXON & R. L. BARRETT. 2002. Microorganisms in plant conservation and biodiversity. Kluwer Academic Publisher. 368 p.

BIDARTONDO M. I., B. BURGHARDT., G. GEBAUER., T. D. BRUNS., D. J. READ., 2004. Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liasions between forest orchids and trees. Proc. R. Soc. Lond. 271: 1799-1806.

BREDDY N. 1991. Orchid Mycorrhiza and symbiotic raising techniques. Amer. Orchid Soc. Bull. 60:556-569.

BRUNDRETT M. C., A. SCADE., A. L. BATTY., K. W. DIXON & K. SIVASITHAMPARAM. 2003. Development of *in situ* and *ex situ* seed baiting techniques to detect mycorrhizal fungi from terrestrial orchid habitats. Mycological Research 107, 1210–1220.

CHOU L & D. CHANG. 2004. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Anoectochilus formosanus* and *Haemaria discolor* and their F1 hybrids. Bot. Bull. Acad. Sin. 45:143-147.

CITES 2006. Convenio sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestre. 2006-04-03 <http://www.cites.org/esp/index.shtml>

CUATRECASAS J. 1989. Aspectos de la vegetación natural en Colombia. 2. Jardín Botánico de Bogotá "José Celestino Mutis". Bogotá. Pp: 155-284.

CUBILLOS D. D. 2005. Caracterización de hongos endófitos en una planta de la Amazonía Colombiana con propiedades medicinales (*Ilex guayusa*). Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias. Universidad Javeriana. Bogotá 98 p.

DRESSLER R. 1981. The Orchids Natural History and Classification. Smithsonian Institution. USA 332 p.

ESCOBAR O. 2006. Aislamiento e identificación de micorrizas en la familia Orchidaceae. Tesis de pregrado. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 31 p.

ESCOBAR R. 1991. Orquídeas Nativas de Colombia. Editorial Colina. Medellín Colombia. Pp 8-9

GEBAUER. G & M. MEYER. 2003.  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytologist*. 160:209-223.

GIANINNAZZI-PEARSON V., A. GOLLOTTE., J. LHERMINIER., B. TISSERANT., P. FRANKEN., M. DUMAS-GAUDOT E., M. C. LEMOINE., D. VAN TUINEN & S. GIANINNAZZI S. 1994. Cellular and molecular approaches in the characterization of symbiotic events in functional arbuscular mycorrhizal associations. *Can. J. Bot.* 73:526-532.

GIRLANDA M. A. SELOSSE, D. CAFASSO, F. BRILLI, S. DELFINE, R. FABBIAN, S. GHIGNONE, P. PINELLI, R. SEGRETO, F. LORETO, COZZOLINO and S . PEROTTO. 2006. Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. *Molecular Ecology*. 15, 491–504

HADLEY G. & B. WILLIAMSON. 1971. Analysis of the post-infection growth stimulus in orchids mycorrhiza. *New Phytologist*. 70: 445-455.

HADLEY G. & B. WILLIAMSON. 1972. Features of mycorrhizal infection in some Malayan orchids. *New Phytologist*. 71: 1111-1118.

HAMEL C., H. FYLES & D. L. SMITH. 1990. Measurement of development of endomycorrhizal mycelium using three different vital stains. *New Phytol.* 115:297-302

HEYWOOD V. M. 1993. Flowering plants of the world. Oxford University Press. New York. 336 p.

JUDD W., C. CAMPBELL., E. KELLOGG & P. STEVENS. 1999. *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer associates inc. Massachusetts. USA 576 p.

KNUDSON L. 1922. Symbiotic and asymbiotic relative to orchids. *Bot. Gaz.* 73: 1-25

LEAKE J. R. 1994. Transley Review No. 69 The biology of myco-heterotrophic (saprophytic) plants. *New Phytologist.* 127(2):171-216

LUER C. 2003. Systematics of *Masdevallia*. Part five. *Icones Pleurothallidarum XXV. Monographs in Systematics Botany from the Missouri Botanical Garden. Vol. 91. pp. 1075-1078.*

MA M., T. K. TAN & S. M. WONG. 2003. Identification and molecular phylogeny of *Epulorhiza* isolates from tropical orchids. *Mycological Research* 107, 1041–1049.

MASUHARA G. & K. KATSUYA. 1994. In situ and in vitro specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames. Var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). *New Phytologist.* 127:711-718

ORTIZ P. 1995. *Orquídeas de Colombia*. 2da edición. Indo-American Press Service. Santa fe de Bogota. Pp 6-10.

OTERO J. T., J. D. ACKERMAN & P. BAYMAN. 2002. Diversity and host specificity of mycorrhizal fungi from tropical orchids. *American journal of Botany* 89(11): 1852–1858.

OTERO J. T., J. D. ACKERMAN & P. BAYMAN. 2003. Variación en germinación simbiótica entre semillas de *Tolumnia variegata* y entre hongos micorrízicos. *Lankesteriana* 7: 145.

OTERO J. T., J. ACKERMAN & P. BAYMAN. 2004. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology* 13: 2393-2404.

OTERO J. T., P. BAYMAN & J. D. ACKERMAN. 2005 Variation in mycorrhizal performance in the epiphytic orchid *Tolumnia variegata in vitro*: The potential for natural selection. *Evolutionary Ecology* 19: 29–43.

OTERO J. T & M. A. CLEMENTS. 2006. Partner preferences in Australian Orchid mycorrhizae: Coevolution or correlation. Pp. 366-370. In: A. Raynal, A. Roguenant, and D. Prat Eds. *Proceedings of the 18th World Orchid Conference*.

PEREIRA O., M. C.MEGUMI., A. C. BORGES & E. F. DE ARAÚJO. 2005. Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. *Can. J. Bot.* 83: 54–65

PEREIRA O., C. L. ROLLEMBERG., A. C. BORGES., K. MATSUOKA & M. C. M. KASUYA. 2003. *Epulorhiza epiphytica* sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. *Mycoscience* 44:153–155

PETERSON R. L & H. MASSICOTTE. 2004. Exploring structural definitions of mycorrhizal, with emphasis on nutrient-exchange interfaces. *Can. J. Bot.* 82: 1074-1088.

PHILLIPS J. M. & D. S. HAYMAN. 1970. Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycolo. Soc.* 55:158-161

PIERIK R. L. M. 1990. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Ediciones Mundi-prensa. Madrid. Pp. 149-167.

RANGEL-Ch J. O. 2000. Colombia Diversidad Biótica III. La región de vida paramuna. Instituto de Ciencias Naturales-Instituto Alexander von Humboldt. Bogotá. P: 85-125

RASMUSSEN H. N & D. F. WHIGHAM. 1993. Seed ecology of dust seed in situ: a new study technique and its application in terrestrial orchids. *American Journal of Botany* 80(12):1374-1378.

RASMUSSEN H. 1990. Cell differentiation and mycorrhizal infection in *Dactylorhiza majalis* (Rchb. F.) Hunt & Summerrh. (Orchidaceae) during germination in vitro. *New Phytologist*. 116:137-147

RASMUSSEN H. N. 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plan and Soil*. 244: 149-163.

RIVETTA C & R. M. MILLER. 2003. Nitroblue tetrazolium (BNT) succinate vital staining of am fungi in roots. Environmental Research Division.

RODRÍGUEZ L & V. JULIA. 2002. Efecto Antagónico Y Biocontrolador De Algunos Microorganismos Saprofíticos Contra *Rhizoctonia solani* Patógeno Causante Del 'Damping Off' En Plantas De Tomate. Tesis (Ms.) Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Escuela de Post-Grado. Lima-Peru. Pp 10-11.

ROTH I. 1964. Microtecnia vegetal. Edic. Biblioteca, Imprenta Universidad Central de Venezuela. Caracas. 88 p

SALOMES PAIS. M & J. BARROSO. 1983. Localization of polyphenoloxidasas during the establishment of *Ophrys lutea* endomycorrhizas. *New Phytologist*. 95:219-222

SEPULVEDA M. E. 2005. Catastro de hongos endófitos miceliales en *Thrinax morrisii* H. Wendl. en el bosque estatal de Susúa, Sabana grande, Puerto Rico. Universidad de Puerto Rico. Tesis de Maestria.

SHAN X. C., E. C. Y. LIEW., M. A. WEATHERHEAD & I. J. HODKISS. 2002. Characterization and taxonomic placement of *Rhizoctonia*-like endophytes from orchid roots. *Mycologia* .94(2):230-239

SMITH S & D. READ. 1997. Mycorrhizal symbiosis. 2da edición. Academic Press. Cambridge. Pp 349-375.

SMRECIU E. A & R. S CURRAH. 1989. Symbiotic seed germination of seeds of terrestrial orchids of North America and Europe. *Lindleyana* 1: 6-15.

SNEH B L. BURPEE & A. OGOSHI. 1998. Identification of *Rhizoctonia* species. The american Phytopathological Society. USA 135 p.

TAYLOR D. L. & T. BRUNS. 1999. Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the 'cheating' orchids *Corallorhiza maculata* and *C. mertensiana*. *Molecular Ecology*. 8: 1719-1732

TRAPPE J. M. 2005. A.B. Frank and mycorrhizae: the challenge to evolutionary and ecologic theory. *Mycorrhiza* 15: 277-281

THOMPSON J. N. 1994. The coevolutionary process. University of Chicago Press. Chicago. London. 376 p.

WATKINSON J. I. 2002. Characterization of two genes, trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase and nucleotide binding protein, shown to be differentially regulated in roots of *Cypripedium parviflorum* var. *pubescens* grown with a mycorrhizal fungus *Thanatephorus pennatus*. Virginia Polytechnic Institute and State University Pp. 1-10.

WARCUP J. H. & P. H. B TALBOT. 1967. Perfect estates of Rhizoctonias associated with orchids. *New Phytologist* 66: 631-641

WARCUP J. H. & P. H. B TALBOT. 1980. Perfect estates of Rhizoctonias associated with orchids III. *New Phytologist* 86: 267-272

ZETTLER L. W & Jr. T. M. MCINNIS. 1993. Symbiotic seed germination and development of *Spiranthes cernua* and *Goodyera pubescens* (*Orchidaceae: Spiranthoideae*). *Lindleyana* 8: 155-16.

ZETTLER L. W. 1997. Terrestrial orchid conservation by symbiotic seed germination: techniques and perspectives. *Selbyana* 18 (2): 188-194.

ZETTLER L. W. & C. HOFER. 1998. Propagation of the little club-spur orchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications. *Environmental and experimental botany* 39:189-195.

ZETTLER L. W., S. L. STEWART., M. L. BOWLES & K. A. JACOBS. 2001. Mycorrhizal fungi and cold-assisted symbiotic germination of the Federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophea* (Nuttall) Lindley. *Am. Midl. Nat.* 145:168-175.

WULLNER. P. 2006. Presidente Corporación Capitalina de Orquideología Colombia. [chinzaco@etb.com.co](mailto:chinzaco@etb.com.co)

### **Recursos electrónicos**

Mycorrhiza Manual, prepared for the Workshop. [en línea]: Arbuscular mycorrhizal fungi in plant production systems: detection, taxonomy, conservation and ecophysiology. Abril 2001. Wuhan, China.

<http://www.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocalc-prg/download.html>. [Consulta: Agosto 28 de 2006]

## 10. ANEXOS

### Anexo 1.

#### **Técnica de aclarado y tinción de raíces (Método de Phillips & Hayman, 1970)**

1. Lavar las raíces con agua corriente
2. Agregar KOH al 15% a las raíces y colocarlas en baño maría 90°C por 150 minutos.
3. Pasado este tiempo sacarlas y lavarlas con agua de la llave.
4. Después de este tiempo decantar y agregar HCL al 1% por de 5 a 10 min.
5. Sin lavar agregar azul de tripano al 0.05%. Colocarlas en el baño maría 90°C por 5 min.
6. Pasado el tiempo de tinción se sacan las raíces y se colocan en portaobjetos siguiendo la metodología de Trouvelot *et al.*, 1986.

## Anexo 2.

### Protocolo Tinción vital de la enzima Succinato deshidrogenada (SDH) (Método de Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1994)

1. Lavar raíces con agua de la llave y mantenerlas en hielo
2. Cortar fragmentos de 1cm de largo
3. Limpiar las raíces en la siguiente solución por 2 horas a temperatura ambiente

Tris HCl de 0.05 M	20 ml
Sorbitol	50 mg/ml
Celulasa ( <i>Aspergillus niger</i> )	15 Unidades
Pectinasa ( <i>Aspergillus niger</i> )	15 Unidades

4. Lavar raíces con agua
  5. Poner raíces en solución SDH
- Solución incubadora tinción SDH (50 ml)

Succinato de Sodio 2.5 M	5ml
Azul de tetrazolio (4mg/ml)	12.5 ml
Tris HCL 0.2 M ph 7.0	12.5 ml
MgCl <sub>2</sub> 5Mn (Cloruro de Magnesio)	5 ml
Agua destilada	15 ml

#### Procedimiento

1. Una vez cortadas las raíces se dejan incubando en la solución incubadora a 37 ° C por 16-18 horas.
2. Transcurrido esto se elimina la solución y se cubren las raíces con hipoclorito de sodio al 3% durante 15-20 minutos
3. Posteriormente se elimina el hipoclorito y las raíces se lavan suavemente.
4. Si la observación no se realiza enseguida las raíces pueden ser conservadas en ácido láctico, no mas de un par de semanas.

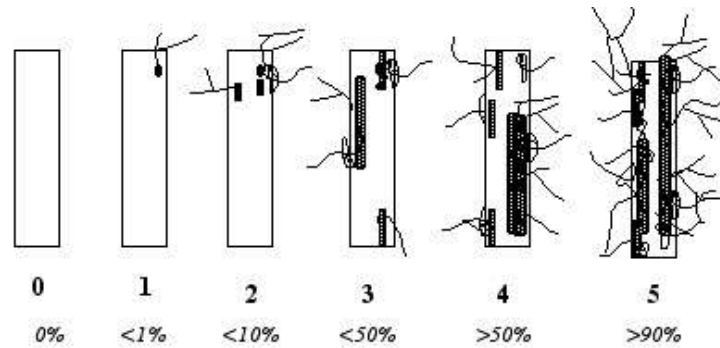
Esta actividad se revela por la deposición púrpura formazan seguida de la reducción azul nitro de tetrazolio.

### Anexo 3.

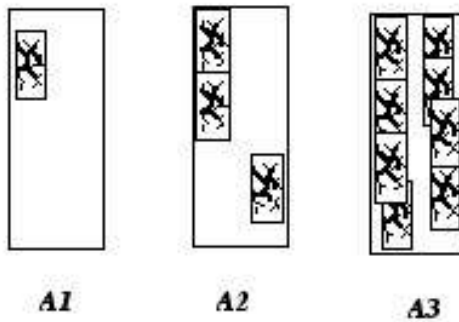
#### Estimación de la actividad micorrícica en raíces vivas (Método de Trouvelot *et al.*, 1986)

##### Procedimiento

1. Colocar x\* fragmentos radicales de aprox. 2cm de longitud teñidas sobre portaobjetos y posteriormente se observan al microscopio
2. El grado de infección se da en 6 condiciones del 0 al 5 donde:



La presencia de pelotones se determinó así:



Donde Ao nula

A1 poca presencia

A2 Media

A3 Abundantes

Y se introducen en un formato de toma de datos (Pagina 70)

\*Edad 2: 7 fragmentos/lámina

Edad 1: varía entre 5 y 7 fragmentos/lámina

3. Finalmente se introducen los datos al programa Mycocal el cual realiza la cuantificación de la infección teniendo en cuenta 5 parámetros

- Frecuencia de micorrización

$$F\% = \# \text{ de fragmentos colonizados} / \# \text{ total de fragmentos}$$

- Intensidad global de la micorrización

% de corteza micorrizada

$$M\% = (95 n^5 + 70 n^4 + 30 n^3 + 5 n^2 + 1) / \# \text{ total}$$

Donde:  $n^5$  # de fragmentos infectados de 5

$n^4$  # de fragmentos infectados con 4 etc.

- Intensidad de la micorrización en los fragmentos infectados

$$m\% = M * (\# \text{ total}) / (\# \text{ micorrizados})$$

- Riqueza arbuscular\* de la parte micorrizada

$$a\% = (100mA3+50mA2+10mA1)/100$$

Donde  $mA3$ ,  $mA2$ ,  $mA1$  son los respectivos % de  $m$ , presencia de  $A3$ ,  $A2$ ,  $A1$ , respectivamente, con esta  $mA3 = ((95n^5A3+70n^4A3+30n^3A3+5n^2A3+n^1A3)/\# \text{ micorrizados}) * 100/m$ .

- Riqueza arbuscular\* del sistema radicular

$$A\% = a * (M/100)$$

Tabla de toma de datos

	0	1				2				3				4				5			
		A1	A2	A3	A0	A1	A2	A3	A0	A1	A2	A3	A0	A1	A2	A3	A0	A1	A2	A3	A0
1																					
2																					
3																					
4																					
5																					
6																					
7																					
8																					
9																					
10																					
11																					
12																					
13																					
14																					
15																					
16																					
17																					
18																					
19																					
20																					
21																					
22																					
23																					
24																					
25																					
26																					
27																					
28																					
29																					
30																					
31																					
32																					
33																					
34																					
35																					
TOTAL																					

\*No se tomó esta estructura como arbusculo si no como pelotones

#### Anexo 4.

#### Promedios de porcentaje de micorrización y viabilidad del micosimbionte

Promedios de Micorrización					
	F%	M%	m%	a%	A%
Edad 1	100	67.88	67.88	66.05	46.54
Edad 2	100	63.4	63.4	53.52	33.91
Promedios de Viabilidad					
	F%	M%	m%	a%	A%
Edad 1	83.76	5.96	7.21	50.07	3.24
Edad 2	54.82	3.31	6.22	36.22	1.31

F% Frecuencia de micorrización

M% intensidad global de la micorrización

m% intensidad de la micorrización en los fragmentos infectados

a% riqueza de pelotones de la parte micorrizada

A% Riqueza de pelotones del sistema radicular

## Anexo 5.

### Resultados Estadísticos

Statistix 8.1

Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas

#### Porcentajes de micorrización

##### Shapiro-Wilk Normality Test

Variable	N	W	P
A%	10	0.9556	0.7349
F%	10	M	M
M%	10	0.9426	0.5826
a%	10	0.9485	0.6504
m%	10	0.9426	0.5826

A M is printed when the values of a sample are all the same.

##### Descriptive Statistics

Variable	Mean	SD	Variance	C.V.
A%	40.226	15.360	235.92	38.184
F%	100.00	0.0000	0.0000	0.0000
M%	65.639	13.961	194.91	21.269
a%	59.789	13.644	186.17	22.821
m%	65.639	13.961	194.91	21.269

##### Análisis de Varianza

##### One-Way AOV for Riqueza de pelotones del sistema radicular(A%) by Edad

Source	DF	SS	MS	F	P
Edad	1	398.67	398.666	1.85	0.2110
Error	8	1724.65	215.581		
Total	9	2123.31			

Grand Mean 40.226      **CV 36.50**

Component of variance for between groups      36.6170  
Effective cell size      5.0

##### Edad      Mean

1      46.540

2      33.912

Observations per Mean      5

Standard Error of a Mean      6.5663

Std Error (Diff of 2 Means) 9.2861

##### One-Way AOV for Intensidad global de la micorrización (M%) by Edad



Observations per Mean 5  
 Standard Error of a Mean 6.5269  
 Std Error (Diff of 2 Means) 9.2305

**Prueba de Normalidad**  
**Viabilidad del micosimbionte**

**Shapiro-Wilk Normality Test**

Variable	N	W	P
A%	10	0.8304	0.0338
F%	10	0.9432	0.5887
M%	10	0.9005	0.2219
a%	10	0.8945	0.1903
m%	10	0.7748	0.0072

Transformacion Log 10

**Shapiro-Wilk Normality Test**

Variable	N	W	P
A%	10	0.9501	0.6700
F%	10	0.9329	0.4771
M%	10	0.9589	0.7727
a%	10	0.9265	0.4145
m%	10	0.8191	0.4247

**Descriptive Statistics**

Variable	Mean	SD	C.V.
A%	2.2760	1.9116	83.988
F%	69.295	16.751	24.174
M%	4.6390	1.8977	40.907
a%	43.149	19.809	45.908
m%	6.7220	2.3013	34.235

**One-Way AOV for Riqueza de pelotones del sistema radicular (A%) by Edad**

Source	DF	SS	MS	F	P
Edad	1	9.3316	9.33156	3.17	0.1129
Error	8	23.5553	2.94441		
Total	9	32.8868			

Grand Mean 2.2760 CV 75.39

Component of variance for between groups 1.27743  
 Effective cell size 5.0

Edad	Mean
1	3.2420
2	1.3100

Observations per Mean 5

Standard Error of a Mean 0.7674  
 Std Error (Diff of 2 Means) 1.0852

**One-Way AOV for Frecuencia de la micorrización (F%) by Edad**

Source	DF	SS	MS	F	P
Edad	1	2092.94	2092.94	38.7	0.0003
Error	8	432.51	54.06		
Total	9	2525.45			

Grand Mean 69.295 **CV 10.61**

Component of variance for between groups 407.775  
 Effective cell size 5.0

**Edad Mean**

1 83.762  
 2 54.828

Observations per Mean 5  
 Standard Error of a Mean 3.2883  
 Std Error (Diff of 2 Means) 4.6503

**One-Way AOV for Intensidad global de la micorrización (M%) by Edad**

Source	DF	SS	MS	F	P
Edad	1	17.5562	17.5562	9.45	0.0152
Error	8	14.8548	1.8569		
Total	9	32.4111			

Grand Mean 4.6390 **CV 29.37**

Component of variance for between groups 3.13988  
 Effective cell size 5.0

**Edad Mean**

1 5.9640  
 2 3.3140

Observations per Mean 5  
 Standard Error of a Mean 0.6094  
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.8618

**One-Way AOV for Riqueza de pelotones de la parte micorrizada(a%) by Edad**

Source	DF	SS	MS	F	P
Edad	1	479.00	479.002	1.26	0.2950
Error	8	3052.51	381.564		
Total	9	3531.52			

Grand Mean 43.149 **CV 45.27**

Component of variance for between groups 19.4876  
 Effective cell size 5.0

<b>Edad</b>	<b>Mean</b>
1	50.070
2	36.228

Observations per Mean 5  
 Standard Error of a Mean 8.7357  
 Std Error (Diff of 2 Means) 12.354

**One-Way AOV for Intensidad de la micorrización en los fragmentos infectados (m%) by Edad**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Edad	1	2.4404	2.44036	0.43	0.5296
Error	8	45.2224	5.65280		
Total	9	47.6628			

Grand Mean 6.7220      **CV 35.37**

Component of variance for between groups -0.64249  
 Effective cell size 5.0

<b>Edad</b>	<b>Mean</b>
1	7.2160
2	6.2280

Observations per Mean 5  
 Standard Error of a Mean 1.0633  
 Std Error (Diff of 2 Means) 1.5037