



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA  
PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS  
AMBIENTALES

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**ACLIMATACIÓN SIMBIÓTICA DE VITROPLANTAS DE *Encyclia parviflora* (REGEL) WITHNER Y *Stanhopea tigrina* BATEMAN (ORCHIDACEAE) PARA SU CONSERVACIÓN *EX SITU*.**

PRESENTA:

**BQ. LUIS JESÚS CASTILLO PÉREZ**

**DIRECTOR DE TESIS:**

DRA. CANDY CARRANZA ÁLVAREZ

**ASESORES:**

DR. JAVIER FORTANELLI MARTÍNEZ

DR. DOMINGO MARTÍNEZ SOTO

## **CRÉDITOS INSTITUCIONALES**

**PROYECTO REALIZADO EN:**

**Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales**

**Laboratorio de Ciencias Básicas**

**Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca**

**Universidad Autónoma de San Luis Potosí**

**CON FINANCIAMIENTO DEL:**

**CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT)**

**A TRAVÉS DEL PROYECTO DENOMINADO:**

**INFRA-269491**

**AGRADEZCO A CONACyT EL OTORGAMIENTO DE LA BECA-  
TESIS**

**Becario No. 773045**

**LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES RECIBE APOYO  
ATRAVÉS**

**DEL PROGRAMA NACIONAL DE POSGRADOS DE CALIDAD  
(PNPC)**

*A Dios*

*A mis padres*

## AGRADECIMIENTOS

A todos los profesores y al personal administrativo de los Programas Multidisciplinarios de Posgrado en Ciencias Ambientales.

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el soporte brindado para realizar este proyecto.

A la Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca, especialmente a la Licenciatura en Bioquímica, al Laboratorio de Ciencias Básicas y al Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales, por permitirme realizar una parte experimental de esta investigación.

A la Dra. Candy Carranza-Álvarez, directora de la presente investigación, encargada del Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales y mi más grande influencia académica. ¡Gracias por todo!

Al Dr. Javier Fortanelli-Martínez y al Dr. Domingo Martínez-Soto, asesores académicos y grandes amigos, que en todo momento me apoyaron para la culminación de este proyecto.

Al Dr. José Ruiz-Herrera, investigador nacional emérito del CINVESTAV, Unidad Irapuato, por su disposición al facilitarnos las instalaciones del Laboratorio de Desarrollo y Diferenciación de Hongos, donde se llevó a cabo una parte experimental de este trabajo.

A la QFB. Claudia León Ramírez, a la Biol. Mayela Sánchez Salazar y al M. en C. Fernando Pérez García por su apoyo y disposición durante la estancia en el CINVESTAV, Irapuato.

A las personas de las comunidades Rancho Nuevo y La Silleta del municipio de Xilitla, S.L.P., especialmente a Don Rosalío Garay, ellos son testigos de que el amor a la naturaleza y la conservación de especies son sinónimo de desarrollo social y económico y a la M. en C. Tania Lucely Rodríguez-Palomenque con quien compartí mis viajes a Xilitla en busca de la orquídea calavera.

Al M. en C. Omar Cruz-Santiago y a la Lic. Lourdes de la Torre Robles por ayudarme y apoyarme siempre, además de compartir conmigo esta pasión por la investigación científica. Espero contar con su amistad y su cariño siempre.

A mis amigos de toda la vida y personas especiales: Danae Almaguer, Lizbeth Ramos, Brenda Juárez, Gabriela Morales, Julieta Ponce, Julieta Rizo, Luis Antonio Aportela, David Malibrán, Eduardo Palomares, Ángel Barragán y José Silva.

A mis grandes amigos botánicos y de otras áreas académicas, a los cuales conocí durante mi proyecto de maestría e hicieron más ameno este camino: Ing. Sofía Choza Farías, Biól. Guillermo Javier Sánchez-Fuente, Dra. Mané Salinas-Rodríguez, M. en C. Gabriel Rubio-Méndez, Dr. Arturo de Nova Vázquez, Ing. Mariana Morón, Dra. Laura Yáñez, Dr. Pedro Castillo, BQ. Martina de la Rosa Hernández, Dr. René Loredo-Portales y al Dr. Juan José Maldonado-Miranda.

A mis amigos del Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales de la UAMZH: Leo, Gabo, Jackie, Karen, Amauri, Alexis, Moi y Yesi, les deseo mucho éxito en su vida personal y profesional.

A mis padres, José Luis Castillo Méndez y Alejandra Pérez Hernández, a mis hermanos Julio Cesar Castillo Pérez y Jesús Armando Castillo Pérez y a mis pequeños sobrinos Yahir y Yadier Castillo Chávez. ¡Gracias por todo, los amo!

Y a cada una de las personas que siempre me han ayudado y creído en mí.

***“Todo tiene su tiempo, y todo lo que se quiere debajo del cielo tiene su hora (Eclesiastés 3:1)”***

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
ÍNDICE DE CUADROS .....	xiii
RESUMEN .....	xiv
ABSTRACT .....	xv
INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Justificación.....	3
1.2. Objetivo General .....	4
1.3. Objetivos específicos .....	4
ANTECEDENTES GENERALES .....	5
2.1. Aspectos generales y ecológicos de la familia Orchidaceae.....	5
2.2. Las orquídeas de México .....	9
2.3. Generalidades y taxonomía de <i>Encyclia parviflora</i> .....	11
2.3.1. Descripción botánica de <i>Encyclia parviflora</i> .....	13
2.4. Generalidades y taxonomía de <i>Stanhopea tigrina</i> .....	15
2.4.1. Descripción botánica de <i>Stanhopea tigrina</i> .....	16
2.5. Riesgos y amenazas de las orquídeas en México .....	18
2.6. El cultivo de tejidos vegetales como alternativa para la conservación .....	19
2.6.1. Micropropagación <i>in vitro</i> .....	20
2.7. Condiciones de aclimatación de plantas <i>in vitro</i> .....	24
2.8. Micropropagación <i>in vitro</i> en especies de la familia Orchidaceae.....	26
2.8.1. Micropropagación simbiótica en orquídeas.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1. Material biológico .....	31
3.2. Inducción del proceso de rizogénesis .....	31
3.2.1. Establecimiento de los medios de cultivo .....	31
3.2.2. Resiembra de vitroplantas y condiciones de cultivo.....	32
3.2.3. Diseño experimental y análisis estadístico para la etapa de rizogénesis .....	33
3.3. Establecimiento del proceso de preaclimatación <i>in vitro</i> .....	34

3.3.1. Formulación de los sustratos de soporte para la preaclimatación .....	34
3.3.2. Diseño experimental y análisis estadístico para el proceso de preaclimatación <i>in vitro</i> .....	36
3.4. Aislamiento e identificación de hongos asociados a <i>Encyclia parviflora</i> y <i>Stanhopea tigrina</i> .....	37
3.4.1. Sitios de muestreo y transporte de muestras .....	37
3.4.2. Preparación del material vegetal y establecimiento de los cultivos fúngicos .....	38
3.4.3. Resiembra de las especies fúngicas cultivables .....	39
3.4.4. Identificación de las especies fúngicas cultivables .....	39
3.5. Identificación molecular de los hongos asociados a <i>Encyclia parviflora</i> y <i>Stanhopea tigrina</i> .....	40
3.5.1. Extracción de ADN genómico de las cepas fúngicas .....	40
3.5.2. Amplificación de ADN y condiciones para la PCR .....	41
3.6. Evaluación de los hongos aislados sobre la promoción de crecimiento en plantas de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) .....	42
3.6.1. Siembra de semillas en suelo y preparación de medio PDA líquido. ....	42
3.6.2. Inoculación de las especies fúngicas en medio PDA líquido .....	42
3.6.3. Obtención de la solución de esporas de cada especie fúngica .....	43
3.6.4. Diseño experimental y análisis estadístico .....	43
3.7. Evaluación de la aclimatación simbiótica <i>ex vitro</i> en plantas de <i>Encyclia parviflora</i> y <i>Stanhopea tigrina</i> .....	45
3.7.1. Formulación de los sustratos para la aclimatación simbiótica .....	45
3.7.2. Diseño experimental y análisis estadístico para la fase de aclimatación simbiótica <i>ex vitro</i> . .....	46
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	47
4.1. Efecto de las auxinas, agua de coco y ácido salicílico sobre la rizogénesis en vitroplantas de <i>Encyclia parviflora</i> .....	47
4.2. Efecto de las auxinas, agua de coco y ácido salicílico sobre la rizogénesis en vitroplantas de <i>Stanhopea tigrina</i> .....	53

4.3. Efecto de los sustratos de soporte en la preaclimatación de vitroplantas de <i>Encyclia parviflora</i> y <i>Stanhopea tigrina</i> .....	58
4.4. Identificación macro y microscópica de hongos aislados y asociados a <i>Encyclia parviflora</i> y <i>Stanhopea tigrina</i> .....	62
4.5. Identificación molecular de hongos aislados y asociados a <i>Encyclia parviflora</i> y <i>Stanhopea tigrina</i> .....	65
4.6. Efecto de los hongos aislados de <i>Encyclia parviflora</i> y <i>Stanhopea tigrina</i> en plantas de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) .....	67
4.6.1. Evaluación del porcentaje de germinación .....	67
4.6.2. Eficacia de los hongos en la promoción del crecimiento.....	70
4.6.3. Efecto de los hongos en la longitud radical.....	74
4.7. Efecto de los hongos aislados en la aclimatación simbiótica de plantas de <i>Encyclia parviflora</i> y <i>Stanhopea tigrina</i> .....	76
<b>CONCLUSIONES</b> .....	81
<b>PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES</b> .....	83
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	84
<b>ANEXOS</b> .....	113
Anexo I. Formulación y preparación del agar PDA .....	113
Anexo II. Aspecto macroscópico e identificación morfológica de los hongos aislados de <i>Encyclia parviflora</i> .....	114
Anexo III. Aspecto macroscópico e identificación morfológica de los hongos aislados de <i>Stanhopea tigrina</i> .....	117

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diversos hábitos de crecimiento de la familia Orchidaceae .....	6
<b>Figura 2.</b> Flor de <i>Odontoglossum crispum</i> para ejemplificar la estructura floral generalizada de las Orchidaceae .....	7
<b>Figura 3.</b> Número de orquídeas endémicas en algunos estados de México. ....	9
<b>Figura 4.</b> Planta adulta de <i>E. parviflora</i> en un sitio de la comunidad de El Sidral en Cd. Valles, S.L.P., México.....	12
<b>Figura 5.</b> Detalle de la flor de <i>Encyclia parviflora</i> .....	12
<b>Figura 6.</b> Ilustración de <i>Encyclia parviflora</i> .....	14
<b>Figura 7.</b> Detalle de la flor de <i>Stanhopea tigrina</i> .....	15
<b>Figura 8.</b> Ilustración de <i>Stanhopea tigrina</i> .....	17
<b>Figura 9.</b> Negocio ambulante con plantas de <i>Stanhopea tigrina</i> a la venta en el mercado municipal de Xilitla, S.L.P., México.....	19
<b>Figura 10.</b> Cuarto de cultivo del Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales de las UAMZH-UASLP .....	33
<b>Figura 11.</b> Sustratos de soporte utilizados para la preaclimatación <i>in vitro</i> .....	34
<b>Figura 12.</b> Mapa de los sitios de muestreo para la recolecta de <i>Encyclia parviflora</i> y <i>Stanhopea tigrina</i> . ....	37
<b>Figura 13.</b> Fotografía de las plantas de frijol al término del periodo de experimentación.....	44
<b>Figura 14.</b> Número de raíces desarrolladas en vitroplantas de <i>E. parviflora</i> . ....	47
<b>Figura 15.</b> Aspecto de las raíces en vitroplantas de <i>E. parviflora</i> después de 90 días de exposición a los tratamientos de enraizamiento .....	48
<b>Figura 16.</b> Longitud de las raíces desarrolladas en vitroplantas de <i>E. parviflora</i> ..	50
<b>Figura 17.</b> Alturas promedio desarrolladas en vitroplantas de <i>E. parviflora</i> .....	51
<b>Figura 18.</b> Número de raíces desarrolladas en vitroplantas de <i>S. tigrina</i> .....	53
<b>Figura 19.</b> Formación de pseudobulbos funcionales en vitroplantas de <i>S. tigrina</i> .	54
<b>Figura 20.</b> Proceso de inducción de la resistencia sistémica de las plantas por el ácido salicílico ante la infección de algún patógeno .....	55
<b>Figura 21.</b> Longitud de las raíces desarrolladas en vitroplantas de <i>S. tigrina</i> .....	56

<b>Figura 22.</b> Alturas promedio desarrolladas en vitroplantas de <i>S. tigrina</i> .....	57
<b>Figura 23.</b> Morfología microscópica de los hongos aislados de <i>E. parviflora</i> .....	62
<b>Figura 24.</b> Morfología microscópica de los hongos aislados de <i>S. tigrina</i> .....	63
<b>Figura 25.</b> Porcentaje y cinética de germinación de plantas de frijol inoculadas con los aislados fúngicos .....	68
<b>Figura 26.</b> Aspecto de las plantas de frijol después de ser expuestas a las cepas fúngicas por un periodo de 10 días .....	71
<b>Figura 27.</b> Efectos sobre la longitud radicular en plantas de frijol por los aislados fúngicos de <i>E. parviflora</i> y <i>S. tigrina</i> .....	75
<b>Figura 28.</b> Esquema sugerido del mecanismo de infección fúngica, liberación y acumulación de moléculas benéficas de <i>T. hamatum</i> .....	79
<b>Figura 29.</b> Etapas para la aclimatación simbiótica de vitroplantas de <i>E. parviflora</i> y <i>S. tigrina</i> .....	80

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Lista comparativa entre una planta en condiciones <i>in vitro</i> respecto a una planta en condiciones <i>in vivo</i> .....	23
<b>Cuadro 2.</b> Investigaciones que abordan el uso de microorganismos en diferentes fases del proceso de micropropagación <i>in vitro</i> . ....	28
<b>Cuadro 3.</b> Tratamientos utilizados para la inducción de rizogénesis en vitroplantas de <i>E. parviflora</i> y <i>S. tigrina</i> . ....	32
<b>Cuadro 4.</b> Composición de los sustratos utilizados para la preaclimatación de plantas de <i>E. parviflora</i> y <i>S. tigrina</i> en condiciones <i>in vitro</i> .....	35
<b>Cuadro 5.</b> Tratamientos utilizados para la etapa de aclimatación simbiótica <i>ex vitro</i> de plantas de <i>E. parviflora</i> y <i>S. tigrina</i> . ....	46
<b>Cuadro 6.</b> Efecto de los sustratos de preaclimatación en vitroplanta de <i>E. parviflora</i> a los 30 y 60 días de exposición. ....	59
<b>Cuadro 7.</b> Efecto de los sustratos de preaclimatación en vitroplantas de <i>S. tigrina</i> a los 30 y 60 días de exposición. ....	60
<b>Cuadro 8.</b> Identificación molecular de cepas fúngicas.....	65
<b>Cuadro 9.</b> ID de las 12 cepas fúngicas que se utilizaron para los ensayos sobre la promoción de crecimiento. ....	67
<b>Cuadro 10.</b> Promoción de crecimiento en plantas de frijol por los aislados fúngicos de <i>E. parviflora</i> y <i>S. tigrina</i> . ....	72
<b>Cuadro 11.</b> Efecto de los hongos aislados en la aclimatación simbiótica de vitroplantas de <i>E. parviflora</i> y <i>S. tigrina</i> . ....	77

## RESUMEN

En este estudio se estableció la aclimatación simbiótica de plantas de *Encyclia parviflora* y *Stanhopea tigrina* propagadas *in vitro*. Para ambas especies se establecieron dos fases previas a la aclimatación: la inducción de rizogénesis *in vitro* y una etapa de preaclimatación *in vitro*. Posterior a ello, se aislaron los hongos endófitos de las dos especies de orquídeas y algunas cepas fueron caracterizadas con técnicas moleculares. Se analizaron doce cepas de hongos endófitos aislados de las orquídeas para comprobar su capacidad en la promoción del crecimiento en una planta modelo y finalmente los dos hongos que mostraron los mejores resultados en esta etapa fueron estudiados para analizar su efecto en la etapa de aclimatación. Para *E. parviflora*, el medio de cultivo más óptimo para la inducción de rizogénesis fue el enriquecido con 2.5 mg L<sup>-1</sup> de la auxina ácido indol butírico (AIB) + 100 ml L<sup>-1</sup> de agua de coco, en tanto que, para *S. tigrina*, la adición de 5.0 mg L<sup>-1</sup> de la auxina ácido indol acético (AIA) + 100 ml L<sup>-1</sup> de agua de coco fue el medio de cultivo más eficiente. Para la etapa de la preaclimatación *in vitro*, los resultados mostraron que el mejor sustrato de soporte para ambas especies fue el constituido por corteza de pino, turba de *Sphagnum* y roca tepezil (2:3:1), con el cual se obtuvo el mejor porcentaje de sobrevivencia, el mejor desarrollo foliar y la mayor altura de las plantas. Respecto a los hongos aislados para las raíces de *E. parviflora* y *S. tigrina*, el género fúngico más abundante fue *Trichoderma* sp., en tanto que, para hojas y pseudobulbos, los géneros más abundantes pertenecieron a *Penicillium* sp. *Colletotrichum* sp., *Lasiodiplodia* sp. y *Fusarium* sp. Los análisis moleculares para tres cepas fúngicas confirmaron la identidad de *Lasiodiplodia theobromae*, *Trichoderma hamatum* y una especie para la cual no se logró su identificación de acuerdo con la base de datos de la NCBI, por lo cual se sugiere como una "Probable Nueva Especie (PNE)". Las vitroplantas inoculadas con *T. hamatum* y la PNE lograron un alto porcentaje de sobrevivencia, además de que indujeron la promoción del crecimiento en hojas y raíces en ambas especies de orquídeas durante la etapa de aclimatación simbiótica.

**Palabras clave:** conservación, orquídeas, biotecnología, hongos, simbiosis

## ABSTRACT

In this study, symbiotic acclimation of *Encyclia parviflora* and *Stanhopea tigrina* plants propagated by *in vitro* ways was established. For both species, two phases prior to acclimatization were established: *in vitro* induction of rhizogenesis and an *in vitro* preacclimatization stage. After that, the endophytic fungi of the two orchid species were isolated and some strains were characterized with molecular techniques. Twelve strains of endophytic fungi isolated from the orchids were analyzed to verify their ability to promote growth in a model plant and finally the two fungi that showed the best results in this stage were studied to analyze their effect in the acclimatization stage. For *E. parviflora*, the most optimal culture medium for the induction of rhizogenesis was that enriched with 2.5 mg L<sup>-1</sup> of the auxin indole butyric acid (IBA) + 100 ml L<sup>-1</sup> of coconut water, while, for *S. tigrina*, the addition of 5.0 mg L<sup>-1</sup> of the auxin indole acetic acid (AIA) + 100 ml L<sup>-1</sup> of coconut water was the most efficient culture medium. For the *in vitro* preacclimatization stage, the results were that the best support substrate for both species was constituted by pine bark, *Sphagnum* and tepezil rock (2:3:1), with which the best was obtained percentage of survival, the best leaf development and the highest height of the plants. For the fungi isolated from the roots of *E. parviflora* and *S. tigrina*, the most abundant fungal genus was *Trichoderma* sp., Whereas, for leaves and pseudobulbs, the most abundant genera belonged to *Penicillium* sp., *Colletotrichum* sp., *Lasiodiplodia* sp. and *Fusarium* sp. Molecular analyzes for three fungal strains confirmed the identity of *Lasiodiplodia theobromae*, *Trichoderma hamatum* and one species for which identification was not achieved according to the NCBI database, which is why it is suggested as a "Probable New Species (PNE)". Vitroplants inoculated with *T. hamatum* and the PNE achieved a high percentage of survival, in addition to inducing the growth promotion in leaves and roots in both species of orchids during the symbiotic acclimatization stage.

**Keywords:** *conservation, orchids, biotechnology, fungus, symbiosis*

## INTRODUCCIÓN

México es uno de los países incluidos en la lista mundial de los conocidos como “megadiversos”, es decir, alberga una gran cantidad de plantas, animales y microorganismos (Mittermeier y Goettsch, 1992; Conabio, 1998; Jiménez-Sierra *et al.*, 2014). En relación con el número de plantas, por ejemplo, México ocupa el cuarto lugar a nivel mundial con aproximadamente 30,000 especies de vegetales vasculares (Espejo-Serna 2012).

Entre las familias taxonómicas más importantes y representativas de las plantas vasculares en México, se encuentran las orquídeas. Esta familia cuenta con aproximadamente 1,300 especies, de las cuales un poco más del 40% son endémicas, es decir, poseen una distribución restringida al territorio nacional (Hágsater *et al.*, 2015), cifra que coloca a México como uno de los países con mayor endemismo de orquídeas en el continente americano (Espejo-Serna 2012; Hágsater *et al.*, 2015).

Sin embargo, a pesar de esta gran diversidad, la familia Orchidaceae, es una de las familias botánicas que más se encuentra amenazada (Alvarado-Martínez, 2012; Tejeda-Sartorius *et al.*, 2017). Los principales problemas a nivel mundial que amenazan a las orquídeas son de origen humano, y entre los más graves se encuentran, la destrucción del hábitat debido a la deforestación de bosques y selvas, los cambios de uso suelo y al saqueo desmesurado de especies para su tráfico y comercio ilegal (Evans *et al.*, 2013; Adhikari *et al.*, 2016; Tejeda-Sartorius *et al.*, 2017).

En este contexto, en México la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) reporta actualmente un total de 184 especies de orquídeas en alguna categoría de riesgo, lo que equivale a aproximadamente al 13.8% del total de las especies mexicanas (Semarnat, 2010).

Una alternativa para contribuir a la conservación de las orquídeas mexicanas es la aplicación de técnicas biotecnológicas, como el cultivo de tejidos vegetales (CTV). Dentro del CTV, la micropropagación *in vitro* permite obtener un gran número de plantas de calidad en un menor periodo de tiempo y actualmente es el método

más práctico para la propagación de orquídeas y otras especies vegetales de interés (Calva-Calva y Pérez-Vargas, 2005; Carranza-Álvarez *et al.*, 2016). Sin embargo, aunque la micropropagación permite la obtención de un gran número de plántulas, la aclimatación de estas es una de las técnicas más cruciales y definitivas de esta técnica biotecnológica.

La fase de aclimatación tiene como objetivo principal la adaptación de las plantas propagadas *in vitro* a las condiciones ambientales del entorno natural, es decir, donde los parámetros ambientales como humedad, fotoperiodo y nutrientes esenciales, ya no se encuentran controlados (Francisco-Nava *et al.*, 2011; Billard *et al.*, 2014; Carranza-Álvarez *et al.*, 2016). De acuerdo con diversos reportes, la fase de aclimatación es el punto más crítico en todo el proceso de la micropropagación *in vitro*, ya que es aquí, donde se pierde una gran cantidad de material vegetal propagado debido a las dificultades físicas, químicas, biológicas y bioquímicas que sufren las especies al ser trasplantadas (Chandra *et al.*, 2010; Francisco-Nava *et al.*, 2011; Lallana *et al.*, 2016).

El Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales de la UASLP-UAMZH, ha desarrollado protocolos de micropropagación *in vitro* de 10 especies de orquídeas, algunas de ellas endémicas de México, como el caso de *Encyclia parviflora* y otras especies que además de endémicas, se encuentran amenazadas como *Stanhopea tigrina*.

A pesar de que los protocolos para la germinación y el desarrollo *in vitro* de *Encyclia parviflora* y *Stanhopea tigrina* ya se encuentran establecidos, no se cuenta con un protocolo para la fase de aclimatación que culmine todo el proceso de la micropropagación *in vitro* con éxito y que, por lo tanto, contribuya a la conservación de ambas especies. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue establecer las condiciones de aclimatación simbiótica de plántulas de *Encyclia parviflora* y *Stanhopea tigrina* propagadas *in vitro*, con el propósito de contribuir a su adaptación en la etapa de aclimatación *ex vitro*.

## 1.1. Justificación

Las orquídeas son la segunda familia más extensa del reino vegetal y consideradas como unas de las más evolucionadas en el planeta. México posee el mayor grado de endemismo en el continente americano, sin embargo, a pesar de poseer esta gran diversidad, aproximadamente el 15% de las especies mexicanas se encuentran en alguna categoría de riesgo.

Algunas orquídeas en el país han sido colectadas por sus propiedades medicinales, como fuente de materiales para elaboración de artesanías, como ornamento en ceremonias religiosas, etc. Sin embargo, la principal fuente de obtención de estas plantas es mediante la extracción ilegal de sus ecosistemas, actividad que ha afectado las poblaciones silvestres y en algunos casos, colocado a algunas especies en peligro de extinción.

La extinción de una especie causa la perturbación ecológica de un ecosistema, ya que se encuentra ampliamente documentado que estas plantas juegan un rol importante en sus nichos ecológicos debido a la gran cantidad de interacciones que realizan, entre las que destacan, los procesos de polinización, la interacción con microorganismos y el establecimiento de microecosistemas para otras plantas y animales.

*Encyclia parviflora* y *Stanhopea tigrina*, son dos especies de orquídeas con distribución en varios municipios de la Huasteca Potosina. Por sus características vegetativas, *E. parviflora* suele ser una especie carente valor ornamental entre los coleccionistas profesionales. *S. tigrina*, por su parte, es una de las especies más valoradas, depredadas y comercializadas en la república mexicana.

Debido a lo anterior, ambas especies han sido propagadas en el Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales de la UASLP-UAMZH con fines de conservación. En ambas especies los protocolos de micropropagación *in vitro* han resultado exitosos, logrando obtener una gran cantidad de plantas propagadas, sin embargo, existe la dificultad para establecer un protocolo de aclimatación. Por lo anterior, es de suma importancia estudiar los parámetros que favorecen la aclimatación simbiótica de *E. parviflora* y *S. tigrina*, los cuales aumentarán la sobrevivencia y conservación de las plántulas generadas *in vitro*.

## 1.2. Objetivo General

Establecer la aclimatación simbiótica de plantas de *Encyclia parviflora* y *Stanhopea tigrina* propagadas *in vitro*.

## 1.3. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la concentración y tipo de auxinas (AIA y AIB), agua de coco y ácido salicílico en la inducción de rizogénesis en vitroplantas de *Encyclia parviflora* y *Stanhopea tigrina*.
- Determinar la composición de un sustrato de soporte óptimo para la preaclimatación de vitroplantas de *Encyclia parviflora* y *Stanhopea tigrina*.
- Aislar, identificar y caracterizar los hongos asociados a plantas de *Encyclia parviflora* y *Stanhopea tigrina* colectadas en campo.
- Evaluar el efecto de los hongos asociados a *Encyclia parviflora* y *Stanhopea tigrina* en el proceso de germinación y desarrollo de una planta modelo.
- Evaluar la aclimatación simbiótica de plantas de *Encyclia parviflora* y *Stanhopea tigrina* a nivel de vivero con la adición de hongos asociados a orquídeas.

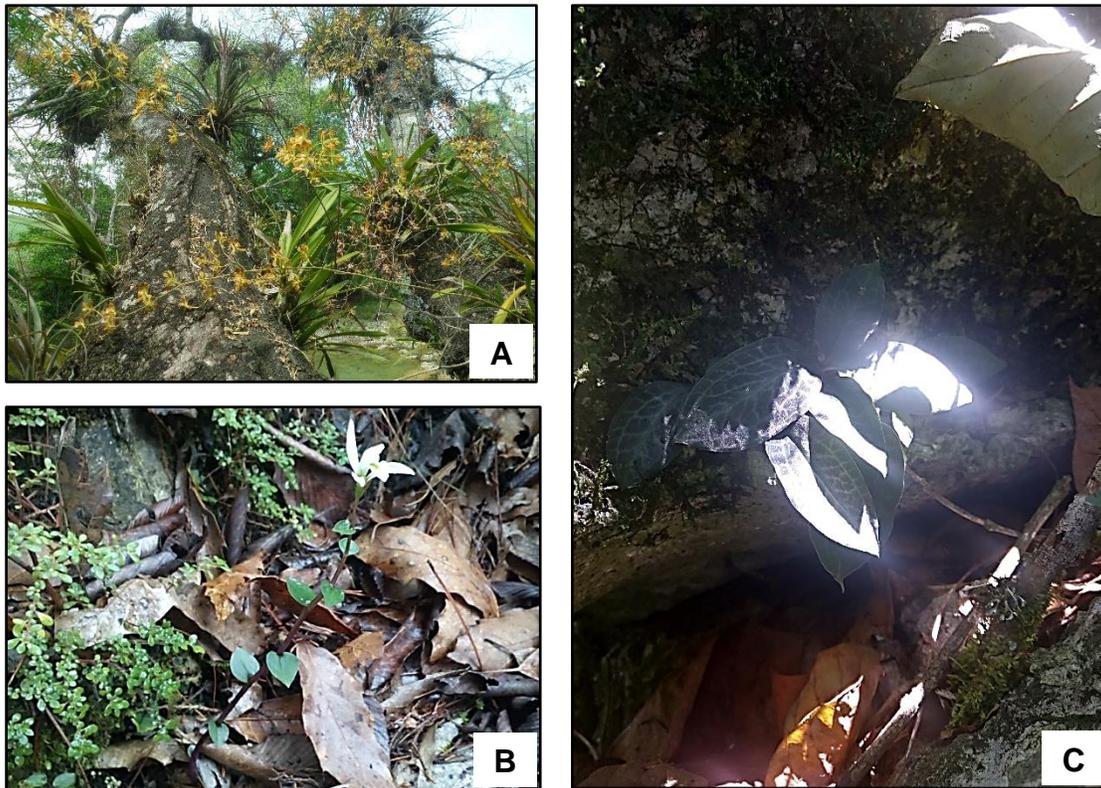
## ANTECEDENTES GENERALES

### 2.1. Aspectos generales y ecológicos de la familia Orchidaceae

Las orquídeas constituyen una de las familias más evolucionadas y más extensas del reino vegetal, son plantas vasculares, monocotiledóneas, herbáceas, perennes y se estima que existen alrededor de 30,000 especies y más de 1,000 géneros distribuidos en la mayoría de los ecosistemas del planeta Tierra (Dressler, 2005; Hágsater *et al.*, 2015).

Es probable que la distribución cosmopolita de la familia Orchidaceae se deba a diversos factores evolutivos que han desarrollado a lo largo del tiempo, entre los que destacan: sus diversos hábitos de crecimiento, la conformación fisiológica y estructural de sus flores y las interacciones ecológicas con otras plantas, animales y microorganismos (López y Runkle, 2005). En lo que respecta a los hábitos de crecimiento, las orquídeas suelen crecer y desarrollarse de tres maneras distintas:

1. Las orquídeas epífitas (Fig. 1a), las cuales germinan, crecen y se desarrollan durante todo su ciclo vital posadas sobre otra planta (sin parasitarla), generalmente arbórea y denominada forófito. Este tipo de crecimiento comprende el 67% del total de las especies en el planeta. (Atwood, 1986; Dematte y Dematte, 1996; Otero-Ospina y Bayman, 2009).
2. Las orquídeas terrestres (Fig. 1b), son especies que desarrollan tallos subterráneos, denominados cormos y que funcionan como almacenamiento de nutrientes, además de ser muy sensibles a la luz durante su proceso de germinación. Estas especies pasan por un periodo de dormición en el cual sus hojas desaparecen durante los meses más fríos (Steege y Cornelissen, 1989; Arévalo y Betancur, 2004; Damián, 2013).
3. Las orquídeas rupícolas (Fig. 1c), las cuales se desarrollan en suelos rocosos como los afloramientos de roca caliza, y en condiciones climáticas a menudo extremas, sus raíces se desarrollan por lo general bajo el musgo que cubre las rocas que colonizan (Pérez-García y Hágsater, 2012; Haber, 2014).



**Figura 1.** Diversos hábitos de crecimiento de la familia Orchidaceae. **A,** Hábito epífita. **B,** Hábito terrestre. **C,** Hábito rupícola.

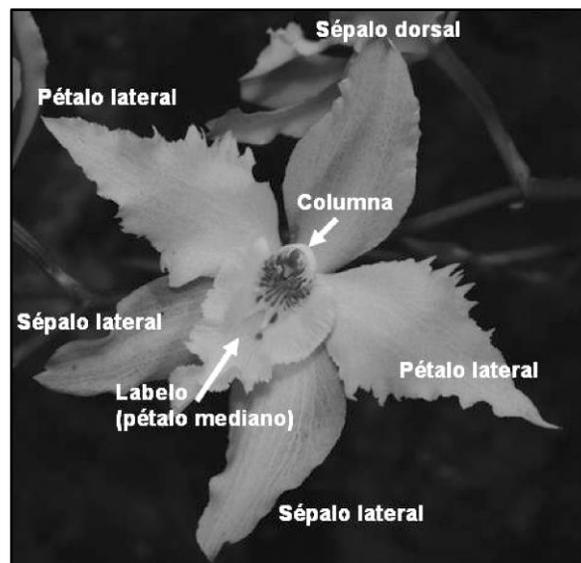
La flor de las orquídeas es sin duda la estructura vegetativa que más ha captado la atención entre los estudiosos de esta familia, pues se encuentra constituida de una manera muy peculiar y que no se repite en ninguna otra familia de las angiospermas.

En la mayoría de los géneros de la familia Orchidaceae, las flores son hermafroditas, es decir, poseen órganos sexuales, masculinos y femeninos fusionados en una estructura denominada columna. A pesar de ello, la fecundación de una orquídea no se lleva a cabo entre las estructuras sexuales de una misma flor, sino que las células sexuales masculinas (polen) son transportadas hasta el órgano femenino de una flor diferente (Ackerman, 1986; Bateman y Rudall, 2006; Cadevall, 2009).

El polen en las orquídeas se encuentra aglomerado en unas estructuras denominadas polinias. Las polinias pueden estar en grupos de dos a ocho

estructuras dependiendo de la especie de orquídea y presentan un apéndice filiforme (caudícula) que se une a una masa pegajosa denominada viscidium situada en la porción receptiva del estigma (Martija-Ochoa, 2003; Ezcurra, 2006).

La flor en la gran mayoría de las orquídeas es zigomorfa, es decir, posee un plano de simetría bilateral y se encuentra compuesta por tres sépalos y tres pétalos. Entre los pétalos existe uno que se encuentra modificado y que confiere a la orquídea toda su originalidad y al cual se le denomina labelo (Fig. 2) (Arditti, 1992; Freuler, 2008; Hágsater *et al.*, 2015).



**Figura 2.** Flor de *Odontoglossum crispum* para ejemplificar la estructura floral generalizada de las Orchidaceae (Tomada de Singer, 2009).

El labelo de las orquídeas es la prueba de millones de años de evolución, algunos géneros han desarrollado labelos tan sorprendentes que incluso toman la forma aparente de sus polinizadores como suele ocurrir en las flores del género *Ophrys*, desarrollando una interacción ecológica planta-animal tan específica que ha sido motivo de diversos estudios (Schiestl *et al.*, 2000; Pecoraro *et al.*, 2015; Stejskal *et al.*, 2015; Bohman *et al.*, 2016; Bateman *et al.*, 2018).

Las interacciones ecológicas que desarrollan las orquídeas juegan un rol importante que influye de manera significativa en la distribución mundial de estas

especies. Estas interacciones se presentan de tres maneras distintas: planta-planta, planta-animal y planta-microorganismo.

Dentro de las interacciones planta-planta, la más común es la que desarrollan las orquídeas epífitas con sus forófitos. Algunas investigaciones han reportado que existe un alto grado de especificidad en la relación orquídea-forófito, es decir, algunas especies de orquídeas se desarrollan de manera exclusiva sobre algún género de especie arbórea en particular (Hurtado-Alza, 2017; Rasmussen y Rasmussen, 2018; Segovia-Rivas *et al.*, 2018).

En lo que compete a las interacciones planta-animal, la más estudiada es el proceso de polinización. Durante este proceso, el agente polinizador extrae el polen de la orquídea y lo transporta a otra flor de la misma especie, de este proceso surge la capsula o fruto, el cual contendrá en su interior millones de semillas que asegurarán la perpetuidad de la especie vegetal (Bawa, 1990; Martija-Ochoa, 2003; Micheneau *et al.*, 2009; Hágsater *et al.*, 2015).

Entre los animales que comúnmente cumplen esta función en las orquídeas, se encuentran diversas especies de mariposas, abejas, hormigas e incluso animales de mayor tamaño como murciélagos y aves (Brantjes, 1981; Gómez y Zamora, 1992; Nilsson, 1992; Johnson, 1994; Gómez *et al.*, 1996; Johnson, 1996; Johnson y Brown, 2004; Micheneau *et al.*, 2006; Gaskett, 2011; Morales-Linares *et al.*, 2018; Pansarin *et al.*, 2018).

Por otro lado, al hablar de interacciones planta-microorganismo, lo más común es referirse a la asociación que estas plantas realizan con los denominados hongos micorrízicos. Los hongos micorrízicos establecen una simbiosis que permite el intercambio mutuo de agua y nutrientes durante la germinación y el desarrollo de las orquídeas (Otero-Ospina y Bayman, 2009; Porras-Alfaro y Bayman, 2017; Shimura *et al.*, 2018).

Diversas investigaciones reportan la existencia de especificidad entre hongos y orquídeas (Curtis 1939; Otero *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2002; Pölme *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2018), sin embargo, algunas especies de la familia Orchidaceae han desarrollado esta simbiosis con distintos tipos de hongos, algunos que incluso suelen ser patógenos para otras plantas, pero que con las orquídeas pueden

asociarse favoreciendo su desarrollo, en contraste, hay micorrizas que pueden afectar la distribución y dinámica poblacional de algunas especies de orquídeas (McCormick *et al.*, 2018; Schweiger *et al.*, 2018; Zettler y Corey, 2018).

Las interacciones ecológicas de las orquídeas deben ser consideradas en los proyectos de conservación y reinserción de especies a su hábitat natural, dado que gran parte del éxito dependerá de dichas interacciones.

## 2.2. Las orquídeas de México

El número total de orquídeas descritas para México aún no se encuentra definido, dependiendo del autor se manejan cantidades entre 1,200 a 1,400 especies distribuidas en aproximadamente 170 géneros taxonómicos (Ramírez, 1996; Hágsater *et al.*, 2015). Sin embargo, más del 40% de las orquídeas con distribución en el país son endémicas, es decir, restringen su crecimiento y desarrollo vegetal al territorio nacional (Soto-Arenas *et al.*, 2007; Hágsater *et al.*, 2015), en este contexto, Oaxaca, Jalisco y Chiapas son los estados que poseen más especies endémicas de la familia Orchidaceae (Fig. 3).

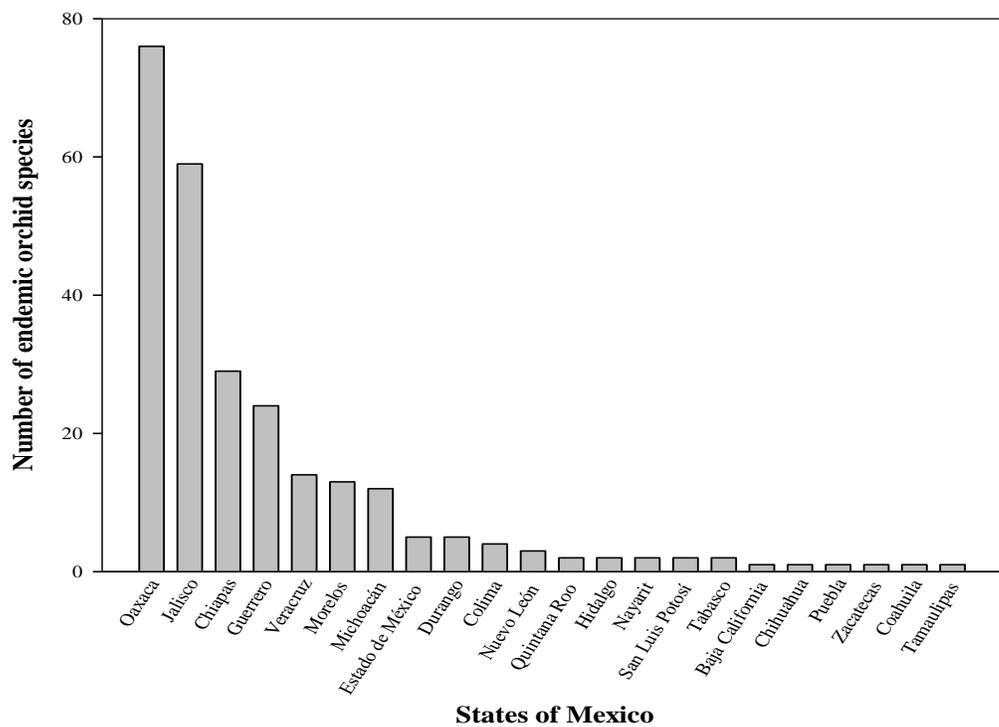


Figura 3. Número de orquídeas endémicas en algunos estados de México.

Debido a las características ambientales que predominan en el país, las orquídeas que más destacan son las epífitas, sin embargo, existe una cantidad considerable de orquídeas terrestres y litófitas, las cuales se distribuyen principalmente al centro y norte de México (Contreras *et al.*, 2011; Hágsater *et al.*, 2015). Se considera que todos los estados del país albergan al menos una especie de orquídea. Oaxaca, Chiapas, Guerrero y Veracruz son los territorios con mayor riqueza de orquídeas en México (Solano-Gómez *et al.*, 2007; Castañeda-Zárate *et al.*, 2012; Beutelspacher-Baigts, 2017).

A pesar de esta gran diversidad, las orquídeas en México son la segunda familia botánica más amenazada, solo después de los cactus (Vovides *et al.*, 1997; Alvarado, 2012). Sus principales amenazas son de origen humano, siendo las más graves, la destrucción de su hábitat natural por diversas actividades como la tala clandestina y los cambios de uso de suelo, y el saqueo desmesurado de especies silvestres para el tráfico y comercio ilegal (Conabio, 2013; Tejeda-Sartorius *et al.*, 2017).

La consecuencia de dichas actividades ha ocasionado que en México existan 184 especies de orquídeas con problemas de conservación (50% endémicas de México), las cuales se distribuyen de la siguiente manera: 107 se encuentran bajo protección especial, 61 están amenazadas, 15 en peligro de extinción y una especie, actualmente se encuentra extinta en su hábitat natural (Semarnat, 2010).

La pérdida de una especie vegetal trae consigo grandes problemas ecológicos, ya que las plantas por ser los organismos autótrofos principales de la cadena trófica poseen diferentes interacciones ecológicas, tales como la polinización y las interacciones con hongos micorrízicos (Phillips *et al.* 2014; Selosse 2014; Nurfadilah *et al.*, 2016).

En lo que respecta a *Encyclia parviflora* y *Stanhopea tigrina*, ambas son especies endémicas de México, *E. parviflora* al ser una especie carente de valor ornamental aún conserva grandes poblaciones silvestres en sus zonas de distribución, por su parte *S. tigrina*, se encuentra en la categoría de Amenazada (Semarnat, 2010; Hagsater *et al.*, 2015).

### 2.3. Generalidades y taxonomía de *Encyclia parviflora*

*Encyclia parviflora*, es una planta epífita que habita los bosques de encino, las selvas bajas secas y los bosques tropicales caducifolios y subcaducifolios. Suele desarrollarse a una altitud de 100 a 800 m y desarrolla su floración durante los meses de abril a mayo (Leopardi-Verde *et al.*, 2016; Villaseñor, 2016).

Esta orquídea es endémica de México y al igual que la mayoría de las especies en su género carece de interés hortícola. Se distribuye en la vertiente del Golfo de México y en la vertiente del Pacífico a través del Istmo de Tehuantepec.

Los estados mexicanos que comprende dicha especie son: Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz, Querétaro, Hidalgo, Puebla y Oaxaca (García-Cruz *et al.*, 2003) y en todos ellos hay registros de grandes poblaciones silvestres.

En San Luis Potosí se ha observado en los municipios de Aquismón, Ciudad Valles, Tamasopo y Tanlajás. Debido al gran número de poblaciones silvestres que aún mantiene *E. parviflora*, no se encuentra considerada dentro de alguna categoría de riesgo o amenaza de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (Semarnat, 2010).

De hecho, *E. parviflora* es una especie que se adapta perfectamente a sitios perturbados; un ejemplo de ello, son el gran número de individuos silvestres que se encuentran en algunas comunidades aledañas al municipio de Ciudad Valles, S.L.P., donde se les puede observar en potreros para diferentes tipos de ganado y en sitios que han sido utilizados para el cultivo de especies agrícolas como la caña de azúcar o el maíz, donde los pseudobulbos globosos que posee esta especie le han permitido almacenar suficiente agua y nutrimentos para soportar el severo período de estiaje de estos ambientes (Fig. 4) (Fortanelli-Martínez *et al.*, 2018).

Otro aspecto importante que considerar de esta especie es la facilidad con la que se puede propagar mediante las técnicas del cultivo de tejidos vegetales. Por ejemplo, en el Laboratorio de Investigación de Ciencias Ambientales de la UAMZH-UASLP, *E. parviflora* es la orquídea que cuenta con más individuos propagados, resultando interesante su fácil asimilación de nutrientes en un sistema *in vitro*.



**Figura 4.** Planta adulta de *E. parviflora* en un sitio de la comunidad de El Sidral en Cd. Valles, S.L.P., México.

La clasificación taxonómica de *E. parviflora* (Fig. 5) de acuerdo con Carl Leslie Withner se describe a continuación:

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Liliopsida

**Subclase:** Liliidae

**Orden:** Asparagales

**Familia:** Orchidaceae

**Subfamilia:** Epidendroideae

**Tribu:** Epidendreae

**Subtribu:** Laeliinae

**Género:** *Encyclia*

**Especie:** *Encyclia parviflora*



**Figura 5.** Detalle de la flor de *Encyclia parviflora*.

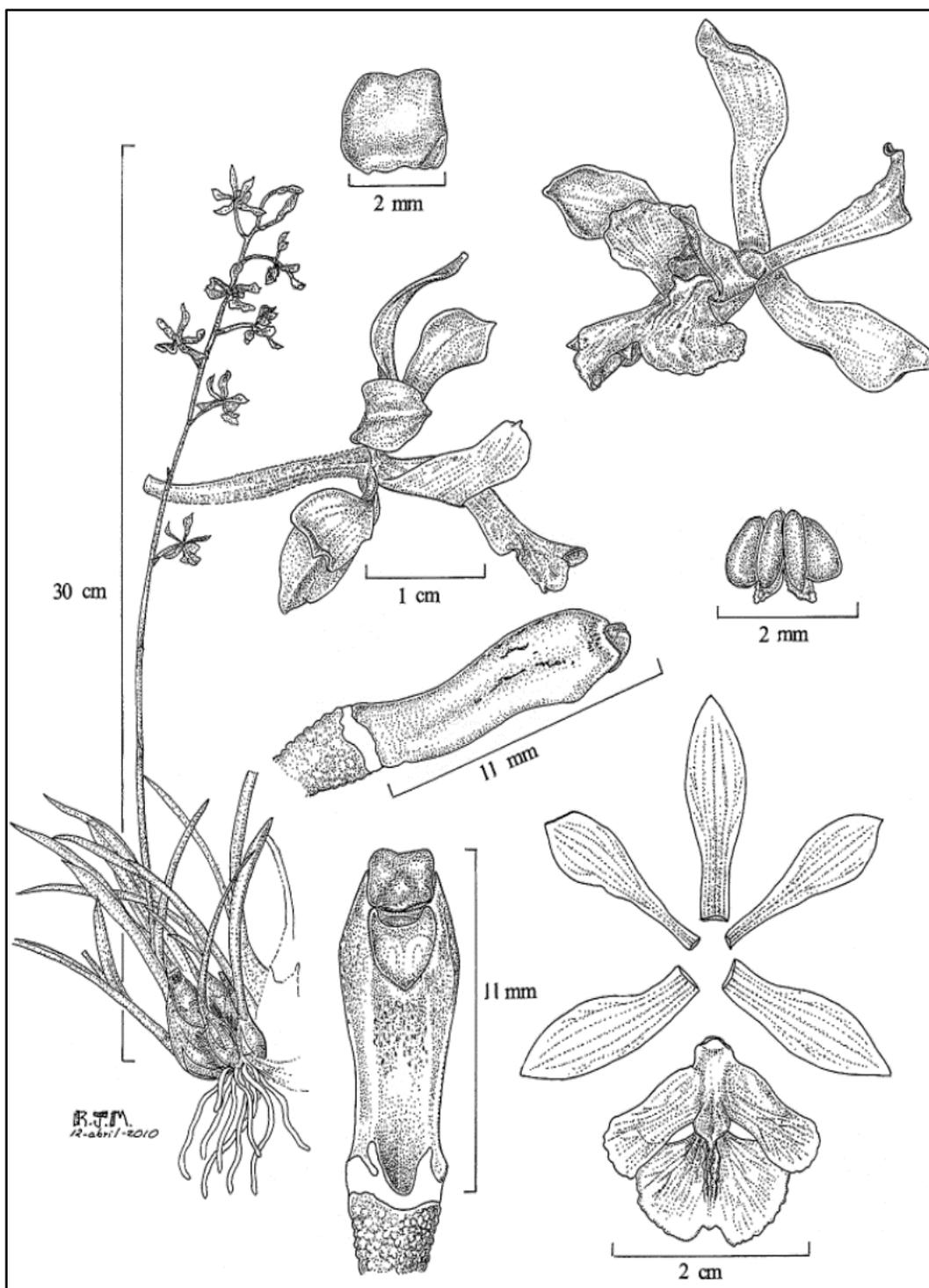
Fotografía: Javier Fortanelli

### 2.3.1. Descripción botánica de *Encyclia parviflora*

*E. parviflora* es una planta herbácea epífita, de 40 a 70 cm de alto; pseudobulbos cónico-ovoides de 5 a 8 cm de longitud y de 1.5 a 2.5 cm de anchura, brácteas del pseudobulbo de 1.5 a 9 cm de largo. Presenta 2 o 3 hojas, lineares a ensiformes, de 20 a 40 cm de longitud, de 1 a 2.5 cm de anchura, agudas u obtusas. La inflorescencia se origina a partir del pseudobulbo maduro, es erecta a arqueada, racemosa, en ocasiones paniculada, de 40 a 55 cm o más de largo, con 4 o 5 brácteas cortamente tubulares, escariosas, blanquecinas, oblongo-trianguulares, de 0.5 a 1 cm de largo, agudas, brácteas florales mucho más pequeñas que el ovario, amplexicaules, escariosas, triangulares, de 3 a 5 mm de largo, de 1 a 2 mm de anchura, obtusas.

Para esta orquídea, la producción de flores es numerosa, se han registrado más de 10 flores por vara floral, posee sépalos y pétalos verde-amarillentos, con rayas hacia el ápice o totalmente pardos oscuros con ligeros tintes rojizos o morados, lóbulos laterales del labelo amarillos, con venas rojas, el lóbulo medio amarillo, los bordes más oscuros, las venas rojizas; ovario glabro, rollizo, ligeramente ensanchado hacia el ápice, de 2 a 3 cm de longitud, de 1 a 2 mm de grosor, los sépalos se encuentran extendidos, obovados a obovado-lanceolados, fuertemente angostados en la base, de 1.5 a 2 cm de longitud, de 5 a 6 mm de ancho, redondeados, por su parte, los pétalos se encuentran extendidos, oblanceolados a obovado-espatulados, de 1.5 a 2 cm de longitud, de 4 a 6 mm de anchura, redondeados.

El labelo de esta orquídea está unido a la columna en su base, es trilobado y mide de 1.4 a 1.8 cm de longitud y de 1.1 a 1.5 cm de anchura, presenta lóbulos laterales oblicuos separados del lóbulo medio por senos de 1.5 a 3 mm de anchura. La columna es algo arqueada hacia el ápice, claviforme y mide de 10 a 12 mm de longitud, alada, las alas cerca del ápices son oblongas a ovadas, el diente medio triangular, obtuso, subigual a los laterales, todos separados por senos poco profundos (Fig. 6) (García-Cruz *et al.*, 2003).



**Figura 6.** Ilustración de *Encyclia parviflora* realizada por Rolando Jiménez Machorro (Herbario AMO, CDMX). Tomada de Pérez-García y Hágater, 2012.

#### 2.4. Generalidades y taxonomía de *Stanhopea tigrina*

*Stanhopea tigrina* conocida comúnmente como “calaverita” o “vaquita” en diversas regiones del país, es una orquídea de hábito epífita o rupícola. Esta especie vegetal habita los bosques húmedos de pino-encino y los bosques liquidámbar y puede crecer a una altitud de 600 a 1700 m y desarrolla sus flores durante los meses de julio a agosto (Hágsater y Soto, 2003).

Es endémica de México, específicamente de la Sierra Madre Oriental, donde su distribución comprende los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo, Puebla, Veracruz y Oaxaca (Hágsater y Soto, 2003).

En San Luis Potosí, se ha observado su crecimiento en los municipios de Aquismón, Cd. Valles, Rayón, Tamasopo, Tamazunchale y Xilitla. Esta especie vegetal se encuentra incluida en la categoría de Amenazada, de acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010.

La clasificación taxonómica de *Stanhopea tigrina* (Fig. 7) de acuerdo con James Bateman se describe a continuación:

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Liliopsida

**Subclase:** Liliidae

**Orden:** Asparagales

**Familia:** Orchidaceae

**Subfamilia:** Epidendroideae

**Tribu:** Maxillarieae

**Subtribu:** Stanhopeinae

**Género:** *Stanhopea*

**Especie:** *Stanhopea tigrina*



**Figura 7.** Detalle de la flor de *Stanhopea tigrina*.

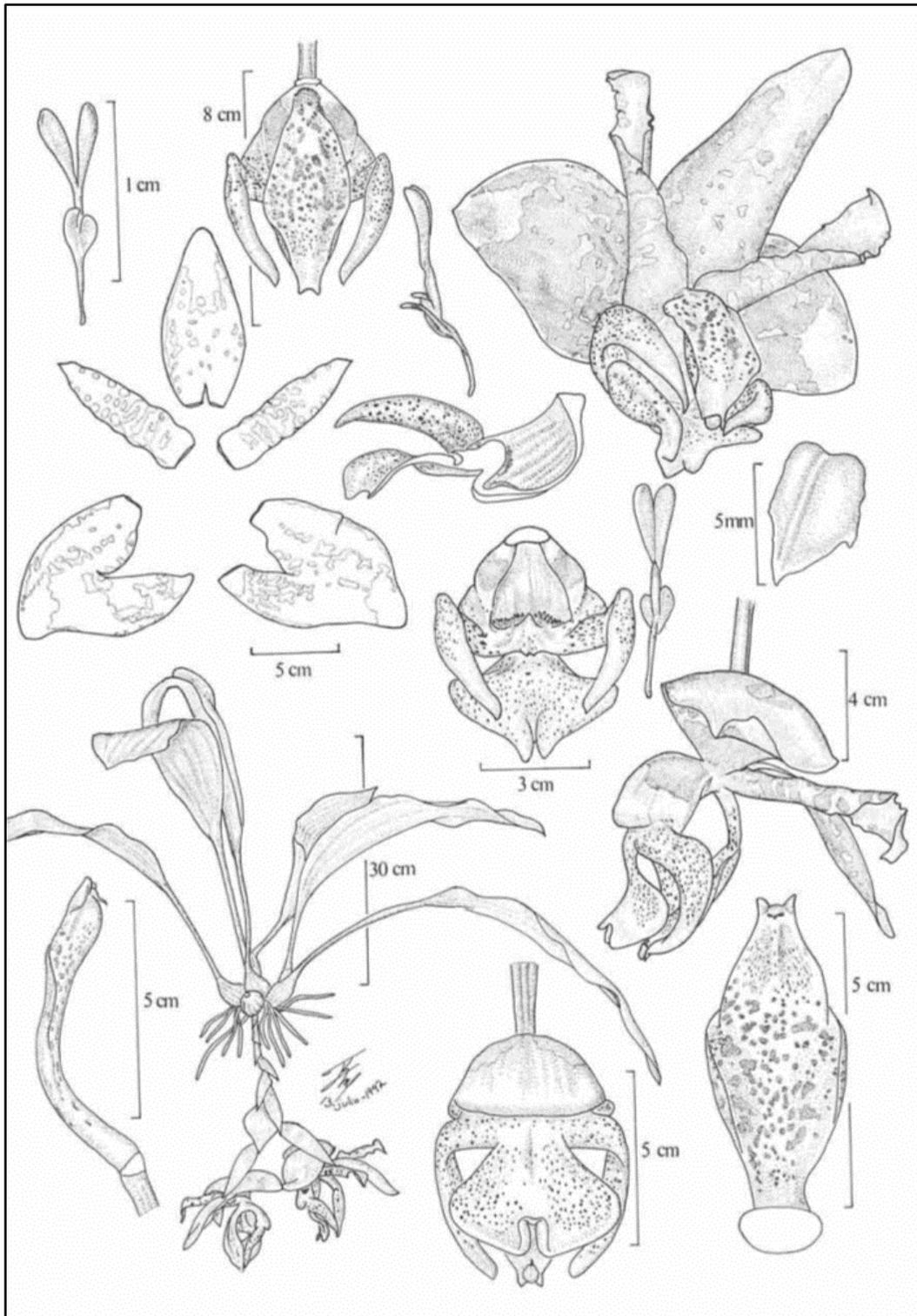
Fotografía: Javier Fortanelli

#### 2.4.1. Descripción botánica de *Stanhopea tigrina*

*Stanhopea tigrina* es una hierba epífita, cespitosa de 40 a 70 cm de altura. Posee raíces flexuosas de 2 a 3 mm de grosor. Presenta pseudobulbos unifoliados, ovoides y longitudinalmente sulcados. Las hojas poseen un peciolo sulcado de 5 a 14 cm de longitud y 4.5 a 6.5 mm de grosor. La inflorescencia es péndula, usualmente biflora y mide de 20 a 35 cm de longitud, presenta brácteas cafés, imbricadas, cimbitiformes, ampliamente ovadas, obtusas y apiculadas. Posee brácteas florales elípticas u oblanceoladas, agudas u obtusas y aristadas.

Las flores son resupinadas y de aproximadamente 11 a 18 cm de diámetro, con sépalos crema o amarillos, los pétalos son de color amarillo y una gran mancha púrpura en la base y otras pocas submarginales hacia el ápice. El hipoquilo es amarillo, con dos bandas púrpura, grandes a los lados y dos más pequeñas, brillantes a los lados del orificio, por su parte el mesoquilo y epiquilo son punteados de púrpura. La columna es blanquecina, axialmente verdosa y con manchas púrpura claro. *S. tigrina* posee una fragancia muy intensa, dulce y aromática, que de acuerdo con Whitten y Williams, 1992, está compuesta químicamente por fenil etil acetato, acetato de cinamilo, indol, acetato de bencilo y fenil etil alcohol. Posee un sépalo dorsal extendido o reflexo, ovado y ovado lanceolado y cóncavo en la base.

Los sépalos laterales son connados entre sí, extendidos, cóncavos, incurvados y con márgenes ligeramente revolutos, de 7-10 x 4.5-7.5 cm. Los pétalos son reflexos, torcidos, linearoblongos, obtusos, apiculados, repandos, plicados, y miden de 7-9.8 x 1.8-2.8 cm. El labelo mide de 63 a 87 mm de largo, posee 2 cuernos falcados, muy carnosos, anchos, aplanados, arqueados, alzados en la base y recurvados en el ápice. El polinario mide de 11.5 a 12 mm de longitud, con dos polinios, de 4.5 x 0.8 mm dorsiventralmente comprimidos. Después de la polinización forma una cápsula elipsoide, carinada y que mide de 8 a 8.5 cm de longitud y de 3.1 a 3.8 cm de grosor, con la columna persistente (Fig. 8) (Hágsater y Soto, 2003).



**Figura 8.** Ilustración de *Stanhopea tigrina* realizada por Rolando Jiménez Machorro (Herbario AMO, CDMX). Tomada de Hágsater y Soto, 2003.

## 2.5. Riesgos y amenazas de las orquídeas en México

La extinción de especies es un proceso que ha ocurrido de forma natural a lo largo de la historia del planeta, sin embargo, los cambios antropogénicos sobre los ecosistemas han acelerado dichos procesos en varias especies de flora y fauna (Flores-Villela y León-Paniagua, 1998; Briggs, 2015; Ceballos *et al.*, 2015).

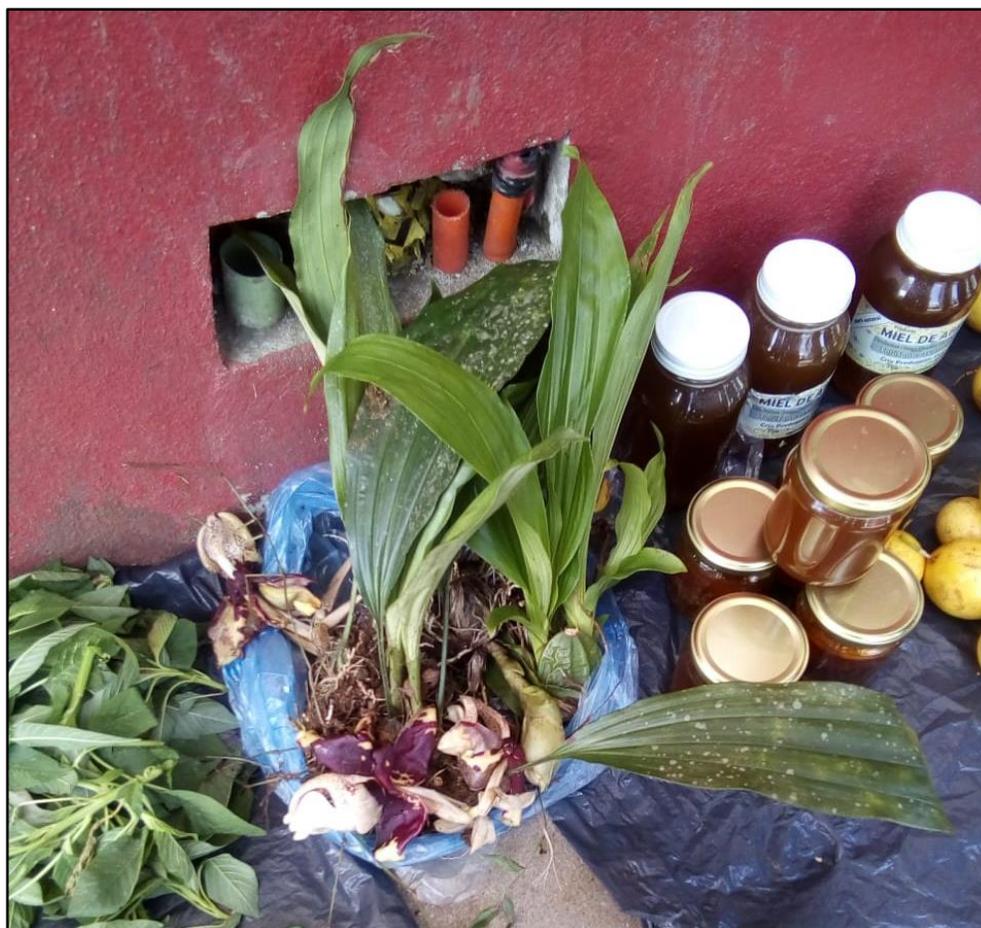
A pesar de que México cuenta con una gran biodiversidad, el tráfico ilegal de especies ocupa el tercer lugar del comercio ilícito en el país, sólo después del tráfico de drogas y del tráfico de armas (Alvarado, 2012). Se estima que, de las 30,000 especies de plantas vasculares del país, el 46% se encuentran amenazadas o en peligro de extinción (Vovides *et al.*, 1997; Semarnat 2010; Espejo-Serna, 2012).

Las poblaciones silvestres de orquídeas han sido afectadas por las presiones del desarrollo humano, como la conversión de terreno para usos agrícolas y/o pecuarios, y las actividades de extracción de las plantas de su hábitat para su venta como plantas de ornato en mercados nacionales e internacionales (Subedi *et al.*, 2013; Hinsley *et al.*, 2015; Hinsley *et al.*, 2017). En consecuencia, la familia completa está incluida en el Apéndice II de la Convención sobre el Tráfico Internacional de Especies Silvestres de Flora y Fauna Amenazadas (CITES).

En México, la NOM-059-SEMARNAT-2010, refiere 184 orquídeas bajo alguna categoría de riesgo, lo que equivale al 15.33% del total en el país. De la cantidad total de orquídeas amenazadas, el 40.33% son endémicas de México (Semarnat, 2010; Espejo-Serna, 2012).

Las poblaciones silvestres de diversas especies de orquídeas se han visto disminuidas con el paso del tiempo, por lo que es importante y urgente realizar estudios para establecer protocolos de conservación (Ávila-Díaz y Salgado-Garciglia, 2006; Menchaca-García *et al.*, 2012).

Algunas especies como *E. parviflora*, han logrado desarrollarse en zonas perturbadas, áreas deforestadas o en sitios contaminados. Otras, como *S. tigrina* están propensas a la recolecta de cientos de ejemplares mensuales para su comercio ilegal, lo que ha vuelto vulnerable a sus poblaciones silvestres (Fig. 9) (García-Cruz *et al.*, 2003; Hágsater y Soto, 2003).



**Figura 9.** Negocio ambulante con plantas de *Stanhopea tigrina* a la venta en el mercado municipal de Xilitla, S.L.P., México. Fotografía: Lizbeth Ramos.

El cultivo de tejidos vegetales es una alternativa biotecnológica de conservación *ex situ*, mediante la cual se generan y conservan una gran cantidad de plantas que se encuentran en riesgo, no solo en México, sino alrededor del mundo. Esta técnica ha sido muy utilizada durante los últimos años, debido a que proporciona mayores ventajas con respecto a otros métodos de propagación convencionales (Carranza-Álvarez *et al.*, 2016).

## **2.6. El cultivo de tejidos vegetales como alternativa para la conservación**

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) comprende una amplia gama de técnicas biotecnológicas que se realizan bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos (Morales-Rubio *et al.*, 2016). Dichas técnicas se basan en la

característica de totipotencialidad de la célula vegetal, es decir, la capacidad de una célula vegetal (sin importar su posición o función) para dividirse, multiplicarse y desarrollar una planta completa (Calva y Pérez, 2005; Thorpe, 2007).

Durante los últimos años, el CTV ha sido ampliamente utilizado con fines de conservación, ayudando a producir, propagar y reinsertar a sus hábitats naturales un gran número de especies maderables y no maderables con algún grado de importancia ecológica o en vías de extinción (Engelmann, 1991; Fay, 1992; Smith *et al.*, 2007; Yam *et al.*, 2010; Endres-Júnior *et al.*, 2018; Segovia-Rivas *et al.*, 2018).

El CTV brinda amplias ventajas sobre el cultivo vegetativo convencional, entre las cuales se encuentran: 1) la obtención masiva de plantas libres de virus, 2) las tasas de multiplicación relativamente rápidas, 3) el almacenaje de una gran cantidad de individuos en espacios reducidos, 4) el fácil transporte de material vegetal para otros contribuir a otros programas de conservación y 5) la capacidad de estudiar los procesos fisiológicos en las plantas de interés (Carranza-Álvarez *et al.*, 2016; Shahzad *et al.*, 2017).

Las técnicas del CTV pueden ser utilizadas en especies vegetales como herramientas para micropropagación *in vitro*, propagación acelerada de clones, eliminación de virus y enfermedades, producción de haploides, cultivo de embriones, producción de semillas sintéticas y estudios de anatomía, fisiología y nutrición vegetal (Mineo, 1990; Calva y Pérez, 2005; Thorpe, 2007; Hussain *et al.*, 2012).

### **2.6.1. Micropropagación *in vitro***

La micropropagación es una herramienta derivada del CTV que mantiene el mismo fundamento de funcionalidad, el cual está basado en la totipotencialidad de la célula vegetal y a la cual se le une la hipótesis del balance hormonal (Skoog y Miller, 1957). Esta técnica es aplicada para propagar a gran escala especies de interés vegetal en el menor periodo de tiempo posible (Roca y Mroginski, 1991). Resulta una importante vía de conservación *ex situ*, ya que se obtienen plantas de alta calidad sin problemas patogénicos, y la producción es ilimitada.

A lo largo del tiempo se han establecido los pasos que se deben seguir durante la micropropagación, siendo éstos modificados en distintas ocasiones debido al surgimiento de diversos problemas durante el proceso, principalmente la contaminación del material vegetativo. En 1974 Murashige consideraba sólo tres etapas en la micropropagación y fue hasta 1981 en que Deberg y Maene consideraron que los problemas de contaminación recurrentes se debían posiblemente a una mala elección del explante y establecieron la etapa cero.

Actualmente se consideran cinco fases de la micropropagación (Téllez y Casanova, 2014), las cuales se describen a continuación:

*Fase 0: Selección y preparación de la planta madre:* La respuesta morfogénica vegetal que se obtendrá de los explantes, dependerá del genotipo de la planta madre, por lo cual se sugiere que las condiciones fitosanitarias y fisiológicas de la planta donadora sean las adecuadas, se debe tener en cuenta principalmente la edad fisiológica y en este aspecto los órganos jóvenes son los que tienen mejor respuesta en el establecimiento del cultivo (George, 1993; Olmos *et al.*, 2004). También es recomendable mantener la planta madre durante algunos meses en un invernadero bajo condiciones controladas, cultivando la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control nutricional adecuado para permitir un crecimiento vigoroso y libre de posibles enfermedades.

*Fase 1: Desinfección del material vegetal:* El principal objetivo de esta etapa es lograr un cultivo axénico, es decir, el desarrollo vegetal sin la presencia de microorganismos, para lo cual se requiere desinfectar superficialmente el explante. Para este proceso se utilizan diversos agentes químicos, como las soluciones de hipoclorito de sodio o calcio, el peróxido de hidrógeno, el nitrato de plata, el etanol en diferentes concentraciones, entre otros, y después es necesario lavar el material con agua destilada estéril para eliminar completamente las sustancias químicas excedentes (Brenes *et al.*, 2015). Para combatir la contaminación endógena, principalmente hongos, bacterias y levaduras, se pueden agregar a los medios de cultivo soluciones fungicidas o con contenido de antibióticos (Valenzuela y Armendáriz, 2000; Royero *et al.*, 2007).

*Fase 2: Establecimiento del medio de cultivo:* El objetivo de esta etapa es mantener y seguir aumentando la cantidad de brotes para los siguientes pasos del proceso de micropropagación. Los protagonistas de esta fase son los reguladores de crecimiento vegetal (PGR, por sus siglas en inglés), los cuales desempeñan un papel importante en el establecimiento de las rutas de desarrollo vegetal durante la micropropagación (Gray y Trigiano, 2004).

El tipo y concentración de PGR dependerá de diversos factores, entre los más importantes, la especie propagada, el tipo de explante a utilizar y los objetivos de los experimentos. De tal manera que, las concentraciones altas de auxinas inducen la rizogénesis, mientras que, concentraciones altas de citocininas promueven la división celular y regeneración de brotes (Hussain *et al.*, 2012; Schäfer *et al.*, 2015; Ali *et al.*, 2017; Cox *et al.*, 2018)

Además de la formulación del medio, es de suma importancia tomar en cuenta las condiciones físicas del cultivo como los fotoperiodos, la temperatura y la humedad relativa, ya que dichas condiciones van a influir directamente en los procesos metabólicos de los explantes, para esto se debe adaptar un cuarto de cultivo especial que mantenga todas estas características con el fin de asegurar un cultivo exitoso (Shahzad *et al.*, 2017; Batista *et al.*, 2018).

*Fase 3: Enraizamiento de los explantes.* Durante esta fase, se utilizan las plántulas provenientes de la multiplicación con aproximadamente 2 cm de longitud. Estos brotes son transferidos a un medio de cultivo con auxinas para inducir la formación de raíces. Las auxinas más utilizadas son el ácido indol acético, el ácido indol butírico y el ácido naftalenacético, aunque algunas investigaciones han utilizado sustratos naturales como el agua de coco u otras sustancias químicas para inducir la formación del sistema radicular en diversas especies vegetales (Poliszulk *et al.*, 1999; Komalavalli y Rao, 2000; Quintero *et al.*, 2003; Santelices 2007; Larqué-Saavedra *et al.*, 2010). Esta fase es muy importante, ya que la obtención de plantas con raíces en óptimo estado de desarrollo fisiológico propiciará una mejor aclimatación en condiciones de invernadero.

*Fase 4: Aclimatación.* Esta etapa, es sin duda la que definirá el éxito del proceso de la micropropagación. El objetivo es obtener plantas que puedan

sobrevivir en el medio ambiente externo. Durante este proceso se debe tener mucho cuidado, ya que las plantas están propensas a sufrir estrés hídrico severo al ser trasplantadas desde una atmósfera con alta humedad relativa, por lo cual, los estomas podrían perder agua de manera más rápida debido a que no se encuentran totalmente funcionales frente a descensos de humedad relativa, lo que ocasionaría el marchitamiento y muerte de la planta. Debido a ello, la mejor manera de sobrellevar esta complicación es disminuir gradualmente la humedad relativa, mientras se someten las plantas a baja intensidad luminosa con el objetivo de inducir en ellas un proceso metabólico autotrófico efectivo (Gil-Rivero *et al.*, 2017).

En el Cuadro 1 se puede observar una comparación de las características morfológicas y fisiológicas de una planta en condiciones de laboratorio (*in vitro*), respecto a una planta en condiciones silvestres (*in vivo*).

Todos estos aspectos deben ser tomados en cuenta para lograr con éxito la fase de aclimatación. En este aspecto es importante mencionar que las interacciones ecológicas que ejercen con otras especies vegetales y animales, además de microorganismos como hongos y bacterias, también influirán en la sobrevivencia final de las plantas propagadas, pues para una orquídea en condiciones silvestres todo funciona en simbiosis para obtener un buen desarrollo vegetal.

**Cuadro 1.** Lista comparativa entre una planta en condiciones *in vitro* respecto a una planta en condiciones *in vivo*.

<b>Planta en condiciones <i>in vitro</i></b>	<b>Planta en condiciones <i>in vivo</i></b>
No realiza el proceso de fotosíntesis.	Realiza el proceso de fotosíntesis.
Obtiene sus nutrientes del medio de cultivo (parcialmente autótrofa).	Fabrica sus propios nutrientes (completamente autótrofa).
Se desarrolla en condiciones de laboratorio, controladas.	Se desarrolla en condiciones silvestres, no controladas.
Se desarrolla bajo condiciones de asepsia.	Se expone a microorganismos patógenos en el ambiente.

---

Alta y constante humedad relativa.	Humedad relativa variable.
Estomas no funcionales.	Estomas completamente funcionales.
Ausencia de pelos radiculares y cera en la cutícula foliar.	Presencia de pelos radiculares y cera en la cutícula foliar.

---

## 2.7. Condiciones de aclimatación de plantas *in vitro*

La aclimatación consiste en transferir las plantas desarrolladas *in vitro* a condiciones *ex vitro*, las cuales contemplan las condiciones ambientales naturales. Este proceso debe ser efectuado de forma lenta y gradual, ya que el material propagado debe pasar de un ambiente con una humedad relativa alta y constante a una humedad relativamente variable, con valores que oscilan entre el 40 y 50%, estos cambios bruscos en las condiciones de desarrollo vegetal podrían causar un estrés hídrico en la planta y en consecuencia la muerte (Pospóšilová *et al.*, 1999; Ubalua y Nsofor, 2017).

Por este motivo, las vitroplantas requieren de un periodo temporal denominado preaclimatación, durante el cual comienzan su adaptación en condiciones *ex vitro* antes de ser llevadas a un ambiente externo no controlado (Carranza-Álvarez *et al.*, 2016).

Durante este proceso, las plantas propagadas deberán comenzar a desarrollar los mecanismos para adaptarse a la baja humedad relativa, comenzar su adaptación a condiciones autótrofas y con ello regular sus procesos de absorción, traslocación y transpiración de agua y nutrientes (Díaz *et al.*, 2004; Martínez-Ruiz *et al.*, 2005; Francisco-Nava *et al.*, 2011; Haygert-Lencina *et al.*, 2017). En este contexto los estomas cumplen un papel muy importante, Van Ginderdeuren-Raveschot, (2009) menciona que los estomas en especies propagadas son de mayor tamaño y redondos, en contraste con plantas cultivadas en invernadero o desarrolladas de forma silvestre, las cuales presentan estomas más pequeños y elípticos, los cuales impiden la deshidratación rápida.

Es importante que durante la etapa de preaclimatación se defina el tipo de sustrato donde se desarrollará la planta. Algunas de las características más

importantes con las que debe contar un buen sustrato son: 1) buena retención de humedad, 2) la capacidad de permitir la aireación de las raíces y 3) poseer poca o nula capacidad para liberar otros compuestos al medio (Olivera-Ortega *et al.*, 2000; Castillo-Pérez, 2016).

Algunos de los sustratos más utilizados para el cultivo de especies de la familia Orchidaceae son: el musgo blanco (*Sphagnum*), la corteza de pino, la corteza de encino, la corteza de coco, el carbón vegetal y la piedra volcánica (tepezil), estos sustratos suelen utilizarse solos o en combinación para poder lograr la mayor parte de las características de un sustrato ideal (Wang, 2008; Díaz y Garciglia, 2013; Cazarez-Favela *et al.*, 2016).

Aunado al tipo de sustrato, existen otros factores ambientales que son imprescindibles durante la etapa de aclimatación. Entre los más importantes se encuentran: la disponibilidad de agua, la incidencia de luz y la temperatura.

La disponibilidad de agua estará definida por los riegos que se realicen a las plantas en aclimatación. Las orquídeas toleran mejor la falta de agua que el exceso (Yoder *et al.*, 2000), por lo cual, un sustrato húmedo de manera permanente podría ocasionar enfermedades por hongos o bacterias, seguido de la pudrición de las raíces y finalmente la muerte de la planta (Cárdenas-Briceño, 2003).

Es importante añadir agua en abundancia cuando la plantas se encuentra con un crecimiento activo y disminuir la cantidad de riegos después de la floración. Especies que desarrollan pseudobulbos como *Encyclia parviflora* y *Stanhopea tigrina* almacenan agua y se mantienen preparadas para su periodo de letargo, por lo cual es importante que durante la propagación se induzca el crecimiento de dichas partes vegetativas (Rosa-Manzano *et al.*, 2014).

Por otro lado, los requerimientos de luz suelen variar dependiendo de la especie de planta propagada, sin duda, el buen suministro de luz solar inducirá en la planta un buen desarrollo foliar y radicular, lo cual se verá reflejado en la producción de su inflorescencia cada temporada (Wang, 1998).

Para los géneros *Encyclia* y *Stanhopea*, las necesidades de luz son muy distintas. *Encyclia parviflora* es una especie que habita las selvas bajas secas, por lo cual es probable que necesite una buena cantidad de luz solar para su desarrollo,

en contraste con *Stanhopea tigrina*, especie que habita los bosques de neblina donde la incidencia de luz solar es muy tenue y predominan los ambientes sombríos con altas cantidades de humedad (García-Cruz *et al.*, 2003; Hágsater y Soto-Arenas, 2003). En este caso, es importante mantener monitoreadas las vitroplantas en aclimatación, ya que un exceso de luz podría causar quemaduras foliares y la posterior muerte de las hojas afectadas.

Para las condiciones de temperatura, es necesario conocer el hábitat de crecimiento de la orquídea propagada. Es recomendable comenzar el proceso de aclimatación con orquídeas que puedan soportar la temperatura del lugar donde se llevará a cabo dicho proceso. En este contexto, existen orquídeas de clima frío que toleran temperaturas menores a los 10°C, las orquídeas de clima cálido como la mayoría de las que se encuentran en México se desarrollan en temperaturas mayores a los 21°C y algunas de las especies más adaptadas pueden tolerar temperaturas altas y bajas sin afectar su crecimiento (Ordoñez-Blanco y Parrado-Rosselli, 2017).

De hecho, existen investigaciones que proponen el uso de orquídeas como biomonitores del cambio climático, esto debido a la vulnerabilidad que poseen frente a los cambios de temperatura (Atala *et al.*, 2017; Valtuille-Faleiro *et al.*, 2018).

## 2.8. Micropropagación *in vitro* en especies de la familia Orchidaceae

Debido a la amplia gama de especies, y a sus diversas aplicaciones y a sus usos convencionales, Orchidaceae es una de las familias botánicas con más especies propagadas por las técnicas y aplicaciones del CTV en el reino vegetal (Musharof-Hossain *et al.*, 2013).

La micropropagación *in vitro* ha sido una de las herramientas más utilizadas alrededor del mundo para propagar orquídeas de manera masiva, ya sean epífitas terrestres o rupícolas, principalmente aquellas que se encuentran en peligro de extinción o que poseen un valor medicinal u ornamental (Zeng *et al.*, 2016; Bhattacharyya *et al.*, 2016; Khamchatra *et al.*, 2016); sin embargo, muy pocas investigaciones han abordado la fase de aclimatación.

En este contexto, resulta importante mencionar, que la relación que establecen las orquídeas con microorganismos, principalmente bacterias y hongos, ha sido ampliamente estudiada y utilizada en diversos protocolos establecidos para la micropropagación *in vitro* y a este método se le conoce como micropropagación simbiótica.

### 2.8.1. Micropropagación simbiótica en orquídeas

La micropropagación simbiótica es un término poco utilizado durante los procesos de micropropagación *in vitro*, ya que la mayoría de las investigaciones sólo se enfocan en una fase específica del proceso sin desarrollarlo por completo mediante condiciones simbióticas.

La palabra “simbiótica”, hace referencia a una interacción ecológica en donde ambos organismos se ven beneficiados por dicha relación y se considera como sinónimo de mutualismo (Otero-Ospina y Bayman, 2009) y en las orquídeas es una técnica con la que se comenzó a trabajar durante los inicios de la micropropagación, utilizando caldos extraídos de raíces de orquídeas para asegurarse de tener los hongos dentro de la formulación y así asegurar la germinación y el desarrollo de las plantas (Karol-Chávez *et al.*, 2014).

Fue hasta el año de 1922 cuando Lewis Knudson demostró que en ausencia de hongos era posible la germinación de semillas de orquídeas en un medio enriquecido con minerales y azúcares, los cuales proporcionaban los nutrientes que el hongo se encargaba de suministrar, además de dilucidar que las semillas de algunos géneros de la familia Orchidaceae germinaban de forma asimbiótica en condiciones *in vitro* (Karol-Chávez *et al.*, 2014).

Durante la fase de aclimatación los microorganismos como hongos y bacterias resultan sumamente necesarios para aumentar el porcentaje de sobrevivencia en las plantas propagadas. En este contexto, el Cuadro 2 enlista algunas investigaciones en las cuales el efecto de la adición microorganismos ha logrado resultados benéficos sobre la germinación, desarrollo, enraizamiento y la aclimatación de orquídeas propagadas *in vitro* en diferentes partes del mundo.

**Cuadro 2.** Investigaciones que abordan el uso de microorganismos en diferentes fases del proceso de micropropagación *in vitro*.

Especie propagada	Tipo de microorganismo analizado	Fase del proceso de propagación	Referencia
<i>Ophrys</i> sp., <i>Dactylorhiza</i> sp. y <i>Serapias</i> sp.	Hongos micorrízicos		Muir, 1989
<i>Pterostylis vittata</i>	Hongos micorrízicos		Wilkinson <i>et al.</i> , 1989
<i>Pterostylis vittata</i>	Bacterias		Wilkinson <i>et al.</i> , 1994
<i>Platanthera clavellata</i>	Hongos micorrízicos		Zettler y Hofer, 1998
<i>Corallorhiza trifida</i>	Hongos micorrízicos		McKendrick <i>et al.</i> , 2000
<i>Platanthera leucophaea</i>	Hongos micorrízicos		Zettler <i>et al.</i> , 2001
<i>Caladenia arenicola</i>	Hongos micorrízicos		Batty <i>et al.</i> , 2002
<i>Habenaria repens</i> , <i>H. quinquiseta</i> , <i>H. macroceratitis</i>	Hongos micorrízicos	Germinación	Stewart y Zettler, 2002
<i>Tolumnia variegata</i>	Hongos micorrízicos		Otero <i>et al.</i> , 2003
<i>Dendrobium moschatum</i>	Bacterias		Tsavkelova <i>et al.</i> , 2007
<i>Epidendrum ramosum</i> , <i>Lepanthes rupestris</i> y <i>Psychilis monensis</i>	Hongos micorrízicos		Otero-Ospina y Bayman, 2009
<i>Vanda coerulea</i>	Hongos endófitos		Aggarwal <i>et al.</i> , 2012
<i>Epidendrum</i> sp. y <i>Dendrobium</i> sp.	Hongos micorrízicos		Gupta, 2013
<i>Vanilla</i> spp.	Hongos micorrízicos		Alomía-Aguirre, 2014

Aclimatación simbiótica de vitroplantas de <i>Encyclia parviflora</i> (Regel) Withner y <i>Stanhopea tigrina</i> Bateman (Orchidaceae) para su conservación <i>ex situ</i>		Castillo-Pérez, 2018
41 especies de orquídeas	Hongos micorrízicos	León-Molina y Molina-López, 2015
<i>Dendrobium nobile</i>	Bacterias	Tsavkelova <i>et al.</i> , 2016
<i>Epidendrum</i> sp.	Hongos endófitos	Bermeo-Criollo y Sari-Cumbe, 2018
<i>Cattleya</i> sp., <i>Encyclia belizensis</i> y <i>Oncidium sphacelatum</i>	Hongos micorrízicos	De la Noval <i>et al.</i> , 1999
<i>Vanilla planifolia</i>	Hongos endófitos	Ordoñez-Castillo, 2012
<i>Cattleya loddigesii</i>	Bacterias endófitas	Faria <i>et al.</i> , 2013
<i>Dendrobium</i> spp.	Bacterias, hongos micorrízicos	Teixeira da Silva <i>et al.</i> , 2015
<i>Paphiopedilum appletonianum</i> y <i>Pholidota articulata</i>	Bacterias endófitas	Enraizamiento Tsavkelova <i>et al.</i> , 2007
<i>Phalaenopsis</i> sp.	Bacterias	Bertolini <i>et al.</i> , 2007
<i>Cattleya walkeriana</i>	Bacterias	Aclimatación Galdiano-Júnior <i>et al.</i> , 2011
<i>Cattleya guttata</i> y <i>Zygopetalum mackayi</i>	Bacterias	Silva <i>et al.</i> , 2013
<i>Cymbidium</i> sp.	Bacterias	Borges-Baldotto <i>et al.</i> , 2014

Como puede observarse en el Cuadro 2, la mayoría de los estudios en los que se han utilizado microorganismos se han enfocado en la etapa de germinación (germinación simbiótica de orquídeas). Algunos otros han intentado dilucidar el efecto que poseen los microorganismos sobre el desarrollo de las vitroplantas, y muy pocos han estudiado los efectos en las etapas de enraizamiento y aclimatación simbiótica de orquídeas propagadas *in vitro*.

Es muy probable que esto se deba a los pocos registros que existen sobre las condiciones físicas, bioquímicas, biológicas y ecológicas que una especie propagada necesita para adaptarse a las condiciones *ex vitro* y del ambiente externo (Cha-um *et al.*, 2009; Cha-um *et al.*, 2010; Chandra *et al.*, 2010).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Material biológico

Para la etapa de rizogénesis, el establecimiento de preaclimatación *in vitro* y la aclimatación simbiótica se utilizaron plántulas de *Encyclia parviflora* y *Stanhopea tigrina* propagadas en el Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales de la UASLP-UAMZH. Las vitroplantas de ambas especies fueron seleccionadas de acuerdo con los siguientes criterios de inclusión:

1. Contar con más de seis meses de haber iniciado el proceso de micropropagación *in vitro*.
2. Sin contaminación fúngica.
3. Contar con al menos tres hojas con apariencia sana, sin oxidación ni pudrición aparente.
4. Contar con al menos tres raíces con apariencia sana, sin oxidación ni pudrición aparente.
5. Tener una altura desarrollada mayor a 3 cm.

### 3.2. Inducción del proceso de rizogénesis

#### 3.2.1. Establecimiento de los medios de cultivo

El material biológico seleccionado se sembró en medio MS completo, el cual contenía la siguiente formulación: 4.46 g L<sup>-1</sup> de medio MS (Murashige y Skoog, 1962; Phyto Technology Laboratories), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa comercial, 3.0 g L<sup>-1</sup> de carbón activado (Karal S.A. de C.V, León, Mexico) y 8.0 g L<sup>-1</sup> de agar (Phyto Technology, Shawnee Mission, KS; Plant Tissue Culture grade).

Los medios de cultivo se adicionaron con dos concentraciones diferentes de la auxinas ácido indol acético (AIA) o ácido indol butírico (AIB), los cuales se agregaron solos o en combinación con agua de coco (AC) o ácido salicílico (AS).

También, se formularon dos tratamientos que contenían agua de coco y ácido salicílico solamente. Se obtuvieron un total de 14 tratamientos y se agregó un tratamiento control el cual contenía únicamente medio MS completo, sin la adición de ningún tipo de auxina ni sustratos orgánicos (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Tratamientos utilizados para la inducción de rizogénesis en vitroplantas de *E. parviflora* y *S. tigrina*.

Tratamiento	AIA (mg L <sup>-1</sup> )	AIB (mg L <sup>-1</sup> )	AC (ml L <sup>-1</sup> )	AS (μM)
T0	-	-	-	-
T1	-	-	100	-
T2	-	-	-	1.0
T3	2.5	-	-	-
T4	5.0	-	-	-
T5	2.5	-	100	-
T6	5.0	-	100	-
T7	2.5	-	-	1.0
T8	5.0	-	-	1.0
T9	-	2.5	-	-
T10	-	5.0	-	-
T11	-	2.5	100	-
T12	-	5.0	100	-
T13	-	2.5	-	1.0
T14	-	5.0	-	1.0

El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.7 con hidróxido de sodio (NaOH) 1N y/o ácido clorhídrico (HCl) 1N, con la ayuda del potenciómetro Jenway 3510. Los medios de cultivo se dispensaron en recipientes de cristal conteniendo 20 mL de medio por cada tratamiento. Finalmente, los recipientes con medio de cultivo se esterilizaron en la autoclave FELISA FE-399 a 120°C con una presión de 15 lb pulg<sup>2</sup> durante 15 min.

### 3.2.2. Resiembra de vitroplantas y condiciones de cultivo

Concluido el proceso de esterilización se procedió a la resiembra de las vitroplantas. Este proceso fue realizado en una campana de flujo laminar (marca Esco), la cual fue previamente desinfectada con etanol al 70% y tres sesiones de luz ultravioleta de 15 minutos cada una. Para la resiembra del material vegetal, fue

necesario utilizar una bata blanca manga larga y cubrebocas, indumentaria que también fue sometida a las sesiones de luz ultravioleta. Cabe destacar que, durante el proceso de resiembra, previo a cada manipulación del material vegetal, fue necesario limpiar completamente las manos utilizando etanol al 70%, con el propósito de mantener la asepsia durante el proceso.

Al término de la resiembra, los cultivos fueron incubados en el cuarto de cultivo del Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales a una temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  con una intensidad lumínica de  $40\text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  generados con lámparas fluorescentes de luz blanca, con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad y una humedad relativa del 70% (Fig. 10).



**Figura 10.** Cuarto de cultivo del Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales de las UAMZH-UASLP.

### 3.2.3. Diseño experimental y análisis estadístico para la etapa de rizogénesis

Se realizó un diseño experimental completamente al azar. En cada tratamiento se sembraron dos vitroplantas por frasco. Los 15 tratamientos se realizaron por triplicado (tres frascos por tratamiento) obteniendo un total de seis

vitroplantas por tratamiento. Este diseño experimental fue utilizado para ambas especies de orquídeas.

El desarrollo *in vitro* de las raíces y la altura total de las vitroplantas fue evaluado tres veces durante un periodo de 90 días. Se registraron los datos correspondientes de las siguientes variables: número de raíces, longitud de raíces y altura de la planta. Los datos obtenidos para cada tratamiento fueron analizados mediante una prueba de varianza ANOVA con ayuda del paquete estadístico Statistica 8.0 (2002-2007 para Windows) y posteriormente las medias se compararon utilizando la prueba de rangos múltiples de HSD (honesto diferencia significativa) de Tukey. Los valores con una  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

### 3.3. Establecimiento del proceso de preaclimatación *in vitro*

#### 3.3.1. Formulación de los sustratos de soporte para la preaclimatación

Las vitroplantas se sembraron en frascos de vidrio previamente lavados y esterilizados, los cuales contenían la mezcla en diferentes proporciones de tres sustratos de soporte utilizados comúnmente para el cultivo de orquídeas: piedra tepezil, corteza de pino y turba de *Sphagnum* (Fig. 11).



**Figura 11.** Sustratos de soporte utilizados para la preaclimatación *in vitro*.

Los tres sustratos fueron adquiridos de forma comercial y sometidos a un proceso de asepsia para eliminar cualquier microorganismo patógeno que pudieran contener. Para el caso de la piedra tepezil y la corteza de pino, ambos materiales se dejaron reposar por 30 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 10% y posteriormente fueron trasladados a la estufa de convección Lindberg/Blue para ser sometidos a un proceso de secado a 60°C durante dos horas.

Finalmente, los tres sustratos fueron sometidos a un proceso de esterilización en la autoclave FELISA FE-399 a 120°C con una presión de 15 lb pulg<sup>2</sup> durante 15 min. Concluido el proceso de esterilización se llevó a cabo la transferencia de vitroplantas. Se establecieron tres tratamientos diferentes, los cuales se diferenciaban sólo por las proporciones de los sustratos (Cuadro 4).

A todos los tratamientos se agregó de forma líquida 20 mL del medio MS, sin sacarosa ni carbón activado y adicionado con 5.0 mg l<sup>-1</sup> de AIB y 100 ml L<sup>-1</sup> de agua de coco. Para mantener la asepsia de los cultivos, el procedimiento se llevó a cabo en el interior de la campana de flujo laminar.

**Cuadro 4.** Composición de los sustratos utilizados para la preaclimatación de plantas de *E. parviflora* y *S. tigrina* en condiciones *in vitro*.

Sustratos*	Composición	Medio líquido para raíces
S1	Corteza de pino, turba de <i>Sphagnum</i> y roca tepezil (1:2:3)	20 mL de medio para raíces
S2	Corteza de pino, turba de <i>Sphagnum</i> y roca tepezil (2:3:1)	(MS completo + 5.0 mg L <sup>-1</sup> de AIB + 100 ml L <sup>-1</sup> de agua de coco)
S3	Corteza de pino, turba de <i>Sphagnum</i> y roca tepezil (3:1:2)	

\*S1-S3 es la clave para identificar a cada uno de los tratamientos con los diferentes sustratos

### 3.3.2. Diseño experimental y análisis estadístico para el proceso de preaclimatación *in vitro*

Se realizó un diseño experimental completamente al azar, en cada tratamiento se sembraron dos vitroplantas por frasco. Los tres tratamientos se realizaron por triplicado (tres frascos por tratamiento) con lo que se obtuvieron seis vitroplantas por tratamiento (este procedimiento fue realizado para ambas especies de orquídeas).

Las vitroplantas en esta fase también fueron colocadas en el cuarto de cultivo del Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales a una temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  con una intensidad lumínica de  $40\text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  generados con lámparas fluorescentes de luz blanca, con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad y una humedad relativa del 70%.

El desarrollo fisiológico durante la preaclimatación de las vitroplantas se evaluó cuatro veces durante 60 días (7 y 21 de noviembre y 5 y 19 de diciembre del año 2017) y se registraron los datos correspondientes a las siguientes variables: altura de la planta, número de hojas y porcentaje de sobrevivencia.

Los datos obtenidos para cada tratamiento fueron analizados mediante una prueba de varianza ANOVA con ayuda del paquete estadístico Statistica 8.0 (2002-2007 para Windows) y posteriormente las medias se compararon utilizando la prueba de rangos múltiples de HSD (honesto diferencia significativa) de Tukey.

Los valores con una  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos y para el reporte y análisis de resultados, se crearon gráficas mediante el software SigmaPlot (Systat Software, Inc. 2016, versión 11.0).

### 3.4. Aislamiento e identificación de hongos asociados a *Encyclia parviflora* y *Stanhopea tigrina*

#### 3.4.1. Sitios de muestreo y transporte de muestras

Con la finalidad de aislar hongos endófitos de las orquídeas en estudio y así evaluar su efecto en la aclimatación de las plántulas generadas *in vitro*, se recolectaron muestras de pseudobulbos con raíces y hojas de una planta adulta de *E. parviflora* en un predio privado de la comunidad El Sidral, del municipio de Cd. Valles, S.L.P., México. Ubicado geográficamente en las coordenadas 21°48'56.13" latitud Norte y 99°03'34.25" longitud Oeste, a una altitud de 51 m (Fig. 12).

Para el caso de *S. tigrina*, la muestra de pseudobulbos con raíces y hojas de una planta adulta fue recolectada en Rancho Nuevo, Ejido Coronel Castillo, del Municipio de Xilitla, S.L.P., México. Geográficamente situado en las coordenadas 21°26'25.39" latitud Norte y 99°02'20.15" longitud Oeste y a una altitud de 919 m (Fig. 12).

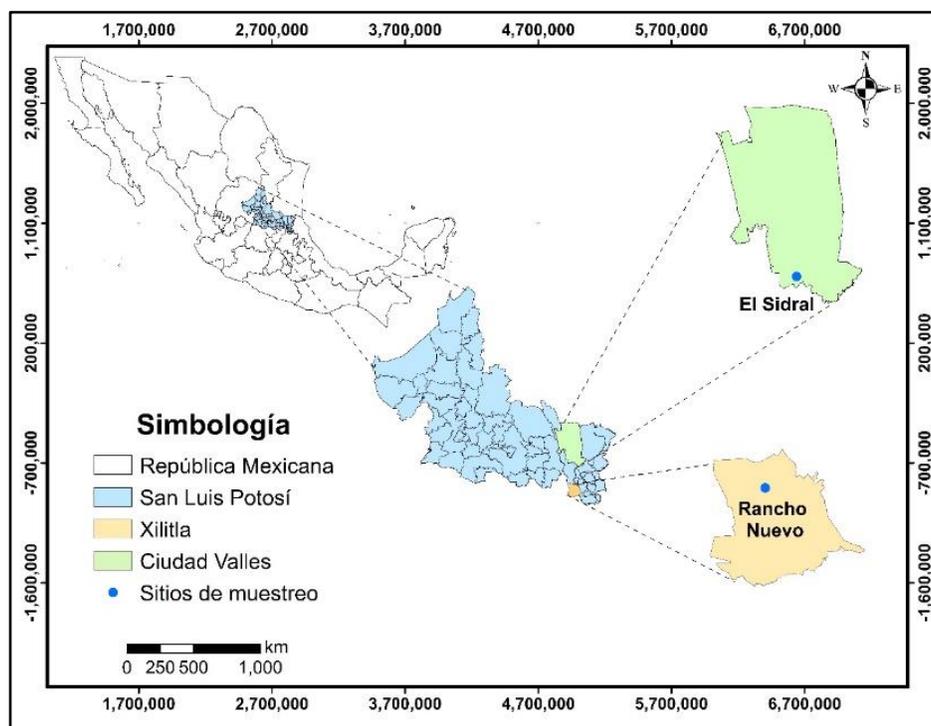


Figura 12. Mapa de los sitios de muestreo para la recolecta de *Encyclia parviflora* y *Stanhopea tigrina*.

Ambas muestras fueron trasladadas de manera individual en bolsas de polietileno lineal de baja densidad (LLDPE por sus siglas en inglés, marca Ziploc), al Laboratorio de Ciencias Básicas de la UAMZH-UASLP, para su posterior tratamiento.

### **3.4.2. Preparación del material vegetal y establecimiento de los cultivos fúngicos**

La metodología que se describe a continuación fue realizada para las dos especies de orquídeas en estudio.

Las muestras del material vegetal se lavaron tres veces con el propósito de eliminar partículas de suelo y cualquier tipo de materia orgánica que pudiera interferir en el desarrollo de la experimentación, esto se hizo primero con abundante agua a flujo constante, posteriormente con etanol absoluto y para finalizar con agua destilada.

Con ayuda de un bisturí estéril, se seccionaron las diferentes partes de la planta en hoja, pseudobulbo y raíces. Enseguida, de cada parte de la planta se cortaron secciones de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>. Para el caso de los pseudobulbos, primero se retiró la corteza superior y las muestras se tomaron aproximadamente a 1 cm de profundidad.

Se prepararon cajas de Petri con agar PDA (ver formulación y preparación de agar PDA en Anexo I). La siembra de las muestras se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la UAMZH-UASLP y se trabajó en una campana de flujo laminar. Se sembraron tres secciones de hoja en la primer caja de Petri, tres secciones de pseudobulbo en una segunda caja y, por último, tres secciones de raíces en una tercer caja de Petri.

Las siembras fueron realizadas por duplicado, por lo que se contó con un total de dos cajas de Petri y seis secciones por cada parte de la planta, para cada una de las especies. El total de las cajas de Petri fueron incubadas en un cuarto aislado en el Laboratorio de Ciencias Básicas de la UAMZH-UASLP, de cinco a diez días a una temperatura de 25±1°C.

### 3.4.3. Resiembra de las especies fúngicas cultivables

Al término de los siete días se observó el crecimiento de distintas especies fúngicas en cada una de las cajas de Petri para cada parte vegetal, por lo cual se realizaron resiembras hasta lograr cultivos puros para cada uno de los hongos; este procedimiento fue realizado en campana de flujo laminar.

Con la ayuda de una asa de platino se tomó una parte del micelio de cada hongo y se traspasó a una nueva caja de Petri con agar PDA. Las cajas de Petri fueron selladas e incubadas al menos siete días a una temperatura de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  en un cuarto aislado en Laboratorio de Ciencias Básicas de la UAMZH-UASLP.

### 3.4.4. Identificación de las especies fúngicas cultivables

Posterior a los siete días de cultivo se evaluaron de forma macroscópica y microscópica cada una de las cepas fúngicas que se lograron aislar de cada parte vegetal. Para la evaluación macroscópica se registraron los siguientes parámetros: forma, aspecto, color, textura y la producción de pigmento difusible en el medio.

Para observar la estructura microscópica se realizó la técnica de microcultivo descrita por Aquiahuatl-Ramos y Pérez-Chabela (2004). Para su realización se preparó una caja de Petri en la cual se colocaron dos palillos formando una "V", sobre esos palillos se colocó un bloque de aproximadamente  $1\text{cm}^2$  de agar PDA.

Posteriormente con ayuda de un asa estéril se removieron porciones pequeñas de las cepas fúngicas y se inocularon en los cuatro cuadrantes del bloque de agar PDA.

Luego de la inoculación se colocó un cubreobjetos estéril sobre la superficie del agar y se agregó acetona en la placa con el propósito de mantener un ambiente húmedo.

A los siete días se obtuvo el crecimiento suficiente, se retiró cuidadosamente el cubreobjetos con pinzas estériles y se colocó en un nuevo portaobjetos con una gota de azul de algodón de lactofenol.

La preparación en fresco fue observada al microscopio óptico de campo claro, enfocando a 10X, observando a 40X y la observación final se realizó con el objetivo de inmersión de 100X.

### **3.5. Identificación molecular de los hongos asociados a *Encyclia parviflora* y *Stanhopea tigrina***

Se seleccionaron doce cepas fúngicas que fueron las mejor desarrolladas de cada parte fisiológica de la planta, de cada una de las dos especies de orquídeas. Dichas cepas fueron sometidas a un protocolo para la extracción de ADN y su posterior identificación molecular. También, con estas 12 cepas fúngicas se realizaron los experimentos de promoción de crecimiento en plantas de frijol común.

#### **3.5.1. Extracción de ADN genómico de las cepas fúngicas**

La metodología para la extracción de ADN se realizó en el Laboratorio de Desarrollo y Diferenciación de Hongos, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-Unidad Irapuato).

Para comenzar, las cepas fúngicas se dejaron desarrollar por un periodo de 10 días a una temperatura de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  y expuestas a luz solar tenue con el propósito de obtener la mayor formación de micelio posible. Una vez desarrolladas las cepas fúngicas, se procedió a raspar el micelio con la ayuda de un asa de platino y se colocó en un mortero con la adición de nitrógeno líquido, el cual se agregó para romper las células fúngicas y obtener el ADN.

Inmediatamente después de agregar el nitrógeno líquido, con ayuda de un pistilo se procedió a pulverizar el micelio, y una vez pulverizado se transfirió a un tubo Ependorff con capacidad de 1.5 ml. Este procedimiento fue realizado para el total de cepas fúngicas de las cuales se extrajo ADN.

A cada una de las muestras de micelio pulverizado, se agregaron 200  $\mu\text{l}$  del reactivo TE y se resuspendió la pastilla formada con la muestra. Posterior a ello, se agregaron 40  $\mu\text{l}$  de TSNTE, 400  $\mu\text{l}$  de fenolcloroformo y perlas de vidrio. Cada uno de los tubos se colocó en agitación con ayuda de un vortex durante 5 minutos y después se centrifugaron por 10 minutos a 12000 rpm. Finalizado el proceso de centrifugación, se recuperó el sobrenadante en nuevos tubos nuevos Ependorff de 1.5 ml y se añadieron 400  $\mu\text{l}$  de etanol al 100% junto con 40  $\mu\text{l}$  de acetato de sodio.

Todas las muestras se incubaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos y al término de este periodo se procedió a centrifugar las muestras a una velocidad de 12000 rpm por

10 minutos y se recuperó la pastilla. Enseguida, se agregaron 200 µl de agua destilada junto con 3 µl de RNAasa y las muestras se incubaron durante 20 minutos a una temperatura de 37°C.

Concluido el tiempo de incubación, se añadieron 20 µl de acetato de amonio 4 M y 400 µl de etanol, nuevamente se incubaron los tubos a -20°C por 30 minutos y al término de este periodo se centrifugaron por 10 minutos a 12000 rpm, se procedió a decantar el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 µL de etanol al 70%, se realizó un segundo periodo de centrifugación a la misma velocidad por 5 minutos.

Para finalizar el protocolo de extracción, se dejó secar la pastilla formada, se resuspendió en 15 µl de agua destilada estéril y se almacenó a -20°C. El ADN extraído se visualizó en electroforesis de gel de agarosa. Para comprobar la existencia del ADN aislado, se procedió a cuantificar el producto con la ayuda del espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

### 3.5.2. Amplificación de ADN y condiciones para la PCR

Para llevar a cabo las reacciones de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en inglés), se utilizaron entre 100 y 200 ng de ADN fúngico, 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl y dNTPs 0.2 mM, además se utilizó 1 µL de cada oligonucleotido (ITS1F e ITS2R) y 2.5 U de DreamTaq DNA polimerasa, todo esto en un volumen total de 50 µL. La secuencia genética para cada uno de los oligonucleótidos fue la siguiente: ITS1F (5´CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A 3´), ITS2 (5´GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC3´), ITS3 (5´GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC3´), ITS4 (5´TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC3´) (De Beeck *et al.*, 2014). Los ciclos de amplificación se llevaron a cabo en un Termociclador Bio-Rad.

La temperatura de desnaturalización fue de 95°C seguido de 40 de ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 50 segundos, 72°C por 60 segundos y finalmente, la extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de la PCR se visualizaron en gel de agarosa para verificar su integridad y calidad.

Para finalizar, el ADN producto de la PCR fue purificado utilizando el método de separación por columnas “GE Healthcare Biosciences”. El producto purificado se envió a las instalaciones del Laboratorio de Secuenciación del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) para su secuenciación. Una vez obtenidas las secuencias, estas fueron consultadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), usando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tools), y se realizó una comparación de las secuencias de nucleótidos homólogos con la base de datos, con el fin de determinar la especie fúngicas.

### **3.6. Evaluación de los hongos aislados sobre la promoción de crecimiento en plantas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*)**

#### **3.6.1. Siembra de semillas en suelo y preparación de medio PDA líquido.**

El suelo utilizado para llevar a cabo los ensayos de este experimento fue obtenido por un proveedor comercial. Después de la apertura del empaque, el suelo se colocó en charolas de aluminio y se sometió a un proceso de horneado a 200°C por 2 horas en la estufa de convección Lindberg/Blue. Al término de este periodo, se vació en recipientes de cristal, los cuales fueron sellados herméticamente y sometidos a un proceso de esterilización en la autoclave FELISA FE-399 a 120°C con una presión de 15 lb pulg<sup>2</sup> durante 15 min.

El agar PDA líquido se realizó como se menciona en el Anexo I, con la excepción de que no se agregó el componente gelificante. El medio líquido se sometió a un proceso de esterilización en la autoclave FELISA FE-399 a 120°C con una presión de 15 lb pulg<sup>2</sup> durante 15 min y se mantuvo en refrigeración a 4°C para su posterior uso.

#### **3.6.2. Inoculación de las especies fúngicas en medio PDA líquido**

Se utilizó un tubo Falcon de 50 ml previamente esterilizado para cada cepa fúngica. En cada tubo se colocaron 20 ml del medio PDA líquido y se inoculó una muestra de micelio de cada uno de los hongos aislados. Todos los tubos fueron sellados herméticamente y colocados en el agitador orbital de matraces Labnet Orbit 1900 con una agitación constante de 200 rpm durante diez días. Las cepas fúngicas

desarrolladas en medio PDA líquido fueron almacenadas a 4°C para su posterior uso.

### 3.6.3. Obtención de la solución de esporas de cada especie fúngica

Una vez que se desarrollaron las cepas fúngicas se procedió a la preparación de una solución de esporas con una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas  $\text{ml}^{-1}$ . Para ello, se preparó una solución de Tween 80 al 0.1%, la solución fue esterilizada en la autoclave FELISA FE-399 a 121°C con una presión de 15 lb pulg<sup>2</sup> durante 30 min.

Posteriormente se preparó una suspensión para cada uno de los hongos, para lo cual se tomaron 5 ml de cada cultivo fúngico y se añadió 1 ml de la solución de Tween al 0.1%. La solución resultante se agitó en vortex durante 1 minuto y después se centrifugó a una velocidad de 2500 rpm durante 10 minutos, para finalizar el proceso con un baño ultrasonido (Baño ultrasonido modelo AS2060b J&G Scientific) de 1 min.

Una vez finalizado el proceso se procedió a contar las esporas con ayuda de una Cámara de Neubauer, en la cual se cargaron 2  $\mu\text{l}$  de la solución de esporas y se contaron cinco campos utilizando un microscopio de campo claro (en los casos que fueron necesarios se realizó una dilución para facilitar el conteo de las esporas). Para obtener el número de esporas se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{número de esporas} = \left( \frac{\text{número total de esporas en 5 campos} \times 10,000}{\text{número de campos} \times \text{dilución}} \right)$$

El número de esporas se ajustó a la concentración deseada ( $1 \times 10^6$  esporas  $\text{ml}^{-1}$ ) y para finalizar, se procedió a la inoculación en las plantas de frijol.

### 3.6.4. Diseño experimental y análisis estadístico

Para este experimento, se utilizó un semillero de unicel totalmente aséptico con capacidad para 70 semillas (Fig. 13). En cada uno de los espacios se agregaron 20 g de tierra previamente estéril y 10 ml de solución de esporas de cada una de las especies fúngicas. El suelo inoculado con la suspensión de esporas se dejó

reposar por 24 horas para la aclimatación de los hongos y transcurrido este tiempo se sembraron las semillas de frijol previamente desinfectadas con gases de cloro.

Se realizó un diseño experimental completamente al azar, donde cada espacio para siembra se contó como una unidad experimental y cada especie fúngica se identificó como un tratamiento, con lo que se obtuvieron 12 tratamientos a los que se agregó un tratamiento control. En cada unidad experimental se sembraron dos semillas de frijol. Para cada tratamiento se realizaron cinco repeticiones, obteniendo un total de diez semillas sembradas por tratamiento.

El semillero fue colocado en el vivero de la UASLP-UAMZH y las semillas se dejaron crecer durante un periodo de diez días, aplicando riego diario con agua potable. Se registró el número de semillas germinadas diariamente para obtener una cinética de crecimiento y calcular el porcentaje de germinación. Concluido el periodo de experimentación, las plantas fueron transportadas al Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales de la UASLP-UAMZH (Fig. 13).



**Figura 13.** Fotografía de las plantas de frijol al término del periodo de experimentación.

Las plantas fueron retiradas de los semilleros y se registraron los datos correspondientes a las siguientes variables: altura de la planta, número de hojas, grosor del tallo, longitud de la raíz, peso fresco y peso seco. Se determinó el índice de salud de las plantas para cada tratamiento de acuerdo con el procedimiento utilizado por You *et al.* (2016).

Los datos obtenidos para cada tratamiento fueron analizados mediante una prueba de varianza ANOVA con ayuda del paquete estadístico Statistica 8.0 (2002-2007 para Windows) y posteriormente las medias se compararon utilizando la prueba de rangos múltiples de HSD (honesto diferencia significativa) de Tukey. Los valores con una  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

### **3.7. Evaluación de la aclimatación simbiótica *ex vitro* en plantas de *Encyclia parviflora* y *Stanhopea tigrina***

#### **3.7.1. Formulación de los sustratos para la aclimatación simbiótica**

Las plantas se sembraron en macetas de plástico de 15 cm de diámetro, de boca circular y con orificios en la parte inferior obtenidas de un proveedor comercial, sin marca específica. Las macetas contenían el sustrato de soporte S1 que arrojó los mejores resultados durante los experimentos de preaclimatación para ambas orquídeas.

El sustrato S1 contenía en su formulación, corteza de pino, turba de *Sphagnum* y roca tepezil (en concentraciones de 1:2:3 respectivamente). En esta fase no se adicionó el medio MS líquido inductor de raíces usado en la fase de la preaclimatación *in vitro*.

Los sustratos se sometieron a un proceso de asepsia antes de ser utilizados y fue el mismo que se utilizó para los experimentos de preaclimatación, el cual se describe en el apartado 3.3.1. de este documento.

Una vez colocado el sustrato de soporte en las macetas, se añadieron 10 ml de la suspensión de esporas fúngicas de cada uno de los dos hongos que se ensayaron (H19 y H24). La formulación de los tratamientos utilizados para la etapa de aclimatación simbiótica se muestra en el Cuadro 5.

**Cuadro 5.** Tratamientos utilizados para la etapa de aclimatación simbiótica *ex vitro* de plantas de *E. parviflora* y *S. tigrina*.

Tratamientos	Solución de esporas ( $1 \times 10^6$ esporas $\text{ml}^{-1}$ )	
	H19*	H24*
Control	-	-
T1	10 mL	-
T2	-	10 mL

\*H19 y H24 son las cepas fúngicas que fueron utilizadas.

### 3.7.2. Diseño experimental y análisis estadístico para la fase de aclimatación simbiótica *ex vitro*.

Se realizó un diseño experimental completamente al azar, en cada tratamiento se sembraron cinco plantas por maceta. Los tres tratamientos se realizaron por duplicado (dos macetas por tratamiento) con lo que se obtuvieron 10 plantas por tratamiento (este procedimiento fue realizado para ambas especies). Todas las macetas fueron colocadas en una bandeja de plástico con tapadera transparente y transportadas al invernadero de la UASLP-UAMZH. Se realizaron orificios cada tercer día en la superficie de la tapadera para modificar de forma gradual el porcentaje de humedad ambiental al interior del recipiente.

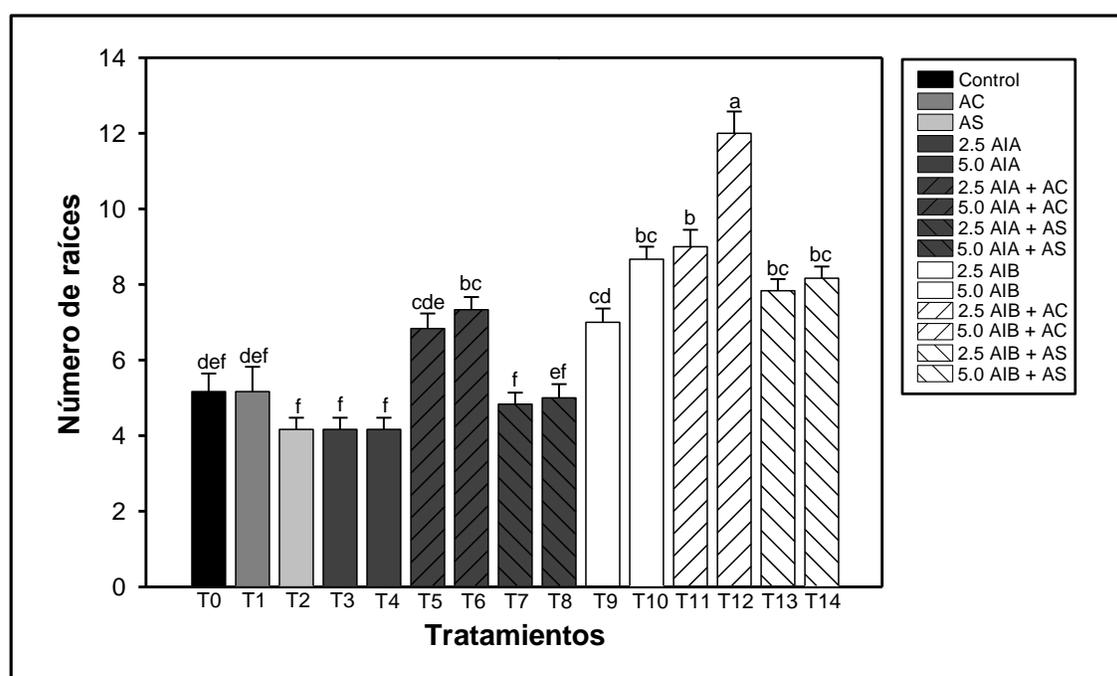
El experimento tuvo una duración de 28 días y cada siete días se evaluó el porcentaje de sobrevivencia, el número de hojas y la altura de las plantas, estas últimas dos variables fueron registradas al inicio y al final del experimento.

Los datos obtenidos para cada tratamiento fueron analizados mediante una prueba de varianza ANOVA con ayuda del paquete estadístico Statistica 8.0 (2002-2007 para Windows) y posteriormente las medias se compararon utilizando la prueba de rangos múltiples HSD de Tukey. Los valores con una  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. Para el reporte y análisis de resultados, se crearon gráficas mediante el software SigmaPlot (Systat Software, Inc. 2016, versión 11.0).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Efecto de las auxinas, agua de coco y ácido salicílico sobre la rizogénesis en vitroplantas de *Encyclia parviflora*

El primer parámetro evaluado fue el número de raíces. Para esta variable el mejor efecto se obtuvo con el tratamiento T12 (5.0 mg L<sup>-1</sup> de la auxina AIB adicionado con 100 ml L<sup>-1</sup> de agua de coco) en donde se produjo un promedio de 12.0 ± 0.5 raíces. El resultado fue estadísticamente significativo (p<0.05) en comparación con el tratamiento control y los demás tratamientos adicionados con auxinas sintéticas (Fig. 14).

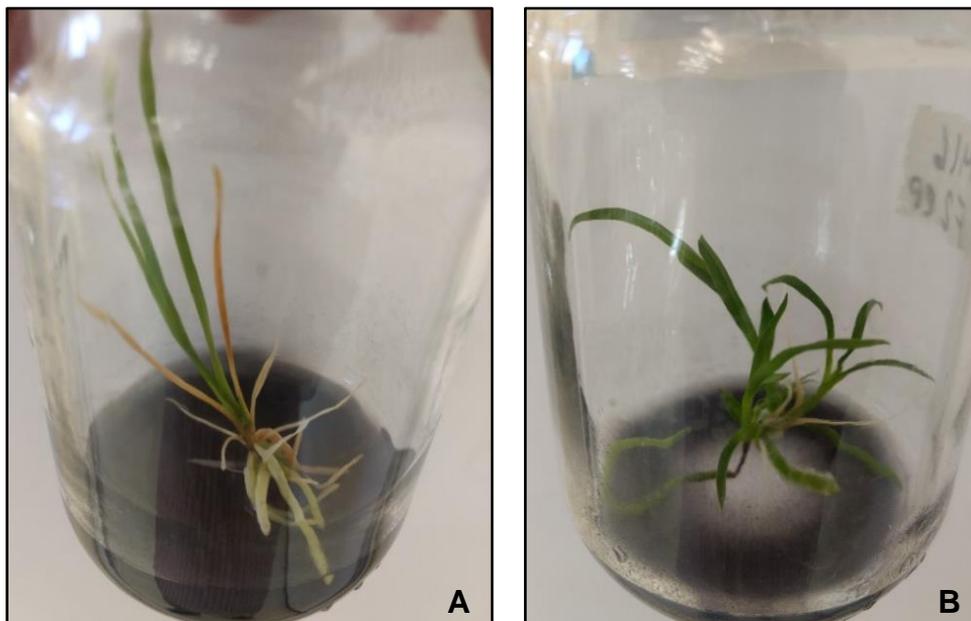


**Figura 14.** Número de raíces desarrolladas en vitroplantas de *E. parviflora*.

AC= 100 ml L<sup>-1</sup> de agua de coco; AS= 1 μM de ácido salicílico; AIA= ácido indol acético; AIB= ácido indol butírico. Las barras representan el promedio de los datos (n=6) y las columnas con letras diferentes indican diferencias significativas (p<0.05).

Para la auxina AIB, los resultados que se presentan en la Fig. 14 mostraron el siguiente comportamiento T12>T11>T10>T14>T13>T10. En tanto que, para la auxina AIA, el comportamiento fue el siguiente T6>T5>T8>T7>T3=T4. Sin embargo,

las raíces desarrolladas en las plantas sometidas al tratamiento T12 mostraron signos necrosantes en raíces y hojas, en comparación con las plantas del tratamiento T11, las cuales, a pesar de desarrollar un menor número de raíces, mostraron un mejor aspecto fisiológico (Fig. 15).



**Figura 15.** Aspecto de las raíces en vitroplantas de *E. parviflora* después de 90 días de exposición a los tratamientos de enraizamiento. **A**, Tratamiento T12 (5.0 mg L<sup>-1</sup> de AIB). **B**, Tratamiento T11 (2.5 mg L<sup>-1</sup> de AIB).

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Santos-Díaz y Carranza-Álvarez (2009) y Mirani *et al.* (2017), donde se observa que al aumentar la concentración de AIB, disminuye el número de raíces en las orquídeas *Encyclia mariae* (actualmente *Prosthechea mariae*) y *Dendrobium nobile* respectivamente. Con base en ello, se puede formular la hipótesis de que la exposición durante más tiempo a la concentración de 5.0 mg L<sup>-1</sup> de AIB provocaría la pérdida del material vegetal propagado, lo cual comprometería todo el proceso de micropropagación.

Es importante mencionar, que la mayoría de los tratamientos con la auxina AIA fueron los que produjeron el menor número de raíces y los resultados fueron similares al tratamiento control, en el que se desarrollaron  $5.1 \pm 0.4$  raíces.

Sin embargo, los tratamientos T5 (2.5 mg L<sup>-1</sup> de AIA con 100 ml L<sup>-1</sup> de agua de coco) y T6 (5.0 mg L<sup>-1</sup> de AIA con 100 ml L<sup>-1</sup> de agua de coco) mostraron resultados similares a la mayoría de los tratamientos con la auxina AIB (Fig. 14).

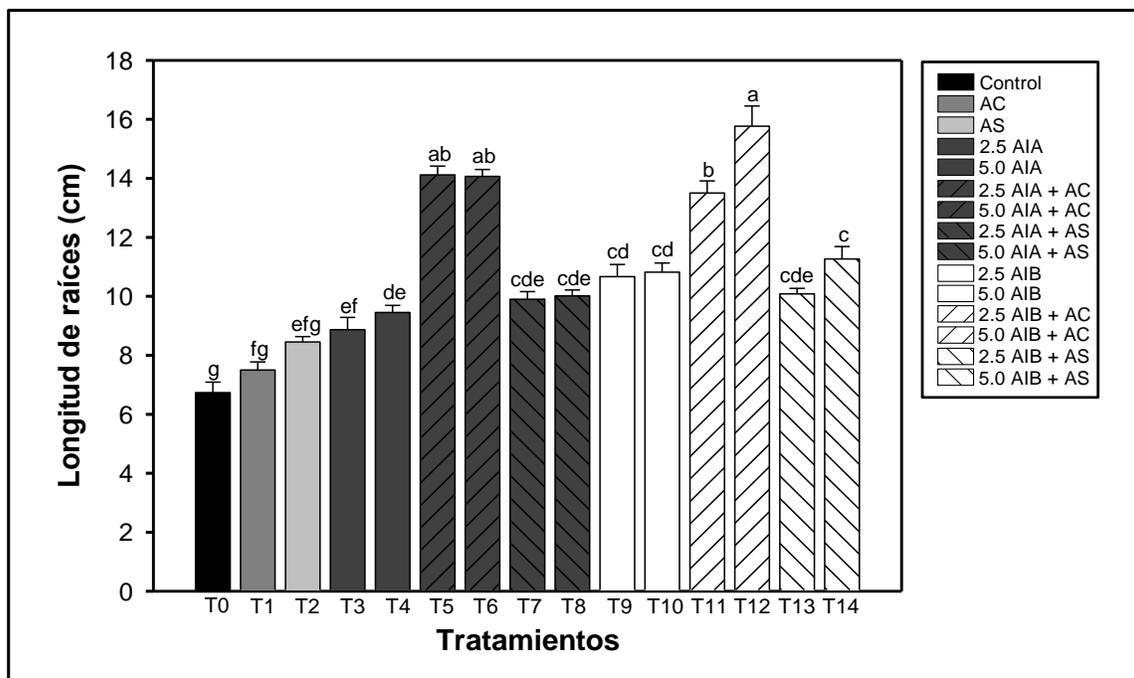
Lo anterior podría deberse a la gran cantidad de auxinas naturales y otros elementos, como vitaminas y minerales que posee el agua de coco y que son benéficos para las plantas, especialmente para el desarrollo fisiológico y estructural de las raíces, ocasionando un efecto positivo en los meristemos apicales radiculares y en algunos casos en los meristemos laterales (Peixe *et al.*, 2007; Nasib *et al.*, 2008; Yong *et al.*, 2009).

En este contexto, Wida-Utami *et al.* (2017), quienes estudiaron la germinación aséptica de semillas y la propagación masiva de *Dendrobium lasianthera*, una orquídea medicinal y en peligro de extinción, demostraron que el agua de coco incrementó la producción de raíces, el desarrollo de brotes y la formación de hojas en las plantas propagadas.

Los tratamientos que contuvieron solamente agua de coco o ácido salicílico (sin auxinas) mostraron comportamientos estadísticamente similares al tratamiento control (Fig. 14), lo cual se puede atribuir al hecho de que, al igual que el agua de coco, se ha comprobado que el uso del ácido salicílico en la micropropagación de distintas especies vegetales produce diversos efectos benéficos, entre ellos: la estimulación de la organogénesis, la inducción de la resistencia sistémica adquirida y la promoción del crecimiento radicular y foliar (López-Delgado y Scott, 1997; Enríquez-del Valle *et al.*, 2001).

El segundo parámetro evaluado fue la longitud de las raíces, donde los mejores efectos se observaron en los tratamientos T5, T6 (2.5 y 5.0 mg L<sup>-1</sup> de AIA) y T12 (5.0 mg L<sup>-1</sup> de AIB), los tres tratamientos contenían 100 ml L<sup>-1</sup> de agua de coco, los cuales desarrollaron una longitud de 14.1 ± 0.3, 14.0 ± 0.5 y 15.7 ± 0.6 cm respectivamente sin diferencias significativas entre ellos (p>0.05). Es importante mencionar que, el efecto producido en las vitroplantas para esta variable mostró una tendencia al incremento conforme se adicionaban las diferentes concentraciones de las auxinas, siendo el tratamiento control el que produjo los efectos más bajos, pero

que, sin embargo, no mostró diferencias estadísticamente significativas con los tratamientos T1 y T2. (Fig. 16).

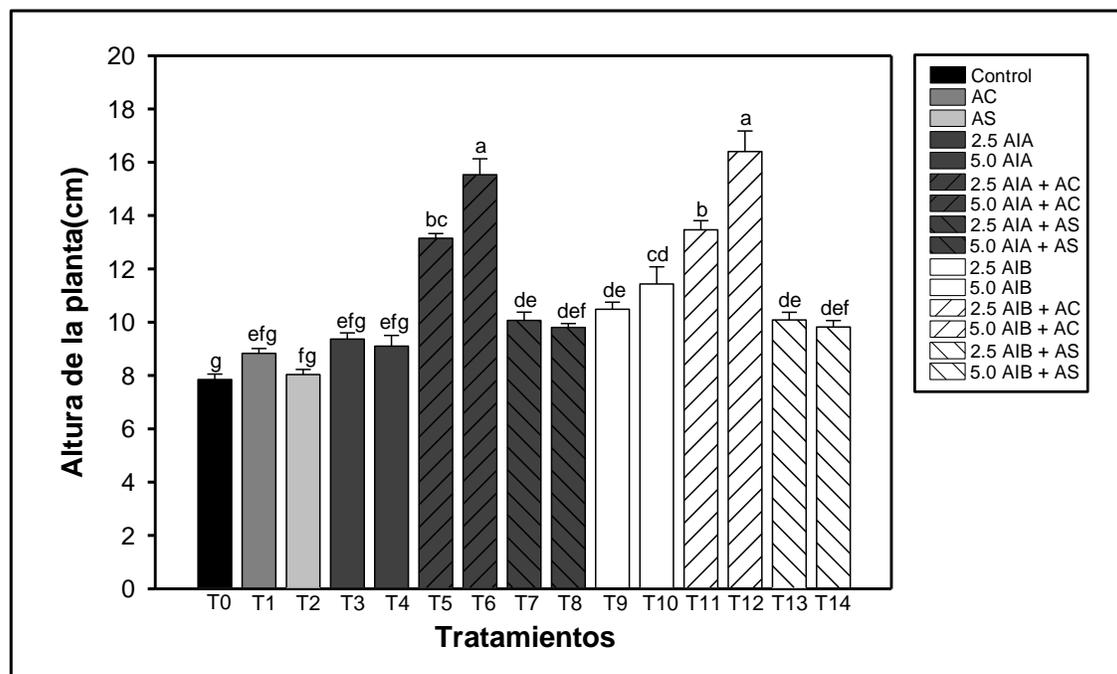


**Figura 16.** Longitud de las raíces desarrolladas en vitroplantas de *E. parviflora*. AC= 100 ml L<sup>-1</sup> de agua de coco; AS= 1 μM de ácido salicílico; AIA= ácido indol acético; AIB= ácido indol butírico. Las barras representan el promedio de los datos (n=6) y las columnas con letras diferentes indican diferencias significativas (p<0.05).

De acuerdo con diversos autores, el AIA favorece el crecimiento primario y la longitud de las plantas, estimula los procesos de multiplicación celular e induce la formación de raíces en cultivo tradicional y bajo condiciones de cultivo *in vitro* (Álvarez y Sagawa, 1965; Pierik, 1990; Cañas 1993; Acosta *et al.*, 2000; Salisbury y Ross, 2000), efectos que pudieron observarse en las plantas expuestas a AIA en la presente investigación.

La tercer variable evaluada, fue la altura promedio de las vitroplantas, donde los mejores resultados se lograron con los tratamientos T6 y T12, los cuales contenían 5.0 mg L<sup>-1</sup> de AIA y 5.0 mg L<sup>-1</sup> de AIB respectivamente, ambos con 100

ml L<sup>-1</sup> de agua de coco. El tratamiento T6 desarrolló una altura de 15.5 ± 0.5 cm y el tratamiento T12 una altura de 16.4 ± 0.7 cm, sin diferencias significativas entre ellos (Fig. 17).



**Figura 17.** Alturas promedio desarrolladas en vitroplantas de *E. parviflora*.

AC= 100 ml L<sup>-1</sup> de agua de coco; AS= 1 μM de ácido salicílico; AIA= ácido indol acético; AIB= ácido indol butírico. Las barras representan el promedio de los datos (n=6) y las columnas con letras diferentes indican diferencias significativas (p<0.05).

Es importante observar que los primeros cuatro tratamientos mostraron un efecto similar al tratamiento control, en tanto que, los tratamientos con las diferentes concentraciones de AIB mostraron un efecto similar conjunto, a excepción de los tratamientos en los cuales se agregó agua de coco, donde se observaron los mejores resultados (Fig. 17), probablemente debido a la composición nutrimental del agua de coco antes mencionada.

La adición de fitohormonas vegetales es un elemento común en la propagación biotecnológica de distintas especies vegetales; sin embargo, no existen protocolos de propagación aún reportados para *E. parviflora*, lo cual podría

deberse a que dicha planta no se encuentra catalogada en alguna categoría de riesgo y tampoco posee valor ornamental por ser una planta con una flor pequeña y sin colores vistosos para la mayoría de la población, a excepción de algunos aficionados y coleccionistas (Fig. 5).

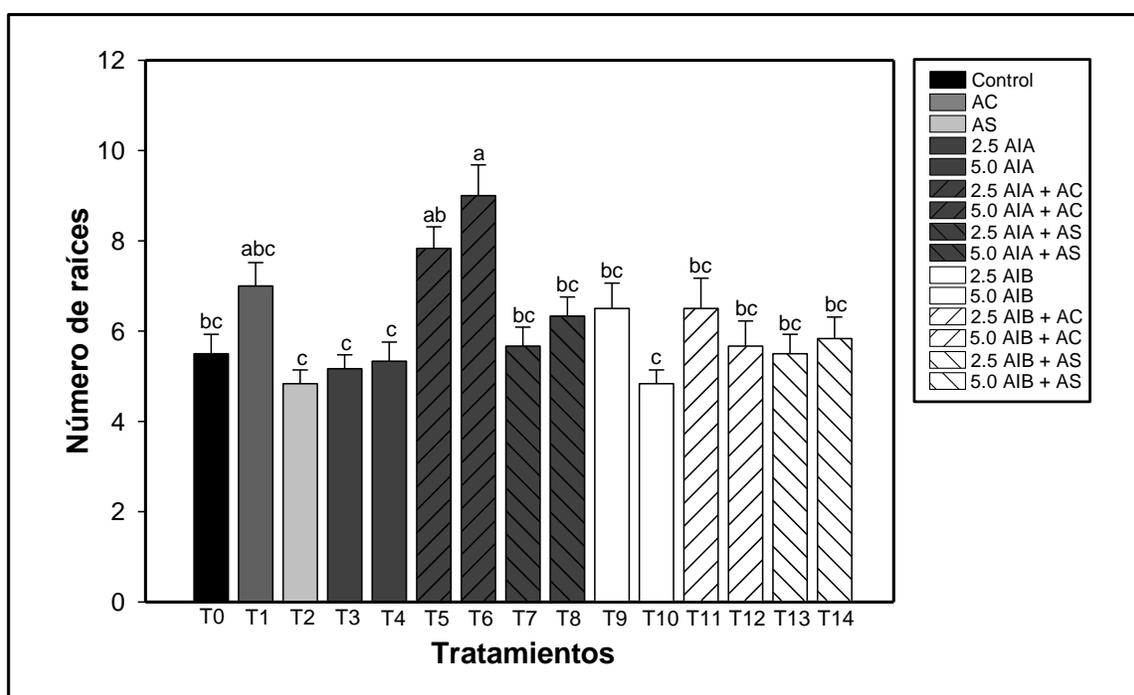
Sin embargo, otras especies del género *Encyclia* que se han propagado han aportado datos interesantes a considerar en la propagación de este género. Por ejemplo, Znaniecka *et al.* (2005) mencionan que la adición de carbón activado en el medio de cultivo produjo un efecto benéfico en plantas propagadas de *E. aff. oncidioides* al inhibir su oxidación por la absorción de los compuestos fenólicos liberados en el medio de cultivo.

Por su parte, Luna-Valladares y Zelaya-Herrera (2012) propagaron con éxito *E. adenocarpon* y observaron que el agua de coco les indujo el mayor número de raíces, lo que concuerda con lo reportado en la presente investigación.

Ruiz *et al.* (2008) al propagar *E. adenocaula* mencionan que el estado de madurez de las cápsulas y la formulación del medio de cultivo son parámetros que se deben considerar para lograr un buen porcentaje de germinación de las semillas, fase que condicionará todo el proceso de micropropagación.

#### 4.2. Efecto de las auxinas, agua de coco y ácido salicílico sobre la rizogénesis en vitroplantas de *Stanhopea tigrina*

Para el caso de *Stanhopea tigrina*, el mejor resultado para el número de raíces se obtuvo con el tratamiento T6 (5.0 mg L<sup>-1</sup> de AIA con 100 ml L<sup>-1</sup> de agua de coco) en donde se produjo un promedio de 9.0 ± 0.6 raíces al terminar el experimento. Sin embargo, este dato resultó similar al obtenido en los tratamientos T5 y T1 contra los cuales no se observaron diferencias estadísticas significativas (Fig. 18).



**Figura 18.** Número de raíces desarrolladas en vitroplantas de *S. tigrina*.

AC= 100 ml L<sup>-1</sup> de agua de coco; AS= 1 μM de ácido salicílico; AIA= ácido indol acético; AIB= ácido indol butírico. Las barras representan el promedio de los datos (n=6) y las columnas con letras diferentes indican diferencias significativas (p<0.05).

El tratamiento T1 contenía en su formulación solamente 100 ml L<sup>-1</sup> de agua de coco y aun así se observó que logró producir un efecto similar a los tratamientos que fueron adicionados con auxinas. Esto concuerda con lo reportado por Moreno-

Martínez y Menchaca-García (2007), quienes al propagar la misma especie observaron que la adición de agua de coco favoreció el crecimiento de las plantas, y la formación de raíces y pseudobulbos.

En este contexto, es importante mencionar que las plantas propagadas de *S. tigrina* han sido las únicas en el Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales de la UASLP-UAMZH en las que se ha observado la formación de pseudobulbos aun cuando las plantas permanecen en condiciones *in vitro* (Fig. 19). Esto sugiere que quizá dicha especie sea muy sensible a la adición de auxinas sintéticas por métodos exógenos.



**Figura 19.** Formación de pseudobulbos funcionales en vitroplantas de *S. tigrina*.

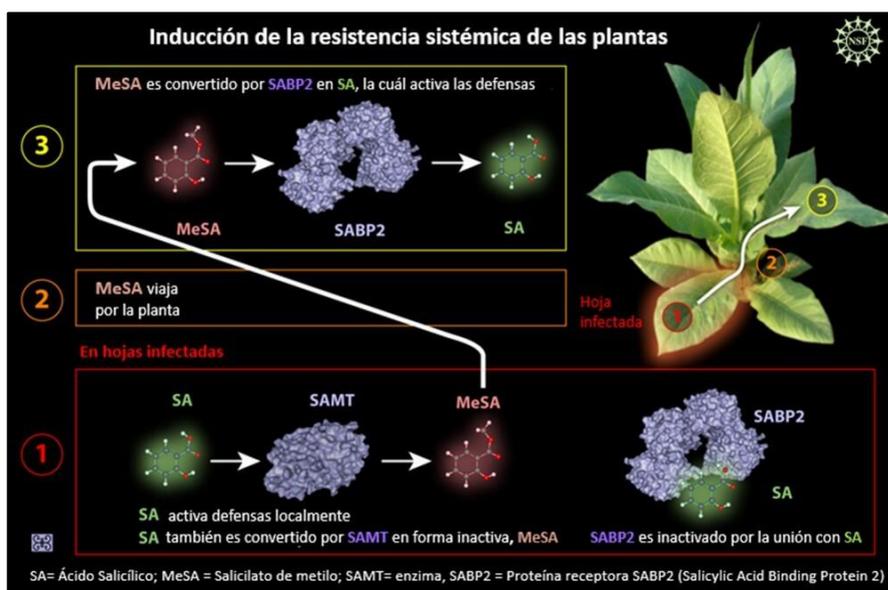
Moreno-Martínez y Menchaca-García (2007), también lograron inducir la formación de pseudobulbos en vitroplantas de *S. tigrina* al añadir al medio extractos naturales de plátano y agua de coco. La formación de pseudobulbos desde temprana edad en las vitroplantas de *S. tigrina* podrían significar un mayor porcentaje de sobrevivencia en la etapa de aclimatación, ya que estos órganos vegetales almacenan agua, carbohidratos y micronutrientes (Arévalo *et al.*, 2011; Menchaca-García y Moreno-Martínez, 2011).

La mayoría de los tratamientos no rebasaron la producción de más de seis raíces (a excepción de los tratamientos T1, T5 y T6). Los demás tratamientos no

fueron significativamente diferentes entre sí ( $p < 0.05$ ) (Fig. 18); esto podría relacionarse con la excelente capacidad de esta especie para responder a las condiciones *in vitro* mencionadas con anterioridad.

En lo que respecta a los tratamientos libres de auxinas, el tratamiento T1, con agua coco, fue el que produjo el mayor número de raíces ( $7.0 \pm 0.5$  raíces); sin embargo, como se observa en la Fig. 18, este resultado no fue significativo cuando se comparó contra el tratamiento que incluía ácido salicílico, ni contra el control, es decir, los tres tratamientos produjeron el mismo efecto en las vitroplantas.

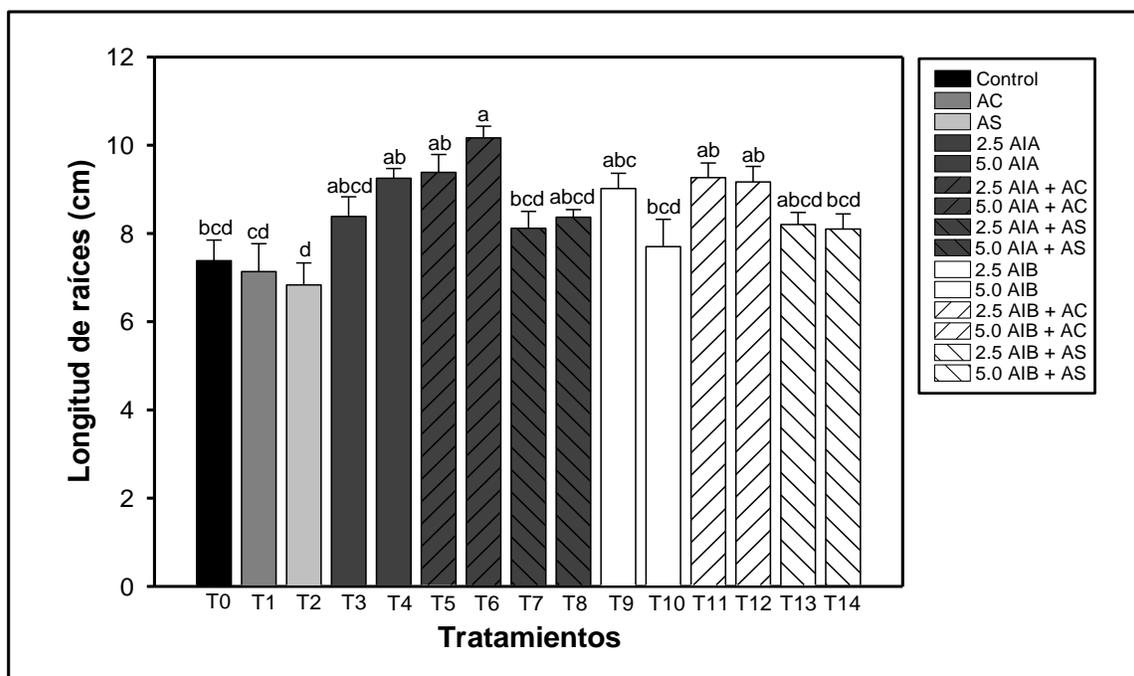
Al igual que el agua de coco, el ácido salicílico es un compuesto que desempeña un papel fundamental en la regulación del crecimiento, desarrollo e interacción de las plantas con microorganismos patógenos (Rangel-Sánchez *et al.*, 2010). Ante una situación de estrés, esta hormona vegetal activa vías bioquímicas de señalización, las cuales conducen a la producción de compuestos como fitoalexinas, fitoanticipinas y proteínas, relacionados con la patogenicidad, los cuales proporcionan a la planta una defensa efectiva de amplio espectro contra un gran número de patógenos (Fig. 20) (Camarena-Gutiérrez y De la Torre-Almaraz, 2007; Rangel-Sánchez *et al.*, 2010).



**Figura 20.** Proceso de inducción de la resistencia sistémica de las plantas por el ácido salicílico ante la infección de algún patógeno. Fuente: Jiménez *et al.* (2018)

Además, se ha comprobado que el ácido salicílico tiene distintos efectos fisiológicos sobre las plantas, entre los que se encuentran: la inducción de la floración (Jordán y Casaretto, 2006; Villanueva-Couoh *et al.*, 2009) la resistencia sistémica a patógenos (Jaimes-Suárez *et al.*, 2009; Contreras-Liza *et al.*, 2014), el incremento de la termogénesis (Anchondo-Aguilar *et al.*, 2011), el retraso de la senescencia en hojas y pétalos (Yamada *et al.*, 2004; Khanna-Chopra, 2012; Liang *et al.*, 2014) y la inducción de respuesta ante el estrés abiótico (Mora-Herrera y López-Delgado, 2006; Segarra-Manzano, 2007; Chávez-Suárez *et al.*, 2012).

En cuanto a la longitud de las raíces, las vitroplantas del tratamiento T6 fueron las que desarrollaron una mayor longitud; sin embargo, aunque este resultado fue el más alto, estadísticamente no mostró diferencias ( $p > 0.05$ ) contra los tratamientos T3, T4, T5, T8, T9, T11, T12 y T13 (Fig. 21).



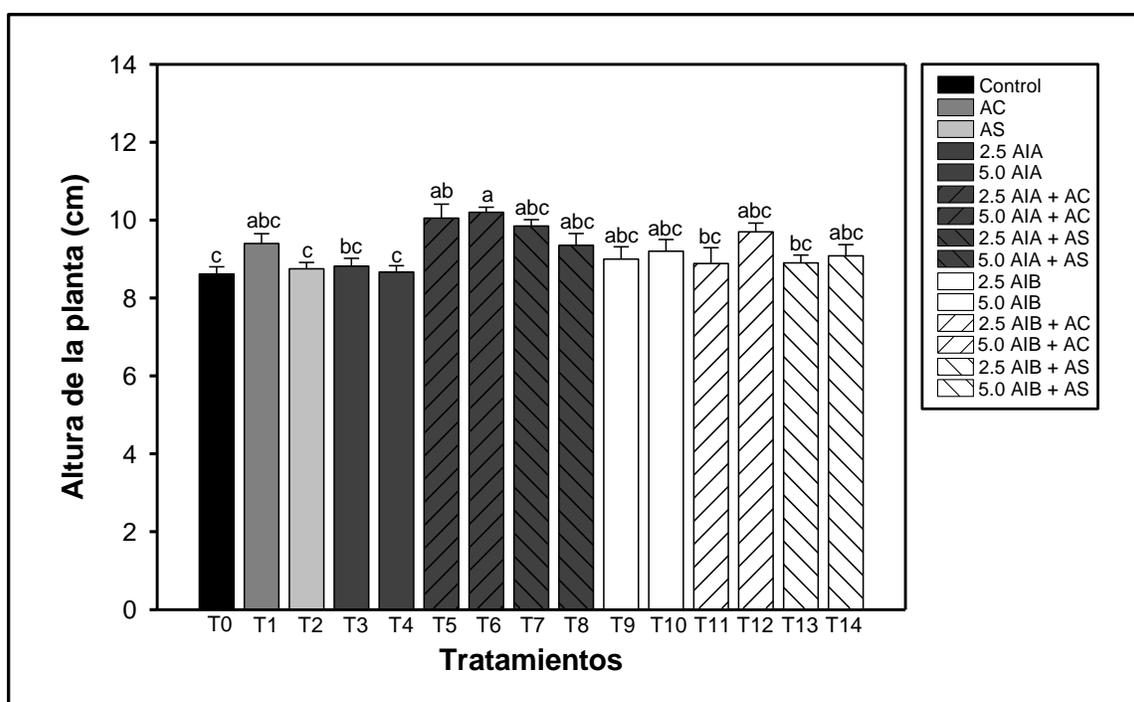
**Figura 21.** Longitud de las raíces desarrolladas en vitroplantas de *S. tigrina*.

AC= 100 ml L<sup>-1</sup> de agua de coco; AS= 1 μM de ácido salicílico; AIA= ácido indol acético; AIB= ácido indol butírico. Las barras representan el promedio de los datos (n=6) y las columnas con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Para el caso de esta variable en particular, las vitroplantas del tratamiento control mostraron un efecto muy similar a las que se cultivaron en los tratamientos T1 y T2, los cuales no contenían auxinas.

El promedio de la altura final mostró un comportamiento similar al anterior, ya que la mayoría de los tratamientos produjeron efectos similares. La mayor altura se alcanzó con las vitroplantas del tratamiento T6 y fue de  $10.2 \pm 0.1$  cm; sin embargo, este tratamiento no fue estadísticamente significativo ( $p > 0.05$ ) contra ocho de los 14 tratamientos ensayados experimentalmente (Fig. 22).

El tratamiento control y los tratamientos adicionados con las concentraciones más bajas de auxinas sintéticas, mostraron los resultados menores, sin embargo, la totalidad de los tratamientos lograron producir un efecto sobre las vitroplantas promoviendo una altura mayor a los 8 cm en todos los casos (Fig. 22).



**Figura 22.** Alturas promedio desarrolladas en vitroplantas de *S. tigrina*.

AC= 100 ml L<sup>-1</sup> de agua de coco; AS= 1 μM de ácido salicílico; AIA= ácido indol acético; AIB= ácido indol butírico. Las barras representan el promedio de los datos (n=6) y las columnas con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Los resultados observados en estas dos últimas variables refuerzan la hipótesis sobre las características de adaptación de esta especie al ser sometida a los procesos de micropropagación *in vitro*, y se sugiere el establecimiento de otros protocolos que colaboren a la propagación de *S. tigrina*.

Aunque *S. tigrina* es una de las especies de orquídeas mexicanas más valoradas en México, sobre todo en la región de la Huasteca Potosina y Veracruzana, existen solamente dos protocolos que abordan su propagación. El primero fue realizado por Moreno-Martínez y Menchaca-García, 2007, quienes probaron compuestos orgánicos y encontraron que el medio MS adicionado con 100 g L de pulpa de plátano + 120 ml L de agua de coco produjo el mayor número de raíces e inducía la formación de pseudobulbos, resultados que concuerdan con lo presentado en esta investigación.

Por su parte Tinoco-Juárez y Mata-Rosas, 2007 reportaron la adquisición de competencia para la propagación de *S. tigrina* y aunque no evaluaron la producción de raíces, encontraron que la adición de 5 mg L<sup>-1</sup> de benciladenina (BA) produce en esta especie la producción de PLB's (Protocorm Like Bodies, por sus siglas en inglés) y esta misma cantidad de BA mezclada con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) indujo la formación de brotes.

#### **4.3. Efecto de los sustratos de soporte en la preaclimatación de vitroplantas de *Encyclia parviflora* y *Stanhopea tigrina***

Los resultados en la preaclimatación de vitroplantas de *E. parviflora* y *S. tigrina* determinaron la composición del sustrato que sería utilizado en la etapa final de aclimatación. Para ello, en ambas especies se evaluó el porcentaje de sobrevivencia, la altura y el número de hojas producidas a los 30 y 60 días de exposición a los sustratos de soporte (la composición de estos sustratos puede consultarse en el Cuadro 4).

Los valores presentados en los Cuadros 6 y 7, son el resultado del promedio y el error estándar de las mediciones efectuadas en cada grupo de individuos que fueron colocados en cada uno de los sustratos de preaclimatación.

Para el caso de *E. parviflora*, a los 30 días de iniciado el proceso de preaclimatación la supervivencia fue de 83.33% en el sustrato que contenía una mayor parte de turba de *Sphagnum* (S2) y de 100% para los sustratos S1 y S3. Para la última observación efectuada a los 60 días, el porcentaje de sobrevivencia decayó en los sustratos S1 y S3 a un 83.33%, para el sustrato S2 se registraron dos plantas muertas, lo cual disminuyó el porcentaje de sobrevivencia a un 66.66% (Cuadro 6).

Estos resultados podrían estar relacionados con las selvas secas, el hábitat de crecimiento natural de *E. parviflora*, por lo cual el genotipo de la especie podría estar inclinado a sustratos con menor retención de agua y humedad (Hauser, 1996; García-Cruz *et al.*, 2003; Domínguez *et al.*, 2017).

A pesar de encontrar diferencias en el porcentaje de sobrevivencia, las variables de altura y número de hojas no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre sustratos ni en el tiempo de exposición, ya que se registraron efectos similares en los tres sustratos de preaclimatación a los 30 y 60 días (Cuadro 6).

De acuerdo con Domínguez-Torrejón y Donayre-Gómez (2006) el hecho de no observar diferencias significativas durante la preaclimatación de vitroplantas en algunas especies epífitas es un efecto normal atribuible a los distintos factores de estrés por los cuales pasan las plantas durante el proceso de micropropagación.

**Cuadro 6.** Efecto de los sustratos de preaclimatación en vitroplanta de *E. parviflora* a los 30 y 60 días de exposición.

	Sustrato	Altura (cm)	No. de hojas	%Sobrevivencia
<b>30 días</b>	S1	1.35 ± 0.12 <sup>a</sup>	2.33 ± 0.33 <sup>a</sup>	100
	S2	1.20 ± 0.29 <sup>a</sup>	1.40 ± 0.40 <sup>a</sup>	83.33
	S3	1.33 ± 0.16 <sup>a</sup>	2.16 ± 0.47 <sup>a</sup>	100
<b>60 días</b>	S1	3.08 ± 0.24 <sup>a</sup>	4.80 ± 0.37 <sup>a</sup>	83.33
	S2	2.62 ± 0.27 <sup>a</sup>	3.75 ± 0.47 <sup>a</sup>	66.66
	S3	2.64 ± 0.17 <sup>a</sup>	4.60 ± 0.50 <sup>a</sup>	83.33

Las columnas con letras iguales indican que no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

Para el caso de *S. tigrina*, a los 30 días de iniciado el proceso de preaclimatación la supervivencia fue de 83.33% para el sustrato que contenía la menor parte de turba de *Sphagnum* y mayor parte de corteza de pino (S3) y de 100% para los sustratos S1 y S2. En tanto que, para la última observación efectuada a los 60 días, el porcentaje de sobrevivencia decayó en el sustrato S2 al 83.33%, mientras que los sustratos S1 y S3 se mantuvieron iguales con un 100% y 83.33% respectivamente (Cuadro 7).

Al contrario de *E. parviflora*, *S. tigrina* se desarrolla en hábitats que poseen un alto grado de humedad, principalmente los bosques mesófilos de montaña, también conocidos como bosques de niebla, lo cual pudo influir en que las plantas colocadas en los sustratos que conservaban mayor humedad mostraran mejores resultados (Hágsater y Soto, 2003; González-Espinosa *et al.*, 2012).

Se observó que a los 30 días el sustrato S2 mostró la mayor producción de hojas; sin embargo, la altura desarrollada en las vitroplantas no fue significativa entre los diferentes sustratos. En tanto que, a los 60 días el sustrato S2 mantuvo el efecto más benéfico en las vitroplantas, lo cual se pudo constatar en ambas variables (altura y número de hojas), esta vez con resultados que fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Efecto de los sustratos de preaclimatación en vitroplanta de *S. tigrina* a los 30 y 60 días de exposición.

	Sustrato	Altura	No. de hojas	%Sobrevivencia
<b>30 días</b>	S1	1.28 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.33 ± 0.33 <sup>ab</sup>	100
	S2	1.38 ± 0.17 <sup>a</sup>	2.66 ± 0.42 <sup>a</sup>	100
	S3	1.38 ± 0.23 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.44 <sup>b</sup>	83.33
<b>60 días</b>	S1	3.33 ± 0.18 <sup>b</sup>	3.00 ± 0.25 <sup>b</sup>	100
	S2	4.26 ± 0.20 <sup>a</sup>	6.80 ± 0.58 <sup>a</sup>	83.33
	S3	3.82 ± 0.37 <sup>ab</sup>	2.80 ± 0.37 <sup>b</sup>	83.33

Las columnas con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Las fases de la micropropagación *in vitro* no incluyen como tal una etapa de preaclimatación; de hecho, existen muy pocos informes en la literatura que se refieran a esta etapa en específico (Figuroa, 2003; Vega, 2009). Sin embargo, en diversos estudios donde se aborda la aclimatación de plantas como tal, se mencionan algunos tratamientos a los cuales consideran como la etapa de preaclimatación.

Por ejemplo, Domínguez-Torrejón y Donayre-Gómez (2006), durante el establecimiento de la aclimatación *in vitro* de *Uncaria tomentosa* mencionan el establecimiento de una etapa que denominaron preaclimatación, en la cual, al igual que en la presente investigación probaron sustratos de soporte. Resulta interesante que dichos autores también evaluaron la altura de las vitroplantas y al igual que en el presente estudio no encontraron diferencias significativas para esta variable.

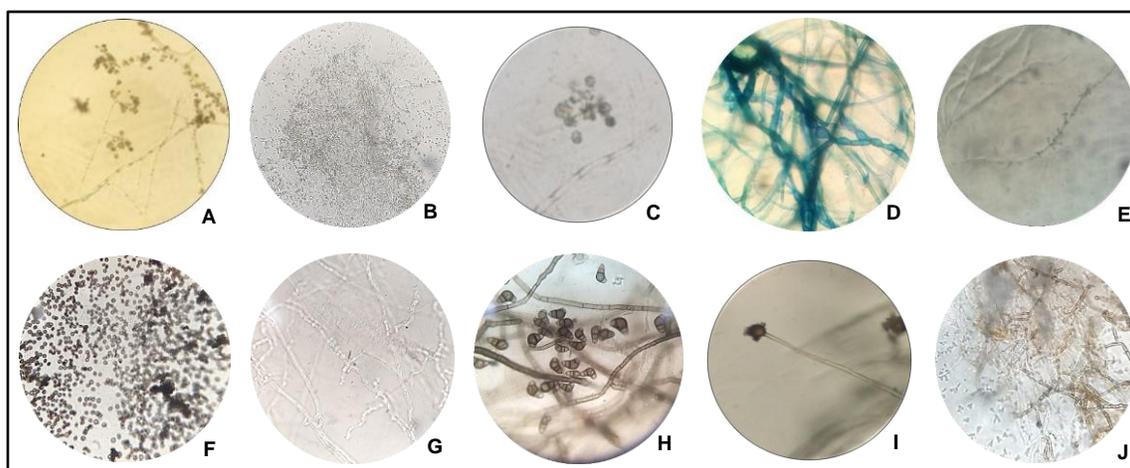
En otro estudio realizado por Sabja *et al.* (2008) para propagar *Nothofagus alpina* se encontró que el uso de un sistema de preaclimatación en laboratorio reduce la mortalidad de las plantas después del traspaso a condiciones de invernadero, mejorando de manera significativa la aclimatación final.

Por su parte, Benavides *et al.* (2016), al evaluar la preaclimatación de *Geranium chilloense*, concluyen que uno de los mejores sustratos utilizados como soporte para vitroplantas es la turba de *Sphagnum*, ya que tiene mayor cantidad de nutrientes como el nitrógeno, el fósforo, el calcio, el magnesio y el azufre disponible en relación con otros sustratos y los cuales pueden ser utilizados por las plantas para un mejor desarrollo vegetal.

Los trabajos antes mencionados coinciden en que una etapa de preaclimatación es esencial en todos los procesos de aclimatación de plantas provenientes del cultivo *in vitro* ya sea simbiótica o asimbiótica. En lo que respecta a la presente investigación, esta etapa fue la base para preparar las vitroplantas para su posterior aclimatación simbiótica en condiciones de vivero, y también para determinar el sustrato de soporte óptimo que sería utilizado durante la última fase del proceso de micropropagación.

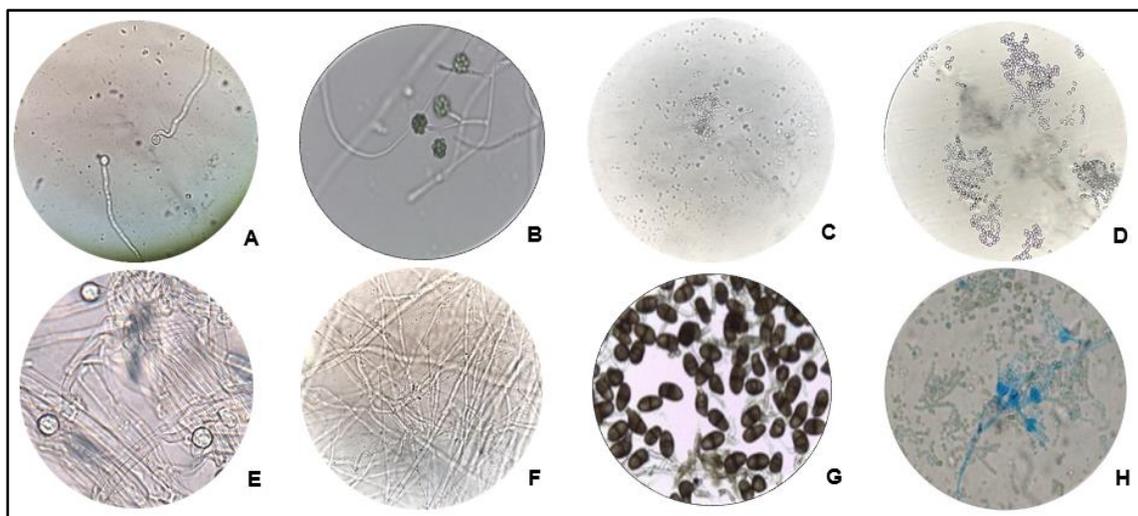
#### 4.4. Identificación macro y microscópica de hongos aislados y asociados a *Encyclia parviflora* y *Stanhopea tigrina*

Se aislaron un total de 10 hongos asociados a *E. parviflora*, de los cuales tres fueron aislados de raíces, tres de pseudobulbos y cuatro de las hojas (Anexo II). En cuanto a géneros fúngicos, dos cepas que fueron aisladas de raíces presentaron los rasgos morfológicos y microscópicos característicos del género *Trichoderma* (Anexo II). Para pseudobulbos y hojas, se aislaron cepas fúngicas catalogadas como contaminantes, de los géneros *Penicillium*, *Rhizopus*, *Colletotrichum* y *Curvularia*. La forma microscópica de estos hongos se muestra en la Fig. 23 A-J.



**Figura 23.** Morfología microscópica de los hongos aislados de *E. parviflora*. Hongos aislados de la raíz: **A**, *Trichoderma* sp. (40X), **B**, *Trichoderma* sp. (10X), **C**, *Penicillium* sp. (40X). Hongos aislados del pseudobulbo: **D**, *Rhizopus* sp. (40X), **E**, *Penicillium* sp. (10X), **F**, *Colletotrichum* sp. (40X). Hongos aislados de las hojas: **G**, *Penicillium* sp. (40X), **H**, *Curvularia* sp. (100X), **I**, *Rhizopus* sp. (100X), **J**, *Penicillium* sp. (40X). El número colocado entre paréntesis, indica el objetivo al que fue realizada la observación al microscopio.

Para el caso de *S. tigrina*, se aislaron un total de ocho hongos, de los cuales tres fueron aislados de las raíces, tres de los pseudobulbos y dos de las hojas (Anexo III). Al igual que en *E. parviflora*, los hongos que fueron aislados de las raíces también presentaron los rasgos morfológicos y microscópicos característicos del género *Trichoderma* (Anexo III) (Fig. 24 A-C).



**Figura 24.** Morfología microscópica de los hongos aislados de *S. tigrina*. Hongos aislados de la raíz: **A**, *Trichoderma* sp. (40X), **B**, *Trichoderma hamatum* (100X), **C**, *Trichoderma* sp. (10X). Hongos aislados del pseudobulbo: **D**, *Fusarium* sp. (40X), **E**, *Fusarium* sp. (100X), **F**, *Penicillium* sp. (40X). Hongos aislados de las hojas: **G**, *Lasiodiplodia theobromae* (100X), **H**, *Penicillium* sp. (40X). El número colocado entre paréntesis, indica el objetivo al que fue realizada la observación al microscopio.

Para pseudobulbos y hojas se identificaron hongos contaminantes pertenecientes a los géneros *Penicillium*, *Fusarium* y *Lasiodiplodia*. La forma microscópica de estos hongos se muestra en la Fig. 24 D-H.

Los hongos del género *Trichoderma* aislados de la raíz en ambas especies de orquídeas constituyen un grupo de hongos filamentosos que pertenecen al reino Fungi, división Eumycota, subdivisión Deuteromycotina, clase Hyphomycetes, orden Hyphales (Moniliales) y familia Moniliaceae (Argumedo-Delira *et al.*, 2009).

Estos hongos se pueden encontrar en la mayoría de los ecosistemas terrestres, inclusive en los desiertos y suelos agrícolas, por lo cual, son de gran importancia y motivo de estudio para una gran cantidad de plantas hortícolas y útiles para el hombre, ya que se han utilizado como un control de hongos fitopatógenos debido a sus propiedades micoparasíticas y antibióticas (Kubicek 2005, Ávila-Miranda *et al.*, 2006, Rojo *et al.*, 2007; Argumedo-Delira *et al.*, 2009).

En lo que respecta a su relación con las orquídeas, algunas especies de este género se han reportado como hongos endófitos de dicha familia botánica, particularmente *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma hamatum* este último aislado de las raíces de *S. tigrina* en la presente investigación (Fig. 24 B) (Chet *et al.*, 1981; Lee, 2002; Bougoure y Dearnaley, 2005; Chen *et al.*, 2012). Un hongo endófito se define como un microorganismo que pasa la mayor parte o todo su ciclo de vida colonizando los tejidos de la planta hospedera para un beneficio mutuo, sin causar daño evidente. Estos hongos confieren gran potencial adaptativo a las especies vegetales hospederas frente a condiciones adversas que generen estrés, abiótico, como la salinidad o la acidez, o bien, estrés biótico, por ejemplo, el ataque de diversas plagas (Abello y Kelemu, 2006; Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

La familia Orchidaceae, es una de las familias vegetales en las que más se han estudiado los hongos, debido a que, para germinar, la mayoría de las especies de orquídeas establecen una relación simbiótica con unos hongos denominados micorrízicos (Brundrett, 2006; Hágsater *et al.*, 2015). Los hongos micorrízicos forman arbuscúlos dentro de las células corticales de las plantas que colonizan y en las orquídeas contribuyen con el aporte de nutrientes a las semillas, las cuales carecen de un endospermo (Barrer, 2009; Morell *et al.*, 2009); de hecho, algunas especies conservan esta relación hasta su etapa adulta, principalmente aquellas que no realizan fotosíntesis y obtienen sus nutrientes de esta relación simbiótica (Brundrett, 2006; Mosquera-Espinosa *et al.*, 2010).

Existen pocos trabajos reportados para los hongos aislados y asociados a *E. parviflora* o *S. tigrina*; de hecho, para la primer especie los trabajos reportados de aislamientos fúngicos son nulos, en tanto que, para *S. tigrina* recientemente se reportó la diversidad fúngica de hongos cultivables productores de giberelinas, y entre los géneros fúngicos endófitos más comunes se encontró al género *Trichoderma* (Salazar-Cerezo *et al.*, 2018); estos resultados concuerdan con lo reportado en la presente investigación.

Por otra parte, existe la posibilidad de que las especies fúngicas catalogadas como contaminantes puedan estar ejerciendo algún otro papel ecológico en el área foliar y en los pseudobulbos de las orquídeas en estudio, por lo cual se sugiere

investigar al respecto, ya que hasta el momento no se tienen datos sobre dichos procesos.

Con el aislamiento y la identificación de los hongos asociados a ambas especies de orquídeas se realizaron estudios para observar su efecto durante el proceso de aclimatación de plantas propagadas *in vitro* (ver apartado 4.7 de este documento), pues como ya se ha mencionado antes, la asociación ecológica de estos microorganismos con las orquídeas se encuentra presente desde las primeras etapas de su ciclo de vida y en algunas especies se realiza hasta la etapa adulta.

#### 4.5. Identificación molecular de hongos aislados y asociados a *Encyclia parviflora* y *Stanhopea tigrina*

En esta sección se presentan los resultados de la identificación molecular de solamente tres hongos aislados de *S. tigrina*; sin embargo, de las tres cepas fúngicas que fueron secuenciadas, para la cepa aislada de las muestras de pseudobulbo no se encontró coincidencia con ninguna especie registrada en la base de datos de la NCBI, por lo cual existe la hipótesis de que dicha cepa corresponda a una especie nueva (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Identificación molecular de cepas fúngicas.

Especie	Tejido vegetal	Phyllum/ Orden	% de identificación	No. de acceso en GenBank
PNE*	Pseudobulbo	-	-	-
<i>Trichoderma hamatum</i>	Raíz	Ascomycota/ Hypocreales	99%	KY225650.1
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Hoja	Ascomycota/ Botryosphaerales	97%	FJ478103.1

\*PNE: Probable Nueva Especie.

El aislamiento del hongo endófito *Trichoderma hamatum* de raíces, también ha sido reportado para la especie vegetal *Theobroma cacao*, en la cual cumplía diversas funciones como el retraso de los cambios inducidos por la sequía y la promoción del crecimiento radicular (Bae *et al.*, 2009).

Otro de los efectos benéficos que confiere *T. hamatum* a las plantas con quienes establece una interacción ecológica, es el actuar como un agente biocontrolador de plagas patógenas, lo cual se ha demostrado en plantas como guisantes, pepinos y tomate (Harman *et al.*, 1980; Chet *et al.*, 1981; Kwok *et al.*, 1987; Alfano *et al.*, 2007; Larran *et al.*, 2016; Shaw *et al.*, 2016)

En lo que respecta al hongo *Lasiodiplodia theobromae*, diversas investigaciones confirman su potente actividad contaminante y fitopatógena, su distribución es cosmopolita y debido a ello posee un amplio rango de hospederos, incluidas las plantas monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas (Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014; Picos-Muñoz *et al.*, 2015).

*L. theobromae* también se ha reportado como agente causal de enfermedades patógenas en plantas frutales y forestales como *Cornus florida* (Mullen *et al.*, 1991), *Carica papaya* (Da Silva-Pereira *et al.*, 2012), *Mangifera indica* (Kamil *et al.*, 2018), *Musa x paradisiaca* (Hernández Henríquez y Morales-Rivas, 2017), *Persea americana* (Pegg *et al.*, 2003), *Vitis* spp. (van Niekerk *et al.*, 2004; Urbez-Torres *et al.*, 2007), e incluso en las semillas de diferentes especies de coníferas (Cilliers *et al.*, 1993).

*L. theobromae* también es considerado como un hongo endófito y es posible encontrarlo en tejidos sanos como fue el caso de la presente investigación, en estas situaciones adquiere su patogenicidad sólo cuando la planta hospedera se encuentra debilitada o estresada (Mohali *et al.*, 2005; Rubini *et al.*, 2005; Picos-Muñoz *et al.*, 2015).

*Trichoderma hamatum* y *Lasiodiplodia theobromae* resultan dos hongos sumamente interesantes debido a las funciones e interacciones ecológicas que realizan y que podrían ser clave para la aclimatación de vitroplantas de la orquídea *Stanhopea tigrina*; además, sería interesante observar si estos hongos son

específicos para esta especie o podrían funcionar también para otras orquídeas epífitas, como *Encyclia parviflora*.

#### 4.6. Efecto de los hongos aislados de *Encyclia parviflora* y *Stanhopea tigrina* en plantas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*)

##### 4.6.1. Evaluación del porcentaje de germinación

Posterior a la identificación macro y microscópica de los hongos aislados de las orquídeas, se seleccionaron doce cepas fúngicas y se etiquetaron como se muestra en el Cuadro 9.

**Cuadro 9.** ID de las 12 cepas fúngicas que se utilizaron para los ensayos sobre la promoción de crecimiento.

ID	Especie	Origen	Orquídea
H19	PNE*	Pseudobulbo	<i>S. tigrina</i>
H20	<i>Penicillium</i> sp.	Pseudobulbo	<i>S. tigrina</i>
H21	<i>Trichoderma</i> sp.	Raíz	<i>E. parviflora</i>
H22	<i>Trichoderma</i> sp.	Raíz	<i>S. tigrina</i>
H23	<i>Trichoderma</i> sp.	Raíz	<i>S. tigrina</i>
H24	<i>Trichoderma hamatum</i> **	Raíz	<i>S. tigrina</i>
H25	<i>Penicillium</i> sp.	Hoja	<i>E. parviflora</i>
H26	<i>Curvularia</i> sp.	Hoja	<i>E. parviflora</i>
H27	<i>Colletotrichum</i> sp.	Pseudobulbo	<i>E. parviflora</i>
H28	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> **	Hoja	<i>S. tigrina</i>
H29	<i>Penicillium</i> sp.	Hoja	<i>E. parviflora</i>
H30	<i>Fusarium</i> sp.	Pseudobulbo	<i>S. tigrina</i>

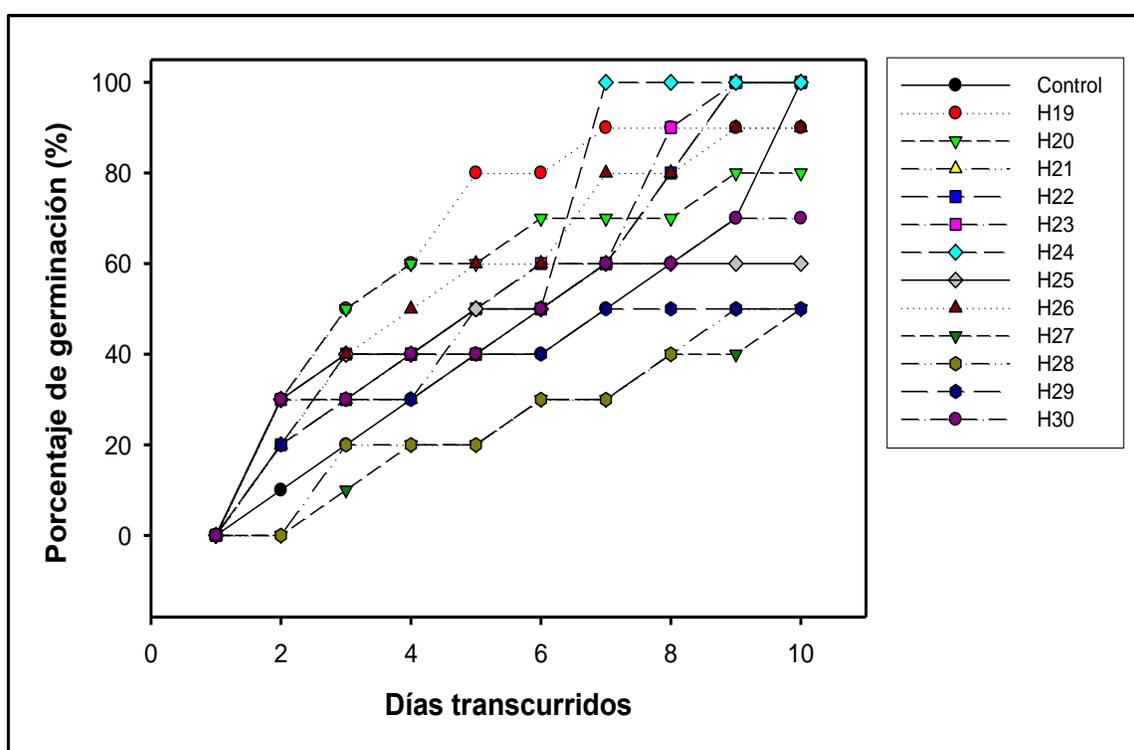
\*PNE: Probable Nueva Especie.

\*\*Especies confirmadas mediante secuenciación molecular, incluyendo a la PNE.

Se evaluó el porcentaje de germinación que tuvieron las plantas al ser inoculadas con cada una de las cepas fúngicas ensayadas. Se observó que las cepas identificadas y pertenecientes al género *Trichoderma* lograron el 100% de germinación (Fig. 25), es decir, todas las semillas lograron romper la cubierta

seminal. Entre estas cepas fue posible identificar de forma molecular la cepa H24, la cual correspondió a *Trichoderma hamatum*. Las cepas H19 y H26 alcanzaron hasta un 90% de germinación, siendo éstos los valores más altos registrados.

En cuanto a la cinética de velocidad de germinación, las plantas inoculadas con la cepa correspondiente a *T. hamatum* mostraron el mejor comportamiento, ya que el total de las semillas germinaron a los siete días. Por su parte las cepas de *Colletotrichum* sp. y *Lasiodiplodia theobromae* fueron las que retardaron en mayor tiempo el proceso de germinación (Fig. 25).



**Figura 25.** Porcentaje y cinética de germinación de plantas de frijol inoculadas con los aislados fúngicos.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por diversas investigaciones que señalan el poder que poseen distintas especies fúngicas del género *Trichoderma* para inducir y acelerar la cinética de germinación en especies vegetales. Por ejemplo, Cubillos-Hinojosa *et al.* (2009) lograron un 93.3% de germinación en plantas de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* al inocular los cultivos

con *T. harzianum*. Por su parte, Cupull-Santana *et al.* (2003) obtuvieron un 39.2% de germinación en plantas de *Coffea arabica* al inocular *T. viride*; Díez-Camejo y Ayala-Sifontes (2011) inocularon *T. harzianum* en plantas de *Talipariti elatum* y lograron un 71%, y más recientemente Márquez-Benavidez *et al.* (2017), lograron un 93.8% de germinación en plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con *T. harzianum*.

Estos datos sugieren que *T. harzianum* es una de las especies más importantes para inducir la germinación en plantas o, al menos, una de las más estudiadas; en este contexto, es importante mencionar que los datos que relacionan a *T. hamatum* con esta cualidad son nulos, por lo cual esta investigación sentaría las bases para explorar el potencial de este hongo endófito en la germinación de otras especies vegetales de interés.

Las cepas que registraron los menores porcentajes de germinación fueron las correspondientes a los géneros *Colletotrichum* sp., *Lasiodiplodia theobromae* y *Penicillium* sp., en las cuales solamente germinaron el 50% de las semillas inoculadas (Fig. 25), mientras que, el 50% restante de las semillas murieron. Este resultado podría atribuirse al alto grado de patogenicidad reportado para estas especies fúngicas, las cuales se ha comprobado que son el agente causal de diversas enfermedades en plantas de cultivo como *Carica papaya*, *Olea europea*, *Annona muricata*, *Cyphomandra betacea*, *Rubus glaucus* y *Malus domestica*, entre otras (Zavala-León *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2005; Saldarriaga-Cardona *et al.*, 2008; Andrades *et al.*, 2009).

La patogenicidad de *Colletotrichum* sp. también ha sido comprobada en distintos géneros de orquídeas con importancia comercial y ornamental como *Acineta* sp., *Cochleantes* sp., *Elleanthus* sp., *Epidendrum* sp., *Guarianthe* sp., *Laelia* sp., *Maxillaria* sp., *Oncidium* sp., *Prosthechea* sp., *Rossioglossum* sp., y *Vanilla* sp. (Cabrera *et al.*, 2003; Salazar-Casasa *et al.*, 2007).

En lo que respecta a *Lasiodiplodia theobromae*, es considerado también un hongo endófito y fitopatógeno de orquídeas, causante de afecciones que producen manchas necróticas, pudrición de tallo, muerte de hojas y desprendimiento cortical

de raíces en especies como *Cattleya* spp. y *Catasetum fimbriatum* (Cabrera y Cúdom, 2013; Martín-Mex *et al.*, 2017).

Finalmente, para los hongos del género *Penicillium* sp., el cual es uno de los géneros más abundante en los suelos, se encuentra ampliamente documentada su actividad patogénica y su relación en el proceso de germinación en plantas como *Psidium guajava*, *Eucalyptus grandis*, *Lycopersicum esculentum*, *Artemisa salina*, *Phaseolus vulgaris*, entre otras (Acosta *et al.*, 2002; Groenewold-Labrada *et al.*, 2003; Acosta *et al.*, 2005; Encina y Piontelli, 2009).

Es importante aclarar que, aunque las últimas tres especies discutidas son catalogadas como contaminantes, la totalidad de las cepas que fueron aisladas de las orquídeas pueden considerarse como hongos endófitos, ya que todas las muestras de tejido vegetal fueron expuestas a un tratamiento de asepsia riguroso para limpiar la superficie, lo cual sugiere el estudio de estos hongos para comprobar las relaciones ecológicas que pudieran realizar con cada especie de orquídea.

#### 4.6.2. Eficacia de los hongos en la promoción del crecimiento

Los resultados mostraron que las cuatro cepas fúngicas del género *Trichoderma* indujeron la promoción del crecimiento en las plantas de frijol común (Fig. 26), estos tratamientos coinciden con los mejores porcentajes de germinación (Fig. 25). Además, estos cuatro resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) para las variables de altura de la planta, peso fresco y peso seco, en comparación con el tratamiento control (Cuadro 10).

Estos resultados concuerdan con lo reportado por distintos autores como Ousley *et al.* (1992), Ortuño *et al.* (2013), Camargo-Cepeda y Ávila (2014), Candeleró *et al.* (2015) y You *et al.* (2016), quienes en sus investigaciones reportaron a distintos hongos del género *Trichoderma* como promotores de crecimiento vegetal en distintas especies de plantas, lo cual atribuyen a la liberación de distintas moléculas químicas que favorecen este proceso, en especial a los transposones ABC en sus moléculas, los cuales son liberados a la circulación vegetal en toda la planta (Cano, 2011).



**Figura 26.** Aspecto de las plantas de frijol después de ser expuestas a las cepas fúngicas por un periodo de 10 días.

Las cepas H27 y H29, correspondientes a las fúngicas *Colletotrichum* sp. y *Penicillium* sp. respectivamente, obtuvieron los resultados más altos en cuanto al diámetro del tallo; sin embargo, estos resultados no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) cuando se compararon contra el tratamiento control (Cuadro 10). Por otro lado, las cepas H27, H28, H29 y H30 correspondientes a *Colletotrichum* sp., *Lasiodiplodia theobromae*, *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp., mostraron los resultados más bajos en cuanto a la variable de peso fresco, la cual se encuentra relacionada directamente con la producción de biomasa. Esto se puede atribuir a que dichos hongos fueron catalogados como especies contaminantes, por lo cual probablemente interrumpieron el desarrollo de las plantas (Cuadro 10).

**Cuadro 10.** Promoción de crecimiento en plantas de frijol por los aislados fúngicos de *E. parviflora* y *S. tigrina*.

ID	No. de hojas/planta	Altura de la planta (cm)	Diámetro del tallo (mm)	Peso fresco (g)/planta	Peso seco (g)/planta	Índice de salud de la planta*
<b>Control</b>	2.00	21.87±2.88 <sup>bc</sup>	2.42±0.20 <sup>abcd</sup>	9.45±0.03 <sup>h</sup>	1.68±0.04 <sup>b</sup>	0.1948±0.0140 <sup>ab</sup>
<b>H19</b>	2.00	29.31±1.21 <sup>ab</sup>	2.46±0.15 <sup>abcd</sup>	14.42±0.05 <sup>c</sup>	1.62±0.03 <sup>bc</sup>	0.1400±0.0134 <sup>abc</sup>
<b>H20</b>	2.00	28.85±0.89 <sup>ab</sup>	2.37±0.11 <sup>bcd</sup>	12.37±0.05 <sup>e</sup>	1.41±0.04 <sup>ed</sup>	0.1180±0.0096 <sup>bc</sup>
<b>H21</b>	2.00	33.66±1.01 <sup>a</sup>	1.99±0.05 <sup>d</sup>	13.20±0.03 <sup>d</sup>	1.42±0.04 <sup>cde</sup>	0.0860±0.0053 <sup>c</sup>
<b>H22</b>	2.00	27.80±0.97 <sup>abc</sup>	2.26±0.08 <sup>cd</sup>	17.28±0.04 <sup>b</sup>	1.76±0.03 <sup>b</sup>	0.1443±0.0074 <sup>abc</sup>
<b>H23</b>	2.00	26.82±0.53 <sup>abc</sup>	2.11±0.05 <sup>cd</sup>	18.79±0.02 <sup>a</sup>	2.15±0.03 <sup>a</sup>	0.1694±0.0048 <sup>abc</sup>
<b>H24</b>	2.00	28.12±0.82 <sup>abc</sup>	2.64±0.09 <sup>abcd</sup>	9.87±0.04 <sup>g</sup>	1.61±0.05 <sup>bcd</sup>	0.1513±0.0047 <sup>abc</sup>

<b>H25</b>	2.00	22.88±1.93 <sup>bc</sup>	2.18±0.14 <sup>cd</sup>	11.16±0.02 <sup>f</sup>	1.31±0.04 <sup>ef</sup>	0.1276±0.0082 <sup>abc</sup>
<b>H26</b>	2.00	26.77±1.14 <sup>abc</sup>	2.17±0.08 <sup>cd</sup>	12.31±0.03 <sup>e</sup>	1.76±0.04 <sup>b</sup>	0.1463±0.0102 <sup>abc</sup>
<b>H27</b>	2.00	27.88±0.97 <sup>abc</sup>	3.00±0.03 <sup>ab</sup>	7.40±0.06 <sup>i</sup>	1.36±0.02 <sup>ef</sup>	0.1467±0.0038 <sup>abc</sup>
<b>H28</b>	2.00	22.50±4.70 <sup>bc</sup>	2.68±0.28 <sup>abc</sup>	5.40±0.03 <sup>k</sup>	1.18±0.02 <sup>fg</sup>	0.2030±0.0768 <sup>a</sup>
<b>H29</b>	2.00	27.32±0.68 <sup>abc</sup>	3.08±0.05 <sup>a</sup>	6.60±0.03 <sup>j</sup>	1.10±0.04 <sup>g</sup>	0.1241±0.0056 <sup>abc</sup>
<b>H30</b>	2.00	20.95±1.87 <sup>c</sup>	2.70±0.24 <sup>abc</sup>	7.57±0.03 <sup>j</sup>	1.40±0.03 <sup>e</sup>	0.1892±0.0221 <sup>ab</sup>

\* Índice de salud de la planta = (diámetro del tallo/altura de la planta) X peso seco.  
Las columnas con letras diferentes indican diferencias significativas (p<0.05).

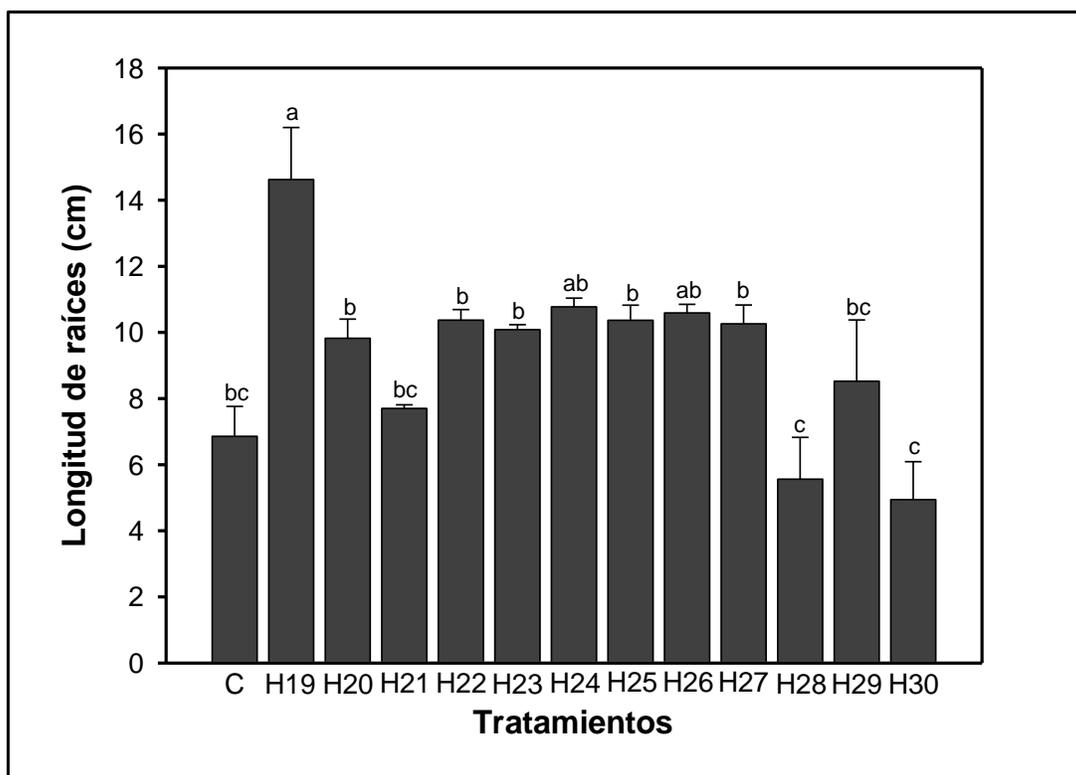
En contraste, la cepa H28 identificada como *Lasiodiplodia theobromae* fue la que obtuvo el valor más alto en cuanto al índice de salud de la planta (ISP), esto nos sugiere que este hongo endófito influyó de forma positiva en las plantas de frijol corroborando el hecho de que, al ser catalogado como contaminante de especies vegetales, no necesariamente debe afectar a una planta en la cual también cumple el papel de endófito.

De hecho, existen reportes en la literatura que mencionan algunos beneficios que *Lasiodiplodia theobromae* ejerce en las especies vegetales, entre ellos y quizás el más importante sea que cumple una función como productor de ácido jasmónico (Aldridge *et al.*, 1971; Dhandhukia y Thakkar, 2007; Tsukada *et al.*, 2010; Eng *et al.*, 2016).

El ácido jasmónico es una fitohormona reguladora del crecimiento vegetal que se encuentra involucrada en diferentes funciones de resistencia y senescencia de las plantas y se produce después de un daño ocasionado por un patógeno, incrementando la producción de compuestos de resistencia (Meyer *et al.*, 1884; Creelman y Mullet, 1995; Laredo-Alcalá *et al.*, 2017). Estos datos sugieren que *L. theobromae* podría ser la razón de que las plantas expuestas a este hongo mostraran el valor más alto para el ISP.

#### **4.6.3. Efecto de los hongos en la longitud radical**

La cepa H19 indujo el mayor efecto en cuanto a la longitud radicular en las plantas de frijol, este resultado fue estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) cuando se comparó con el tratamiento control y la mayoría de los demás tratamientos (Fig. 27). Este hongo corresponde al que se ha propuesto como nueva especie, por lo cual se sugiere continuar con el estudio de esta cepa fúngica con el fin de determinar su identificación, ya que, al ser un hongo inductor de la longitud radicular, podría proporcionar grandes beneficios a especies de plantas con interés agrícola, ornamental y medicinal o ser de gran utilidad para la aclimatación de vitroplántulas de otras especies de la familia Orchidaceae.



**Figura 27.** Efectos sobre la longitud radicular en plantas de frijol por los aislados fúngicos de *E. parviflora* y *S. tigrina*. Las barras representan el promedio de los datos y las columnas con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En la Fig. 27 también se puede observar que tres de las cepas correspondientes al género *Trichoderma* (H22, H23 y H24) produjeron efectos positivos en las raíces. Las plantas sometidas a estos tratamientos alcanzaron a desarrollar una longitud de entre 9 y 10 cm. Resultados similares se obtuvieron con las cepas H20, H25, H26 y H27, correspondientes a los géneros *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., *Curvularia* sp., y *Colletotrichum* sp.

Estos resultados concuerdan con los reportados por diversos autores quienes señalan la excelente habilidad que poseen diversas especies del género *Trichoderma* para inducir un efecto positivo en la longitud del sistema radicular de distintas especies vegetales (Kleifeld y Chet, 1992; Yedidia *et al.*, 2001; Cubillos-Hinojosa *et al.*, 2009).

Por su parte, para el género *Penicillium*, Valencia-Chona (2013) encontró que *Penicillium janthinellum* induce un crecimiento en la longitud radicular de plantas de arroz (*Oriza sativa*). No existen hasta el momento investigaciones que relacionen a *Curvularia* sp., y *Colletotrichum* sp. como hongos que contribuyan a la longitud de raíces en especies vegetales, por lo cual esta investigación sería uno de los primeros acercamientos a dicha actividad en estos hongos.

En contraste, los tratamientos con las cepas H28 y H30 que correspondían a *Lasiodiplodia theobromae* y *Fusarium* sp., produjeron las raíces con la menor longitud desarrollada, ya que las plantas no superaron los 6 cm de longitud. Estos tratamientos no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) cuando se compararon con el tratamiento control (Fig. 27).

Fue importante observar que, para esta variable, 10 de las 12 cepas ensayadas produjeron un efecto mayor o similar al tratamiento control, lo cual podría deberse a que la totalidad de los hongos aislados estaban cumpliendo con su papel de endófitos mutualistas.

#### **4.7. Efecto de los hongos aislados en la aclimatación simbiótica de plantas de *Encyclia parviflora* y *Stanhopea tigrina***

La sobrevivencia fue del 100% para las vitroplantas de las dos especies de orquídeas en todos los tratamientos (Cuadro 11), es decir, al finalizar los 30 días de experimentación, todas las plantas colocadas en condiciones *ex vitro* y sometidas al proceso de aclimatación simbiótica sobrevivieron.

Como se puede observar en el Cuadro 11, las plantas de *E. parviflora* desarrollaron una mayor altura cuando fueron inoculadas con el hongo H24 (*Trichoderma hamatum*), sin embargo, este resultado no mostró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) cuando se comparó contra el tratamiento control, pero si cuando fue comparado contra la cepa H19, la cual se ha sugerido en esta investigación como una especie fúngica probablemente nueva. Para el número de hojas desarrolladas, los resultados no fueron significativos ( $p > 0.05$ ), es decir ambos hongos produjeron el mismo efecto que al observado con el tratamiento control.

**Cuadro 11.** Efecto de los hongos aislados en la aclimatación simbiótica de vitroplantas de *E. parviflora* y *S. tigrina*.

Especie	Tratamiento	Altura (cm)	No. de hojas	%Sobrevivencia
<i>E. parviflora</i>	C	0.42 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.31 <sup>a</sup>	100
	H19	0.28 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.20 ± 0.20 <sup>a</sup>	100
	H24	0.96 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.44 <sup>a</sup>	100
<i>S. tigrina</i>	C	0.16 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.00 ± 0.31 <sup>b</sup>	100
	H19	0.48 ± 0.05 <sup>b</sup>	2.00 ± 0.31 <sup>a</sup>	100
	H24	2.54 ± 0.33 <sup>a</sup>	2.40 ± 0.40 <sup>a</sup>	100

Las columnas con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Para el caso de *S. tigrina*, las plantas inoculadas con el hongo *Trichoderma hamatum* mostraron los mejores resultados en cuanto a la altura y al número de hojas desarrolladas. Los resultados que generó la inoculación de este hongo en plantas de *S. tigrina* fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) cuando se compararon contra el tratamiento control, pero contra la cepa H19, solamente la altura de las plantas arrojó un resultado estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 11).

Estos resultados sugieren que *T. hamatum* es un hongo que podría ser utilizado en la aclimatación simbiótica de distintas especies de la familia Orchidaceae, pues como se observa en el Cuadro 11, en ambas especies aumentó la altura de las plantas, y para el caso de *S. tigrina* también indujo la producción de un mayor número de hojas.

En cuanto a la cepa fúngica H19, se observó que en las plantas de *E. parviflora* no se produjeron beneficios significativos; sin embargo, este resultado podría deberse al poco tiempo de exposición de las plantas al hongo, aunado al hecho de que dicha especie fúngica no fue aislada de esta orquídea. Dicha hipótesis se ve reforzada al observar que en *S. tigrina* esta cepa si logró un incremento en la

altura y el número de las hojas, aunque no fue tan significativo como el obtenido con la inoculación de *T. hamatum*.

Como se pudo observar en la presente investigación, la adición del endófito adecuado a las plantas propagadas *in vitro* generó un buen porcentaje de sobrevivencia, aumentó la altura de las plantas e indujo el desarrollo foliar. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Castillo (2002) y Ortega-Larrocea *et al.* (2005), quienes afirman que la simbiosis genera plantas más vigorosas que sobreviven mejor el proceso de aclimatación *ex vitro*.

Los resultados también concuerdan con lo reportado por Córdova-Yépez (2003), quien evaluó la adición de un hongo durante la aclimatación de vitroplántulas de *Rhynchoaelia digbyana* (Orchidaceae) y encontró que este hongo estableció una simbiosis con las raíces de la orquídea, lo cual aumentó el porcentaje de sobrevivencia en la etapa de aclimatación.

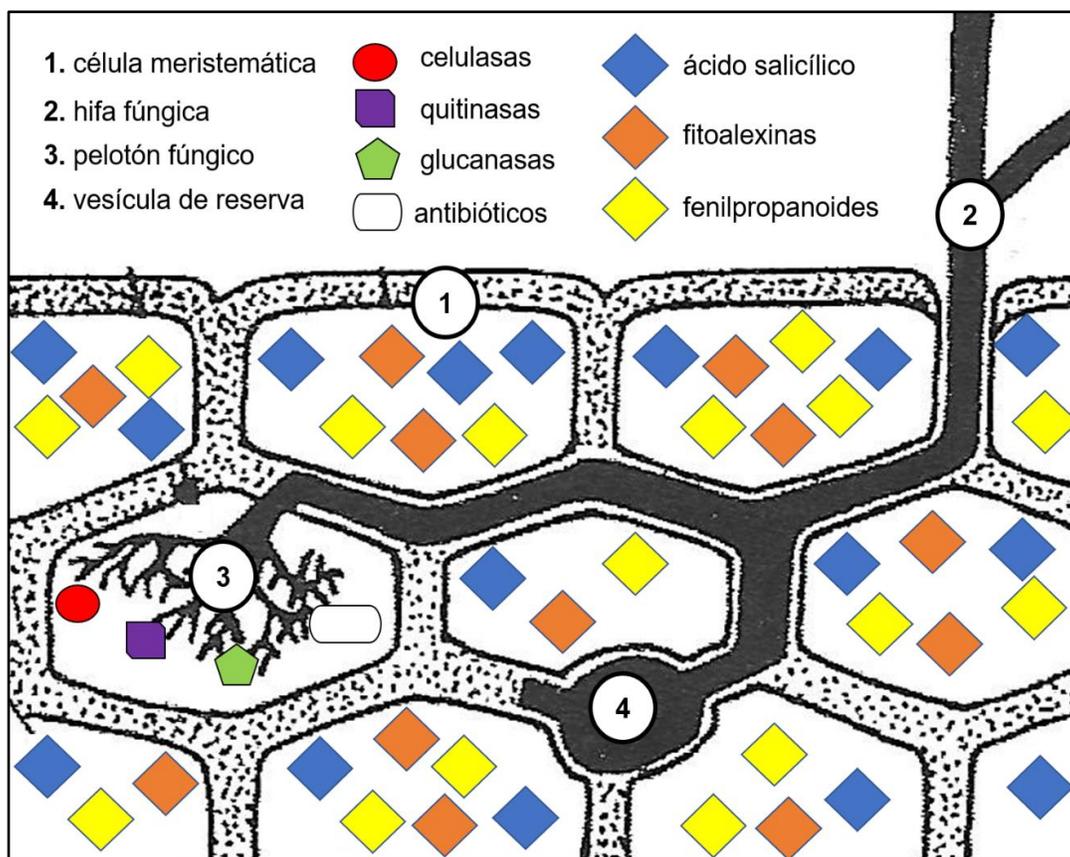
Para las especies de la familia Orchidaceae, los hongos con los que se establecen interacciones ecológicas son muy importantes. Durante la germinación proporcionan nutrientes a la semilla carente de endospermo (Otero-Ospina y Bayman, 2009; Karol-Chávez *et al.*, 2015; Fuertes-Flores y Mallitasig-Quishpe, 2018) y en la fase de crecimiento colaboran para satisfacer necesidades de captación de agua y nutrientes como el fósforo, el carbono orgánico y los carbohidratos (Trejo-Aguilar *et al.*, 2018).

El mecanismo por el que actúan los hongos micorrízicos como *Trichoderma hamatum*, comienza cuando las hifas penetran las células meristemáticas de la raíz, para posteriormente desarrollarse en su interior, formando estructuras denominadas “pelotones” (Mosquera-Espinosa *et al.*, 2010; Jiménez-Peña *et al.*, 2018).

Cuando el hongo ha logrado establecerse dentro de las raíces de la orquídea, este produce enzimas de tipo celulasas, quitinasas, glucanasas y antibióticos, moléculas que degradan la pared celular de patógenos, incluyendo otras especies de hongos e incluso nemátodos (Cano, 2011; Pérez *et al.*, 2015). Este es el fundamento por el cual diversos hongos del género *Trichoderma* son ampliamente utilizados como agentes de control biológico (Sahebani y Hadavi, 2008; Redda *et al.*, 2018). También, como se demostró en la presente investigación, *T. hamatum*

es un hongo que estimula el crecimiento vegetal, lo cual se debe a la existencia de transposones ABC en sus moléculas (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2009).

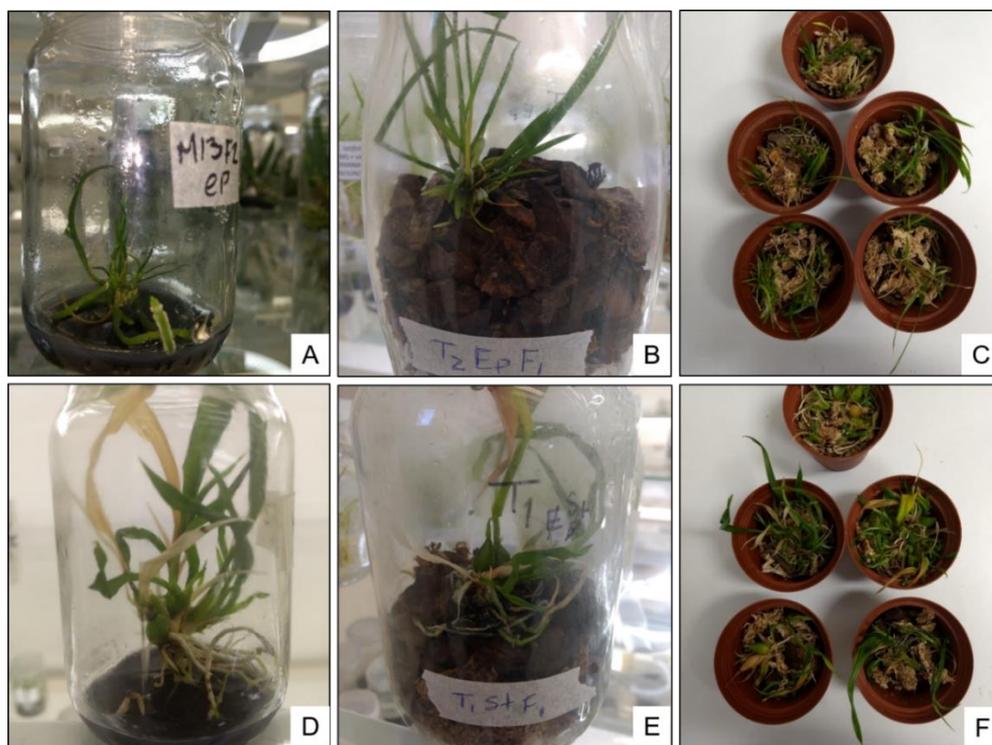
En otras investigaciones se sugiere que *T. hamatum* también favorece a la orquídea mediante la acumulación de ácido salicílico, fitoalexinas y activación de fenilpropanoides, los cuales inducen la resistencia contra patógenos (Donoso *et al.*, 2008; Pelicice *et al.*, 2000; Cano, 2011; Diaz-Puentes, 2012; Malolepsza *et al.*, 2017). El mecanismo de infección y la producción de las moléculas anteriormente mencionadas se presentan en el esquema de la Fig. 28.



**Figura 28.** Esquema sugerido del mecanismo de infección fúngica, liberación y acumulación de moléculas benéficas de *T. hamatum*. Basado en: Malolepsza *et al.* (2017) y Jiménez-Peña *et al.* (2018).

Si bien, el proceso de aclimatación simbiótica en las orquídeas adquiere grandes ventajas cuando se utilizan los hongos endófitos, en esta investigación se pudo demostrar que son importantes las etapas de rizogénesis y preaclimatación *in*

*vitro*, debido a que estas dos fases previas preparan a las vitroplantas para la posterior aclimatación *ex vitro*. La Fig. 29 muestra el aspecto de las vitroplantas en las diferentes etapas establecidas en esta investigación.



**Figura 29.** Etapas para la aclimatación simbiótica de vitroplantas de *E. parviflora* y *S. tigrina*. **A**, Vitroplantas de *E. parviflora* en el proceso de rizogénesis *in vitro*. **B**, Vitroplantas de *E. parviflora* en el proceso de preaclimatación *in vitro*. **C**, Vitroplantas de *E. parviflora* en el proceso de aclimatación simbiótica *ex vitro*. **D**, Vitroplantas de *S. tigrina* en el proceso de rizogénesis *in vitro*. **E**, Vitroplantas de *S. tigrina* en el proceso de preaclimatación *in vitro*. **F**, Vitroplantas de *S. tigrina* en el proceso de aclimatación simbiótica *ex vitro*.

Por último, es importante mencionar que el uso de hongos endófitos en el proceso de aclimatación de vitroplantas no ha sido ampliamente estudiado; así la presente investigación podría sentar las bases para probar otras especies fúngicas en distintas especies de orquídeas mexicanas con alguna importancia medicinal u ornamental o con algún grado de amenaza.

## CONCLUSIONES

Las vitroplantas de *Encyclia parviflora* y *Stanhopea tigrina* sometidas al proceso de aclimatación *ex vitro* aumentaron su porcentaje de sobrevivencia cuando se agregaron hongos endófitos, es decir, cuando se realizó un proceso de aclimatación simbiótica. Sin embargo, también se evidenció la importancia de dos etapas previas: la inducción de rizogénesis *in vitro* y la preaclimatación *in vitro*.

El medio óptimo para la inducción de rizogénesis en las vitroplantas de *E. parviflora* fue el enriquecido con 2.5 mg L<sup>-1</sup> de AIB + 100 ml L<sup>-1</sup> de agua de coco, ya que los medios con 5.0 mg L<sup>-1</sup> de AIB evidenciaron daños por procesos de oxidación vegetal. Para *S. tigrina*, el medio que mostró los mejores resultados en la inducción de raíces fue el adicionado con 5.0 mg L<sup>-1</sup> de AIA + 100 ml L<sup>-1</sup> de agua de coco.

El agua de coco resultó el mejor sustrato orgánico en el proceso de rizogénesis *in vitro* para las dos orquídeas estudiadas en esta investigación; esto en comparación con el ácido salicílico, aunque ambos están reportados en la literatura como compuestos con importantes beneficios fisiológicos para las plantas.

El mejor sustrato de soporte en la preaclimatación *in vitro*, para ambas especies de orquídeas fue el que contenía en su formulación: corteza de pino, turba de *Sphagnum* y roca tepezil (en concentraciones de 1:2:3 respectivamente). Con esta etapa se logró preparar las vitroplantas para su posterior aclimatación *ex vitro* y asegurar un mejor porcentaje de sobrevivencia.

Algunos géneros de hongos considerados como fitopatógenos para las plantas, al cumplir su rol de endófitos en las orquídeas, colaboran con su desarrollo vegetal, en especial sobre el desarrollo foliar, la producción de biomasa y la promoción del crecimiento radicular.

En este contexto *Trichoderma hamatum* y una cepa sugerida como una Probable Nueva Especie (PNE) fueron las que indujeron los mejores resultados en plantas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*), aunque diez de los doce hongos endófitos aislados mostraron resultados positivos en la promoción del crecimiento vegetal y la producción radical y foliar.

*Trichoderma hamatum* y la PNE no afectaron la sobrevivencia de plantas de *E. parviflora* y *S. tigrina* propagadas *in vitro* y evaluadas en condiciones de invernadero durante la aclimatación simbiótica. *T. hamatum* logró inducir la promoción del crecimiento y la producción foliar en ambas especies de orquídeas, mientras que, la PNE solo produjo efectos positivos para ambas variables en *S. tigrina*, orquídea de la cual fueron aisladas ambas cepas fúngicas.

Los experimentos realizados en esta investigación sugieren que los hongos endófitos de una familia botánica producen efectos similares en sus diferentes especies; sin embargo, los efectos son potencializados cuando se usan en la especie vegetal de la que fueron aislados.

## PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Los resultados de la presente investigación serán utilizados para completar el proceso de micropropagación *in vitro* de las dos especies estudiadas, sin embargo, se sugiere realizar ensayos *in situ*, es decir, exponiendo las plantas propagadas y aclimatadas a las condiciones ambientales de los lugares donde posiblemente puedan ser reintroducidas.

En este contexto, es importante mencionar los dos objetivos a largo plazo que se planean para las orquídeas reproducidas *in vitro* en el Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales de la UAMZH; el primero es contribuir en proyectos de conservación, en los cuales las especies propagadas y aclimatadas sean transportadas y monitoreadas hasta lograr su establecimiento en forófitos dentro de sus hábitats naturales y con ello lograr contrarrestar el efecto de la depredación y venta ilegal que tanto ha vulnerado las poblaciones silvestres.

El segundo objetivo es trabajar en conjunto con colegas que han logrado establecer Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA's) en el municipio de Xilitla, S.L.P., México. En estos espacios naturales se pretende colocar orquídeas propagadas *in vitro*, las cuales podrán ser admiradas en proyectos ecoturísticos y comercializadas de manera legal; con ello se contribuirá al ingreso económico en una de las regiones más vulnerables y pobres del país, al mismo tiempo que se logra la conservación de las poblaciones silvestres.

Una de las principales recomendaciones, es evaluar el efecto que causarían las 10 cepas fúngicas que no fueron evaluadas en plantas de orquídeas, pero que si mostraron efectos benéficos en las plantas de frijol. De igual manera, se sugiere ampliar el periodo de evaluación para la aclimatación simbiótica en las orquídeas y realizar un tratamiento que incluya todas las cepas fúngicas aisladas.

Sería muy importante realizar estudios filogenéticos y moleculares para determinar la identidad de la PNE que fue encontrada, no sin antes repetir el protocolo de extracción de ADN e identificación molecular para asegurar la hipótesis de que sea una especie nueva. De ser así será importante determinar sus características y sus funciones dentro y fuera de la planta hospedera.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Goltapeh, E. M., Zare, R., y Phillips, A. J. L. (2010). Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 25, 1-10.
- Abello, J. F., y Kelemu, S. (2006). Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 7, 55-57.
- Ackerman, J. D. (1986). Systems in orchids. *Lindleyana*, 1, 108-113.
- Acosta, E., Sánchez, B., y Bañón, A. (2000). Auxinas. En: Azcon, B. y Talon, M. (eds). *Fundamentos de fisiología vegetal*. Madrid: McGraw-Hill, 2000, pp. 305-322.
- Acosta, M., Alvarado, Y., Cruz, M., Leiva, M., y Delgado, L. (2005). Micobiota epífita y contaminantes fungosos del establecimiento *in vitro* de *Eucalyptus grandis*. *Manejo Integrado de Plagas Agroecológicas*, 75, 60-63.
- Acosta, M., Caballero, I., Alvarado-Capó, Y., y Leiva-Mora, M. (2002). Micobiota epifítica y contaminantes fungosos del establecimiento *in vitro* de la guayaba (*Psidium guajava* L.). *Biotecnología vegetal*, 2, 67-71.
- Adhikari, Y. P., Fischer, A., y Fischer, H. S. (2016). Epiphytic orchids and their ecological niche under anthropogenic influence in central Himalayas, Nepal. *Journal of Mountain Science*, 13, 774-784.
- Aggarwal, S., Nirmala, C., Beri, S., Rastogi, S., y Adholeya, A. (2012). *In vitro* symbiotic seed germination and molecular characterization of associated endophytic fungi in a commercially important and endangered Indian orchid *Vanda coerulea* Griff. Ex Lindl. *European Journal of Environmental Sciences*, 2, 33-42.
- Aldridge, D. C., Galt, S., Giles, D., y Turner, W. B. (1971). Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 25, 1623-1627.
- Alfano, G., Ivey, M. L., Cakir, C., Bos, J. I. B., Miller, S. A., Madden, L. V., y Hoitink, H. A. J. (2007). Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. *Phytopathology*, 97, 429-437.

- Ali, S., Charles, T. C., y Glick, B. R. (2017). Endophytic phytohormones and their role in plant growth promotion. En: Doty S. (eds) *Functional Importance of the Plant Microbiome*. Springer, Cham.
- Alomía-Aguirre, Y. A. (2014). Hongos micorrízicos en *Vanilla* spp.(Orchidaceae) y su potencial para la germinación de semillas. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia. 142 pp.
- Alvarado-Martínez, I. (2012). Delincuencia organizada ambiental en México, una nueva manifestación criminal del tráfico de especies. *Rev. Crim.*, 54, 283-311.
- Alvarez, M. R., y Sagawa, Y. (1965). A histochemical study of embryo development in *Vanda* (Orchidaceae). *Caryologia*, 18, 251-261.
- Anchondo-Aguilar, A., Núñez-Barrios, A., Ruiz-Anchondo, T., Martínez-Téllez, J., Vergara-Yoisura, S., y Larqué-Saavedra, A. (2011). Efecto del ácido salicílico en la bioproductividad de la fresa (*Fragaria ananassa*) cv *Aromosa*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 2, 293-298.
- Andrades, I., Yender, F., Labarca, J., Ulacio, D., Paredes, C., y Marín, Y. (2018). Evaluación de la antracnosis (*Colletotrichum* sp.) en guanábana (*Annona muricata* L.) tipo Gigante en el sector Moralito del estado Zulia, Venezuela. *Revista UDO Agrícola* 9, 148-157.
- Aquihuatl-Ramos, M. A., y Pérez-Chabela, M. L. (2004). Manual de Prácticas del Laboratorio de Microbiología General. Universidad Autónoma Metropolitana, 123 pp.
- Arditti, J. (1992) *Fundamentals of Orchid Biology*, John Wiley & Son.
- Arévalo, R., Figueroa, J., y Madriñán, S. (2011). Anatomía foliar de ocho especies de orquídeas epífitas. *Lankesteriana*, 11, 39-54.
- Arévalo, R., y Betancur, J. (2004). Diversidad de epífitas vasculares en cuatro bosques del sector suroriental de la serranía de Chiribiquete, Guayana Colombiana. *Caldasia*, 26, 359-380.
- Argumedo-Delira, R., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., & Peña-Cabriales, J. J. (2009). El género fúngico *Trichoderma* y su relación con los contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 25, 257-269.

- Atala, C., Muñoz-Tapia, L., Pereira, G., Romero, C., Vargas, R., Acuña-Rodríguez, I. S., y Brito, E. (2017). The effect of future climate change on the conservation of *Chloraea disoides* Lindl. (Orchidaceae) in Chile. *Brazilian Journal of Botany*, 40, 353-360.
- Atwood, J. T. (1986). The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. *Selbyana*, 9, 171-186.
- Ávila-Díaz, I., y Salgado-Garciglia, R. (2006). Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biológicas*, 8, 138-149.
- Ávila-Miranda, M. E., Herrera-Estrella, A., y Peña-Cabriales, J.J. (2006). Colonization of the rhizosphere, rhizoplane and endorhiza of garlic (*Allium sativum* L.) by strains of *Trichoderma harzianum* and their capacity to control allium white-rot under field conditions. *Soil Biol. Biochem.*, 38, 1823-1830.
- Bae, H., Sicher, R. C., Kim, M. S., Kim, S. H., Strem, M. D., Melnick, R. L., y Bailey, B. A. (2009). The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany*, 60, 3279-3295.
- Barrer, S. E. (2009). El uso de hongos micorrízicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 7, 123-132.
- Bateman, R. M., Guy, J. J., Rudall, P. J., Leitch, I. J., Pellicer, J., y Leitch, A. R. (2018). Evolutionary and functional potential of ploidy increase within individual plants: somatic ploidy mapping of the complex labellum of sexually deceptive bee orchids. *Annals of botany*, 122, 133-150.
- Bateman, R. M., y Rudall, P. J. (2006). Evolutionary and morphometric implications of morphological variation among flowers within an inflorescence: a case-study using European orchids. *Annals of Botany*, 98, 975-993.
- Batista, D. S., Felipe, S. H. S., Silva, T. D., de Castro, K. M., Mamedes-Rodrigues, T. C., Miranda, N. A., y Torres-Silva, G. (2018). Light quality in plant tissue culture: does it matter? *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 54, 195-215.

- Batty, A. L., Dixon, K. W., Brundrett, M., y Sivasithamparam, K. (2001). Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a mediterranean bushland. *New Phytologist*, 152, 511-520.
- Bawa, K. S. (1990). Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. *Annual review of Ecology and Systematics*, 21, 399-422.
- Benavides, T., Córdova, A., y Vaca, I. (2016). Propagación *in vitro* de *Geranium chilloense* Willd. ex. Kunth. para la obtención de plantas completas. *La Granja Revista de Ciencias de la Vida*, 24, 150-158.
- Bermeo Criollo, C. A., Sari-Cumbe A. F. (2018). Simbiosis hongo-micorriza como factor promotor de la germinación en semillas de orquídeas del género *Epidendrum*. Tesis de Licenciatura. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Universidad Estatal de Cuenca. Cuenca, Ecuador, 125 pp.
- Bertolini, V., Carrillo-Castañeda, G., y Gonzáles-Camacho, J. M. (2007). Biofertilización y hormonas vegetales en la sobrevivencia y crecimiento de plántulas de *Phalaenopsis* (Orchidaceae) producidas *in vitro*. *Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal*, 6, 1-14.
- Beutelspacher-Baigts, C. R. (2017). Catálogo de las orquídeas de Chiapas. *Lacandonia*, 2, 23-122.
- Bhattacharyya, P., Kumaria, S., y Tandon, P. (2016). High frequency regeneration protocol for *Dendrobium nobile*: a model tissue culture approach for propagation of medicinally important orchid species. *South African Journal of Botany*, 104, 232-243.
- Billard, C. E., Barsanti, M. V., y Lallana, V. H. (2014). Cultivo *in vitro* y aclimatación de plantas de *Polystachya concreta* (Orchidaceae). *FABICIB*, 18, 95-106.
- Bohman, B., Flematti, G. R., Barrow, R. A., Pichersky, E., y Peakall, R. (2016). Pollination by sexual deception-it takes chemistry to work. *Current opinion in plant biology*, 32, 37-46.
- Bougoure, J. J., y Dearnaley, J. (2005). The fungal endophytes of *Dipodium variegatum* (Orchidaceae). *Australasian Mycologist*, 24, 15-19.
- Brantjes, N. B. M. (1981). Ant, bee and fly pollination in *Epipactis palustris* (L.) Crantz (Orchidaceae). *Acta Botanica Neerlandica*, 30, 59-68.

- Brenes, A. A., Castillo, M. R., y Gómez, A. L. (2015). Micropropagación de cuatro cultivares de arándano (*Vaccinium* spp.) a partir de segmentos foliares de dos procedencias. *Agronomía Costarricense*, 39, 7-23.
- Briceño, C. C. (2003). Estudio de la pudrición negra de las orquídeas causada por *Phytophthora* sp. en colecciones del Valle Central de Costa Rica. *Lankesteriana*, 7, 179-180.
- Briggs, J. C. (2015). Species extinction: Frequency and biogeography. *Environmental Skeptics and Critics*, 4, 96-105.
- Brundrett, M. C. (2006). Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. In *Microbial root endophytes*, 281-298. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Cabrera, M. G., Galmarini, M. R., y Flachslund, E. (2003). *Colletotrichum gloeosporioides*, patógeno de orquídeas en el noreste de Argentina. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 68, 57-61.
- Cabrera, M. G., y Cúndom, M. A. (2013). Ocurrencia de *Lasiodiplodia theobromae* en *Cattleya* spp. en Corrientes, Argentina. *Summa Phytopathologica*, 39, 143-143.
- Cadevall, M. (2009). Darwin naturalista: el caso de la fecundación de las orquídeas. *Teorema: Revista Internacional de Filosofía*, 28, 95-105.
- Calva-Calva, G., y Pérez-Vargas, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6, 1-16.
- Camarena-Gutiérrez, G., y De la Torre-Almaraz, R. (2007). Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. *Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 13, 157-162.
- Camargo-Cepeda, D. F., y Ávila, E. R. (2014). Efectos del *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento y desarrollo de la arveja (*Pisum sativum* L.). *Ciencia y Agricultura*, 11, 91-100.
- Cañas, B. M. (1993). Metodologías *in vitro* de vegetales. Bucaramanga:UIS.
- Candeleró, D. J., Cristóbal, A. J., Reyes, R. A., Tun, S. J. M., Gamboa, A. M. M., y Ruíz, S. E. (2015). *Trichoderma* spp. promotoras del crecimiento en plántulas de

- Capsicum chinense* Jacq. y antagonicas contra *Meloidogyne incognita*. *Phyton*, 84, 113-119.
- Capull-Santana, R., Rodríguez-Andreu, C. M., Pérez-Navarro, C., Delgado-Pérez, Y., y Capull-Santana, M. C. (2003). Efecto de *Trichoderma viride* como estimulante de la germinación, en el desarrollo de posturas de cafetos y el control de *Rhizoctonia solani*. *Centro Agrícola*, 30, 21-25.
- Carranza-Álvarez, C., Hernández-Benavides, D. M., y Maldonado-Miranda, J. J. (2016). Micropropagación de orquídeas del humedal natural Ciénega de Cabezas, Tamasopo. *Universitarios Potosinos*, 202, 4-10.
- Castañeda-Zárate, M., Viccon-Esquivel, J., Ramos-Castro, S. E., y Solano-Gómez, R. (2012). Registros nuevos de Orchidaceae para Veracruz, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 83, 281-284.
- Castillo, M. (2002). Micorrización *in vitro* de *Bletia urbana* (Orchidaceae) como una estrategia para su reintroducción. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 102 pp.
- Castillo-Pérez, L. J. (2016). Micropropagación de *Laelia anceps* Lindl. subsp. *anceps* (Orchidaceae). Tesis de Licenciatura. Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, México. 96 pp.
- Ceballos, G., Ehrlich, P. R., Barnosky, A. D., García, A., Pringle, R. M., y Palmer, T. M. (2015). Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Science advances*, 1, e1400253.
- Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V., y Chandra, R. (2010). Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters*, 32, 1199-1205.
- Cha-um, S., Puthea, O., y Kirdmanee, C. (2009). An effective in-vitro acclimatization using uniconazole treatments and ex-vitro adaptation of *Phalaenopsis* orchid. *Scientia horticultrae*, 121, 468-473.
- Cha-um, S., Ulziibat, B., y Kirdmanee, C. (2010). Effects of temperature and relative humidity during *in vitro* acclimatization, on physiological changes and growth

- characters of *Phalaenopsis* adapted to *in vivo*. *Australian Journal of Crop Science*, 4, 468-473.
- Chávez-Suárez, L., Álvarez-Fonseca, A., y Ramírez-Fernández, R. (2012). Apuntes sobre algunos reguladores del crecimiento vegetal que participan en la respuesta de las plantas frente al estrés abiótico. *Cultivos Tropicales*, 33, 47-56.
- Chen, J., Wang, H., y Guo, S. X. (2012). Isolation and identification of endophytic and mycorrhizal fungi from seeds and roots of *Dendrobium* (Orchidaceae). *Mycorrhiza*, 22, 297-307.
- Chet, I., Harman, G. E., y Baker, R. (1981). *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microbial Ecology*, 7, 29-38.
- Cilliers, A. J., Swart, W. J., y Wingfield, M. J. (1993). A review of *Lasiodiplodia theobromae* with particular reference to its occurrence on coniferous seeds. *South African Forestry Journal*, 166, 47-52.
- Conabio (1998). La diversidad biológica de México: Estudio de País. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 293 pp.
- Conabio (2013). La biodiversidad en Chiapas: Estudio de Estado. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad/Gobierno del Estado de Chiapas. México, 436 pp.
- Contreras, A. S., Alanís, F. I., Contreras, B. S., y Ferry, J. R. (2011). Las orquídeas silvestres del estado de Nuevo León. *Planta*, 6, 8-9.
- Contreras-Liza, S., Cajaleón-Asencios, D., Palomares-Anselmo, E., Amaro-Palomino, E., y Del Solar-La Rosa, O. (2014). Efecto de ácido salicílico y peróxido de hidrógeno en resistencia sistémica adquirida (RSA) en papa (*Solanum tuberosum* L.) y camote (*Ipomoea batatas* L.). *Big bang Faustiniiano*, 3, 8-11.
- Córdova-Yépez, J. A. (2003). Evaluación de seis substratos y Mycoral durante la aclimatación de vitroplántulas de la orquídea *Rhynchoaelia digbyana*. Tesis de Licenciatura. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria. Universidad Nacional de Honduras. Zamorano, Honduras. 61 pp.

- Cox, C. E., Brandl, M. T., de Moraes, M. H., Gunasekera, S., y Teplitski, M. (2018). Production of the plant hormone auxin by *Salmonella* and its role in the interactions with plants and animals. *Frontiers in microbiology*, 8, 2668.
- Creelman, R. A., y Mullet, J. E. (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 4114-4119.
- Cubillos-Hinojosa, J., Valero, N., y Mejía, L. (2009). *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener). *Agronomía Colombiana*, 27, 81-86.
- Curtis, J. T. (1939). The relation of specificity of orchid mycorrhizal fungi to the problem of symbiosis. *American Journal of Botany*, 26, 390-399.
- Da Silva, J. A. T., Tsavkelova, E. A., Zeng, S., Ng, T. B., Parthibhan, S., Dobránszki, J., y Rao, M. V. (2015). Symbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development. *Planta*, 242, 1-22.
- Da Silva-Pereira, A. V., Martins, R. B., Michereff, S. J., Da Silva, M. B., y Câmara, M. P. S. (2012). Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to MBC and DMI fungicides. *European Journal of Plant Pathology*, 132, 489-498.
- Damián, A. (2015). Diversidad y distribución altitudinal de especies terrestres de la familia Orchidaceae en un bosque montano al interior del Parque Nacional Yanachaga Chemillen (Pasco, Perú). *Arnaldoa*, 20, 103-116.
- De Beeck, M., Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J., y Colpaert, J. V. (2014) Comparison and validation of some ITS primer pairs Useful for fungal metabarcoding studies. *PlosOne*, 9, e97629.
- De la Noval, B. M., Oria, A., Casadesus, L., y Gómez, M. (1999). Aislamiento, caracterización e inoculación con endomicorrizas orquídeas en especies de orquídeas. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5, 149-152.
- Debergh, P. C. y Maene, L. J. (1981). Ascheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Hortic.*, 14, 335-345.

- Dematte, J. E., y Dematte, M. E. (1996). Estudos hídricos com substratos vegetais para cultivo de orquídeas epífitas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 31, 803-813.
- Dhandhukia, P. C., y Thakkar, V. R. (2007). Standardization of growth and fermentation criteria of *Lasiodiplodia theobromae* for production of jasmonic acid. *African Journal of Biotechnology*, 6, 707-712.
- Díaz, I., y Garciglia, R. (2013). Propagación y mantenimiento in vitro de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico-Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 8, 138-149.
- Díaz, L. P., Medina, L. F., Latife, J., Digonzelli, P. A., y Sosa, S. B. (2004). Aclimatación de plantas micropropagadas de caña de azúcar utilizando el humus de lombriz. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 33, 115-128.
- Díaz-Puentes, L. N. (2012). Resistencia sistémica adquirida mediada por el ácido salicílico. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10, 257-267.
- Díez-Camejo, M. C., y Ayala-Sifontes, J. L. (2011). Influencia de *Trichoderma harzianum* a-34 en la germinación de las semillas de majagua (*Talipariti elatum* Sw. Fryxell). *Fitosanidad*, 15, 159-161.
- Domínguez, E., Leod, C., Águila, K., Ojeda, A., Ivelic-Sáez, J. (2017) Cómo utilizar la turba rubia de *Sphagnum* en horticultura. Reporte Técnico. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Punta Arenas, Chile.
- Domínguez-Torrejón, G., y Donayre-Gómez, M. L. (2006). Aclimatación de *Uncaria tormentosa* (Willd.) DC. producida *in vitro*. *Ecología Aplicada*, 5, 67-74.
- Donoso, E., Lobos, G. A., y Rojas, N. (2008). Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* en vivero. *Bosque*, 29, 52-57.
- Dressler, R. L. (2005). How many Orchid species? *Selbyana*, 26, 155-158.
- Encina, F., y Piontelli, E. (2009). Hongos filamentosos en la epidermis del fruto del tomate: énfasis en el género *Cladosporium* Link. *Boletín Micológico*, 24, 1-13.
- Endres-Júnior, D., Sasamori, M. H., Schmitt, J. L., y Droste, A. (2018). Survival and development of reintroduced *Cattleya intermedia* plants related to abiotic factors

- and herbivory at the edge and in the interior of a forest fragment in South Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, 6, 1-12.
- Eng, F., Haroth, S., Feussner, K., Meldau, D., Rekhter, D., Ischebeck, T., y Feussner, I. (2016). Optimized jasmonic acid production by *Lasiodiplodia theobromae* reveals formation of valuable plant secondary metabolites. *PLoS one*, 11, e0167627.
- Engelmann, F. (1991). *In vitro* conservation of tropical plant germplasm-a review. *Euphytica*, 57, 227-243.
- Enríquez-del Valle, J. R., Carrillo Castañeda, G., Sánchez-García, P., Rodríguez-Mendoza, M. N., y Mendoza-Castillo, M. C. (2001). Efectos de los ácidos acetilsalicílico e indol butírico en el enraizamiento) *in vitro* y rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Rev. Fitotec. Mex.*, 24, 71-78.
- Espejo-Serna, A. (2012). El endemismo en las Liliopsidas mexicanas. *Acta Botanica Mexicana*, 100, 195-257.
- Estrela Borges Baldotto, L., Altoé Baldotto, M., Brandão Gontijo, J., Miranda de Oliveira, F., y Gonçalves, J. (2014). Aclimatização de orquídea (*Cymbidium* sp.) em resposta à aplicação de ácidos húmicos. *Ciência Rural*, 44, 830-833.
- Evans, M., Kamweya, A., Ochora, J., y Maobe, S. (2013). Effects of anthropogenic activities on distribution and abundance of the epiphytic orchid, *Polystachya fusiformis* (Thou.) Lindl. in the Manga Range Ecosystem, Kisii, Kenya. *International Journal of Science and Research*, 2, 81-89.
- Ezcurra, E. (2006). Orquídeas de México. *Ciencias*, 82, 76-78.
- Faleiro, F. V., Nemésio, A., y Loyola, R. (2018). Climate change likely to reduce orchid bee abundance even in climatic suitable sites. *Global change biology*, 24, 2272-2283.
- Faria, D. C., Dias, A. C. F., Melo, I. S., y de Carvalho Costa, F. E. (2013). Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 217-221.
- Favela, T. L. C., Luna, J. D. J. G., González, S. S., Ramírez, B. D., Luna, J. A. N., y Ayón, J. B. M. (2016). Propagación *in vitro* de la orquídea *Prosthechea citrina*

- (La Llave & Lex.) WE Higgins nativa del estado de Durango, México. *Investigación y Ciencia*, 24, 19-25.
- Fay, M. F. (1992). Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 28, 1-4.
- Figueroa, N. (2003). Preaclimatación *in vitro* de plantas de violeta africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) y su efecto sobre la aclimatación. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía, 64 pp.
- Flores-Villela, O. y León-Paniagua, S. (1998). Extinción de especies en México. En: Toledo, G. y M. Leal Pérez (eds.), *Destrucción del hábitat* (155-170). México, D.F.
- Fortanelli-Martínez, J., Castillo-Lara, P., y De Nova-Vázquez, J. A. (2018) Las orquídeas. En: Reyes-Hernández, H., De Nova-Vázquez, J. A., Durán-Fernández, A. (eds.), *Reserva de la Biósfera Sierra del Abra Tanchipa. Biodiversidad y Acciones para su Conservación* (79-96). Comisión Nacional de Áreas Protegidas – Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, S.L.P., México.
- Francisco-Nava, J. J., Jiménez-Aparicio, A. R., Sánchez, A. J., Arenas-Ocampo, M. L., Ventura-Zapata, E., y Evangelista-Lozano, S. (2011). Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laelia eyermaniana* Rchb. f. generadas *in vitro*. *Polibotánica*, 32, 107-117.
- Freuler, M. J. (2008). Orquídeas. Buenos Aires, Albatros, 112 pp.
- Fuertes-Flores, B. G. y Mallitasig-Quishpe, D. A. (2018). Identificación morfológica y molecular de hongos micorrízicos de especies del género *Dracula* y *Epidendrum* (Orchidaceae). Tesis de Licenciatura. Universidad Politécnica Salesiana. Quito, Ecuador. 95 pp.
- Galdiano Júnior, R. F., Pedrinho, E. A. N., Castellane, T. C. L., y Lemos, E. G. D. M. (2011). Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered Brazilian orchid, and their role in acclimatization. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 35, 729-737.

- García-Cruz, J., Sánchez-Saldaña, L. M., Jiménez-Machorro, R., y Solano-Gómez, R. (2003). Orchidaceae. Tribu Epidendreae. Flora del Bajío y Regiones Adyacentes. Herbario AMO. México, 178 pp.
- Gaskett, A. C. (2011). Orchid pollination by sexual deception: pollinator perspectives. *Biological Reviews*, 86, 33-75.
- George, E. F. (1993). Plant propagation by tissue culture. Part 1: The technology. 2<sup>a</sup> Ed. Exegetics Ltd., UK., 574 pp.
- Gil-Rivero, A. E., López-Medina, S. E., y López-Zavaleta, A. (2017). Aclimatación de plántulas *in vitro* de *Saintpaulia ionantha* H. Wendl.(Gesneriaceae) “violeta africana” a condiciones de invernadero. *Arnaldoa*, 24, 343-350.
- Gómez, J. M., y Zamora, R. (1992). Pollination by ants: consequences of the quantitative effects on a mutualistic system. *Oecologia*, 91, 410-418.
- Gómez, J. M., Zamora, R., Hódar, J. A., y García, D. (1996). Experimental study of pollination by ants in Mediterranean high mountain and arid habitats. *Oecologia*, 105, 236-242.
- González-Espinosa, M., Meave, J. A., Ramírez-Marcial, N., Toledo-Aceves, T., Lorea-Hernández, F. G., y Ibarra-Manríquez, G. (2012). Los bosques de niebla de México: conservación y restauración de su componente arbóreo. *Revista Ecosistemas*, 21, 36-52.
- Gray, D. J., y Trigiano, R. N. (2004). Plant growth regulators in plant tissue culture and development. En: *Plant development and biotechnology*, 98-114. CRC Press.
- Groenewold-Labrada, B., Mayek-Pérez, N., y Padilla-Ramírez, J. S. (2003). Hongos asociados a la semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21, 375-378.
- Gupta, P. B. (2013). Un método sencillo para sembrar orquídeas de semillas sin condiciones asépticas. *Lankesteriana International Journal on Orchidology*, 13, 148.
- Haber, W. (2014). Las plantas y la vegetación. Monteverde: ecología y conservación de un bosque nuboso tropical. Oxford University Press.

- Hágsater, E., Soto-Arenas, M. A., Salazar-Chávez, G. A., Jiménez-Machorro, R., López-Rosas, M. A., y Dressler, R. L. (2015). Las orquídeas de México. Instituto Chinoín México, D.F. 2ª Edición, 304 pp.
- Hágsater, E., y Soto, M. A. (2003). Icones Orchidacearum fasc. 5-6: Orchids of Mexico. Instituto Chinoín México, D.F., 426 pp.
- Harman, G. E., Chet, I., y Baker, R. (1980). *Trichoderma hamatum* effects on seed and seedling disease induced in radish and pea by *Pythium* spp. or *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 70, 1167-1172.
- Hauser, A. (1996). Los depósitos de turba en Chile y sus perspectivas de utilización. *Andean Geology*, 23, 217-229.
- Haygert-Lencina, K., Antônio-Bisognin, D., Kielse, P., y Pimentel, N. (2017). Rooting and acclimatization of *Apuleia leiocarpa* plantlets. *Agrociencia*, 51, 909-920.
- Hernández-Henriquez, G. E., y Morales Rivas, R. M. (2017). Aislamiento e identificación de hongos causantes de antracnosis en *Musa paradisiaca* L. (Plátano) y hongos antagonistas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador, 153 pp.
- Hinsley, A., Nuno, A., Ridout, M., John, F. A. S., y Roberts, D. L. (2017). Estimating the Extent of CITES Noncompliance among Traders and End-Consumers; Lessons from the Global Orchid Trade. *Conservation Letters*, 10, 602-609.
- Hinsley, A., Verissimo, D., Roberts, D. L. (2015). Heterogeneity in consumer preferences for orchids in international trade and the potential for the use of market research methods to study demand for wildlife. *Biological Conservation*, 190, 80-86.
- Hossain, M. M., Kant, R., Van, P. T., Winarto, B., Zeng, S., y Teixeira da Silva, J. A. (2013). The application of biotechnology to orchids. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 32, 69-139.
- Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S., y Bissett, J. (2009). Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological control*, 51, 409-416.
- Huang, H., Zi, X. M., Lin, H., y Gao, J. Y. (2018). Host-specificity of symbiotic mycorrhizal fungi for enhancing seed germination, protocorm formation and

- seedling development of over-collected medicinal orchid, *Dendrobium devonianum*. *Journal of Microbiology*, 56, 42-48.
- Hurtado-Alza, H. A. (2017). Caracterización y distribución vertical de epífitas vasculares (orquídeas y bromelias) y hospederos en un ecosistema de selva en el sur del Perú. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Contables Económicas y Administrativas. Universidad de Manizales. Manizales, Colombia. 142 pp.
- Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., y Ullah, I. (2012). Plant tissue culture: current status and opportunities. En: *Recent advances in plant in vitro culture*. InTech.
- Jaimes-Suárez, Y. Y., Velandia, C. A., y Prado, A. M. (2009). Inducción de resistencia sistémica contra *Fusarium oxysporum* en tomate por *Trichoderma koningiopsis* Th003. *Acta biológica colombiana*, 14, 111-120.
- Jiménez-Peña, N., Sandoval-Villa, M., Volke-Haller, V. H., Pedraza-Santos, M. E., y Fernández-Herrera, E. (2018). Colonización micorrízica de *Laelia autumnalis* (La Llave & Lex.) Lindl. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 5, 547-553.
- Jiménez-Sierra, C. L., Sosa-Ramírez, J., Cortés-Calva, P., Solís-Cámara, A. B., Íñiguez-Dávalos, L. I., y Ortega-Rubio, A. (2014). Mexico a megadiverse country and the importance of natural protected areas. *Investigación y Ciencia*, 60, 16-22.
- Johnson, S. D. (1994). Evidence for Batesian mimicry in a butterfly-pollinated orchid. *Biological Journal of the Linnean Society*, 53(1), 91-104.
- Johnson, S. D. (1996). Bird pollination in South African species of *Satyrium* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 203, 91-98.
- Johnson, S. D., y Brown, M. (2004). Transfer of pollinaria on birds' feet: a new pollination system in orchids. *Plant Systematics and Evolution*, 244, 181-188.
- Jordán, M., y Casaretto, J. (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y ácido jasmónico. *Fisiología Vegetal*.
- Kamil, F. H., Saeed, E. E., El-Tarabily, K. A., y AbuQamar, S. F. (2018). Biological control of mango dieback disease caused by *Lasiodiplodia theobromae* using streptomycete and Non-streptomycete actinobacteria in the United Arab Emirates. *Frontiers in microbiology*, 9, 1-19.

- Khamchatra, N., Dixon, K. W., Tantiwivat, S., y Piapukiew, J. (2016). Symbiotic seed germination of an endangered epiphytic slipper orchid, *Paphiopedilum villosum* (Lindl.) Stein. from Thailand. *South African Journal of Botany*, 104, 76-81.
- Khanna-Chopra, R. (2012). Leaf senescence and abiotic stresses share reactive oxygen species-mediated chloroplast degradation. *Protoplasma*, 249, 469-481.
- Kleifeld, O., y Chet, I. (1992). *Trichoderma harzianum*-interaction with plants and effect on growth response. *Plant and soil*, 144, 267-272.
- Komalavalli, N., y Rao, M. V. (2000). *In vitro* micropropagation of *Gymnema sylvestre*. A multipurpose medicinal plant. *Plant cell, tissue and organ culture*, 61, 97-106.
- Kubicek, C. P., y Harman, G. E. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium*: Basic biology, taxonomy and genetics. *Trends Microbiol.*, 6, 459-460.
- Kwok, O. C. H., Fahy, P. C., Hoitink, H. J., y Kuter, G. A. (1987). Interactions between bacteria and *Trichoderma hamatum* in suppression of *Rhizoctonia* damping-off in bark compost media. *Phytopathology*, 77, 1206-1212.
- Lallana, V. H., Billard, C. E., Martínez, V. A., García, L. F., Barsanti, M. V., Di Persia, J. F., Dalzotto, C., Scimpft, K. M., De La Cruz, V. (2016). Conservación de orquídeas nativas de Entre Ríos utilizando técnicas de cultivo de tejidos “*in vitro*”. *Ciencia, Docencia y Tecnología Suplemento*, 6, 94-121.
- Laredo-Alcalá, E. I., Martínez-Hernández, J. L., Iliná, A., Guillen-Cisneros, L., y Hernández-Castillo, D. (2017). Aplicación de ácido jasmónico como inductor de resistencia vegetal frente a patógenos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8, 673-683.
- Larqué-Saavedra, A., Martín-Mex, R., Nexticapan-Garcéz, Á., Vergara-Yoisura, S., y Gutiérrez-Rendón, M. (2010). Efecto del ácido salicílico en el crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 16, 183-187.
- Larran, S., Simon, M. R., Moreno, M. V., Siurana, M. S., y Perelló, A. (2016). Endophytes from wheat as biocontrol agents against tan spot disease. *Biological control*, 92, 17-23.
- Lee, S. S. (2002). A review of orchid mycorrhizae in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 18, 169-178.

- León-Molina, E. T., y Molina-López, R. L. (2015). Aislamiento y selección de micorrizas con evaluación preliminar de su efecto en la germinación de orquídeas en el orquideario de la Universidad de Cuenca. Tesis de Licenciatura. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Universidad Estatal de Cuenca. Cuenca, Ecuador, 116 pp.
- Leopardi-Verde, C. L. (2014). Sistemática y evolución de *Encyclia* Hook.(Orchidaceae: Laeliinae), con énfasis en Megaméxico III. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. 142 pp.
- Liang, C., Wang, Y., Zhu, Y., Tang, J., Hu, B., Liu, L., y Chu, C. (2014). OsNAP connects abscisic acid and leaf senescence by fine-tuning abscisic acid biosynthesis and directly targeting senescence-associated genes in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 10013-10018.
- Lopez, R. G., y Runkle, E. S. (2005). Environmental physiology of growth and flowering of orchids. *HortScience*, 40, 1969-1973.
- Lopez-Delgado, H., y Scott, I. M. (1997). Induction of *in vitro* tuberization of potato microplants by acetylsalicylic acid. *Journal of Plant Physiology*, 151, 74-78.
- Luna-Valladares, E. C. y Zelaya-Herrera, R. E. (2016). Micropropagación de Orquídeas (*Encyclia adenocarpon*), del bosque seco del pácifico de Nicaragua. Tesis de Licenciatura. Departamento de Biología. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. León, Nicaragua. 72 pp.
- Małolepsza, U., Nawrocka, J., ymj88 Szczech, M. (2017). *Trichoderma virens* 106 inoculation stimulates defence enzyme activities and enhances phenolic levels in tomato plants leading to lowered *Rhizoctonia solani* infection. *Biocontrol Science and Technology*, 27, 180-199.
- Márquez-Benavidez, L., Rizo-León, M. Á., Montaña-Arias, N. M., Ruiz-Nájera, R., y Sánchez-Yáñez, J. M. (2017). Respuesta de *Phaseolus vulgaris* a la inoculación de diferentes dosis de *Trichoderma harzianum* con el fertilizante nitrogenado reducido al 50%. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 8, 135-144.
- Martija-Ochoa, M. (2003). El gran libro de las orquídeas. Ed. De Vecchi. Barcelona, España, 190 pp.

- Martínez-Ruíz, R., Azpíroz-Rivero, H. S., y Cetina-Alcalá, V. M. (2000). Aclimatación de plantas obtenidas *in vitro* de *Eucalyptus urophylla* St Blake y *Eucalyptus grandis* Hill Ex Maiden. *Ra Ximhai*, 1, 591-597.
- Martín-Mex, R., Cauich-Rejón, J. A., Montejo-Canul, E. E., y Quijano-Ramayo, A. (2017). Hongos fitopatógenos asociados a enfermedades en orquídeas cultivadas en la península de Yucatán. *Desde el Herbario CICY*, 9, 203-208.
- McCormick, M. K., Whigham, D. F., y Canchani-Viruet, A. (2018). Mycorrhizal fungi affect orchid distribution and population dynamics. *New Phytologist*, 219, 1207-1215.
- McKendrick, S. L., Leake, J. R., y Read, D. J. (2000). Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. *The New Phytologist*, 145, 539-548.
- Menchaca, R., y Moreno, D. (2011). Manual para la propagación de orquídeas. Comisión Nacional Forestal-México.
- Menchaca-García, R. A., Lozano-Rodríguez, M. Á., y Sánchez-Morales, L. (2012). Estrategias para el aprovechamiento sustentable de las orquídeas de México. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 3, 9-16.
- Meyer, A., Miersch, O., Büttner, C., Dathe, W., y Sembdner, G. (1984). Occurrence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 3, 1-8.
- Micheneau, C., Fournel, J., y Pailler, T. (2006). Bird pollination in an angraecoid orchid on Reunion Island (Mascarene Archipelago, Indian Ocean). *Annals of Botany*, 97, 965-974.
- Mineo, L. (1990). Plant tissue culture techniques. *Tested studies for laboratory teaching*, 11, 151-174.
- Mirani, A. A., Abul-Soad, A. A., y Markhand, G. S. (2017). *In Vitro* rooting of *Dendrobium nobile* orchid: Multiple responses to auxin combinations. *Notulae Scientia Biologicae*, 9, 84-88.

- Mittermeier, R., y Goettsch, C. (1992). La importancia de la diversidad biológica de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, CONABIO, 343 pp.
- Mohali, S., Burgess, T. I., y Wingfield, M. J. (2005). Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *Forest Pathology*, 35, 385-396.
- Mora-Herrera, M. E., y López-Delgado, H. A. (2006). Tolerancia a baja temperatura inducida por ácidos salicílico y peróxido de hidrógeno en microplantas de papa. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29, 81-85.
- Morales-Linares, J., García-Franco, J. G., Flores-Palacios, A., Valenzuela-González, J. E., Mata-Rosas, M., y Díaz-Castelazo, C. (2018). Orchid seed removal by ants in Neotropical ant-gardens. *Plant Biology*, 20, 525-530.
- Morales-Rubio, M. E., Espinosa-Leal, C. A., y Garza-Padrón, R. A. (2016). Cultivo de tejidos vegetales y su aplicación en productos naturales. *OmniaScience Monographs*.
- Morell, F., Hernández, A., Borges, Y., y Marentes, F. L. (2009). La actividad de los hongos micorrízicos arbusculares en la estructura del suelo. *Cultivos Tropicales*, 30, 25-31.
- Moreno-Martínez, D., y Menchaca García, R. A. (2007). Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación *in vitro* de *Stanhopea tigrina* Bateman (Orchidaceae). *Foresta Veracruzana*, 9, 27-32.
- Mosquera-Espinosa, A. T., Bayman, P., y Otero, J. T. (2010). Ceratobasidium como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia. *Acta Agronómica*, 59, 316-326.
- Muir, H. J. (1989). Germination and mycorrhizal fungus compatibility in European orchids. *Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management*, 39-56.
- Mullen, J. M., Gilliam, C. H., Hagan, A. K., y Morgan-Jones, G. (1991). Canker of dogwood caused by *Lasiodiplodia theobromae*, a disease influenced by drought stress or cultivar selection. *Plant Disease*, 75, 886-889.

- Nasib, A., Ali, K., y Khan, S. (2008). An optimized and improved method for the *in vitro* propagation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) using coconut water. *Pak. J. Bot*, 40, 2355-2360.
- Nilsson, L. A. (1992). Orchid pollination biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 7, 255-259.
- Nurfadilah, S., Yulia, N. D., y Ariyanti, E. E. (2016). Morphology, anatomy, and mycorrhizal fungi colonization in roots of epiphytic orchids of Sempu Island, East Java, Indonesia. *Biodiversitas*, 17, 592-603.
- Oliveira, R., Moral, J., Bouhmidi, K., y Trapero, A. (2005). Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la Antracnosis del olivo. *Bol. San. Veg. Plagas*, 31, 531-548.
- Olivera-Ortega, V. Z., Gutiérrez-Espinosa, M. A., Gutiérrez-Espinosa, J. A., y Andrade-Rodríguez, M. (2000). Cultivo *in vitro* de Gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus) y su aclimatación en invernadero. *Bioagro*, 12, 75-80.
- Olmos, S., Luciani, G., y Galdeano, E. (2004). Micropropagación. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Consejo Argentino para la Información y Desarrollo de la Biotecnología. Buenos Aires, 172 pp.
- Ordóñez-Blanco, J. C., y Parrado-Rosselli, Á. (2017). Relación fenología-clima de cuatro especies de orquídeas en un bosque altoandino de Colombia. *Lankesteriana*, 17, 1-15.
- Ordoñez-Castillo, N. F. (2012). Efecto de hongos endófitos de orquídeas del grupo Rhizoctonia y otros endófitos cultivables sobre el desarrollo de plantas de *Vanilla planifolia* Jacks. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia, 73 pp.
- Ortega-Larrocea, M. P., E. Sandoval, C. Ramos y V. M. Chávez-Ávila. (2005). Histological development of *Bletia urbana*: an endangered terrestrial orchid from México. *Selbyana*, 26, 309-315.
- Ortuño, N., Miranda, C., y Claros, M. (2013). Selección de cepas de *Trichoderma* spp. generadoras de metabolitos secundarios de interés para su uso como

- promotor de crecimiento en plantas cultivadas. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 1, 16-32.
- Otero, J. T., Ackerman, J. D., y Bayman, P. (2002). Diversity and host specificity of endophytic Rhizoctonia-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*, 89, 1852-1858.
- Otero, J. T., Bayman Gupta, P., y Ackerman, J. D. (2003). Variación en germinación simbiótica entre semillas de *Tolumnia variegata* y entre hongos micorrízicos. *Lankesteriana*, 3, 145.
- Otero-Ospina, J. T., y Bayman, P. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epífitas. *Acta Agronómica*, 58, 270-276.
- Ousley, M. A., Lynch, J. M., y Whipps, J. M. (1992). Potential of *Trichoderma* spp. as consistent plant growth stimulators. *Biology and Fertility of Soils*, 17, 85-90.
- Pansarin, E. R., Bergamo, P. J., Ferraz, L. J., Pedro, S. R., y Ferreira, A. W. (2018). Comparative reproductive biology reveals two distinct pollination strategies in Neotropical twig-epiphyte orchids. *Plant Systematics and Evolution*, 304, 1-14.
- Pecoraro, L., Girlanda, M., Liu, Z. J., Huang, L., y Perotto, S. (2015). Molecular analysis of fungi associated with the Mediterranean orchid *Ophrys bertolonii* Mor. *Annals of microbiology*, 65, 2001-2007.
- Pegg, K. G., Coates, L. M., Korsten, L., y Harding, R. M. (2003). Foliar, fruits and soilborne diseases. En: A. W. Whiley AW, Schaffer B and Wolstenholme BN (eds.) *The Avocado: Botany, Production, and Uses*. CABI Publishing, UK. 560 pp.
- Peixe, A., Raposo, A., Lourenço, R., Cardoso, H., y Macedo, E. (2007). Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. *Scientia Horticulturae*, 113, 1-7.
- Pelicice, F. M., Dietrich, S. M., & Braga, M. R. (2000). Phytoalexin response of fifteen Brazilian soybean cultivars. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12, 45-53.
- Pérez, A., Sierra, J. R., y Montes, V. D. (2011). Hongos formadores de micorrizas arbusculares: una alternativa biológica para la sostenibilidad de los agroecosistemas de praderas en el caribe colombiano. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 3, 366-385.

- Pérez-García, E. A., y Hágsater, E. (2012). *Encyclia nizanburyi* (Orchidaceae) un nuevo híbrido natural del Istmo de Tehuantepec, México. *Lankesteriana International Journal on Orchidology*, 12, 1-8.
- Phillips, R. D., Peakall, R., Hutchinson, M. F., Linde, C. C., Xu, T., Dixon, K. W., y Hopper, S. D. (2014). Specialized ecological interactions and plant species rarity: The role of pollinators and mycorrhizal fungi across multiple spatial scales. *Biological Conservation*, 169, 285-295.
- Picos-Muñoz, P. A., García-Estrada, R. S., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A., y Allende-Molar, R. (2015). *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: taxonomía, hospedantes, diversidad y control. *Revista mexicana de fitopatología*, 33, 54-74.
- Pierik, R. L. M. (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Madrid: Mundi Prensa.
- Poliszulk, H., Silva, W., Ferrer, M., Betancourt, E., y Rivero, G. (1999). Efectos de distintos tratamientos hormonales en la inducción de raíces adventicias en estacas apicales de "Búcaro" *Bucida buceras*. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 16, 71-75.
- Pölme, S., Bahram, M., Jacquemyn, H., Kennedy, P., Kohout, P., Moora, M., Oja, J., Öpik M., Pecoraro L. y Tedersoo, L. (2018). Host preference and network properties in biotrophic plant-fungal associations. *New Phytologist*, 217, 1230-1239.
- Porras-Alfaro, A., y Bayman, P. (2007). Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *Mycologia*, 99, 510-525.
- Pospóšilová, J., Tichá, I., Kadleček, P., Haisel, D., y Plizáková, Š. (1999). Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum*, 42, 481-497.
- Quintero, I., Polo, J., Jarma, A., y Espitia, A. (2003). Enraizamiento *in vitro* de *Dioscoreas* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5, 51-56.
- Ramírez, J. (1996). Orquídeas de México. *Biodiversitas*, 5, 1-5.

- Rasmussen, H. N., y Rasmussen, F. N. (2018). The epiphytic habitat on a living host: reflections on the orchid-tree relationship. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 186, 456-472.
- Redda, E. T., Ma, J., Mei, J., Li, M., Wu, B., y Jiang, X. (2018). Biological Control of Soilborne Pathogens (*Fusarium oxysporum* F. Sp. Cucumerinum) of Cucumber (*Cucumis sativus*) by *Trichoderma* sp. *Journal of Life Sciences*, 12, 1-12.
- Roca, W. M., y Mroginski, L. A. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 970 pp.
- Rojo, F. G., Reynoso, M. M., Ferez, M., Chulze, S. N. y Torres, A. M. (2007). Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop Prot.*, 26, 549-555.
- Rosa-Manzano, E. D. L., Andrade, J. L., Zotz, G., y Reyes-García, C. (2014). Respuestas fisiológicas a la sequía, de cinco especies de orquídeas epífitas, en dos selvas secas de la península de Yucatán. *Botanical Sciences*, 92, 607-616.
- Royero, M., Vargas, T. E., y Oropeza, M. (2007). Micropropagación y organogénesis de *Dioscorea alata* (ñame). *Interciencia*, 32, 247-252.
- Rubini, M. R., Silva-Ribeiro, R. T., Pomella, A. W., Maki, C. S., Araújo, W. L., Dos Santos, D. R., y Azevedo, J. L. (2005). Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosus*, causal agent of Witches Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences*, 1, 24-33.
- Ruiz, B. C., Laguna, C. A., Iglesias, A. L. G., Damon, A., Marín, H. T. N. J., Azpíroz, R. H. S., y Moreno, M. J. L. (2008). Germinación *in vitro* de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae). *Phyton*, 77, 203-215.
- Sabja, A. M., Ortiz, O., y Triviño, C. (2008). Avances de clonación *in vitro* de árboles adultos de raulí (*Nothofagus alpina* Poepp. et Endl.) para propagación comercial. *Agrociencia*, 42, 595-603.
- Sahebani, N., y Hadavi, N. (2008). Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 2016-2020.

- Salazar-Casasa, W., Rivera-Coto, G., y Corrales-Moreira, G. (2007). Comparación de los problemas fitosanitarios en orquídeas de poblaciones silvestres y de cultivo, como evaluación de riesgos de plagas o epidemias. *Lankesteriana International Journal on Orchidology*, 7, 362-367.
- Salazar-Cerezo, S., Martínez-Montiel, N., Cruz-Lopez, M. D. C., y Martínez-Contreras, R. D. (2018). Fungal diversity and community composition of culturable fungi in *Stanhopea tigrina* cast gibberellin producers. *Frontiers in microbiology*, 9, 1-15.
- Saldarriaga-Cardona, A., Castaño-Zapata, J., y Arango-Isaza, R. (2008). Caracterización del agente causante de la antracnosis en tomate de árbol, manzano y mora. *Rev. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 32, 145-156.
- Salisbury, F., y Ross, C. (2000). Fisiología vegetal: desarrollo de las plantas y fisiología ambiental. España: Thomson editores Paraninfo.
- Sánchez, G. R., Mercado, E. C., de la Cruz, H. R., y Pineda, E. G. (2010). El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico-Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 12, 90-95.
- Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, Y. K. M., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M. C., y Macías-Rubalcava, M. L. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16, 132-146.
- Santelices, R. (2007). Efecto del ácido indolbutírico (AIB) y de la presencia de hojas en el arraigamiento de estacas de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser cosechadas en dos épocas diferentes. *Ecología austral*, 17, 151-158.
- Santos-Díaz, M. S. y Carranza-Álvarez, C. (2009). Plant regeneration through direct shoot formation from leaf cultures and from protocorm-like bodies derived from callus of *Encyclia mariae* (Orchidaceae), a threatened Mexican orchid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45, 162-170.

- Schäfer, M., Brütting, C., Meza-Canales, I. D., Grobkinsky, D. K., Vankova, R., Baldwin, I. T., y Meldau, S. (2015). The role of cis-zeatin-type cytokinins in plant growth regulation and mediating responses to environmental interactions. *Journal of experimental botany*, 66, 4873-4884.
- Schiestl, F. P., Ayasse, M., Paulus, H. F., Löfstedt, C., Hansson, B. S., Ibarra, F., y Francke, W. (2000). Sex pheromone mimicry in the early spider orchid (*Ophrys sphegodes*): patterns of hydrocarbons as the key mechanism for pollination by sexual deception. *Journal of comparative physiology A*, 186, 567-574.
- Schweiger, J. M. I., Bidartondo, M. I., y Gebauer, G. (2018). Stable isotope signatures of underground seedlings reveal the organic matter gained by adult orchids from mycorrhizal fungi. *Functional Ecology*, 32, 870-881.
- Segarra-Manzano, S. (2007). Función del ácido salicílico en la floración acelerada por estrés en *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Doctorado. Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 182 pp.
- Segovia-Rivas, A., Meave, J. A., González, E. J., y Pérez-García, E. A. (2018). Experimental reintroduction and host preference of the microendemic and endangered orchid *Barkeria whartonia* in a Mexican Tropical Dry Forest. *Journal for Nature Conservation*, 43, 156-164.
- Selosse, M. A. (2014). The latest news from biological interactions in orchids: in love, head to toe. *New Phytologist*, 202, 337-340.
- Semarnat (2010). NOM-059-SEMARNAT-2010 "Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo". Diario Oficial de la Federación. México.
- Shahzad, A., Sharma, S., Parveen, S., Saeed, T., Shaheen, A., Akhtar, R., Yadav, V., Upadhyay, A. y Ahmad, Z. (2017). Historical perspective and basic principles of plant tissue culture. En: *Plant biotechnology: principles and applications*, 1-36). Springer, Singapore.
- Shaw, S., Le Cocq, K., Paszkiewicz, K., Moore, K., Winsbury, R., de Torres Zabala, M., y Grant, M. R. (2016). Transcriptional reprogramming underpins enhanced plant growth promotion by the biocontrol fungus *Trichoderma hamatum* GD12

- during antagonistic interactions with *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Molecular plant pathology*, 17, 1425-1441.
- Shimura, H., Masuta, C., y Koda, Y. (2018). Metagenomic analyses of the viruses detected in mycorrhizal fungi and their host orchid. En: Pantaleo V., Chiumenti M. (eds) Viral Metagenomics. *Methods in Molecular Biology*, 1746. Humana Press, New York, NY.
- Silva, L. A. A., Castro, B. B., Motta, N. L., Pereira, V. R., Erthal, A. P. R. C., Manhães, N. E., y Jasmim, J. M. (2013). Loofah Fiber and *Sphagnum* Moss in the acclimatization of *Cattleya guttata* and *Zygopetalum mackayi* inoculated with Plant Growth-Promoting Bacteria. In II International Symposium on Organic Matter Management and Compost Use in Horticulture 1076 (pp. 113-118).
- Skoog, F., y Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11, 118-131.
- Smith, Z. F., James, E. A., y Mclean, C. B. (2007). Experimental reintroduction of the threatened terrestrial orchid *Diuris fragrantissima*. *Lankesteriana International Journal on Orchidology*, 7, 1-2.
- Solano-Gómez, R., Bello-López, R., y Vásquez-Martínez, A. (2007). Listado de las orquídeas de la región de Juquila, Oaxaca, México. *Naturaleza y Desarrollo*, 5, 5-4.
- Soto-Arenas, M. A., Solano-Gómez, R., y Hágsater, E. (2007). Risk of extinction and patterns of diversity loss in Mexican orchids. *Lankesteriana International Journal on Orchidology*, 7, 1-2.
- Steege, H. T., y Cornelissen, J. H. C. (1989). Distribution and ecology of vascular epiphytes in lowland rain forest of Guyana. *Biotropica*, 21, 331-339.
- Stejskal, K., Streinzer, M., Dyer, A., Paulus, H. F., y Spaethe, J. (2015). Functional significance of labellum pattern variation in a sexually deceptive orchid (*Ophrys heldreichii*): evidence of individual signature learning effects. *PloS one*, 10, 1-18.
- Stewart, S. L., y Zettler, L. W. (2002). Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinquiseta*, *H. macroceratitis*) from Florida. *Aquatic Botany*, 72, 25-35.

- Subedi, A., Kunwar, B., Choi, Y., Dai, Y., van Andel, T., Chaudhary, R. P., Boer, H., y Gravendeel, B. (2013). Collection and trade of wild-harvested orchids in Nepal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 9, 64-74.
- Taylor D.L., Bruns T.D., Leake J.R., y Read D.J. (2002) Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. En: van der Heijden M.G.A., Sanders I.R. (eds) *Mycorrhizal Ecology. Ecological Studies (Analysis and Synthesis)*, 157. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Tejeda-Sartorius, O., Téllez-Velasco, M. A. A., y Trejo-Téllez, L. I. (2017). Características ornamentales de orquídeas silvestres y su propagación con fines comerciales. Alternativa de aprovechamiento sustentable *ex situ*. *Agroproductividad*, 10, 37-45.
- Téllez, M. D., y Casanova, P. L. (2014). El cultivo de tejidos vegetales: herramienta para la conservación de orquídeas amenazadas. *Biodiversitas*, 117, 13-16.
- Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37, 169-180.
- Tinoco Juárez, M. S., y Mata Rosas, M. (2007). Adquisición de competencia para la micropropagación de *Stanhopea tigrina*, *Laelia anceps*, *Epidendrum veroscriptum* y *Cattleya x esbetts* (Orchidaceae). *Lankesteriana*, 7, 404-418.
- Trejo-Aguilar, D. (2018). Efecto de la micorriza arbuscular en plantas de café (*Coffea arabica* L.) infectadas por el nematodo de la corchosis de la raíz. *Agro Productividad*, 11, 98-104.
- Tsavkelova, E. A., Cherdyntseva, T. A., Botina, S. G., y Netrusov, A. I. (2007). Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiological Research*, 162, 69-76.
- Tsavkelova, E. A., Cherdyntseva, T. A., Botina, S. G., y Netrusov, A. I. (2007). Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiological Research*, 162, 69-76.
- Tsavkelova, E. A., Egorova, M. A., Leontieva, M. R., Malakho, S. G., Kolomeitseva, G. L., y Netrusov, A. I. (2016). *Dendrobium nobile* Lindl. seed germination in co-cultures with diverse associated bacteria. *Plant growth regulation*, 80, 79-91.

- Tsukada, K., Takahashi, K., & Nabeta, K. (2010). Biosynthesis of jasmonic acid in a plant pathogenic fungus, *Lasiodiplodia theobromae*. *Phytochemistry*, *71*, 2019-2023.
- Ubalua, A. O., y Nsofor, G. C. (2017). The role of supporting substrates in *ex vitro* acclimatization and growth of tissue cultured cassava plantlets. *Plant Knowledge Journal*, *6*, 1-6.
- Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Guerrero, J. C., Guevara, J., y Gubler, W. D. (2008). Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease*, *92*, 519-529.
- Valencia-Chona, J. A. (2013). Evaluación de *Penicillium janthinellum* como promotor de crecimiento de la planta de arroz (*Oryza sativa*). Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia, 115 pp.
- Valenzuela, N. L., y Armendáriz, E. S. (2000). Use of antibiotics in culture media to reduce the presence of poluting agents during in vitro propagation of date palm. (*Phoenix dactylifera*). *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, *1*, 47-50.
- Van Ginderdeuren-Raveschot, V. (2009). Aclimatación de plántulas de *Chloraea virescens* (Willd.) Lindl. cultivadas *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Escuela de Agronomía. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 67 pp.
- Van Niekerk, J. M., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Fourie, P. H., y Halleen, F. (2004). DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia*, *96*, 781-798.
- Vega, A. (2009). Efecto de la preaclimatación in vitro sobre la supervivencia en invernadero de tres plantas micropropagadas. Tesis de Doctorado. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacán, México. 67 pp.
- Villanueva-Couoh, E., Alcántar-González, G., Sánchez-García, P., Soria-Fregoso, M., y Larque-Saavedra, A. (2009). Efecto del ácido salicílico y dimetilsulfóxido en la floración de [*Chrysanthemum morifolium* (Ramat) Kitamura] en Yucatán. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, *15*, 25-31.
- Villaseñor, J. L. (2016). Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *87*, 559-902.

- Vovides, A. P., Luna, V., y Medina, G. (1997). Relación de algunas plantas y hongos mexicanos raros, amenazados o en peligro de extinción y sugerencias para su conservación. *Acta Botanica Mexicana*, 39, 1-42.
- Wang, C., Liu, H., Li, J., y Sun, H. (2014). Degradation of PAHs in soil by *Lasiodiplodia theobromae* and enhanced benzo [a] pyrene degradation by the addition of Tween-80. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 10614-10625.
- Wang, Y. T. (1998). Deferring flowering of greenhouse-grown Phalaenopsis orchids by alternating dark and light. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123, 56-60.
- Wang, Y. T. (2008). High NO<sub>3</sub>-N to NH<sub>4</sub>-N ratios promote growth and flowering of a hybrid Phalaenopsis grown in two root substrates. *Hortscience*, 43, 350-353.
- Widama-Utami, E. S., Hariyanto, S., y Manuhara, S. W. (2017). *In vitro* propagation of the endangered medicinal orchid, *Dendrobium lasianthera* JJ Sm through mature seed culture. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7, 406-410.
- Wilkinson, K. G., Dixon, K. W., Sivasithamparam, K., y Ghisalberti, E. L. (1994). Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria. *Plant and soil*, 159, 291-295.
- Wilkinson, K. G., Dixon, K. W., y Sivasithamparam, K. (1989). Interaction of soil bacteria, mycorrhizal fungi and orchid seed in relation to germination of Australian orchids. *New Phytologist*, 112, 429-435.
- Yam, T. W., Chua, J., Tay, F., y Ang, P. (2010). Conservation of the native orchids through seedling culture and reintroduction-A Singapore experience. *The Botanical Review*, 76, 263-274.
- Yamada, K., Nishimura, M., y Hara-Nishimura, I. (2004). The slow wound-response of γVPE is regulated by endogenous salicylic acid in *Arabidopsis*. *Planta*, 218, 599-605.
- Yedidia, I., Srivastva, A. K., Kapulnik, Y., y Chet, I. (2001). Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and soil*, 235, 235-242.

- Yoder, J. A., Zettler, L. W., y Stewart, S. L. (2000). Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. *Plant Science*, 156, 145-150.
- Yong, J. W., Ge, L., Ng, Y. F., y Tan, S. N. (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*, 14, 5144.
- You, J., Zhang, J., Wu, M., Yang, L., Chen, W., y Li, G. (2016). Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. *Biological Control*, 101, 31-38.
- Zavala-León, M. J., Tun-Suárez, J. M., Cristóbal-Alejo, J., Ruiz-Sánchez, E., Gutiérrez-Alonso, O., Vázquez-Calderón, M., y Méndez-González, R. (2005). Control postcosecha de la antracnosis en papaya y sensibilidad de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. a fungicidas organosintéticos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 11, 251-255.
- Zeng, S., Huang, W., Wu, K., Zhang, J., Teixeira da Silva, J. A., y Duan, J. (2016). *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchids. *Critical reviews in biotechnology*, 36, 521-534.
- Zettler, L. W. y Hofer, C. J. (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., Stewart, S. L., Bowles, M. L., y Jacobs, K. A. (2001). Mycorrhizal fungi and cold-assisted symbiotic germination of the federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea* (Nuttall) Lindley. *The American Midland Naturalist*, 145, 168-175.
- Zettler, L. W., y Corey, L. L. (2018). Orchid Mycorrhizal Fungi: Isolation and Identification Techniques. En: Lee Y. I., Yeung E. T. (eds) *Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses-Methods and Protocols*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press, New York, NY.
- Znanięcka, J., Królicka, A., Sidwa-Gorycka, M., Rybczynski, J. J., Szlachetko, D. L., y Lojkowska, E. (2005). Asymbiotic germination, seedling development and plantlet propagation of *Encyclia* aff. *oncidoides* an endangered orchid. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 74, 193-198.

## ANEXOS

### Anexo I. Formulación y preparación del agar PDA

El agar papa dextrosa (Potato Dextrose Agar, PDA, por sus siglas en inglés) es un medio de propósito general para levaduras y mohos que puede ser suplementado con antibióticos para inhibir el crecimiento bacteriano. La base (infusión de papa) nutricionalmente rica, estimula la esporulación de los hongos. La formulación para su elaboración es la siguiente:

#### Fórmula para un litro:

Infusión de Papa a partir de 250 g .....	4 g*
Dextrosa .....	20 g
Agar bacteriológico .....	15 g

\*4.0 g de extracto de papa es equivalente a 200 g de infusión de papas.

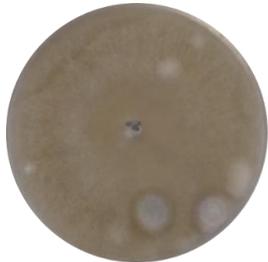
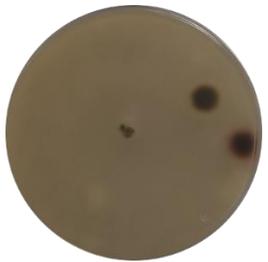
pH Final:  $5,6 \pm 0,2$  a  $25^{\circ}\text{C}$

La fórmula puede ser ajustada y/o suplementada de acuerdo con los requerimientos para cumplir con las especificaciones de rendimiento o desempeño.

El procedimiento para su elaboración es el siguiente:

1. Suspender 39 g del medio de cultivo en un litro de agua purificada
2. Caliente agitando frecuentemente y permita que hierva por un minuto para disolver completamente el medio.
3. Esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

Anexo II. Aspecto macroscópico e identificación morfológica de los hongos aislados de *Encyclia parviflora*

Origen de la muestra	Aspecto macroscópico		Identificación morfológica*
	Anverso de la caja de Petri	Reverso de la caja de Petri	
Raíz			<p>El aspecto de la colonia inició con un color blanco y posterior a los cuatro días fue adquiriendo una coloración final verde claro. La textura de la colonia presentó un aspecto polvoso. El revés de la colonia resulto amarillo.</p> <p><b>Género sugerido:</b> <i>Trichoderma</i> sp.</p>
			<p>El aspecto de la colonia inició con un color blanco y posterior a los cuatro días fue adquiriendo una coloración final verde oscuro. La textura de la colonia presentó un aspecto polvoso. El revés de la colonia resulto de un aspecto verdoso.</p> <p><b>Género sugerido:</b> <i>Trichoderma</i> sp.</p>
			<p>El aspecto de la colonia presentó un color blanco. La textura presentó un aspecto algodonoso. El revés de la colonia resultó incoloro.</p> <p><b>Genero sugerido:</b> <i>Penicillium</i> sp.</p>

Pseudobulbo



El aspecto de la colonia presentó un color negro. La textura presentó un aspecto algodonoso debido al gran desarrollo de micelio. En cuanto al revés de la colonia, resultó de un color negro intenso.

**Genero sugerido:**  
*Rhizopus* sp.



El aspecto de la colonia presentó un color blanco, con anillos de crecimiento evidentes. La textura presentó un aspecto aterciopelado. El revés de la colonia resultó en un color amarillo-cremoso.

**Genero sugerido:**  
*Penicillium* sp.



El aspecto de la colonia presentó un color blanco con crecimiento de micelio aéreo de textura algodonosa y una producción de acérvulos pequeños de color negro. El revés de la colonia resultó trasparente.

**Genero sugerido:**  
*Colletotrichum* sp.

Hoja



El aspecto de la colonia presentó un color blanco. La textura presentó un aspecto aterciopelado. El revés de la colonia resultó de un color crema-amarillento.

**Genero sugerido:**  
*Penicillium* sp.



El aspecto de la colonia presentó un color negro con orillas café. La textura presentó un aspecto algodonoso debido al gran desarrollo de micelio. En cuanto al revés de la colonia, resultó de un color negro con el contorno café claro.

**Genero sugerido:**

*Curvularia* sp.



El aspecto de la colonia presentó un color negro con puntos blancos. La textura presentó un aspecto algodonoso. El revés de la colonia resultó de un aspecto negro/café.

**Genero sugerido:**

*Rhizopus* sp.



El aspecto de la colonia presentó un color blanco. La textura presentó un aspecto algodonoso. El revés de la colonia resultó gris.

**Genero sugerido:**

*Penicillium* sp.

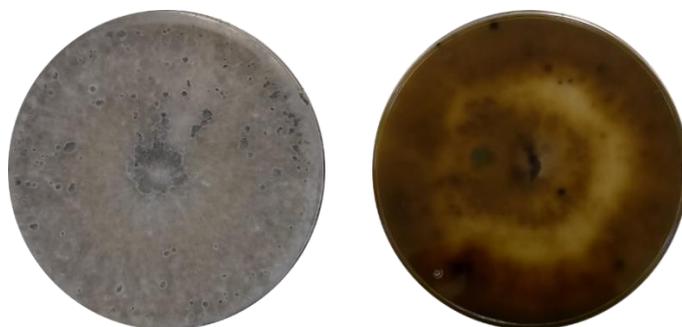
Anexo III. Aspecto macroscópico e identificación morfológica de los hongos aislados de *Stanhopea tigrina*

Origen de la muestra	Aspecto macroscópico		Identificación morfológica
	Anverso de la caja de Petri	Reverso de la caja de Petri	
Raíz			<p>El aspecto de la colonia presentó un color verde característico del género. La textura presentó un aspecto polvoroso, indicios del comienzo de la esporulación. El revés de la colonia resultó de un aspecto color crema transparente.</p> <p><b>Género sugerido:</b> <i>Trichoderma</i> sp.</p>
			<p>El aspecto de la colonia presentó un color verde. La textura presentó un aspecto polvoroso, indicios del comienzo de esporulación. El revés de la colonia resultó de un aspecto color crema transparente.</p> <p><b>Género sugerido:</b> <i>Trichoderma hamatum</i>*</p>

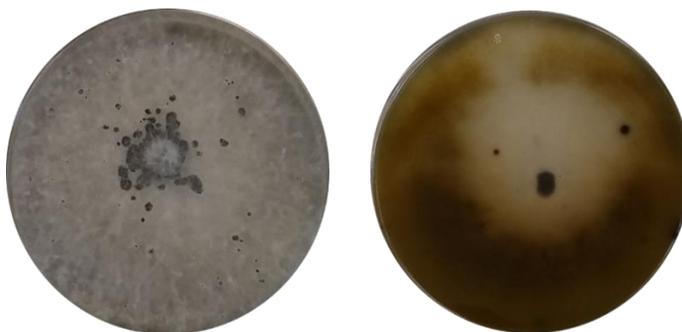


El aspecto de la colonia presentó un color negro blanco algodonoso, posterior a los siete días comenzó a adquirir el color verde (no presentado) característico del género. El revés de la colonia resultó de un aspecto color crema transparente.  
**Genero sugerido:**  
*Trichoderma* sp.

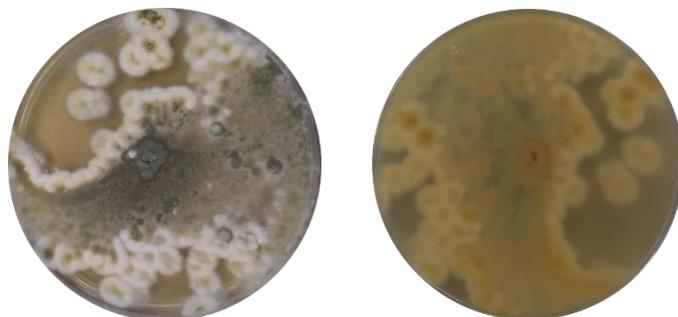
Pseudobulbo



El aspecto de la colonia presentó un color blanco grisáceo, con textura aterciopelada. El revés de la colonia produjo una pigmentación color café oscuro.  
**Genero sugerido:**  
*Fusarium* sp.



El aspecto de la colonia presentó un color blanco grisáceo. El revés de la colonia produjo una pigmentación color café oscuro.  
**Genero sugerido:**  
*Fusarium* sp.



El aspecto de la colonia presentó un color verdoso con estructuras blancas con aspecto algodonoso. El revés de la colonia resultó en una pigmentación de color café claro con bordes amarillentos.  
**Genero sugerido:**  
*Penicillium* sp.

Hoja



El aspecto de la colonia presentó un color negro con crecimiento de micelio aéreo. El revés de la colonia produjo una pigmentación de color negro intenso.  
**Genero sugerido:**  
*Lasiodiplodia theobromae*\*



El aspecto de la colonia presentó un color blanco, con textura de aspecto algodonoso. El revés de la colonia resultó de un aspecto café claro.  
**Genero sugerido:**  
*Penicillium* sp.

\*Especies confirmadas mediante secuenciación molecular.