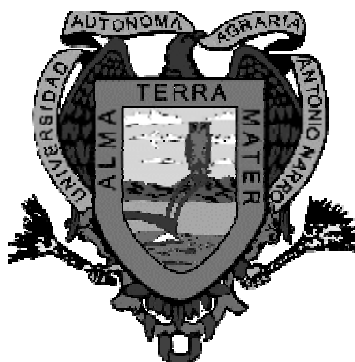


UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA



**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS
DE ORQUÍDEAS EPÍFITAS DE LA REGIÓN DEL SOCONUSCO,
CHIAPAS”**

POR:

JOSE LUIS LARA FUENTES

TESIS

**PRESENTAD COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:**

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Buena Vista, Saltillo, Coahuila, México.

Marzo del 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

TESIS

PRESENTADA POR:

JOSE LUIS LARA FUENTES

Que somete a consideración del H. Jurado Examinador como
Requisito Parcial para Obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

APROBADA POR:

Dr. Manuel De La Rosa Ibarra

Presidente

Dr. Víctor Olalde Portugal

Asesor Externo

Dra. Anne Ashby Damon Beale

Asesor Externo

Q.B.P. Gloria León Martínez

Sinodal

M.C. Arnoldo Oyervides García
Coordinador de la División de Agronomía

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Marzo del 2006

AGRADECIMIENTOS

Al DR. VÍCTOR OLALDE PORTUGAL por su participación en la realización de este trabajo y por sus sugerencias aportadas.

A la Dra. ANNE ASHBY DAMON BEALE por su apoyo y colaboración al realizar esta investigación.

A la Q.B.P. GLORIA LEÓN MARTÍNEZ por su participación y apoyo en la realización de este trabajo.

Al DR. MANUEL DE LA ROSA IBARRA por su asesoría y apoyo en este escrito.

A la M. C. Rosalinda Serrato Flores por su colaboración en este trabajo.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional – Unidad Irapuato.

A mi querida Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” por albergarme durante mi estancia como estudiante y por formarme como profesionista.

GRACIAS SEÑOR

*Gracias Señor por el día de hoy...
por darme salud y una familia...
que me permiten crecer en plenitud...
para vivir dándome con amor...*

*Gracias Señor, por el día de hoy...
que no sea ciego, que vea claramente...
quiénes necesitan de mi...
aunque sea una sonrisa... mi tiempo...*

*Gracias Señor, por el día de hoy...
por darme el don de la vida...
permíteme ver claramente mi misión...
quiero gastarme lentamente en ti...*

Gracias Señor por el día de hoy...

*por darme y darles esta satisfacción a mis padres...
por permitirme dar un paso mas en mi vida...*

Gracias por todo Señor... Gracias Señor...

DEDICATORIA

A MIS PADRES

**Ma. Guadalupe Fuentes Sosa
Víctor Lara Martínez**

A los dos seres tan maravillosos que me dieron la vida, que desde pequeño me cuidaron y me han guiado por el camino de mi existencia, a ellos que siempre han estado a mi lado, aconsejándome y apoyándome incondicionalmente, a ellos que me han enseñado que para llegar a ser alguien hay que hacer las cosas con dedicación, respeto y amor, que el trabajo, los valores, la responsabilidad y la honestidad son parte de la persona.

Gracias mamá y papá

Los amo...

A MIS HERMANOS

**Víctor Manuel Lara Fuentes
Aldo Joab Lara Fuentes**

A mis incondicionales amigos, a ellos que siempre han estado conmigo, apoyándome y alentándome para seguir adelante.

Los amo...

A mis familiares, amigos y a aquellas personas que me han apoyado y han estado a mi lado.

Gracias...

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Víctor Olalde Portugal (CINVESTAV-Unidad Irapuato) y la Dra. Anne Ashby Damon Beale

(ECOSUR-Unidad Tapachula). La investigación que aquí se presenta pertenece al proyecto “Restauración y aprovechamiento sustentable de las orquídeas del Soconusco, Chiapas”, CONACYT-SEMARNAT 2002-C01-0697 (2003-2006).

ÍNDICE

CONTENIDO

PÁGINA

INDICE DE TABLAS

INDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo General.....	4
2.2 Objetivos Específicos.....	4
3. HIPOTESIS.....	5

4. ANTECEDENTES.....	6
4.1 Importancia del uso de Microorganismos.....	6
4.1.1 Asociación Micorrícica.....	7
4.1.2 Tipos de Asociaciones Micorrícicas.....	8
4.2 La Familia Orchidaceae.....	9
4.2.1 Tipos de Orquídeas.....	11
4.2.2 Ciclo de Vida de las Orquídeas.....	12
4.3 Simbiosis Micorrícica en Orquídeas.....	14
4.3.1 Hongos Micorrícicos de Orquídeas.....	14
4.4 Métodos de Identificación de Hongos.....	15
4.4.1 Técnicas Moleculares para la Identificación de Hongos.....	16
4.4.1.1 Técnicas Bioquímicas y Serológicas.....	16
4.4.1.2 Técnicas basadas en DNA.....	17
4.4.1.2.1 Amplificación Inespecífica del Polimorfismo del DNA (RAPDs)..	18
4.4.1.2.2 Ventajas y Desventajas de los RAPDs.....	20
4.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
5.1 Sitio de Colecta.....	23
5.2 Colecta de Material Vegetal.....	24
5.3 Tinción de Raíces.....	25
5.4 Desinfección de Raíces.....	26
5.5 Siembra de Raíces.....	26
5.6 Siembra de Corteza.....	26
5.7 Aislamiento de Hongos.....	27
5.8 Aislamiento de Bacterias.....	27
5.9 Microcultivo de Hongos.....	28
5.10 Identificación Morfológica Microscópica de Hongos.....	31
5.11 Identificación Molecular de Hongos mediante RAPDs.....	31
5.12 Tinción Gram de Bacterias.....	34
5.13 Antibiogramas de Bacterias.....	34
6. RESULTADOS.....	36

6.1 Tinción de Raíces.....	36
6.2 Identificación Morfológica Microscópica de los Hongos.....	38
6.3 Identificación Molecular de los Hongos mediante RAPDs.....	45
6.3.1 PCR-RAPDs con el iniciador OPC8.....	46
6.3.1.1 PCR-RAPDs de <i>Rhizoctonia sp.</i> con el iniciador OPC8.....	47
6.3.1.2 PCR-RAPDs de <i>Trichoderma sp.</i> con el iniciador OPC8.....	48
6.3.1.3 PCR-RAPDs de <i>Fusarium sp.</i> con el iniciador OPC8.....	49
6.3.1.4 PCR-RAPDs de <i>Aspergillus sp.</i> con el iniciador OPC8.....	51
6.3.1.5 PCR-RAPDs de <i>Sclerotium sp.</i> y <i>Penicillium sp.</i> con el iniciador OPC8.....	52
6.3.2 PCR-RAPDs con el iniciador OPC11.....	52
6.3.2.1 PCR-RAPDs de <i>Rhizoctonia sp.</i> con el iniciador OPC11.....	53
6.3.2.2 PCR-RAPDs de <i>Trchoderma sp.</i> con el iniciador OPC11.....	54
6.3.2.3 PCR-RAPDs de <i>Fusarium sp.</i> con el iniciador OPC11.....	56
6.3.2.4 PCR-RAPDs de <i>Aspergillus sp.</i> con el iniciador OPC11.....	57
6.3.2.5 PCR-RAPDs de <i>Sclerotium sp.</i> y <i>Penicillium sp.</i> con el iniciador OPC11.....	58
6.3.3 PCR con los iniciadores específicos para <i>Rhizoctonia solani</i> PC1F y PC1R.....	58
6.4 Tinción Gram y Antibiogramas de Bacterias.....	59
7. DISCUSIÓN.....	63
8. CONCLUSIONES.....	67
9. PERSPECTIVAS.....	68
10. LITERATURA CITADA.....	69
11. APENDICES.....	73

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los aislados de <i>Guarianthe aurantiaca</i> por medio de la morfología microscópica.....	39
Tabla 2. Clasificación de los aislados de <i>Notylia barkeri</i> por medio de la morfología microscópica.....	40
Tabla 3. Clasificación de los aislados de <i>Trichocentrum oerstedii</i> por medio de morfología microscópica.....	41
Tabla 4. Clasificación de los aislados de <i>Stelis aeolica</i> por medio de morfología microscópica.....	42
Tabla 5. Clasificación de los aislados de <i>Anasthallis racemifolia</i> por medio de morfología microscópica.....	43
Tabla 6. Clasificación de los aislados de <i>Erycina crista galli</i> por medio de morfología microscópica.....	43
Tabla 7. Patrón de resistencia a diferentes antibióticos de las bacterias aisladas.....	60
Tabla 8. Resumen de la resistencia de las bacterias a antibióticos y tinción Gram.....	61

INDICE DE FIGURAS

- Fig.1, *Anathallis racemiflora*, Fig. 2, *Guarianthe aurantiaca*,
Fig.3, *Erycina crista galli*, tres especies de orquídeas
epífitas características de la región del Soconusco, Chiapas.....13**
- Fig. 4. Técnica de RAPDs. En esta figura se muestran
los pasos y el fundamento básico de la técnica de RAPDs.....19**
- Fig. 5. Secuencia de pasos que se realizan en la técnica de
la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....22**
- Fig. 6. Mapa en el cual se observan las diferentes regiones
del estado de Chiapas, entre ellas se encuentra la región
del Soconusco, región en la cual se colectaron las diferentes
especies de orquídeas.....23**
- Fig. 7 y 8. Plántulas de *Notylia barkeri* y *Stelis aeolica*, dos
de las especies colectadas en el ejido Santo Domingo, Chiapas.....24**
- Fig. 9. Se muestra una de las bacterias aisladas y puras
obtenidas de la siembra de la corteza adjunta a las
raíces de las orquídeas.28**
- Fig.10. *Fusarium sp.* y Fig.11. *Trichoderma sp.*, cepas puras
aisladas de las raíces de orquídeas procesadas.....30**
- Fig. 12. Antibiograma de bacteria aislada. En la foto se
pueden observar los halos de inhibición resultado de la
resistencia de los antibióticos a la bacteria.....35**
- Fig. 13. Enrollamiento de hifa formando un pelotón teñido
con Fucsina ácida.....36**

- Fig. 14. Hifa abriéndose camino entre las células corticales de la raíz, tinción realizada con Negro clorazol.....37**
- Fig. 15. Pelotones teñidos con Azul de tripano dentro de las células de las raíces.....37**
- Fig. 16. Amplificaciones obtenidas para *Rhizoctonia sp.* con el iniciador OPC 8 , M es el marcador *Pst I*, 1 cepa aislada de *Guarjanthe aurantiaca*, 2 cepa aislada de *Notylia barkeri*, 3, 4, 5, 6 y 7 cepas obtenidas de *Erycina crista galli*.....46**
- Fig. 17. Amplificaciones obtenidas para *Trichoderma sp.* con el iniciador OPC 8, M es el marcador *Pst I*, 1 y 2 son las cepas obtenidas de *Notylia barkeri*, 3, 4 y 5 se aislaron de *Trichocentrum oerstedii*, 6, 7, 8 y 9 de *Stelis aeolica*, y 10 de *Anasthallis racemifolia*.....47**
- Fig. 18. Bandas obtenidas para *Fusarium sp.* con el iniciador OPC 8. M es el marcador de peso molecular *Pst I*, 1 es la cepa aislada de *Guarjanthe aurantiaca*, 2 es el aislado de *Notylia barkeri*, 3 cepa adquirida de *Trichocentrum oerstedii*, 4 y 5 aislados de *Erycina crista galli*.....49**
- Fig. 19. Bandas obtenidas de dos cepas de *Aspergillus sp.* con el iniciador OPC 8, M es el marcador *Pst I*, 1 aislado de *Trichocentrum oerstedii* y 2 cepa adquirida de *Erycina crista galli*.....50**
- Fig. 20. Bandas obtenidas de dos cepas, una *Sclerotium sp.*, 1, y la otra *Penicillium sp.*, 2,. M es el marcador de peso molecular *Pst I*, 1 cepa adquirida de *Guarjanthe aurantiaca*, 2 aislado de *Stelis aeolica*.....51**
- Fig. 21. Amplificaciones obtenidas para *Rhizoctonia sp.* con el iniciador OPC 11. M es el marcador de peso molecular *Pst I*, 1 aislado *Guarjanthe aurantiaca*, 2 cepa aislada de *Notylia barkeri*, 3, 4, 5, 6 y 7 cepas obtenidas de *Erycina crista galli*.....53**
- Fig. 22. Bandas obtenidas de *Trichoderma sp.* con el iniciador**

OPC 11. M es el marcador de peso molecular *Pst I*, 1 y 2 son las cepas obtenidas de *Notylia barkeri*, 3, 4 y 5 se aislaron de *Trichocentrum oerstedii*, 6, 7, 8 y 9 de *Stelis aeolica*, y 10 de *Anasthallis racemifolia*.....54

Fig. 23. Amplificaciones obtenidas de *Fusarium sp.* con el iniciador OPC 11. M es el marcador de peso molecular *Pst I*, 1 es la cepa aislada de *Guarianthe aurantiaca*, 2 es el aislado de *Notylia barkeri*, 3 cepa adquirida de *Trichocentrum oerstedii*, 4 y 5 aislados de *Erycina crista galli*.....55

Fig. 24. Bandas obtenidas de las cepas de *Aspergillus sp.* con el iniciador OPC 11. M es el marcador *Pst I*, 1 aislado de *Trichocentrum oerstedii* y 2 cepa adquirida de *Erycina crista galli*.....56

Fig. 25. Amplificaciones obtenidas de las cepas de *Sclerotium sp.* y *Penicillium sp.* con el iniciador OPC 11. M es el marcador de peso molecular *Pst I*, 1 cepa preidentificada como *Sclerotium sp.*, aislada de *Guarianthe aurantiaca*, 2 aislado de *Penicillium sp.* obtenido de *Stelis aeolica*.....57

1. INTRODUCCIÓN.

La familia Orchidaceae es una de las más diversas en el Reino Vegetal, posee entre 17,000 y 35,000 especies, y desde el punto de vista estructural, es una de las más avanzadas de las monocotiledoneas. Las orquídeas son plantas que se distribuyen en las distintas regiones del mundo, desde las regiones polares, hasta las tropicales y subtropicales, pero alrededor del 80% de las especies se encuentran en los trópicos y regiones con climas templados (Granbizu y Todmann, 1997; Pridgeon *et al.*, 2001).

En México se encuentran 144 géneros y 1,200 especies de orquídeas, las cuales distribuyen en las regiones tropicales y templadas del país, con especial abundancia en los estados de Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Guerrero, Morelos, Jalisco, Puebla, San Luis Potosí y Michoacán (Áviles, 1996). Se han localizado ejemplares en casi todos los tipos de vegetación, inclusive en regiones que rebasan los 3,500 m.s.n.m., esto en los estados de Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Veracruz y Chiapas (Ramírez, 2002). Poco más de la mitad de las 1,200 especies se encuentran en el estado de Chiapas (Cabrera-Chacón, 1999).

Las poblaciones de orquídeas han sido afectadas por distintos factores, entre los cuales se pueden citar el tráfico ilícito y comercialización de especies nativas, la agricultura, la ganadería, la industria y el crecimiento de los asentamientos humanos, todo esto ha repercutido en la disminución de las poblaciones, afectando así la distribución y abundancia de las orquídeas (Collins *et al.*, 1995; Ellison y Bedford, 1995; Stohlgren *et al.*, 1997).

La mayoría de las investigaciones realizadas sobre esta familia, se han enfocado al estudio de orquídeas terrestres; sobre orquídeas epífitas (plantas que viven adheridas a los troncos y las ramas de los árboles, sin extraerles nada), en especial de la región del Soconusco se sabe poco. En la literatura existen evidencias aisladas sobre diferentes aspectos de la ecología y la biología reproductiva de las orquídeas y de esta información se han formado unas hipótesis e ideas generales sobre las orquídeas.

Se conoce que en la naturaleza la propagación de las orquídeas por semilla es sumamente difícil y se conoce muy poco del proceso. Lo que si se sabe es que las semillas son diminutas y que poseen pocas reservas nutritivas para alimentar al embrión o a la planta en etapas posteriores a la germinación, por lo tanto necesitan de la ayuda de hongos, los cuales les proporcionan los nutrientes necesarios, esencialmente carbohidratos, para poder sobrevivir, estableciéndose así una relación simbiótica entre los hongos y las plantas.

El aislamiento e identificación de hongos endófitos son importantes en el estudio de las simbiosis micorrícicas ya que permiten conocer al protagonista

que normalmente no se ve y no se toma en cuenta. Es por ello que en este trabajo se pretendió realizar el aislamiento e identificación de los hongos endófitos de raíces de algunas orquídeas epífitas de la región del Soconusco.

No se conocen los hongos que interaccionan con una o con varias especies de orquídeas, y no se sabe nada de aquellos que se asocian con orquídeas epífitas, sobre esta especificidad entre la orquídea y el hongo, existe gran controversia debido a que los reportes en ocasiones se contradicen, es por ello que se ha desarrollado este proyecto, ya que con él se pretende aislar e identificar los hongos involucrados en la asociación orquídea-hongo de las especies de plantas que aquí se trabajaron. Las investigaciones realizadas sobre orquídeas se han enfocado al estudio de aquellas con hábitos terrestres, sobre orquídeas epífitas es poco lo que se conoce.

Este estudio forma parte de una secuencia de investigaciones encaminada hacia la conservación y aprovechamiento sustentable de orquídeas nativas en la región del Soconusco. La producción masiva por semillas *in vitro* de especies de orquídeas nativas, tiende a generar plantas débiles y poco resistentes. Se espera que con los aislamientos de hongos se pueda desarrollar una técnica para unir semillas y hongos, bajo condiciones rústicas, y así entrar en la producción masiva de orquídeas a bajo costo, favoreciendo un producto sano, vigoroso y resistente.

2. OBJETIVOS.

2.1 Objetivo General.

Aislar e identificar los hongos endófitos de las orquídeas epífitas colectadas en la Región del Soconusco, Chiapas.

2.2 Objetivos Específicos.

Confirmar la presencia de hongos endófitos en orquídeas epífitas.

Aislar e identificar los hongos endófitos presentes en las raíces de las orquídeas epífitas colectadas.

3. HIPOTESIS.

Es posible aislar e identificar hongos endófitos existentes en las raíces de orquídeas epífitas de la Región del Soconusco, Chiapas

4. ANTECEDENTES.

4.1 Importancia del uso de Microorganismos.

A comienzos del siglo XX se creía que la mayoría de los microorganismos eran patógenos, sin embargo, con el paso del tiempo este paradigma ha ido cambiando, gracias a que se ha descubierto que muchos de estos microorganismos son benéficos y de gran importancia para el hombre. Los procesos que llevan a cabo los microorganismos tienen un valor inmenso para la humanidad, por ejemplo en agricultura, hay plantas pertenecientes a la familia de las leguminosas las cuales están estrechamente relacionadas con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, el cual se convierte en compuestos nitrogenados que las plantas pueden usar para crecer. Para la reforestación se aprovechan ciertas especies de hongos llamados micorrícicos, los cuales son necesarios para que algunas especies de árboles, en especial pinos, sobrevivan. Actualmente, el hombre está utilizando este tipo de hongos en algunos cultivos, obteniendo resultados favorables. Otro claro ejemplo del uso de

microorganismos es en la industria de alimentos, aquí existen microorganismos como las levaduras que son utilizados para elaborar productos tan comunes como el pan y la cerveza. También se han tenido beneficios de los microorganismos en otras áreas como lo son la farmacéutica y el medio ambiente, en la primera se ha permitido el desarrollo de antibióticos y en la segunda se ha ayudado a controlar y reducir los daños ocasionados por agentes o elementos tóxicos al ambiente. Los ejemplos citados anteriormente son algunos de los tantos beneficios obtenidos por el hombre de los microorganismos, sin embargo, con el avance de la tecnología, para ser mas precisos, la biotecnología, esto apenas es el inicio de nuevas áreas de investigación (Higa y Parr, 1994).

4.1.1 Asociación Micorrízica.

El término micorríza ha sido definido como asociación entre las hifas de hongos y los órganos de las plantas, la cual permite el intercambio de sustancias (Harley y Smith, 1983). Actualmente existe una definición más completa la cual engloba todos los tipos de micorrizas descritos, y es la siguiente: una micorríza es una asociación simbiótica esencial para uno o ambos organismos que la constituyen, entre un hongo (especializado para la vida en el suelo y en las plantas), y la raíz (u otro órgano) de una planta, permitiendo principalmente la transferencia de nutrientes entre ambos

organismos. Los hongos micorrícicos pueden realizar diversas aportaciones positivas a las plantas con las cuales se asocian, entre las cuales están la producción de reguladores de crecimiento, la protección contra enfermedades y principalmente una mayor absorción de agua y nutrientes (Brundrett, 2004).

4.1.2 Tipos de Asociaciones Micorrícicas.

En general las asociaciones micorrícicas se clasifican de la siguiente manera (Harley y Smith, 1983):

- **Ectomicorrizas:** Los hongos que las forman, Basidiomicetes y Ascomicetes, desarrollan una espesa capa de micelio sobre la zona cortical de las raíces nutricias de la planta. Se producen principalmente sobre especies forestales y leñosas.
- **Endomicorrizas:** Los hongos que las producen se caracterizan por colonizar intracelularmente el córtex radical. Dentro de este grupo existen tres tipos característicos:
 - Orquideomicorrizas (asociadas a la Familia Orchidaceae).
 - Ericomicorrizas (ligadas a la Familia Ericáceae y con muchas similitudes estructurales con las ectendomicorrizas.
 - Micorrizas arbusculares: Caracterizadas por formar arbusculos intracelulares y sin duda las de mayor difusión e importancia económica y ecológica.

- **Ectoendomicorrizas:** Los hongos que las producen colonizan de forma dual las raíces: externamente formando un manto cortical e internamente penetrando intracelularmente en el córtex.

4.2 La Familia Orchidaceae.

En el Reino Vegetal, la familia Orchidaceae es considerada como una de las más diversas pues posee entre 16,000 y 30,000 especies, aunque algunos autores mencionan que pueden ser más, y quizá otros 60,000 híbridos y variedades producidas por horticultores. Estas plantas se extienden alrededor de todo el mundo, pero particularmente son abundantes en las regiones tropicales. Debido a su complejidad floral, a sus interacciones con los agentes polinizadores y su simbiosis con hongos micorrícicos, están consideradas como la culminación de la evolución floral (Arditti, 1994).

Morfología de la flor. Las flores están formadas por tres elementos externos llamados sépalos, dos laterales y uno dorsal, y tres elementos internos, dos pétalos y un labio o labelo que generalmente es de un color más intenso. En algunas especies, los sépalos laterales se encuentran fusionados en un solo elemento llamado sinsépalo. Pero lo que define ciertamente a una planta como perteneciente a la familia Orchidaceae es la existencia en sus flores de una estructura llamada "columna" donde se encuentran localizados los órganos reproductivos, el masculino o "polinia" y el femenino o "superficie estigmática". Las polinias son en realidad pequeños sacos que contienen miles de granos de polen; poseen una superficie

pegajosa que se adhiere al insecto facilitando su transporte hasta otra flor donde se producirá la fecundación. En algunos géneros se pueden encontrar sexos separados, produciéndose por separado flores masculinas y flores femeninas.

Morfología de las plantas. Las plantas de crecimiento simpodial están formadas por un rizoma rastrero, que es en realidad el tallo de la planta, donde se producen las raíces. Las raíces tienen una doble función, son las estructuras que se encargan de captar los nutrientes que la planta necesita y también funcionan como elementos de fijación. Del rizoma nacen a su vez las hojas, que pueden poseer pseudobulbos o no. Los pseudobulbos son estructuras ubicadas en la base de las hojas que sirven para almacenar agua y nutrientes. Por lo general, los pseudobulbos están recubiertos por vainas o brácteas membranosas que se secan con la edad. Las flores pueden surgir, dependiendo del género y la especie, de la base de la hoja, del rizoma o de algún entrenudo del pseudobulbo. Sin embargo hay también orquídeas de crecimiento monopodial con crecimiento erecto desde un punto determinado. En este tipo de desarrollo se van añadiendo hojas en el ápice y en el tallo se van desarrollando también. Las flores se encuentran en el tallo que sale entre las hojas. Presentan unas raíces muy desarrolladas, que en las epífitas se distribuyen sobre la corteza del árbol hospedero, de color verde y gruesas que en las partes viejas de la raíz desarrolla una epidermis de un tejido esponjoso, llamado velamen, que absorbe y retiene humedad (Arditti, 1992).

4.2.1 Tipos de Orquídeas.

Las orquídeas son clasificadas de acuerdo al tipo de sustrato en el que se desarrollan, como epífitas, semiterrestres o terrestres.

Orquídeas epífitas constituyen más del 90% del total de especies. Se adhieren a los árboles o arbustos. Son las más vistosas y las que encontramos a la venta normalmente. Proceden de las regiones tropicales. No son parásitas, sus necesidades son escasas, obtienen el agua y nutrimentos de los escurrimientos de agua que se dan sobre los árboles al llover y de la humedad del aire.

Orquídeas semiterrestres crecen sobre un colchón de hojas en descomposición en el suelo o sobre piedras recubiertas de musgo. Este tipo de orquídeas son los menos conocidos ya que son muy escasas. También se pueden llamar litofíticas.

Orquídeas terrestres tienen sus raíces en tierra. Estas son las orquídeas mas estudiadas y por lo tanto sobre las cuales se tiene mayor conocimiento (Rodríguez, 2005).

4.2.2 Ciclo de Vida de las Orquídeas.

El ciclo de vida de las orquídeas se parece al de otras plantas con flor. Después de ser transportada por el insecto, la polinia, con sus miles de granos de polen es depositada en la parte femenina de la flor, el estigma. Dentro de poco, germina y empieza a crecer hacia el ovario. En unas seis semanas los tubos polínicos entran dentro del ovario y los espermias se unen a los óvulos. El óvulo fertilizado se desarrolla y forma una masa de células que llegarán a ser el embrión. Esta masa de células está cubierta de una capa seca que es tan liviana que el viento puede transportar la semilla por largas distancias; una vez que estas semillas llegan a su destino y germinan, el éxito de que la plantita sobreviva depende de la presencia de un hongo micorrízico (Rodríguez, 2005)



Fig.1, *Anathallis racemiflora*



Fig.2, *Guarianthe aurantiaca*



Fig.3, *Erycina crista galli*

Fig.1, *Anathallis racemiflora*, Fig. 2, *uarianthe aurantiaca*, Fig.3, *Erycina crista galli*, tres especies de orquídeas epífitas características de la región del Soconusco, Chiapas.

4.3 Simbiosis Micorrícica en Orquídeas.

El proceso y establecimiento de la simbiosis micorrícica en orquídeas no es bien conocido, pero tal vez sea igual o similar al de las micorrizas arbusculares o endomicorrizas. En éstas el proceso se inicia con la identificación mutua planta-hongo en regiones próximas a las raíces; este reconocimiento al parecer es mediado por sustancias exudadas por la raíz las cuales propician el crecimiento del micelio y un biotropismo positivo del mismo hacia la raíz (Pal Bai *et al.*, 2004). Luego se produce el contacto intercelular al formarse una estructura llamada apresorio. En tercer lugar se producen cambios morfológicos y estructurales tanto en los tejidos colonizados por el hongo, como en la organización de la pared celular del simbionte fúngico. Posteriormente se produce la integración fisiológica de ambos simbiontes, y por último se produce una alteración de las actividades enzimáticas, que se coordinan entre los simbiontes para integrar sus procesos metabólicos.

4.3.1 Hongos Micorrícicos de Orquídeas.

Entre los hongos asociados con orquídeas, podemos citar miembros de los Phylum Zygomycetes, Ascomycetes y Basidiomycetes, (Arditti, 1994). Dentro de estos filos existen géneros, en especial algunas especies, que son patógenas para cultivos, pero simbioses micorrízicas en orquídeas y hasta el momento no se sabe el porque de la preferencia por parte de la orquídea por estos hongos. Se ha reportado que algunas especies del género *Rhizoctonia* son comúnmente encontradas en orquídeas, siendo *Rhizoctonia solani* la más difundida, motivo por el cual ha sido objeto diversos estudios (Milligan y Williams 1988; Bayman *et al.*, 1997)

4.4 Métodos de Identificación de Hongos.

Existen varias técnicas para la identificación de hongos, la más usada por su rapidez y economía es la basada en la morfología, en esta técnica para la identificación de hongos es necesario la observación de las estructuras somáticas y reproductivas. La observación de las características de las estructuras reproductivas y el uso de claves taxonómicas es el método comúnmente utilizado para determinar el género y la especie del hongo. Sin embargo, también es común que se presenten problemas y más cuando se trata de identificar diferentes especies de un mismo género, pues las características estructurales de una especie no siempre son las mismas, ya que pueden estar influenciadas por la planta hospedante. Algunos problemas de identificación y taxonomía de hongos pueden ser solucionados mediante

el empleo de técnicas moleculares, entre estas técnicas están las técnicas basadas en características bioquímicas y serológicas, pero ninguna de ellas ha tenido el nivel de resolución adecuado y su utilidad no ha sido del todo generalizada. Los marcadores moleculares basados en el DNA han mostrado ser excelente herramienta en los estudios taxonómicos, estimación de relaciones evolutivas y variabilidad genética e identificación de diferentes organismos, por lo que tienen el potencial para ser utilizados en la identificación y caracterización de hongos, apoyados en gran medida con la técnica conocida como Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (Gómez, *et al.*,2004).

4.4.1 Técnicas Moleculares para la Identificación de Hongos.

Existen diferentes metodologías para abordar el tema de la identificación a diferentes niveles taxonómicos, basados principalmente en marcadores bioquímicos y de DNA.

4.4.1.1 Técnicas Bioquímicas y Serológicas.

De entre estas técnicas algunas de las más utilizadas son los perfiles de proteínas y el análisis de isoenzimas los cuales representan una buena

aproximación para la identificación intrarradical de los hongos micorrícicos, pero como ya se mencionó anteriormente muchas veces no tienen el nivel de resolución adecuado (Gómez, *et al.*, 2004).

4.4.1.2 Técnicas Basadas en DNA.

La mayoría de las técnicas moleculares empleadas hasta ahora para identificar o estudiar la diversidad genética de los hongos micorrícicos recurren a la tecnología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR. El diagnóstico molecular basado en el PCR requiere el uso de secuencias únicas para el organismo en cuestión, resultado en una señal distintiva. Después de varias décadas de estudio del RNA ribosomal (RNAr) en varios organismos, se llegó a la conclusión de que los genes que codifican para el RNAr presentan varias características que los hacen ideales para fines de diagnóstico. Estas incluyen un alto número de copias de fácil aislamiento, la cual se traduce en una señal fuerte y de rápida evaluación. Entre las técnicas moleculares basadas en DNA para la identificación de hongos podemos encontrar aquellas en las que se utilizan iniciadores o primers específicos, ya que para poder utilizar estas técnicas se deben de tener antecedentes de las secuencias de los mismos, las cuales permitan la elaboración de estos iniciadores específicos para cada hongo. Claros ejemplos de estas técnicas en la que se usan iniciadores específicos son los RFLPs (Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción) y los AFLPs (Amplificación de

Fragmentos de Longitud Polimórfica). Sin embargo existe otra técnica en la que no es necesario tener conocimiento o antecedentes sobre la secuencia del hongo, es la técnica llamada RAPDs (Amplificación Inespecífica del Polimorfismo del DNA), en ella los iniciadores usados son aleatorios, lo cual quiere decir que si la secuencia del iniciador se encuentra presente en el genoma del hongo éste se podrá pegar y así obtener una amplificación (Gómez, *et al.*, 2004; Rosewich y McDonald, 1994; Valadez y Kahl, 2000).

4.4.1.2.1 Amplificación Inespecífica del Polimorfismo del DNA (RAPDs).

La técnica de RAPDs (Random Amplified Polymorphims DNA, por sus siglas en ingles), ha sido la metodología más ampliamente utilizada en la PCR para diferentes propósitos, utiliza pequeños iniciadores de secuencias aleatorias. Esos iniciadores no contienen secuencias repetidas inversas internas (autocomplementarias) y se pegan a distintos sitios en un genoma, si es que existen diferentes sitios blanco para ellos. Esta unión es reconocida por la DNA polimerasa (DNA Taq polimerasa) que inicia el alargamiento del iniciador; el alargamiento resultante produce una cadena de DNA, cuya secuencia de bases es complementaria a la cadena molde. El producto de amplificación, se acumula en un gran número de copias y puede ser visualizado con electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (Valadez y Kahl, 2000).

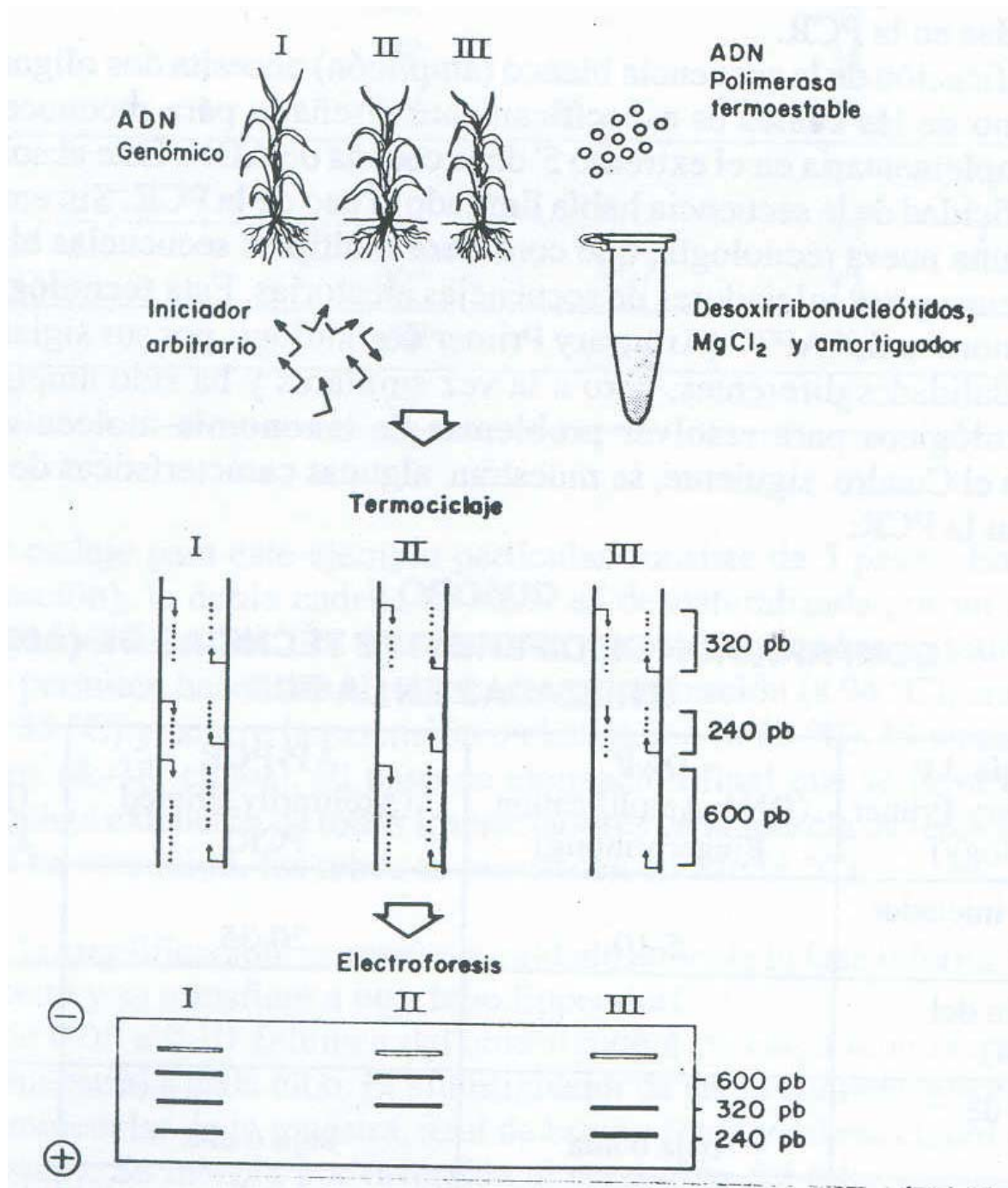


Fig. 4. Técnica de RAPDs. En esta figura se muestran los pasos y el fundamento básico de la técnica de RAPDs.

4.4.1.2.2 Ventajas y Desventajas de los RAPDs.

El procedimiento de RAPDs es relativamente rápido, solo se requieren pequeñas cantidades de DNA, no involucran radiactividad, como en el caso de los RFLPs y AFLPs, usualmente los RAPDs proveen marcadores dominantes, ya que los polimorfismos o productos se detectan mediante la presencia o ausencia de bandas. Sin embargo para la reproducibilidad de los productos o bandas obtenidas mediante RAPDs es necesario optimizar las concentraciones del DNA, $MgCl_2$, oligonucleotidos, dNTPs y la enzima DNA Taq polimerasa, así como también es necesario utilizar el mismo termociclador porque cualquier cambio tanto en los reactivos como en el termociclador puede afectar la reproducibilidad de los resultados.

4.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction), es una tecnología que se utiliza para sintetizar *in vitro* fragmentos específicos de DNA con la finalidad de detectar una secuencia o un gen de interés en el genoma de un organismo. Esta tecnología se ha venido utilizando con bastante éxito y se ha empleado en diferentes campos, tales como la medicina, taxonomía, biología, agronomía, área forense y criminalística, principalmente. Tiene varios requerimientos, entre los cuales es indispensable un molde de DNA, moléculas iniciadoras llamadas,

iniciadores (también llamados primers), una enzima DNA polimerasa resistente a cambios de temperatura, una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), un amortiguador apropiado y un equipo llamado termociclador que tiene la capacidad de cambiar las temperaturas dependiendo del ciclaje programado. La PCR consiste de tres pasos esenciales: el primero es la desnaturalización y sirve para separar mediante temperatura (94°C) la molécula doble de DNA a cadenas sencillas, que servirán como moldes para la síntesis del (o los) fragmento respectivo. En el segundo paso, la temperatura se reduce para permitir el alineamiento (o reconocimiento) de los iniciadores a la secuencia blanco del DNA molde. Los iniciadores, pueden variar en longitud, composición de bases nitrogenadas y especificidad para unirse a las secuencias blanco y dependiendo de esto, la temperatura de alineamiento puede variar desde 25 a 65°C. En el tercero, se lleva acabo el alargamiento o extensión de los iniciadores mediante una enzima DNA polimerasa a 72°C. Estos tres pasos o ciclos se repiten en un termociclador, permitiendo de manera exponencial el fragmento o fragmentos sintetizados a partir del molde de DNA, estas secuencias amplificadas se visualizan comúnmente en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (Valadez y Kahl, 2000).

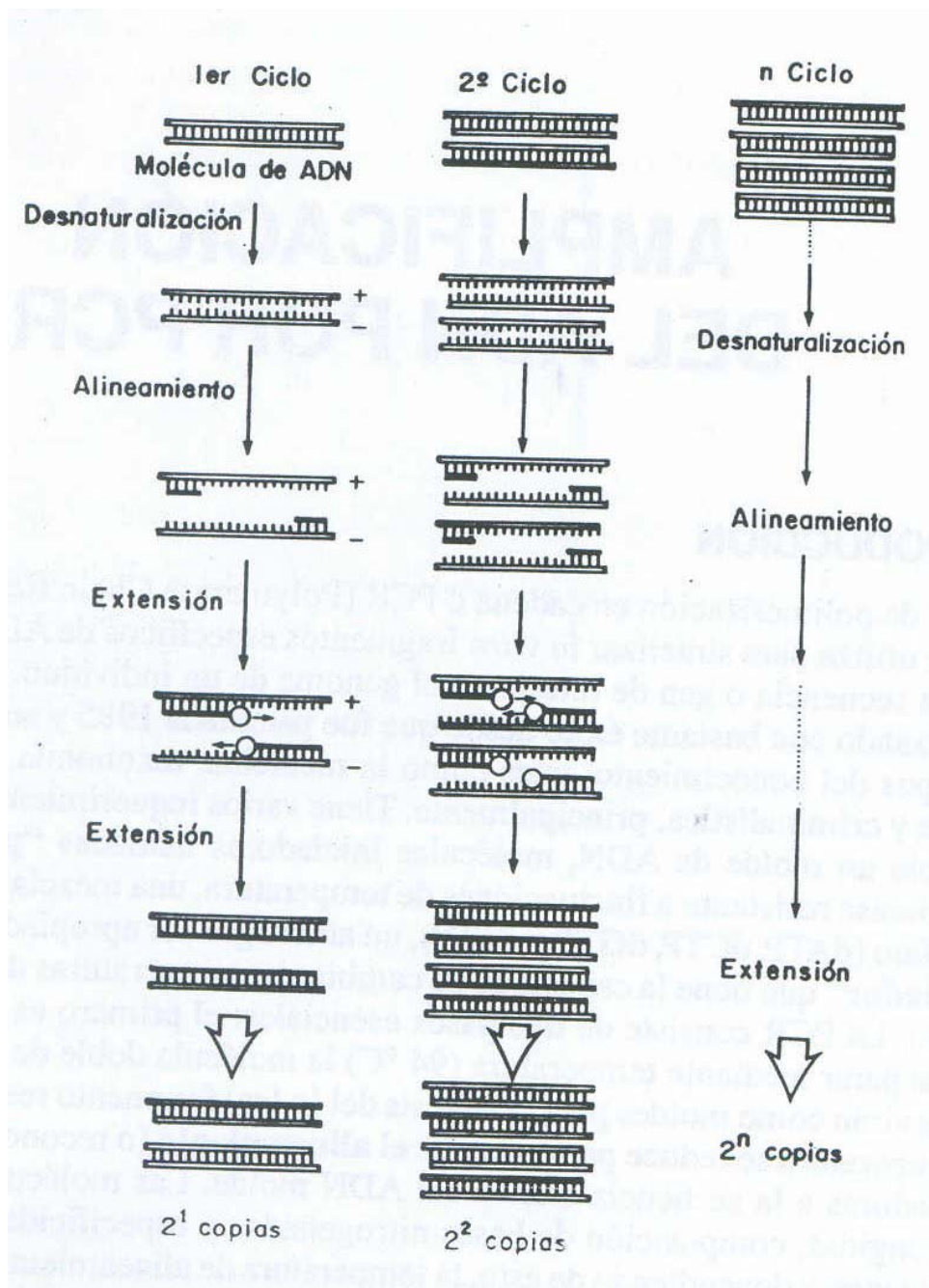


Fig. 5. Secuencia de pasos que se realizan en la técnica de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).

5. MATERIALES Y METODOS.

5.1 Sitio de Colecta.

Se recolectaron varias plántulas de orquídeas epífitas en la región del Soconusco en el estado de Chiapas, específicamente en el ejido Santo Domingo, ubicado en la parte alta de la región del Soconusco a 1800 msnm, éste ejido se caracteriza por tener un clima cálido húmedo, lo cual le ha permitido desarrollarse como zona cafetalera.

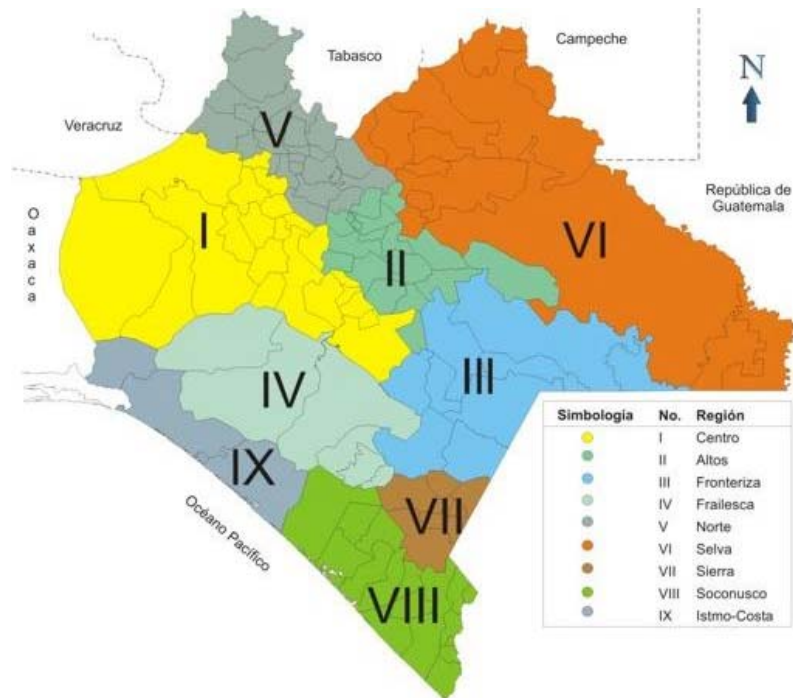


Fig. 6. Mapa en el cual se observan las diferentes regiones del estado de Chiapas, entre ellas se encuentra la región del Soconusco, región en la cual se colectaron las diferentes especies de orquídeas.

5.2 Colecta del Material Vegetal.

Las plántulas se colectaron junto con un trozo de corteza, esto con la finalidad de no maltratar las raíces. Las especies colectadas fueron: *Guarianthe aurantiaca*, *Notylia barkeri*, *Trichocentrum oerstedii*, *Stelis aeolica*, *Anathallis racemifolia* y *Erycina crista galli*. Posteriormente las plántulas fueron trasladadas a las instalaciones del CINVESTAV-Unidad Irapuato, al Laboratorio de Bioquímica Ecológica para ser procesadas.



Fig. 7, *Notylia barkeri*



Fig. 8, *Stelis aeolica*

Fig. 7 y 8. Plántulas de *Notylia barkeri* y *Stelis aeolica*, dos de las especies colectadas en el ejido Santo Domingo, Chiapas.

5.3 Tinción de Raíces.

Una vez en el laboratorio, se realizó la tinción de raíces, para observar las estructuras características de la simbiosis micorrícica entre la orquídea y el hongo, los pelotones. Solo se eligieron tres plántulas de *Trichocentrum oerstedii* ya que se contaba con varias plántulas de esta especie en el laboratorio. Los colorantes utilizados fueron Azul de tripano al 0.5%, Fucsina ácida al 1% y Negro clorazol al 1%. Primero se eliminó la corteza adyacente a las raíces para luego ser lavadas con agua corriente, después se puso KOH al 10% hasta cubrir las raíces y se sometieron a 15 lb por 10 minutos, esto con la finalidad de decolorarlas. Posteriormente las raíces fueron lavadas con agua corriente, se les agregó peróxido de hidrógeno alcalino durante 20 minutos en estado de agitación, nuevamente las raíces fueron lavadas con agua corriente, para luego agregarles HCl al 1% por 4 minutos. Se eliminó el HCl, únicamente decantando, no lavando. Se adicionaron cada uno de los colorantes hasta cubrir las raíces y se dejaron actuar por 10 minutos a 15 lb; se eliminó el exceso de los colorantes con agua corriente y finalmente se agregó Acetoglicerol (ver apéndices).

5.4 Desinfección de Raíces.

En el laboratorio se eliminó la corteza adjunta a las raíces de las plántulas, posteriormente se procedió a desinfectar las raíces con Cloramina T al 2%, después se enjuagaron seis veces con agua destilada estéril.

5.5 Siembra de Raíces.

Se cortaron las raíces en fragmentos de 5mm aproximadamente y se sembraron en medio de cultivo PDA (Agar Papa Dextrosa) previamente preparado para el crecimiento de los hongos. Las placas con los fragmentos de raíces se incubaron a 25°C hasta observar el crecimiento de los hongos.

5.6 Siembra de Corteza.

Una vez removida la corteza adjunta a las raíces, se procedió a cortarla en pequeños trozos de alrededor de 1 cm cuadrado para luego sembrarlos en medio de cultivo PDA. Las placas se incubaron a 25°C durante dos días.

5.7 Aislamiento de Hongos.

El aislamiento se realizó tomando un pequeño trozo de agar con hongo de la colonia de interés, el trozo tomado fue de alrededor de 1cm cuadrado, posteriormente éste fue sembrado nuevamente en medio de cultivo PDA. Se realizaron varios pases de cada uno de los hongos, esto con la finalidad de obtener cepas puras y así tener la certeza de que solo se trataba de un hongo.

5.8 Aislamiento de Bacterias.

Se realizó tomando de una a dos azadas de cada una de las colonias bacterianas obtenidas de la siembra de la corteza, cada bacteria fue sembrada de manera independiente sobre medio de cultivo PDA nuevo. La forma de siembra fue mediante estría cruzada. Las placas se incubaron durante 24 horas a 28°C.

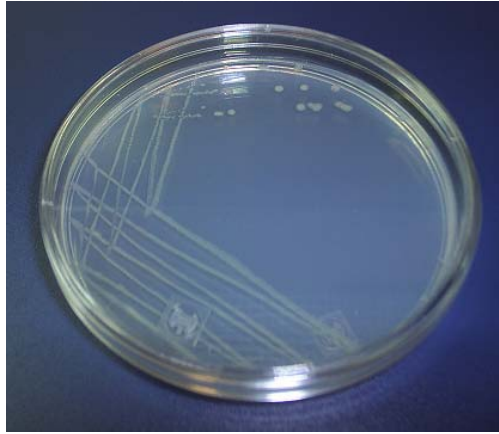


Fig. 9. Bacteria pura y aislada mediante estría cruzada de la siembra de la corteza adjunta a las raíces de las orquídeas.

5.9 Microcultivo de Hongos.

Después de obtener la colonia fúngica, se procedió a realizar el microcultivo, el cual consistió en lo siguiente: dentro de placas Petri que contenían varillas angulares había portaobjetos con trozos de medio de cultivo PDA de 1cm cuadrado, se inoculó cada una de las caras del trozo de agar con el hongo, posteriormente se colocó sobre el trozo un cubreobjetos y para mantener la humedad se adicionaron 10 ml de glicerol al 10% estéril dentro de cada placa, éstas se incubaron a 28°C durante tres días. Para inactivar el crecimiento del hongo se eliminó el glicerol y se adicionaron 10 ml de formaldehído al 40% en cada placa y se dejó actuar durante 20 minutos, Después del tiempo transcurrido se tomó el cubreobjetos y se colocó en un portaobjetos con dos gotas de Azul de tripano. El portaobjetos que contenía

el cubo de agar se utilizó para hacer otra preparación. Esta técnica se realizó con la finalidad de observar las estructuras microscópicas de los hongos, facilitando así su identificación morfológica (Ortigoza y Hernández, 1994).

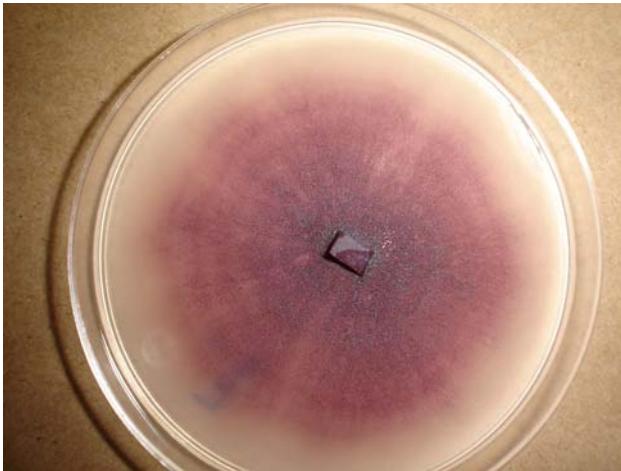


Fig 10, *Fusarium* sp.



Fig.11, *Trichoderma* sp.

Fig.10. *Fusarium* sp. y Fig.11. *Trichoderma* sp., cepas puras aisladas de las raíces de orquídeas procesadas.

5.10 Identificación Morfológica Microscópica de Hongos.

Una vez realizado el microcultivo se tomó el cubreobjetos y se colocó en un portaobjetos con dos gotas de Azul de tripano. El portaobjetos que contenía el cubo de agar se utilizó para hacer otra preparación. Con las preparaciones listas se procedió a observar al microscopio. Para la identificación se compararon las estructuras morfológicas y reproductivas de cada uno de los hongos con las reportadas en la literatura científica correspondiente (Agrios, 1999; Finch, 1974; García, 1985).

5.11 Identificación Molecular de Hongos mediante RADPs.

Para poder realizar la identificación molecular primero se realizó extracción de DNA cromosómico de cada uno de los hongos aislados, para ello se utilizó la técnica "Extracción de DNA de Plantas", basada en el método de Dellaporta *et al.*, (1983). Una vez que se tenían el DNA se procedió a realizar las reacciones de PCR-RAPDs con los iniciadores aleatorios OPC 8 y OPC 11, para ello se utilizó un kit de PCR (PCR regulador 10X, dNTPS 10 mM, MgCl₂ 50 mM), de la marca SIGMA. Para preparar la mezcla de reacción se utilizaron las siguientes concentraciones, 2 µL de regulador de PCR, 0.4 µL de dNTPS, 0.6 µL de MgCl₂, 2 µL del iniciador aleatorio (ambos iniciadores utilizados a una concentración de 100 ng/ µL), 0.2 µL de DNA-Taq polimerasa (5U/ µL) y

13.8 μL de agua desionizada esterilizada y 1 μL de DNA cromosómico de cada hongo para tener un volumen de 20 μL de mezcla de reacción por tubo para cada hongo. Los tubos con la mezcla se introdujeron en un termociclador *Gene Amp PCR System 9700* con el siguiente programa, una desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 45 ciclos de 15 segundos a 94°C, 15 segundos a 36°C y 30 segundos a 72°C, para terminar con una extensión final de 10 minutos a 72°C. La amplificación de los productos de los PCR-RAPDs se llevó a cabo mediante geles de agarosa al 1.5%, para poder observar las bandas obtenidas bajo luz ultravioleta se agregó 1 μL de bromuro de etidio el cual estaba a una concentración de 10 mg/mL.

Rhizoctonia spp. en especial *Rhizoctonia solani*, son hongos patógenos para algunos cultivos, sin embargo, han demostrado ser muy buenos simbiontes micorrizicos de orquídeas, tanto terrestres como epífitas, (Milligan y Williams, 1988), por ambas razones muchos de los estudios llevados a cabo se han enfocado a *Rhizoctonia solani*. En esta investigación se pretendía conocer si alguno o algunos de los aislados, preclasificados anteriormente como *Rhizoctonia* eran *Rhizoctonia solani*, para ello se utilizaron los iniciadores específicos para *Rhizoctonia solani* PC1F (5'-TATCGTGAGGAGTGGAAAGC) y PC1R (3'-TGTCCTCAACTCATAACACCCG). Para esto también se realizó extracción de DNA utilizando la misma técnica usada para los PRC-RAPDs, una vez que se tuvo el DNA se procedió a realizar la reacción de PCR, para ello se utilizó un kit de PCR (PCR regulador 10X, dNTPS 10 mM, MgCl₂ 50 mM), de la marca SIGMA, para preparar la mezcla de reacción se

utilizaron las siguientes concentraciones 2 μL de regulador de PCR, 0.4 μL de dNTPS, 0.6 μL de MgCl_2 , 1 μL del iniciador PC1F y 1 μL del iniciador PC1R (ambos iniciadores a una concentración de 20 pm/ μL), 0.2 μL de DNA-Taq polimerasa (5U/ μL) y 13.8 μL de agua desionizada esterilizada y 1 μL de DNA cromosómico de cada hongo para tener un volumen de 20 μL de mezcla de reacción por tubo para cada hongo. Aquí el programa utilizado en el termociclador *Gene Amp PCR System 9700*, fue una desnaturalización inicial de 94°C por 2 minutos, seguida de 39 ciclos de 15 segundos a 94°C, 15 segundos a 58°C y 30 segundos a 72°C, para terminar con una extensión final de 10 minutos a 72°C. La amplificación de estos productos se realizó de la misma manera que los de PCR-RAPDs (Weerasena *et al.*, 2004).

5.12 Tinción Gram de Bacterias.

Se realizó la tinción Gram de las bacterias aisladas, para ello fue necesario colocar de una a dos azadas de inóculo de cada una de las bacterias sobre un portaobjetos y se hicieron frotis. Realizados los frotis se dejaron secar al aire para luego ser fijados con calor, esto se hizo pasando los portaobjetos por el mechero. Se agregó Cristal violeta por 1 minuto, luego se hizo un lavado con agua corriente. Posteriormente se colocó Lugol durante 1 minuto, nuevamente se enjuagó con agua corriente. Se destiñó el colorante no eliminado por el agua con etanol al 96%, se agregó Safranina por 1 minuto, para finalmente enjuagar con agua corriente y dejar secar al aire. Las preparaciones fueron observadas en el microscopio con los objetivos 40X y 100X (en el caso de 100x utilizando aceite de inmersión).

5.13 Antibiogramas de Bacterias.

Se sembró cada una de las bacterias aisladas sobre placas de PDA en forma de césped, se colocó un multidisco combinado, el cual contenía varios antibióticos. Se incubaron las placas por una hora a 4°C, esto con la finalidad de estabilizar y homogenizar la actividad tanto de los antibióticos como de las bacterias. Posteriormente las placas fueron trasladadas al cuarto de incubación, en el que se mantuvieron a 28°C

durante 24 hrs. Al final de este periodo se midieron los halos de inhibición de los antibióticos para determinar así cuales antibióticos controlaron a las bacterias.



Fig. 12. Antibiograma de bacteria aislada. En la foto se pueden observar los halos de inhibición resultado de la resistencia de los antibióticos a la bacteria.

6.0. RESULTADOS.

6.1. Tinción de Raíces.

Una vez realizada la tinción de raíces de *Trichocentrum oerstedii*, con los tres colorantes, se pudieron observar claramente las hifas de los hongos dentro de las células corticales de las raíces, algunas de estas hifas presentaban enrollamientos formando así los característicos pelotones.



Fig. 13. Enrollamiento de hifa formando un pelotón teñido con Fucsina ácida.

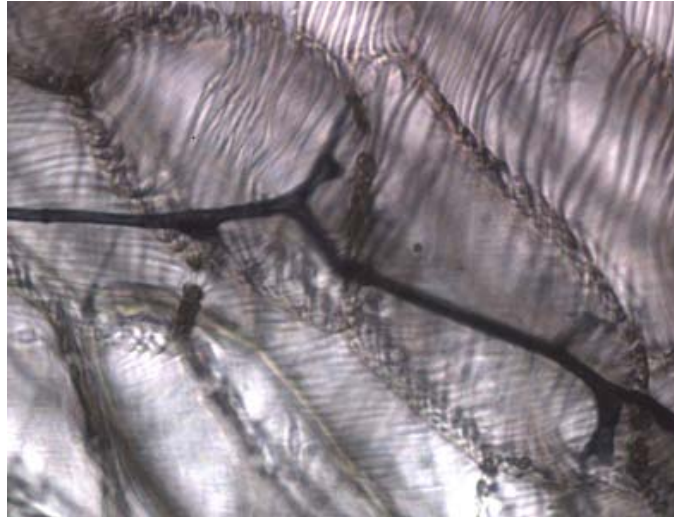


Fig. 14. Hifa abriéndose camino entre las células corticales de la raíz, tinción realizada con Negro clorazol.

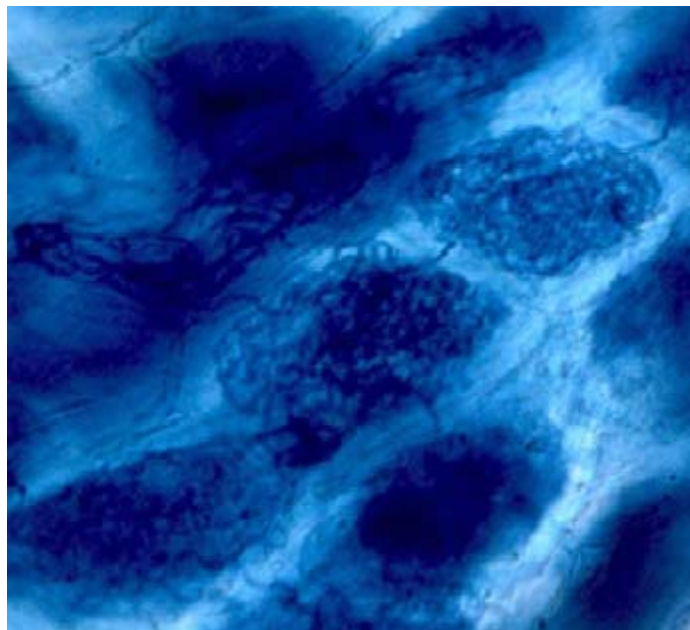


Fig. 15. Pelotones teñidos con Azul de tripano dentro de las células corticales de las raíces.

6.2. Identificación Morfológica de los Hongos.

Con la técnica de microcultivo y realizando observaciones al microscopio LEICA se pudieron identificar los 26 hongos aislados de las seis especies de orquídeas, estos hongos fueron clasificados en base a sus características morfológicas distintivas. En las tablas siguientes se presentan las especies de orquídeas con las cuales se trabajó, el total de hongos aislados de cada una de ellas, una fotografía de la morfología y la clasificación preliminar de los mismos.

Tabla 1. Clasificación de los aislados de *Guarianthe aurantiaca* por medio de la morfología microscópica.

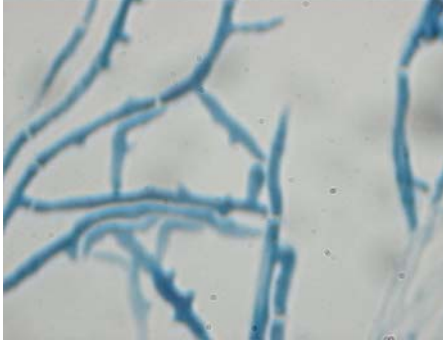
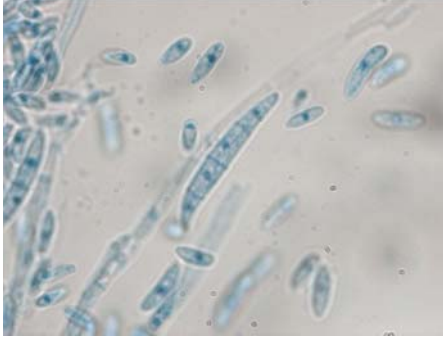
Orquídea	No. de hongos aislados	Morfología microscópica	Clasificación
<i>Guarianthe aurantiaca</i>	3		<i>Rhizoctonia sp.</i>
			<i>Fusarium sp.</i>
			<i>Sclerotium sp.</i>

Tabla 2. Clasificación de los aislados de *Notylia barkeri* por medio de la morfología microscópica.



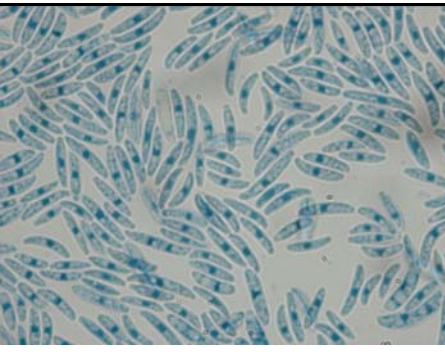

Orquídea	No. De hongos aislados	Morfología microscópica	Clasificación
<i>Notylia barkeri</i>	4		<i>Trichoderma</i> <i>sp.</i>
			<i>Trichoderma</i> <i>sp.</i>
			<i>Fusarium</i> <i>sp.</i>
			<i>Rhizoctonia</i> <i>sp.</i>

Tabla 3. Clasificación de los aislados de *Trichocentrum oerstedii* por medio de morfología microscópica.

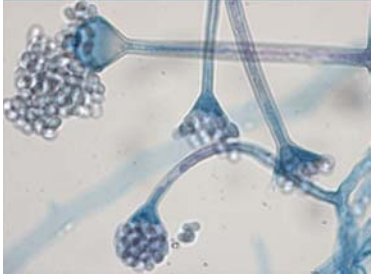
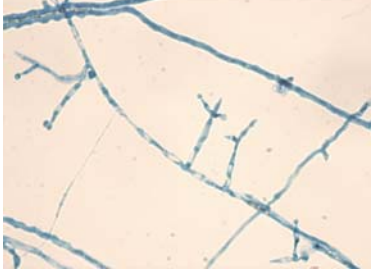
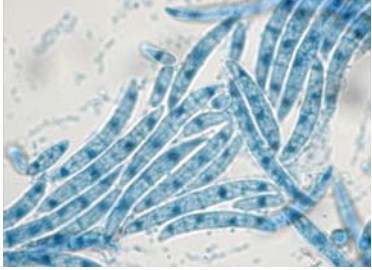

Orquídea	No. de hongos aislados	Morfología microscópica	Clasificación
<i>Trichocentrum oerstedii</i>	5		<i>Aspergillus</i> <i>sp.</i>
			<i>Trichoderma</i> <i>sp.</i>
			<i>Fusarium</i> <i>sp.</i>
			<i>Trichoderma</i> <i>sp.</i>
			<i>Trichoderma</i> <i>sp.</i>

Tabla 4. Clasificación de los aislados de *Stelis aeolica* por medio de morfología microscópica.

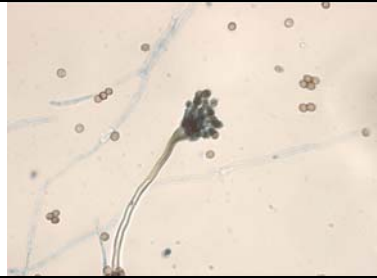


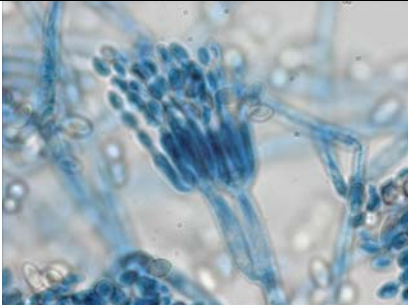


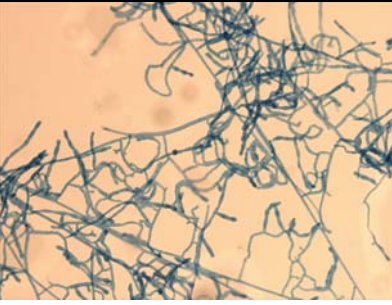


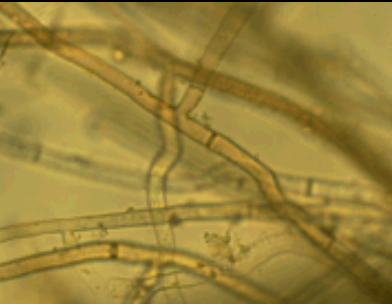
Orquídea	No. de hongos aislados	Morfología microscópica	Clasificación
<i>Stelis aeolica</i>	5		<i>Trichoderma sp</i>
			<i>Trichoderma sp</i>
			<i>Penicillium sp</i>
			<i>Trichoderma sp</i>
			<i>Trichoderma sp</i>

Tabla 5. Clasificación de los aislados de *Anasthallis racemifolia* por medio de morfología microscópica.

Orquídea	No. de hongos aislados	Morfología microscópica	Clasificación
<i>Anasthallis racemifolia</i>	1		<i>Trichoderma</i> <i>sp</i>

Tabla 6. Clasificación de los aislados de *Erycina crista galli* por medio de morfología microscópica.

Orquídea	No. de hongos aislados	Morfología microscópica	Clasificación
<i>Erycina crista galli</i>	8		<i>Fusarium sp</i>
			<i>Aspergillus</i> <i>sp</i>
			<i>Rhizoctonia</i> <i>sp</i>

<i>Erycina crista galli</i>	8		<i>Rhizoctonia</i> <i>a sp.</i>
			<i>Rhizoctonia</i> <i>a sp.</i>
			<i>Rhizoctonia</i> <i>a sp.</i>
			<i>Fusarium</i> <i>sp.</i>
			<i>Rhizoctonia</i> <i>a sp.</i>

6.3. Identificación Molecular de los Hongos mediante RAPDs.

Se seleccionaron dos primers o iniciadores, el OPC 8 y OPC 11, de la serie OPC (Operon Technologies Inc. Alameda, California, USA), ya que algunos con los que se contaba en el laboratorio (OPC 2, OPC 5, OPC 7, OPC 8, OPC 9, OPC 10, OPC 11, OPC 12, OPC 13, OPC 14, OPC15, OPC 16, OPC 17, OPC18, OPC19, OPC 20), se habían degradado. Para determinar esto se realizaron pruebas de PCR con cada uno de los iniciadores, se prepararon mezclas de reacción con los iniciadores sin DNA, se esperaba observar que los iniciadores que estuvieran en buen estado no se utilizaran en las reacciones, viéndose los iniciadores no utilizados como pequeñas manchas sobre el gel mediante luz ultravioleta, siendo solamente los iniciadores OPC 8 y OPC 11 los que se encontraban en buen estado para realizar los PCR-RAPDs. Con ayuda de la clasificación morfológica preliminar, los hongos se agruparon de acuerdo al mismo género, y con ello se pudo así comparar estos con los resultados obtenidos mediante la técnica de RAPDs.

Para identificar por huella genética a cada una de las cepas de acuerdo a la clasificación, se pretendía seleccionar las bandas de un mismo tamaño, bandas que tuvieran el mismo número de pares de bases, presentes en todos los aislados preclasificados como la misma especie, sin embargo se observó bandeo diferente para las cepas y con ello se procedió a la búsqueda de una huella genética o una banda distintiva para cada uno de los aislados.

6. 3. 1. PCR- RAPDs con el iniciador OPC8.

En esta sección se presentan las amplificaciones obtenidas en las diferentes especies de hongos con el iniciador aleatorio OPC 8.

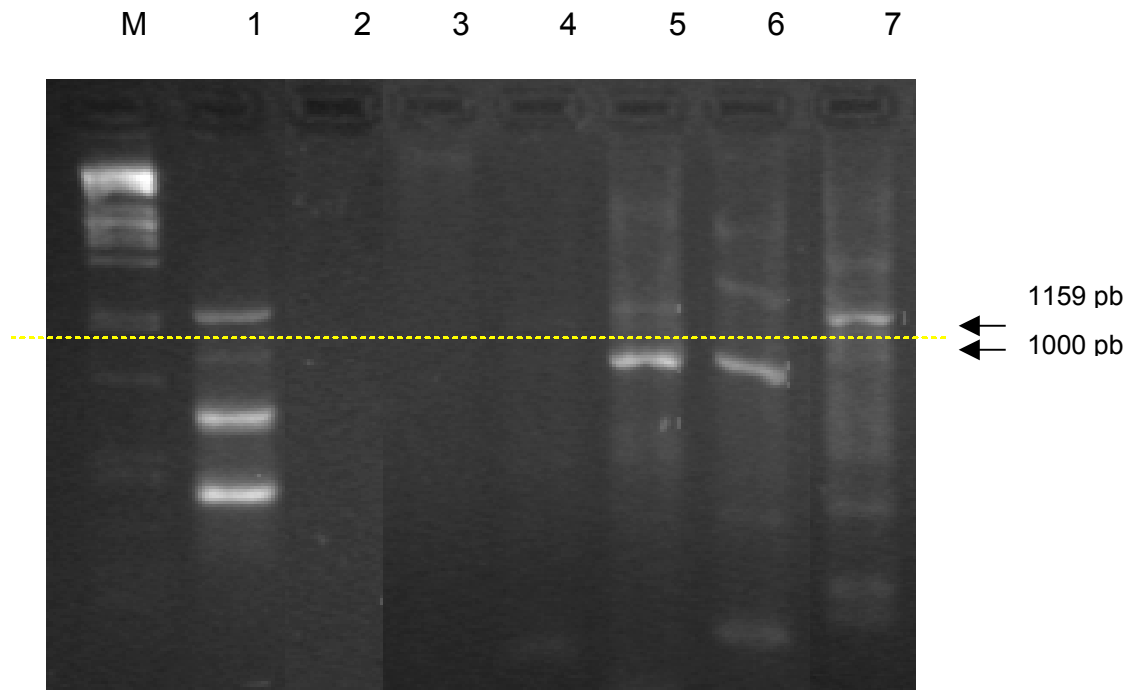


Fig. 16. Amplificaciones obtenidas para *Rhizoctonia sp.* con el iniciador OPC 8 , M es el marcador *Pst I*, 1 cepa aislada de *Guarianthe aurantiaca*, 2 cepa aislada de *Notylia barkeri*, 3, 4, 5, 6 y 7 cepas obtenidas de *Erycina crista galli*.

6.3.1.1 PCR-RAPDs de *Rhizoctonia sp.* con el iniciador OPC8.

De las amplificaciones obtenidas para las probables *Rhizoctonia sp.* se puede apreciar que se obtuvieron bandas de un mismo tamaño en algunos de los aislados, como en la cepa obtenida de *Guarianthe*

aurantiaca y tres de las cepas aisladas de *Erycina crista galli*, en estos aislados se aprecian bandas de un mismo tamaño, una de 1159 pb y la otra de 1000 pb, ambas bandas muestran que estos aislados están más relacionados genéticamente, tratándose tal vez del mismo género y especie, sin embargo en la cepa aislada de *Notylia barkeri* y en dos de *Erycina crista galli* no hubo amplificación.

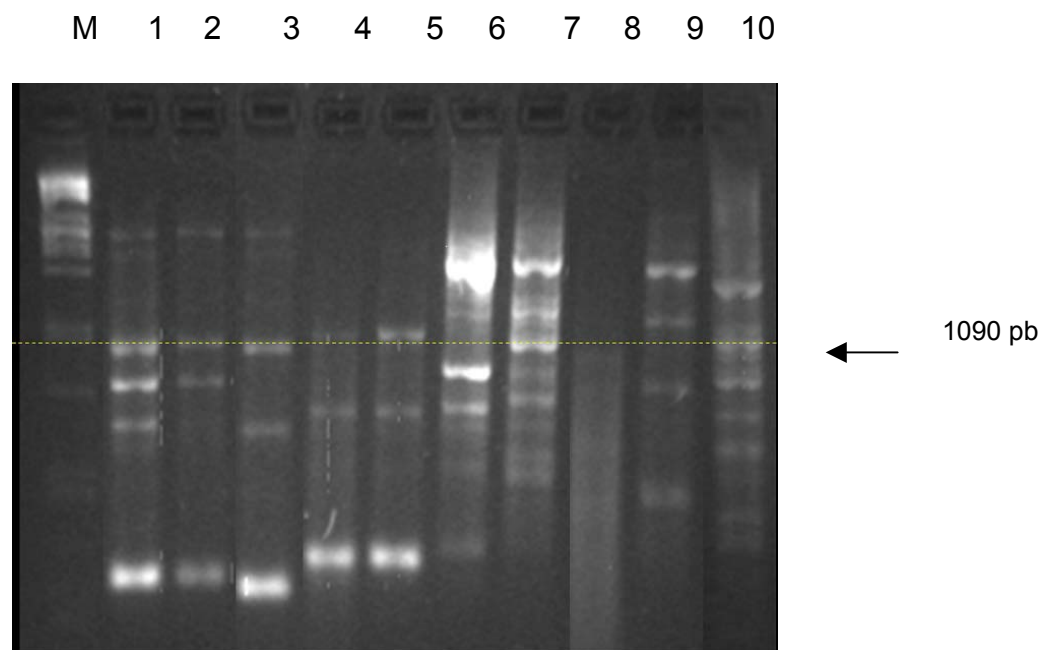


Fig. 17. Amplificaciones obtenidas para *Trichoderma sp.* con el iniciador OPC 8, M es el marcador *Pst I*, 1 y 2 son las cepas obtenidas de *Notylia barkeri*, 3, 4 y 5 se aislaron de *Trichocentrum oerstedii*, 6, 7, 8 y 9 de *Stelis aeolica*, y 10 de *Anasthallis racemifolia*.

6.3.1.2 PCR-RAPDs de *Trichoderma sp.* con el iniciador OPC8.

Se presentaron amplificaciones en todas las cepas de *Trichoderma sp.* con excepción de una (8), la cual se obtuvo de *Stelis aeolica*. Los dos

aislados de *Notylia barkeri*, uno de *Trichocentrum oerstedii* (3), uno de *Stelis aeolica* (7) y uno de *Anasthallis racemifolia* (10), presentaron una misma banda de alrededor de 1090 pb, esta banda presente en la mayoría de los aislados muestras que existe una relación entre ellos, pudiendo así determinar que se trata del mismo género, *Trichoderma*, además hubo algunas bandas amplificadas sólo en determinados aislados, tal es el caso de las dos cepas obtenidas de *Notylia barkeri* y una de las cepas aisladas de *Trichocentrum oerstedii* (3), en éstas la banda amplificada fue de alrededor de 2560 pb, en dos de los aislados de *Trichocentrum oerstedii* (4 y 5) se presentaron dos bandas una de 1159 pb y la otra de 600 pb respectivamente, en dos de las cepas obtenidas de *Stelis aeolica* (6 y 7) y en la cepa de *Anasthallis racemifolia* al parecer muchas de las bandas son similares.

M 1 2 3 4 5

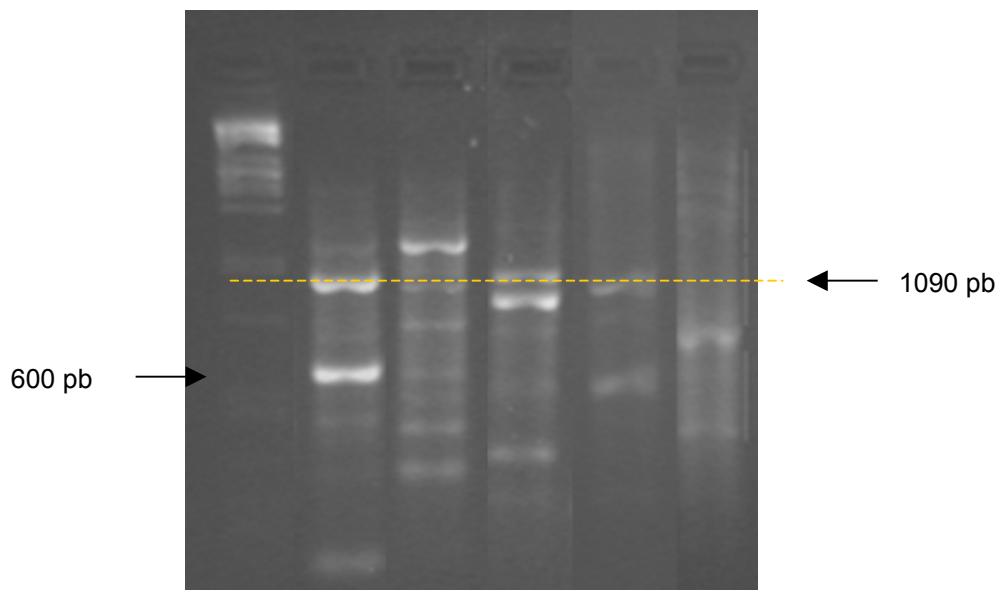


Fig. 18. Bandas obtenidas para *Fusarium sp.* con el iniciador OPC 8. M es el marcador de peso molecular *Pst I*, 1 es la cepa aislada de *Guarianthe aurantiaca*, 2 es el aislado de *Notylia barkeri*, 3 cepa adquirida de *Trichocentrum oerstedii*, 4 y 5 aislados de *Erycina crista galli*.

6.3.1.3. PCR-RADPs de *Fusarium sp.* con el iniciador OPC8.

En el caso de las cepas de *Fusarium sp.*, en el aislado de *Guarianthe aurantiaca*, en el de *Notylia barkeri* y en uno de los de *Erycina crista galli* (4) existe una banda de similar tamaño de alrededor de 1090 pb. En los aislados de *Guarianthe aurantiaca* y *Notylia barkeri* apareció otra banda del mismo peso, 600 pb. Con estos resultados se puede observar que existe una mayor similitud genética entre las cepas de *Guarianthe aurantiaca* y *Notylia barkeri* sin embargo también lo hay, en menor grado, con una de las cepas de *Erycina crista galli* (4), pues con ella tan solo tienen en común una banda, esto hace pensar que

posiblemente se trata del mismo hongo, o por lo menos tal vez del mismo género.

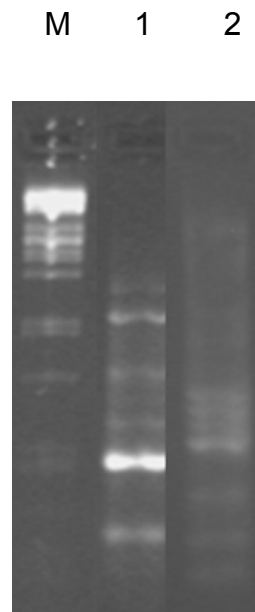


Fig. 19. Bandas obtenidas de dos cepas de *Aspergillus sp.* con el iniciador OPC 8, M es el marcador *Pst I* , 1 aislado de *Trichocentrum oerstedii* y 2 cepa adquirida de *Erycina crista galli*.

6.3.1.4. PCR-RAPDs de *Aspergillus sp.* con el iniciador OPC8.

Desafortunadamente en ambos aislados preclasificados como *Aspergillus sp.* no se obtuvieron bandas del mismo peso, algunas son muy similares pero no exactamente iguales, todas son de diferentes pesos, esto no permite hacer una clara comparación entre bandas.

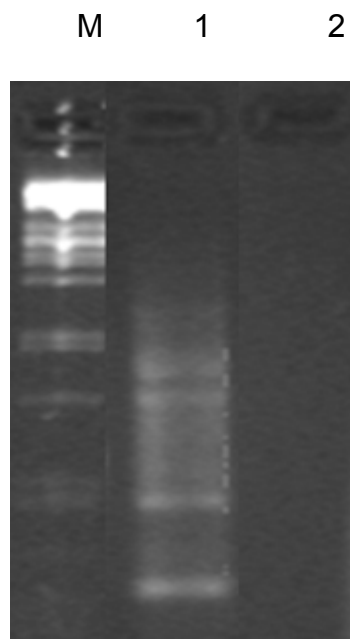


Fig. 20. Bandas obtenidas de dos cepas, una *Sclerotium sp.*, 1, y la otra *Penicillium sp.*, 2,. M es el marcador de peso molecular *Pst I*, 1 cepa adquirida de *Guarjanthe aurantiaca*, 2 aislado de *Stelis aeolica*.

6.3.1.5 PCR-RAPDs de *Sclerotium sp.* y *Penicillium sp.* con el iniciador OPC8.

La cepa que fue obtenida *Guarianthe aurantiaca* fue preidentificada como *Sclerotium sp.*, 1, en ésta si se obtuvieron bandas de diferentes tamaños, sin embargo en 2 cepa aislada de *Stelis aeolica* y preidentificada como *Penicillium sp.* no se obtuvieron bandas, esto tal vez se debió a que la secuencia del primer opc 8 no encontró ninguna región en la cual pudo haberse pegado dentro del genoma del hongo.

En el caso de los aislados preclasificados como *Aspergillus sp.*, *Sclerotium sp.* y *Penicillium sp.*, no se puede realizar una verdadera clasificación molecular pues se necesita tener un mayor número de aislados de estas especies y mayor cantidad de bandas obtenidas de los mismos para así poder comparar el tamaño de las bandas obtenidas y seleccionar las del mismo peso.

6.3.2 PCR- RAPDs con el oligonucleótido OPC11.

A continuación se presentan las amplificaciones obtenidas en las diferentes especies de hongos con el iniciador aleatorio OPC 11.

M 1 2 3 4 5 6 7

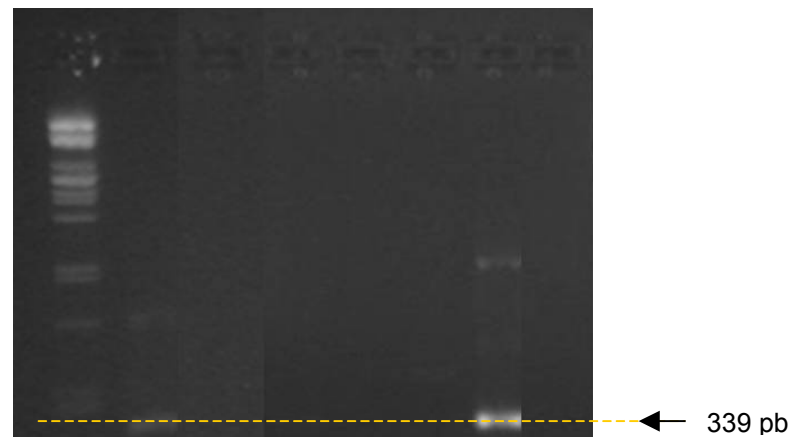


Fig. 21. Amplificaciones obtenidas para *Rhizoctonia sp.* con el iniciador OPC 11. M es el marcador de peso molecular *Pst I*, 1 aislado *Guarianthe aurantiaca*, 2 cepa aislada de *Notylia barkeri*, 3, 4, 5, 6 y 7 cepas obtenidas de *Erycina crista galli*.

6.3.2.1 PCR-RAPDs de *Rhizoctonia sp.* con el iniciador OPC 11.

Aquí no se presentaron amplificaciones para la mayoría de los aislados preclasificados como *Rhizoctonia sp.*, solo en el aislado de *Guarianthe aurantiaca* y en una de las cepas obtenidas de *Erycina crista galli*, 6, hubo amplificación, siendo únicamente similar una banda en ambos aislados, cuyo peso es de 339 pb.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

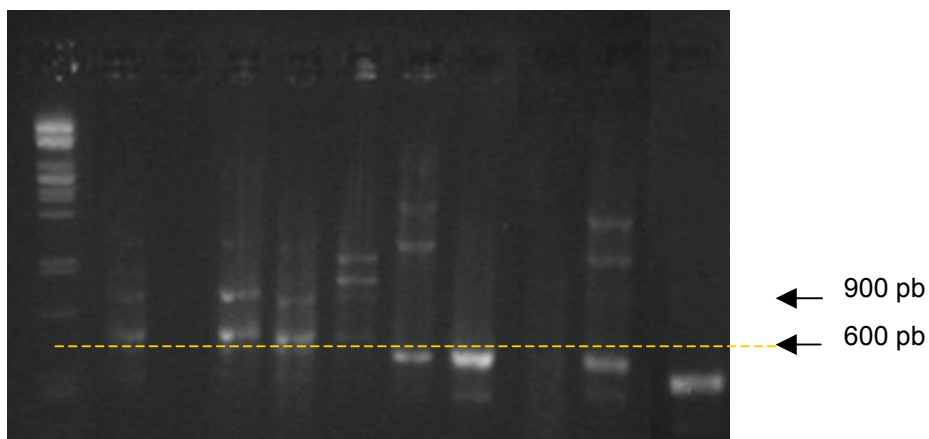


Fig. 22. Bandas obtenidas de *Trichoderma sp.* con el iniciador OPC 11. M es el marcador de peso molecular *Pst I*, 1 y 2 son las cepas obtenidas de *Notylia barkeri*, 3, 4 y 5 se aislaron de *Trichocentrum oerstedii*, 6, 7, 8 y 9 de *Stelis aeolica*, y 10 de *Anasthallis racemifolia*.

6.3.2.2 PCR-RAPDs de *Trichoderma sp.* con el iniciador OPC11.

En este caso una de las cepas aisladas de *Notylia barkeri*, 1, y los tres aislados de *Trichocentrum oerstedii*, 3, 4, 5, presentaron dos bandas similares entre los aislados, una de alrededor de 900 pb y otra de 600 pb aproximadamente. En las cepas 6 y 7, cepas obtenidas de *Stelis aeolica* se presentó una banda de similar tamaño, 339 pb, sin embargo en los aislados restantes las bandas obtenidas fueron de diferentes pesos. Las bandas más representativas en la mayoría de los aislados, la banda de 900 pb y la de 600 pb permiten demostrar que existe una mayor relación genética entre las cepas que comparten las mismas bandas, y que es muy probable que se trate del mismo hongo, en este caso de *Trichoderma sp.*

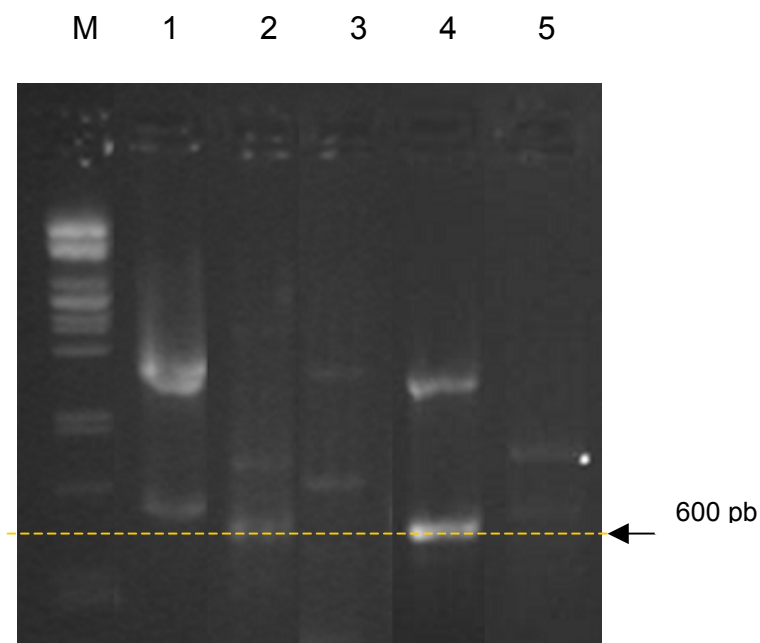


Fig. 23. Amplificaciones obtenidas de *Fusarium sp.* con el iniciador OPC 11. M es el marcador de peso molecular *Pst I*, 1 es la cepa aislada de *Guarlanthe aurantiaca*, 2 es el aislado de *Notylia barkeri*, 3 cepa adquirida de *Trichocentrum oerstedii*, 4 y 5 aislados de *Erycina crista galli*.

6.3.2.3 PCR-RAPDs de *Fusarium sp.* con el iniciador OPC11.

Se obtuvieron amplificaciones en todos los aislados, en el aislado de *Notylia barkeri*, 2, y en uno de los aislados de *Erycina crista galli*, 4, existe una banda igual de 600 pb aproximadamente. Entre el aislado de

Guarlanthe aurantiaca, 1, y uno de *Erycina crista galli*, 4, parece ser que existe una banda similar, sin embargo es difícil determinar si son iguales pues uno de las bandas presenta un barrido. En los demás aislados las bandas presentes fueron muy diferentes en sus pesos, lo cual no ayudó para poder hacer una comparación con ellas.

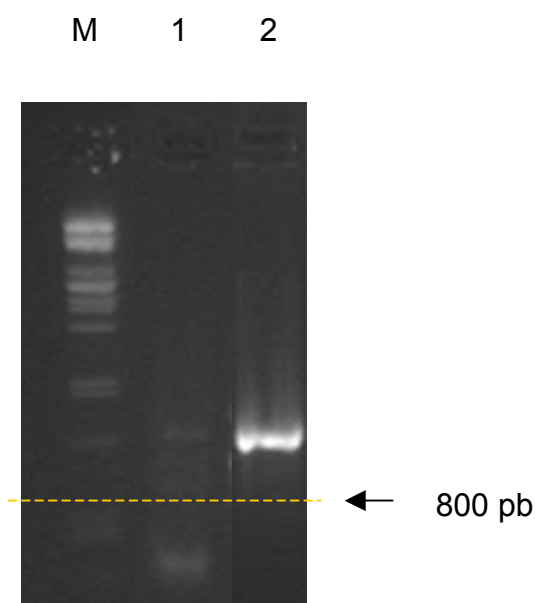


Fig. 24. Bandas obtenidas de las cepas de *Aspergillus sp.* con el iniciador OPC 11. M es el marcador *Pst I*, 1 aislado de *Trichocentrum oerstedii* y 2 cepa adquirida de *Erycina crista galli*.

6.3.2.4 PCR-RAPDs de *Aspergillus sp.* con el iniciador OPC11.

En ambas cepas preclasificadas como *Aspergillus sp.* hubo amplificaciones, pero estas fueron muy escasas, solo una banda de 800 pb se obtuvo en ambos aislados, esto permite saber que tal vez ambas

cepas estén relacionadas genéticamente, sin embargo no es suficiente para determinar que se trata del mismo hongo.

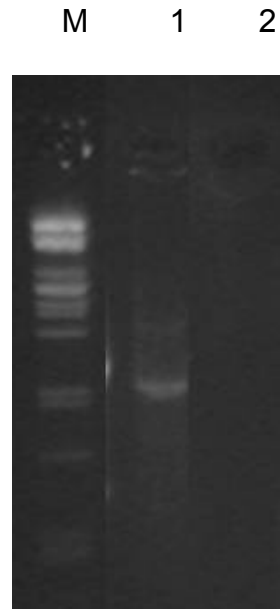


Fig. 25. Amplificaciones obtenidas de las cepas de *Sclerotium sp.* y *Penicillium sp.* con el iniciador OPC 11. M es el marcador de peso molecular *Pst I*, 1 cepa preidentificada como *Sclerotium sp.*, aislada de *Guarianthe aurantiaca*, 2 aislado de *Penicillium sp.* obtenido de *Stelis aeolica*.

6.3.2.5 PCR-RAPDs de *Sclerotium sp.* y *Penicillium sp.* con el iniciador OPC11.

En este caso solo se obtuvo una banda en el aislado de *Sclerotium sp.*, en el aislado de *Penicillium sp.* no hubo amplificaciones, al igual que

en los casos anteriores esto tal vez se debió a que la secuencia del iniciador OPC 11 no se pegó en ninguna región del genoma del hongo.

Para las cepas de *Fusarium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Sclerotium sp.* y *Penicillium sp.* es necesario tener un mayor número de aislados de estas especies, así como las bandas de los mismos para poder determinar si efectivamente se trata de las especies mencionadas basándose en la comparación y selección de bandas de igual tamaño.

6.3.3 PCR con los iniciadores específicos para *Rhizoctonia solani* PC1F y PC1R.

Desafortunadamente no se obtuvieron resultados positivos con estos iniciadores pues ninguna de las cepas que se habían preclasificado como *Rhizoctonia sp.* resultaron ser *Rhizoctonia solani*.

6.4 Tinción de Gram y Antibiogramas de Bacterias.

En total se aislaron 36 bacterias de la corteza, a las cuales se les realizó la tinción Gram, para poder determinar si eran positivas o negativas, también todas las cepas bacterianas fueron enfrentadas a algunos antibióticos. Los resultados de las pruebas de resistencia a antibióticos mediante multidiscos combinados (BIO RAD) se muestran en

la tabla 2. En la tabla se aprecian los valores de los halos de inhibición de las cepas bacterianas ante cada uno de los antibióticos utilizados. Se puede observar que en algunos casos los halos de inhibición fueron muy grandes y en otros muy pequeños. De todas las cepas algunas no presentaron crecimiento en la placa con PDA, incluso después de haber resembrado en cuatro ocasiones cada una de las cepas, estas cepas fueron PM2B4, PM2B5, PM2B6, PM2B7, PM3B2, PM3B5, PM3B6, PM3B7, PM3B9 y PM5B2.

Tabla 7. Patrón de resistencia a diferentes antibióticos de las bacterias aisladas

Bacteria	ANTIBIOTICOS											
	CF	CL	E	AM	AK	SXT	CRO	GE	NET	ENX	DC	PE
PM1B1	41,2	17,2	36,9	44,5	13	21,8	15,6	17,2	6,8	19	20,2	13,8
PM1B2	0	12,8	0	18,3	3,46	30,6	34,4	13	0	9,1	0	0
PM1B3	29,4	22,6	9,6	14,5	8,4	18,1	13,6	0	0	30	17,4	0
PM1B4	31,7	14,6	0	27,4	9,1	27,2	38,9	7,4	9,09	17	0	0
PM1B5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PM1B6	8,26	22,3	0	20,6	11,07	31,8	33	8,8	9,9	14	0	0
PM1B7	33,96	12,2	10,5	28,3	13,6	28,5	14,7	11,1	0	19	0	0
PM1B8	0	0	0	0	13,9	19,6	15,2	0	0	21	0	0

PM1B9	20,2	21,6	0	11,8	8	0	10,1	11,6	12,1	25	13,1	0
PM2B1	8,06	21,8	8,8	0	6,2	0	14	12,3	12,2	31	12,2	0
PM2B2	36,18	5,8	8,6	37	23,8	0	12,2	2,32	5,68	21	22,8	0
PM2B3	13,4	24	0	0	9,79	0	0	0	8,42	17	0	0
PM2B4	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///
PM2B5	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///
PM2B6	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///
PM2B7	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///
PM3B1	48	19,9	28,4	23,3	21,6	53,6	46	20,8	10,6	22	14,4	22,6
PM3B2	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///
PM3B3	0	0	0	0	0	8,4	9,8	0	0	16	0	0
PM3B4	30,4	25,8	10,8	22,2	11	21,4	17,4	0	0	19	23,2	19,2
PM3B5	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///
PM3B6	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///
PM3B7	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///
PM3B8	0	0	0	0	9,4	17,8	9,07	0	0	6,6	0	0
PM3B9	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///
PM4B1	18,3	18,2	12,8	22,7	8,6	0	14,9	13,2	15,4	34	8,8	3,4
PM4B2	0	0	0	0	15,8	25,5	16,2	0	0	11	0	7,4
PM4B3	47,2	13,4	18,6	30,6	13,5	39,4	26,4	13,3	10,4	24	13,6	17,3
PM5B1	0	0	0	16,4	22,4	21	0	6,2	18,4	30	9,3	12,3
PM5B2	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///
PM5B3	28,8	20	13,8	43,4	12,4	28,2	13,8	16	14,1	36	17,8	22,4
PM6B1	17,41	9,61	0	13,9	12,6	9,43	20,6	0	0	28	0	0
PM6B2	0	0	0	0	12,6	18,9	17,4	0	0	17	0	0
PM6B3	0	0	0	0	11,1	27,6	22,3	0	0	24	0	0

AK=amikacina
AM= ampicilina
CF=cefalotina
CRO= ceftriaxona
CL=cloranfenicol

DC= dicloxacilina
ENX=enoxacina
E=eritromicina
GE=gentamicina
NET=netilmicina
PE= penicilina
SXT=sulfametoxazol

Tabla 8. Resumen de la resistencia de las bacterias a antibióticos y tinción Gram.

Aislado de	Bacteria	Resistencia (antibióticos)	Gram
<i>Guarianthe aurantiaca</i>	PM1B1	CF, CL, E, AM, AK, SXT, CRO, GE, NET, ENX, DC, PE	Negativo
	PM1B2	CL, AM, AK, SXT, CRO, GE, ENX, DC	Negativo
	PM1B3	CF, CL, E, AM, AK, SXT, CRO, ENX, DC	Negativo
	PM1B4	CF, CL, AM, AK, SXT, CRO, GE, NET, ENX,	Negativo
	PM1B5	CF, CL, E, AM, AK, SXT, CRO, GE, NET, ENX, DC	Negativo
	PM1B6	CF, CL, AM, AK, SXT, CRO, GE, NET, ENX,	Negativo
	PM1B7	CF, CL, E, AM, AK, SXT, CRO, GE, ENX	Negativo
	PM1B8	AK, SXT, CRO, ENX	Negativo
	PM1B9	CF, CL, AM, AK, CRO, GE, NET, ENX, DC	Negativo
<i>Notylia barkeri</i>	PM2B1	CF, CL, E, AK, CRO, GE, NET, ENX, DC	Negativo
	PM2B2	CF, CL, E, AM, AK, CRO, GE, NET, ENX, DC	Negativo
	PM2B3	CF, CL, AK, NET, ENX,	Positivo
	PM2B4	No presento crecimiento en la placa con antibiograma después de 4 repeticiones	Negativo
	PM2B5	No presento crecimiento en la placa con antibiograma después de 4 repeticiones	Negativo
	PM2B6	No presento crecimiento en la placa con antibiograma después de 4 repeticiones	Negativo
	PM2B7	No presento crecimiento en la placa con antibiograma después de 4 repeticiones	Negativo
<i>Trichocentrum oerstedii</i>	PM3B1	CF, CL, E, AM, AK, SXT, CRO, GE, NET, ENX, DC, PE	Negativo
	PM3B2	No presento crecimiento en la placa con antibiograma después de 4 repeticiones	Positivo
	PM3B3	SXT, CRO, ENX	Negativo
	PM3B4	CF, CL, E, AM, AK, SXT, CRO, ENX, DC, PE	Negativo
	PM3B5	No presento crecimiento en la placa con antibiograma después de 4 repeticiones	Negativo
	PM3B6	No presento crecimiento en la placa con antibiograma después de 4 repeticiones	Positivo
	PM3B7	No presento crecimiento en la placa con antibiograma después de 4 repeticiones	Negativo
	PM3B8	AK, SXT, CRO, ENX	Negativo
	PM3B9	No presento crecimiento en la placa con antibiograma después de 4 repeticiones	Negativo
<i>Stelis aeolica</i>	PM4B1	CF, CL, E, AM, AK, CRO, GE, NET, ENX, DC, PE	Positivo
	PM4B2	AK, SXT, CRO, ENX, PE	Negativo
	PM4B3	CF, CL, E, AM, AK, SXT, CRO, GE, NET, ENX, DC, PE	Negativo
<i>Anasthallis racemifolia</i>	PM5B1	AM, AK, SXT, GE, NET, ENX, DC, PE	Negativo
	PM5B2	No presento crecimiento en la placa con antibiograma después de 4 repeticiones	Negativo
	PM5B3	CF, CL, E, AM, AK, SXT, CRO, GE, NET, ENX, DC, PE	Positivo
<i>Erycina crista galli</i>	PM6B1	CF, CL, AM, AK, SXT, CRO, ENX,	Negativo
	PM6B2	AK, SXT, CRO, ENX	Negativo
	PM6B3	AK, SXT, CRO, ENX	Negativo

En la tabla anterior se resumen los resultados obtenidos en el procesamiento de las bacterias mostrando la orquídea de la que fueron

aisladas, la clave de la bacteria, los antibióticos a los cuales fueron resistentes y el tipo de Gram de cada una de las cepas.

7. DISCUSIÓN.

La tinción de raíces solo se llevó a cabo en plantas de *Trichocentrum oerstedii* por ser la única especie de la cual se tenían

varias plantas en el laboratorio, lo ideal en este caso era realizar la tinción de raíces de todas las especies con las cuales se trabajó, para aparte de observar los pelotones poder ver el nivel de colonización en las raíces. A pesar de esto tanto hifas como pelotones se pudieron observar claramente dentro de las raíces de *Trichocentrum oerstedii* con los tres colorantes utilizados.

Al llevar a cabo el aislamiento de las raíces de las orquídeas, se obtuvo variedad en el número de aislados de hongos por planta, observando que en una de ellas, *Anasthallis racemiflora* hubo especificidad, ya que solo se obtuvo un hongo. Las cinco orquídeas restantes fueron promiscuas variando el número de hongos aislados de cada una de ellas. Esto puede deberse tal vez a los distintos requerimientos nutricionales de cada una de las orquídeas, ya sea que algunas necesiten mayor cantidad de nutrientes, o que haya una asociación entre hongos para proporcionar los nutrientes, en el caso de las promiscuas, y otras, las específicas en las que un hongo es capaz de proporcionar los nutrientes necesarios a la planta. Pero para poder determinar si todos los hongos aislados son micorrícicos de las orquídeas con las que se trabajó es necesario hacer inoculación de las semillas y pruebas de germinación, debido a que tal vez lo sean pero algunos mejores que otros.

Al realizar la identificación de hongos pueden existir algunos problemas, el más común es determinar la o las características distintivas de los organismos de un mismo género o especie y en base a esto identificarlos, sin embargo los hongos pueden presentar características morfológicas

muy similares que nos lleven a una identificación errónea, y este trabajo no fue la excepción, es por ello que se ha recurrido a técnicas moleculares que ayuden a realizar una identificación mas precisa.

En este caso antes de iniciar con la técnica molecular seleccionada, PCR-RAPDs, se realizó una prueba (mezcla de reacción para PCR-RAPDs sin DNA) para determinar si los iniciadores arbitrarios de la serie OPC que se tenían en el laboratorio (OPC 2, OPC 5, OPC 7, OPC 8, OPC 9, OPC 10, OPC 11, OPC 12, OPC 13, OPC 14, OPC15, OPC 16, OPC 17, OPC18, OPC19, OPC 20), no se habían degradado. Desafortunadamente de todos los iniciadores probados solo dos , el OPC 8 y el OPC 11 se encontraban en buenas condiciones para ser utilizados, sin embargo la cantidad de cada una de ellos no fue suficiente para poder realizar repeticiones de cada aislado. Los resultados moleculares aquí presentados se obtuvieron con este par de iniciadores, siendo con el iniciador OPC 8 con el que se presentaron mayor cantidad de bandas similares entre hongos pertenecientes al mismo género, esto se observó con mayor claridad en el caso de *Rhizoctonia sp.* y *Trichoderma sp.*. Con el iniciador OPC 11 solo en *Trichoderma sp.* se puede observar un par de bandas que permiten hipotetizar que se trata de *Trichoderma sp.*. Pero para poder realizar una identificación precisa se necesita hacer un mayor número de pruebas, con más iniciadores, seleccionando los que proporcionen el mayor número de bandas de igual tamaño, permitiendo así determinar si se trata del mismo género y especie de hongos.

En varios artículos e investigaciones realizadas anteriormente se ha reportado que miembros del género *Rhizoctonia*, en especial *Rhizoctonia*

solani, han demostrado ser unos de los mejores simbiosomas de orquídeas (Milligan y Williams, 1988). De las cepas de *Rhizoctonia* obtenidas en este trabajo de investigación al parecer ninguna resultó ser *Rhizoctonia solani*, pues de los resultados obtenidos con los iniciadores específicos PC1F y PC1R para *Rhizoctonia solani* (Weerasena et al, 2004), no hubo amplificación, esto pudo deberse a varios factores, uno posiblemente a los equipos y reactivos utilizados, ya que como se mencionó antes, al utilizar equipos y reactivos diferentes a los reportados en los artículos los resultados pueden variar, otro factor es la contaminación, pero también puede ser que la región específica del genoma de *Rhizoctonia solani* no está presente en los aislados que obtuvimos. Sin embargo se puede apreciar que probablemente 4 de los aislados son de la misma especie, pues las bandas obtenidas son iguales.

En los últimos años se han realizado estudios en los que se muestran que pueden existir bacterias promotoras de crecimiento relacionadas con las orquídeas (Tsavkelova, 2005), desafortunadamente como es una línea de investigación es nueva, necesita una mayor inversión de tiempo, esfuerzo y dinero, es por ello que en este trabajo solo se realizó el aislamiento y se inició la identificación y clasificación de las bacterias para poder abrir esta línea de investigación en el Laboratorio de Bioquímica Ecológica del CINVESTAV – UNIDAD IRAPUATO.

Tal vez los resultados aquí presentados no sean muy contundentes, sin embargo permiten profundizar un poco más y dar opciones para resolver algunas de las interrogantes referentes a la relación simbiótica entre la orquídea y el hongo, aún así faltan muchos

estudios por realizar, no se ha profundizado en otros aspectos importantes como lo son el conocer como la planta “selecciona” al o los hongos simbiotes, como se da este proceso, si existe algún tipo de señalización emitido por la planta para que el hongo actúe sobre ella, como se lleva a cabo el intercambio de nutrientes, en fin son tantos los procesos relacionados con esta simbiosis , como las dudas que se tienen sobre ellos.

8. CONCLUSIONES.

En orquídeas epífitas existe una asociación simbiótica, la cual puede ser entre una orquídea y varios hongos, ya que tal vez cada hongo proporcione a la planta distintos metabolitos o que exista una asociación

de varios hongos que le brinden a la planta el o los nutrientes necesarios para que ésta continúe con su desarrollo.

Trichoderma sp. fue el hongo mas comúnmente encontrado en las especies de orquídeas estudiadas. Sin embargo, *Rhizoctonia sp.*, también estuvo presente en la mayoría ellas.

La técnica de identificación de hongos basada en la morfología es rápida y relativamente sencilla, pero es común que se cometan errores de identificación al realizarla. En este caso las dificultades presentadas en la identificación morfológica solo permitieron realizar una identificación de los hongos hasta nivel de género.

PCR-RAPDs es una técnica que puede ayudar a realizar una mejor identificación, permitiendo corroborar la identificación basada en la morfología. En el caso de *Trichoderma* y *Rhizoctonia*, se logró apreciar mejor la similitud en las bandas obtenidas, demostrando la relación genética que existe entre los hongos.

9. PERSPECTIVAS.

Este trabajo es el inicio de una serie de investigaciones que permitan conocer los aspectos implicados en la relación orquídea, en este caso epífita, y el hongo, aquí solo se presenta el primer paso, que es el aislamiento e identificación preliminar de los hongos, sin embargo se

pretende con estos hongos inocular semillas de las orquídeas con las cuales se trabajó para realizar pruebas de germinación que nos permitan seleccionar los mejores hongos micorrícicos. Todo esto se realiza con el fin de restaurar y conservar las poblaciones de orquídeas epífitas de la región del Soconusco.

Respecto a la identificación de los hongos aquí aislados, se pretende crear un iniciador específico para cada uno de ellos, esto se haría comparando las bandas amplificadas mediante la técnica de RAPDs o Polimorfismo de DNA Amplificado al Azar, para luego seleccionar y secuenciar fragmentos generados de manera específica. Esta secuencia se traduciría en un marcador molecular, mejor conocido como Secuencia Caracterizada de una Región Amplificada o SCAR por sus siglas en inglés "Sequense Characterized Amplified Region", las cuales permitirán generar iniciadores específicos para la identificación de cada hongo.

10. LITERATURA CITADA.

Agrios, G. 1999. Fitopatología. Segunda edición. LIMUSA. México D.F.

Arditti, J. E. 1992. Fundamentals of Orchid Biology. John Wiley and Sons, USA.

Arditti, J. E. 1994. *Orchid Biology: Reviews and Perspectives III*. Cornell University Press.

Áviles, D. I. 1996. *Orquídeas Michoacanas*. Internet, [http://. www. ccu. unimich.mx](http://www.ccu.unimich.mx).

Bayman, P., Lebrón L., Tremblay R. and Lodge J. 1997. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). *New Phytologist* 135: 143-149.

Brundrett, M. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol. Rev.* 79. 473-495.

Cabrera-Chacón, T. 1999. *Orquídeas de Chiapas*. Instituto de Historia Natural y Gobierno del Estado. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

Collins, S. Gleen S. and Gibson D. 1995. Experimental analysis of intermediate disturbance and initial floristic composition: Decoupling cause and effect. *Ecology* 76: 486-492.

Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. (1983) A plant DNA mini-preparation Version II, *Plant Mol. Biol. Report* 1: 19-21.

Ellison, A. and Bedford B. 1995. Response of a wetland vascular plant community to disturbance : A simulation study. *Ecological Applications* 5: 109-123.

Finch, H. 1974. Los hongos comunes que atacan cultivos en América Latina. 1ª edición. Editorial Trillas. México, D.F.

García, A. 1985. Patología Vegetal Práctica. 2ª edición. LIMUSA. México.

Gómez, J., Lara, J. y Martínez, J. 2004. Técnicas Moleculares Aplicadas al Estudio de Hongos Micorrízico-arbusculares. Centro de Investigación y Graduados Agropecuarios. Instituto Agropecuario de Jalisco. Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México.

Grambizu, A. y Todmann, K.. 1997. Orquídeas Venezolanas. Internet, [www. geocites .com](http://www.geocites.com).

Harley J. and Smith S. 1983. Mycorrizal Symbiosis. Academic Press. London.

Higa, T. and Parr, J. 1994. Benefical and Effective Microorganisms for a Sustainable Agricultura and Environment. International Nature Farming Center. Atami, Japan.

Milligan, J. And Williams, P. 1988. The mycorrhizal relationship of multinucleate rhizoctonias from non-orchids with *Microtis* (Orchidaceae). *New Phytologist* 108: 205-209.

Ortigoza, F. y Hernández, H. 1994. *Microbiología Práctica*. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.

Pal Bai, H., Park, S., Weir, T., Callaway, R. and Vivanco J. 2004. How plants communicate using the underground information superhighway. *TRENDS in Plant Science*. Vol. 9 No. 1. 26-32

Pridgeon, A., Cribb, P., Chase M. and Rasmussen F. 2001. *Genera Orchidacearum*, Vol. 2, Orchidoideae (Part one). Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.

Ramírez, J. 2002. Orquídeas de México. Internet, www.conabio.gob.mx

Rodríguez, A. 2005. Boletín Informativo correspondiente al mes de Agosto. Asociación Costarricense de Orquideología. San José, Costa Rica.

Rosewich, L. and McDonald, B. 1994. DNA Fingerprinting in fungi. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5: 41-48.

Stohlgren, T., Coughenour, G., Chong, G., Brinley, M., Calan, L., Shell, D., Buckley D. and Berry J. 1997. Landscape analysis of plant diversity. *Landscape Ecology* 12: 155-170.

Tsavkelova, E. 2005. Auxin production by bacteria associated with orchid roots. *Mikrobiologiya*. Jan-Feb; 74 (1):55-62 Russian.

Valadez, E. y Kahl, G. 2000. Huella de ADN en genomas de plantas (Teoría y protocolos de laboratorio). Mundi-Prensa. México.

Weerasena, J., Chandrasekharan, V., Wijesundera, C. y Karunanayake, E. 2004. Development of a DNA probe and a PCR based diagnostic assay for *Rhizoctonia solani* using a repetitive DNA sequence cloned from a Sri Lankan isolate. *Mycological Research* 108: 649-653.

11. APÉNDICES.

APENCICE UNO.

En este apéndice se muestran las soluciones utilizadas la tinción de raíces.

Acetoglicerol.

Acido acetico al 85%

Glicerol

Agua destilada.

Para preparar el colorante se hace de la misma manera que el acetoglicerol agregando al final el colorante.

APENDICE DOS.

Todos los reactivos, enzimas, material y medios de cultivo fueron adquiridos de Gibco, Sigma, Bio Rad, Invitrogen o Amersham.

A) Soluciones para la extracción de DNA cromosómico.**Regulador de lisis (Buffer Dellaporta).**

Tris-HCl 100 mM pH 5.8

EDTA 50 mM pH 8.0

NaCl 500 mM

10 mM beta-mercaptoethanol

1.3% SDS

Fenol-Cloroformo.

Mezclar un volumen igual de fenol y cloroformo.

Acetato de Sodio 5 M.

5M a pH 5.2

Isopropanol frío al 100%**Etano al 70%****B) Electroforesis de ácidos nucleicos.**

Tris-borato (TBE 5X).

Tris base 54g

Ácido bórico 27.5g

EDTA 0.5 M pH 5.8 20ml

Regulador de carga para electrtforesis.

Glicerol 30%

EDTA pH 8.0 25 mM

Naranja G 0.025%

Guardar a 4% y utilizar una parte de esta solución por cada tres partes de ácido nucleico.

Marcador de peso molecular.***Pst I***

DNA λ (0.4 μg / μL) 45 μL

Buffer de reacción 2 (10X) 5.5 μL

Enzima Pst I 4.5 μL

Hind III

DNA λ (0.4 μg / μL) 45 μL

Buffer de reacción 2 (10X) 5.5 μL

Enzima Hind III 4.5 μL

En ambos casos se preparó la reacción, DNA λ y buffer de reacción 2 (10X), se incubó a 37°C por una hora y media, posteriormente se adicionaron 4.5 de enzima respectivamente, ahora incubando por un periodo de dos horas a 37°C. Para inactivar la enzima se sometió a una

temperatura de 65°C por veinte minutos. Se comprobó la digestión mediante una electroforesis.

Geles de agarosa.

Agarosa al 1.5 %:

Agarosa 0.75 g

TBE 5X 5 ml

Agua destilada 50 ml

Todos estos reactivos se mezclan y se funden.

C) Medios de Cultivo.

Medio PDA (Agar Papa Dextrosa).

Papas 200 g/l

D-glucosa 10g/l

Agar bacteriológico 18g/l

Se cortan las papas y se ponen en agua hirviendo durante 20 minutos, para luego filtrar el agua y agregar el agar para preparar el medio sólido.

Se esteriliza en autoclave a 20 lbs durante 15 minutos.

APENDICE TRES.

En este apéndice se muestran las secuencias de los iniciadores utilizados en este trabajo.

Iniciadores específicos para *Rhizoctonia solani*

PC1F

5 TATCGTGAGGAGTGGAAAGC 3

PC1R

5 TGTCCAACCTCATAACACCCG 3

Iniciadores aleatorios OPC 8 y OPC 11

OPC 8

5 TGGACCGGTG 3

OPC 11

5 AAAGCTGCGG 3