

Colonización micorrízica de *Laelia autumnalis* (La Llave & Lex.) Lindl.)

Mycorrhizal colonization of *Laelia autumnalis* (La Llave & Lex.) Lindl.)

Nadia Jiménez-Peña^{1*}, Manuel Sandoval-Villa¹, Víctor Hugo Volke-Haller¹, Martha Elena Pedraza-Santos², Ernesto Fernández-Herrera³

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Carretera México-Texcoco, km 36.5, CP. 56230. Texcoco, Estado de México, México.

²Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Agrobiología, Paseo Lázaro Cárdenas 2290, Emiliano Zapata, Melchor Ocampo, CP. 60170. Uruapan, Michoacán, México.

³Universidad de Sonora, Departamento de Agricultura y Ganadería. Carretera Bahía de Kino km 21, CP. 83340. Hermosillo, Sonora, México.

*Autor de correspondencia: jimenez.nadia@colpos.mx

Nota científica recibido: 20 de febrero de 2018 aceptado: 07 de julio de 2018

RESUMEN. El objetivo del estudio fue determinar la presencia y el grado de colonización micorrízica en raíces de la orquídea epífita *Laelia autumnalis*, que crece de forma natural en bosques de encino del estado de Michoacán, México. Se observó colonización micorrízica en las raíces de los siete sitios de estudio, la colonización varió de acuerdo al tipo y sección de raíz muestreada, y el sitio de muestreo, siendo mayor la colonización en la parte basal de las raíces maduras. Las raíces que crecen en materia orgánica, son las que presentaron mayor colonización con respecto a las raíces que crecen fuera de la materia orgánica. Este es uno de los primeros reportes donde se indica la colonización micorrízica en raíces de la orquídea epífita *Laelia autumnalis*.

Palabras clave: Colonización radical, micorriza orquideoide, orquídea epífita, pelotones

ABSTRACT. This research aimed to determine the presence and degree of mycorrhizal colonization in roots of the epiphytic orchid *Laelia autumnalis*, which grows naturally in oak forests of the state of Michoacán, Mexico. Mycorrhizal colonization was observed in the roots of the seven study sites; colonization varied according to the type and section of root sampled, and the sampling site, with colonization being greater in the basal part of the mature roots. The roots that grew in organic matter had greater colonization than those that grew outside the organic matter. This is one of the first reports indicating mycorrhizal colonization in roots of the epiphytic orchid *Laelia autumnalis*.

Key words: Root colonization, orchid mycorrhiza, epiphytic orchid, pelotons

INTRODUCCIÓN

Las orquídeas presentan los sistemas estructurales y funcionales más complejos de todas las monocotiledóneas. Tienen una profunda especialización en la polinización, y utilizan estrategias de adaptación que les ayudan a mantener su balance hídrico, como cutículas gruesas en las hojas y la presencia de pseudobulbos para almacenamiento de agua (Yang et al. 2016). Todos los miembros de esta familia se caracterizan por depender de hongos micorrízicos para la germinación de sus semillas en la naturaleza, y como complemento de su ali-

mentación micotrófica durante su ciclo de vida hasta la etapa adulta (Rasmussen y Whigham 2002). El hongo participa en una relación mutualista, proporcionando alimento a las semillas para iniciar la germinación (Vij et al. 2002). El embrión embebido es colonizado por la hifa del hongo, principalmente *Rhizoctonia* spp., que invade algunas células del embrión formando enrollamientos hifales en su interior, llamados pelotones (Sathiyadash et al. 2012, Jiang et al. 2015). Estos pelotones son digeridos por las células del embrión y los nutrientes que obtiene se usan en el proceso de germinación, desencadenando la diferenciación de órganos vege-

tativos (Rasmussen 1995). La participación de los hongos micorrízicos es un elemento esencial en el proceso de germinación (Rasmussen et al. 2015). La probabilidad de que una semilla de orquídea germine, aún en contacto con el simbionte micorrízico, es en términos generales baja y solo germinan algunas de millones de semillas (Arditti y Ghani 2000, Mukerji et al. 2002). No obstante, que la colonización de la semilla es esencial para la germinación, se ha sugerido que en la etapa adulta las orquídeas no siempre están colonizadas por hongos, lo que puede indicar que éstas son menos dependientes de la simbiosis micorrízica conforme maduran (Batty et al. 2002, Bayman et al. 2002). Sin embargo, particularmente en orquídeas epífitas, se ha observado colonización micorrízica continua y generalizada (Sathiyadash et al. 2012). Aunque en México, se encuentran alrededor de 1 260 especies de orquídeas (Soto et al. 2007), se tiene pocos estudios que reporten la presencia de micorrizas en orquídeas y mucho menos los factores que la influyen (Beltrán-Nambo et al. 2010). Los estudios realizados se centran en especies terrestres del género *Bletia* (*B. roezlii*, *B. punctata*, *B. purpurata*) o en especies epífitas como *Epidendrum stamfordianum*, *Stelis quadrifida* y *Erycina crista-galli* (Bertolini et al. 2014).

El género *Laelia* (Orchidaceae) se compone de 22 especies, de las cuales 11 se encuentran en México. En general, estas orquídeas crecen en los bosques de encinos (Halbinger y Soto 1997). Las orquídeas *Laelia* spp. se cultivan en huertos familiares por sus hermosas flores, por lo que las poblaciones naturales se han visto afectadas por la destrucción de su hábitat y la extracción excesiva de plantas (Beltrán-Rodríguez et al. 2012, Bertolini et al. 2012), aun cuando se encuentran protegidas en la norma NOM-059-2010 (SEMARNAT 2010). Particularmente para especies epífitas del género *Laelia*, no hay información sobre la colonización micorrízica, que pudiera sugerir la importancia de esta asociación en la nutrición, y por lo tanto en el crecimiento y desarrollo de estas especies. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la presencia y el grado de colonización micorrízica,

en diferentes tipos de raíces de la orquídea epífita *Laelia autumnalis*, desarrolladas en ambientes naturales de zonas de bosque de encino del estado de Michoacán, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del área y especie de estudio

La población de *Laelia autumnalis* estudiada fue proporcionada por el banco de germoplasma del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos (SINAREFI). Las plantas se colectaron en siete sitios de bosque de encino de dos localidades en los municipios de Tzintzuntzan y Uruapan, Michoacán. Cada muestra fue georeferenciada mediante GPS V (GARMIN®) (Tabla 1). La colecta se realizó entre los meses de marzo y diciembre, en árboles de *Quercus* como planta hospedera.

Raíces y procesamiento de las muestras

Las plantas muestreadas se colectaron junto con las ramas y troncos de la planta hospedera (forofito) y se colocaron en bancales que contenían tezontle, el cual se regaba todos los días para proporcionar las condiciones de humedad, en un invernadero de cristal de dos aguas con malla sombra al 60% para evitar exceso de radiación, temperatura promedio de 25 °C y humedad relativa promedio del 70%. De cada individuo colectado se tomaron al azar y con ayuda de un bisturí raíces en diferentes estadios: 1) raíces jóvenes (en desarrollo), localizadas en la parte aérea (adventicias); 2) maduras (completamente desarrolladas); 3) vieja (lignificadas); también se consideraron las raíces que estaban dentro de materia orgánica o fuera de la materia orgánica. Las muestras se procesaron de acuerdo con la metodología propuesta por Ortega-Larrocea (2008) con modificaciones, que consiste en lavado con agua de pozo y agua destilada, esterilizado con hipoclorito de sodio al 1% y corte transversal.

La micorrización se evaluó a partir de cortes transversales realizados de forma manual. Para lo cual, se tomó una muestra de 1.5 cm de la parte basal, media y apical de cada tipo de raíz, cada segmento se envolvió en Parafilm® MR para facilitar

Tabla 1. Descripción de los sitios de colecta de las muestras de *Laelia autumnalis*.

Sitio	Localidad	Municipio	Latitud	Longitud	Altitud (m)
1	Ucasanastacua	Tzintzuntzan	19° 37' 18.7"	101° 37' 29.4"	2073
2	Ucasanastacua	Tzintzuntzan	19° 37' 18.9"	101° 37' 29.5"	2067
3	Ucasanastacua	Tzintzuntzan	19° 37' 17.5"	101° 37' 29.5"	1981
4	San Lorenzo	Uruapan	19° 31' 10.3"	102° 06' 50.2"	2115
5	San Lorenzo	Uruapan	19° 31' 12.0"	102° 06' 45.7"	2086
6	San Lorenzo	Uruapan	19° 30' 40.1"	102° 07' 08.4"	2103
7	San Lorenzo	Uruapan	19° 30' 40.8"	102° 07' 06.1"	2082

su corte. De cada segmento de la raíz se tomaron seis secciones, los cuales se montaron en portaobjetos, que se tiñeron con fucsina ácida (0.01%, w/v en ácido láctico-glicerol-agua destilada, 14:1:1), y se observaron en un microscopio óptico a 40x.

La micorrización se evaluó en plantas de siete sitios de muestreo, cinco tipos de raíces (jóvenes, maduras, viejas, dentro de materia orgánica, y fuera de materia orgánica), tres secciones de la raíz (basal, media y apical), y cuatro repeticiones con seis observaciones. Para la intensidad de colonización micorrízica se consideró en cada observación la presencia o ausencia de pelotones e hifas, dando el valor de uno o cero en caso de presencia o ausencia de pelotones e hifas (Figura 1a y 1b).

Análisis estadístico

Los datos en porcentaje se transformaron a logaritmos naturales, para realizar el análisis de varianza y la comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$), con el programa estadístico SAS para windows 9.1 (SAS 2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La orquídea *L. autumnalis* presentó colonización micorrízica (Figura 1b, c y d) en todas las raíces muestreadas en los siete sitios de estudio. Pero la intensidad de la colonización varió de acuerdo al sitio de muestreo, tipo y sección de la raíz (Tabla 2), siendo mayor la colonización en la zona basal de las raíces maduras, donde predominan los pelotones digeridos. Esto coincide con Rasmussen y Whigham (2002) y Bertolini et al. 2014 quienes mencionan que la cantidad de pelotones se incrementa al aumentar la madurez de la raíz, y

el contacto con la materia orgánica. Lo que también indica que la orquídea epífita *L. autumnalis* es una especie infectada y colonizada por hongos micorrízicos en la etapa adulta, y sugiere dependencia de la orquídea con los hongos micorrízicos durante su ciclo de vida. Tal vez debido a que esta orquídea epífita vive a la sombra de los árboles, con poca irradiación solar y por lo tanto baja fotosíntesis, lo que ocasiona dependencia de carbono, que es suministrado por la asociación micorrízica. Al respecto Osorio-Gil et al. (2008) mencionan que los ambientes donde se desarrollan las plantas epífitas son pobres en nutrientes, por lo que estas han tenido que desarrollar estrategias para mejorar su nutrición. En este sentido, es factible que la orquídea epífita *L. autumnalis* use su asociación con hongos micorrízicos para mejorar la absorción de nutrientes y por ende su crecimiento.

La muestra seis procedente de San Lorenzo, Uruapan tuvo la mayor presencia de hifas con porcentajes mayores al 80%, independientemente del tipo y sección de raíz. Mientras que la muestra siete de San Lorenzo, Uruapan tuvo poca presencia de hifas con porcentajes menores de 15.3%. También se observó que todas las raíces de *L. autumnalis* tuvieron en la zona del cortex colonización micorrízica con presencia de pelotones (Tabla 2). Siendo la muestra dos procedente de Ucasanastacua, Tzintzuntzan de bosque de *Quercus* la que presentó los mayores porcentajes (57 al 76.4%) de pelotones, independiente del tipo o sección de raíz, mientras que la muestra del sitio siete de San Lorenzo, Uruapan presentó porcentajes menores (15 a 22%) de pelotones. Resultados similares fueron reportados por Sathiyadash et al. (2012) quienes indican que de 22 especies de orquídeas epífitas

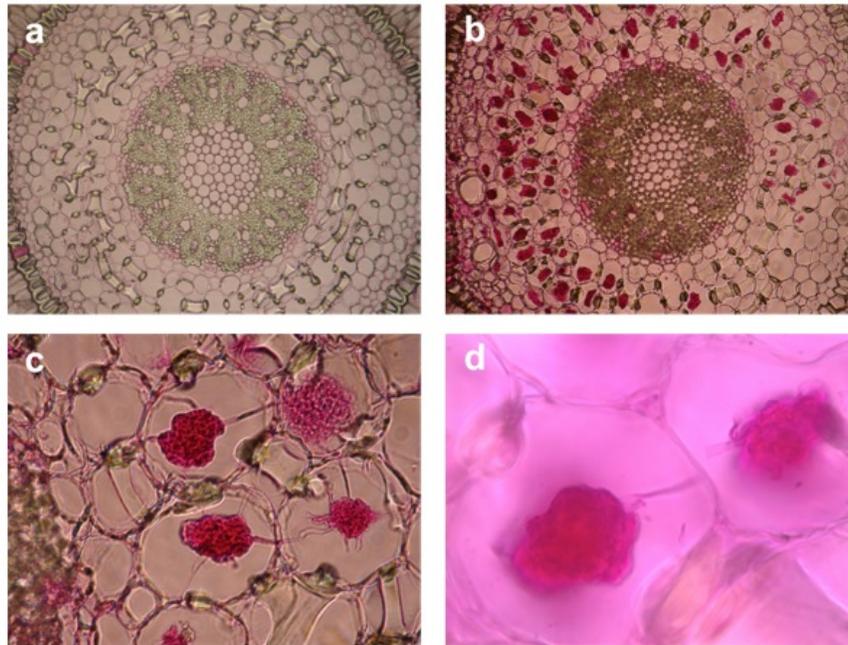


Figura 1. Colonización micorrízica de raíces de *Laelia autumnalis*. a) Cilindro central sin presencia de pelotones, ni hifas a 40x, b) corte transversal con presencia de pelotones, c) Pelotones e hifas teñidos con fucsina ácida en diferentes estados de digestión, d) acercamiento de pelotones a 100x.

analizadas para colonización micorrízica, todas tuvieron colonización entre 34 y 79%, lo que sugiere la importancia de los hongos micorrízicos como parte de la nutrición de las orquídeas. Sobre lo mismo Rasmussen y Whigham (2002) encontraron alta colonización micorrízica en estado adulto de cinco especies de orquídeas.

Se encontró que la colonización micorrízica se favorece por el desarrollo de las raíces dentro de la materia orgánica, con diferencias en hifas o pelotones. Las raíces jóvenes y maduras, dentro de la materia orgánica, por lo general presentan alta colonización. Es posible inferir que cuando las raíces entran en contacto con el sustrato, la colonización aumenta, mientras que las raíces viejas poseen menor colonización. Por lo que se puede concluir que el porcentaje de colonización de *Laelia autumnalis* es afectado por la materia orgánica. Al respecto Rivas et al. (1998), Suárez et al. (2006) y Murugan et al. (2010) mencionan que las zonas de mayor colonización ocurren en los sitios donde la raíz

tiene contacto con el sustrato y que raíces aéreas se han encontrado libres de colonización. Así mismo Bertolini et al. (2014) indican que la variación de la colonización micorrízica en la raíz está influenciado por la extensión y la distribución del detritus orgánico en el dosel arbóreo. Mientras que Osorio-Gil et al. (2008) sugieren que la variación en la colonización micorrízica de la orquídea epífita *Lonopsis utricularioides* puede ser afectada por factores abióticos como humedad, temperatura, pH, radiación y sustrato, así como por competidores semejantes a organismos patógenos o fungívoros. Estos factores probablemente varían con el tiempo y en pequeñas áreas, creando diferentes microhábitats que afectan la distribución y composición de la comunidad fúngica de alrededor de la raíz de la orquídea y de la colonización micorrízica.

Se reporta la presencia de colonización micorrízica en raíces de la orquídea epífita *Laelia autumnalis*. Con presencia de hifas y pelotones en todas las raíces de los siete sitios de muestreo,

Tabla 2. Análisis de varianza y comparación de medias de Tukey para las variables presencia de hifas y pelotones en raíces de la orquídea *Laelia autumnalis* en siete sitios de estudio de bosque de *Quercus*.

Tipo de raíz	Hifas Pr ≤ F (0.05)	Media	Tipo de raíz	Pelotones Pr ≤ F (0.05)	Media
Sitio 1 Ucasanastacua, Tzintzuntzan					
Dentro de materia orgánica	0.0602	69.44 ^a	Dentro de m.o.	0.0161	55.56 ^a
Fuera de materia orgánica		81.94 ^a	Fuera de m.o.		36.11 ^b
Joven	0.6477	75.00 ^a	Joven	0.0348	38.89 ^{ab}
Madura		75.69 ^a	Maduras		45.83 ^a
Vieja		80.56 ^a	Viejas		27.78 ^b
Sitio 2 Ucasanastacua, Tzintzuntzan					
Dentro de materia orgánica	0.5749	72.22 ^a	Dentro de m.o.	0.1945	66.67 ^a
Fuera de materia orgánica		76.39 ^a	Fuera de m.o.		76.39 ^a
Joven	0.5600	75.00 ^a	Joven	0.0964	65.28 ^a
Madura		74.31 ^a	Maduras		71.53 ^a
Vieja		68.06 ^a	Viejas		56.94 ^a
Sitio 3 Ucasanastacua, Tzintzuntzan					
Dentro de materia orgánica	0.2050	65.28 ^a	Dentro de m.o.	0.1808	22.22 ^a
Fuera de materia orgánica		75.00 ^a	Fuera de m.o.		31.94 ^a
Joven	0.6191	76.39 ^a	Joven	0.3019	18.06 ^a
Madura		70.14 ^a	Maduras		27.08 ^a
Vieja		70.83 ^a	Viejas		22.22 ^a
Sitio 4 San Lorenzo, Uruapan					
Dentro de materia orgánica	0.0686	30.56 ^a	Dentro de m.o.	0.0053	48.611 ^a
Fuera de materia orgánica		18.06 ^a	Fuera de m.o.		27.778 ^b
Joven	0.0018	45.83 ^a	Joven	0.0957	51.39 ^a
Madura		24.31 ^b	Maduras		38.19 ^a
Vieja		23.61 ^b	Viejas		36.11 ^a
Sitio 5 San Lorenzo, Uruapan					
Dentro de materia orgánica	0.1114	46.30 ^a	Dentro de m.o.	0.5412	46.30 ^a
Fuera de materia orgánica		61.11 ^a	Fuera de m.o.		40.74 ^a
Joven	0.7422	59.26 ^a	Joven	0.0015	31.48 ^b
Madura		53.70 ^a	Maduras		43.52 ^b
Vieja		57.41 ^a	Viejas		62.96 ^a
Sitio 6 San Lorenzo, Uruapan					
Dentro de materia orgánica	0.0007	100.00 ^a	Dentro de m.o.	0.0064	52.083 ^a
Fuera de materia orgánica		81.48 ^b	Fuera de m.o.		25.926 ^b
Joven	0.6811	90.74 ^a	Joven	0.0001	59.26 ^a
Madura		90.74 ^a	Maduras		38.24 ^b
Vieja		94.44 ^a	Viejas		20.37 ^b
Sitio 7 San Lorenzo, Uruapan					
Dentro de materia orgánica	0.542	6.94 ^a	Dentro de m.o.	0.677	18.06 ^a
Fuera de materia orgánica		9.72 ^a	Fuera de m.o.		20.83 ^a
Joven	0.2288	8.33 ^a	Joven	0.5627	15.28 ^a
Madura		8.33 ^a	Maduras		19.44 ^a
Vieja		15.28 ^a	Viejas		22.22 ^a

lo que sugiere una relación mutualista entre hongos micorrízicos y *L. autumnalis* en su estado adulto. La intensidad de colonización micorrízica

está influenciada por el contacto con el sustrato o materia orgánica.

LITERATURA CITADA

- Arditti J, Ghani AKA (2000) Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist* 145: 367-421.
- Batty AL, Dixon KW, Brundrett MC, Sivasithamparam K (2002) Orchid conservation and mycorrhizal associations. In: Sivasithamparam K, Dixon KW, Barrett RL (ed). *Microorganisms in plant conservation and biodiversity*. Kluwer Academic Publishers. pp: 195-226.

- Bayman P, González EJ, Fumero JJ, Tremblay RL (2002) Are fungi necessary? How fungicides affect growth and survival of the orchid *Lepanthes rupestris* in the field. *Journal of Ecology* 90: 1002-1008.
- Beltrán-Nambo M De los A, Carreón-Abud Y, Ortega-Larrocea MP (2010) Mycorrhizal colonization patterns of three *Bletia* species in a natural forest reserve in Michoacán, Mexico. *Acta Horticulturae* 878: 43-52.
- Beltrán-Rodríguez LA, Martínez-Rivera B, Paulo MA (2012) Etnoecología de la flor de Catarina - *Laelia autumnalis* (La Llave & Lex.) Lindl.) - (Orchidaceae) en una comunidad campesina al sur del estado de Morelos, México: conservando un recurso y preservando saberes populares. *Etnobiología* 10: 1-17.
- Bertolini V, Damon A, Luna-Talavera FR, Rojas-Velázquez AN (2012) Las orquídeas del Valle del Mezquital, Hidalgo (México), resultados preliminares. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas* 10: 85-94.
- Bertolini V, Cruz-Blasi J, Damon A, Valle-Mora J (2014) Seasonality and mycorrhizal colonization in three species of epiphytic orchids in southeast Mexico. *Acta Botanica Brasílica* 28: 512-518.
- Halbinger F, Soto M (1997) *Laelias* of Mexico. *Revista del Herbario de la AMO* 15: 1-160.
- Jiang J-H, Lee Y-I, Cubeta MA, Chen L-Ch (2015) Characterization and colonization of endomycorrhizal Rhizoctonia fungi in the medical herb *Anoectochilus formosanus* (Orchidaceae). *Mycorrhiza* 25: 431-445.
- Mukerji KG, Manoharachary C, Chamola BP (2002) Techniques in mycorrhizal studies. Kluwer Academic Publ. The Netherlands. 554p.
- Murugan T, Sathiyadash K, Muniappan V, Muthukumar T (2010) The mycorrhizal status of south indian epiphytic orchids. *The Journal of the Orchid Society of India* 24: 29-33.
- Ortega-Larrocea MP (2008) Propagación simbiótica de orquídeas terrestres con fines de restauración edafocológica. En: Álvarez SJ, Monroy AA (Comps). Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración. Departamento de Edafología, Instituto de Geología, UNAM. México. pp: 85-96.
- Osorio-Gil EM, Forero-Montaña J, Tupac-Otero J (2008) Variation in mycorrhizal infection of the epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidiaceae) on different substrata. *Caribbean Journal of Science* 44: 130-132.
- Rasmussen HN (1995) Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant. Cambridge University Press, Cambridge. UK. 460p.
- Rasmussen HN, Whigham DF (2002) Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. *New Phytologist* 154: 797-807.
- Rasmussen HN, Dixon KW, Jersáková J, Tesitelová T (2015) Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements. *Annals of Botany* 116: 391-402.
- Rivas M, Warner J, Bermúdez M (1998) Presencia de micorrizas en orquídeas de un jardín botánico neotropical. *Revista Biología Tropical* 46: 211-216.
- SAS Institute (2003) SAS/STAT user's guide Release 9.1. SAS Institute. Cary, NC, USA. 5121p.
- Sathiyadash K, Muthukumar T, Uma K, Pandey RR (2012) Mycorrhizal association and morphology in orchids. *Journal of Plant Interactions* 7: 238-247.
- SEMARNAT (2010) Norma Oficial Mexicana 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, 30 de diciembre de 2002.

- Soto MA, Hágsater E, Jiménez R, Salazar GA, Solano R, Flores R, Contreras EI (2007) Las orquídeas de México: catálogo digital. Herbario Amo. Instituto Chinoín. México. En CD.
- Suárez JP, Weib M, Abele A, Garnica S, Oberwinkler F, Kottke I (2006) Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycological Research* 11: 1257-1270.
- Vij SP, Lakhanpal TN, Gupta A (2002) Orchidoid mycorrhiza and techniques to investigate. In: KG Mukerji, C Manoharachary and BP Chamola (eds.). *Techniques in mycorrhizal studies*. Kluwer Acad. Publ., Netherlands. pp: 385-434.
- Yang SH, Sun M, Yang QY, Ma R-Y, Zhang JL, Zhang SB (2016) Two strategies by epiphytic orchids for maintaining water balance: thick cuticles in leaves and water storage in pseudobulbs. *AOB Plants*. Doi: 10.1093/aobpla/plw046.

