

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería

Aislamiento y caracterización de hongos
micorrícicos en cuatro especies de
orquídeas terrestres del departamento de
Zacapa

Trabajo de investigación presentado por Fátima
Melgar Maza para optar por el grado académico de
Licenciada en Ingeniería Agroforestal

Guatemala
2012

Aislamiento y caracterización de hongos
micorrícicos en cuatro especies de
orquídeas terrestres

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

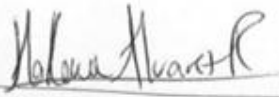
Facultad de Ingeniería

Aislamiento y caracterización de hongos
micorrícicos en cuatro especies de
orquídeas terrestres del departamento de
Zacapa

Trabajo de investigación presentado por Fátima
Melgar Maza para optar por el grado académico de
Licenciada en Ingeniería Agroforestal

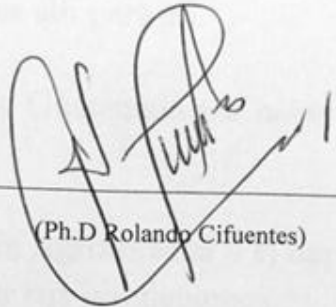
Guatemala
2012

Vo. Bo. :

(f) 

(Licda. María Renée Álvarez)

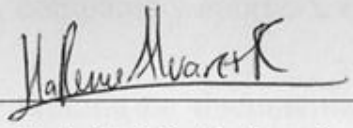
Tribunal Examinador:

(f) 

(Ph.D Rolando Cifuentes)

(f) 

(Licda. Margarita Palmieri)

(f) 

(Licda. María Renée Álvarez)

Fecha de aprobación: Guatemala , 18 de enero de 2012

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida y permitirme llegar hasta aquí, dándome los medios para alcanzar mis sueños.

A mis padres y mis hermanos por siempre darme su apoyo, ayudarme, comprenderme y siempre estar allí para mí.

A la Universidad del Valle de Guatemala por haber permitido el desarrollo de este estudio.

Al departamento de Ingeniería Agroforestal y el departamento de Biología por su apoyo y permitirme utilizar sus instalaciones.

A mi asesora María Renée Alvarez por su invaluable ayuda, asesoría científica, disposición e interés en este estudio.

Al personal de laboratorio de Fitopatología de la UVG, por su asesoría científica, por compartir su experiencia, por enseñarme y colaborar conmigo.

A Thomas Schrei por su ayuda, compañía y aportes a este estudio.

A la Ph.D Beatriz Dreyer por facilitarme documentación relacionada a este estudio y por su asesoría científica.

A Giovanni Gandolfo por darme su apoyo incondicional, su cariño y su ayuda cuando la necesité.

PREFACIO

La elaboración de esta tesis surgió de la intriga sobre el tema generada por mi asesora y por mi trabajo con orquídeas en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad del Valle de Guatemala. Además por mi interés en generar información sobre la relación simbiótica entre los hongos micorrícicos y las orquídeas en Guatemala ya que no existen estudios de este tipo en el país. Mi mayor reto al realizar este estudio fue la poca información disponible sobre el tema, pero conté con mucha ayuda nacional e internacional para poder conseguir la información disponible y generar el primer estudio sobre micorrizas orquidioides en Guatemala.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	V
PREFACIO	Vi
LISTA DE CUADROS	iX
LISTA DE FIGURAS	iX
RESUMEN.....	X
I. INTRODUCCIÓN	1
A. Objetivos.....	1
1. Generales	1
2. Específicos.....	1
B. Justificación	2
II. MARCO TEÓRICO	3
A. Orquídeas.....	3
1. Hábitat..	4
2. Crecimiento..	4
3. Morfología.....	4
a. Flores..	4
b. Inflorescencias..	5
c. Rizomas..	5
d. Hojas.....	6
B. Hongos.....	6
1. Composición.....	7
2. Clasificación.....	7
C. Micorrizas	8
1. Tipos de micorrizas..	9
2. Fisiología de la simbiosis..	10
3. Aportes de los hongos micorrícicos a las plantas.....	11
a. Producción de reguladores de crecimiento.....	11
b. Protección contra enfermedades.....	11
D. Algunos estudios realizados sobre el tema	11
E. Área de estudio	12
2. Uso actual del suelo.....	12

III. METODOLOGÍA.....	13
A. Colecta de orquídeas.....	13
B. Limpieza, cultivo del hongo en medio sólido y cultivo puro	13
C. Métodos de observación directa del hongo micorrícico en la raíz.	14
1. Metodología de tinción con azul de tripano (Sylvia, 1994)..	14
2. Metodología de tinción de micorrizas con azul de indofenol (J. Calderon, com. pers.)..	14
D. Cortes histológicos	14
E. Descripción de los hongos	16
IV. RESULTADOS.....	17
A. Colecta de las orquídeas utilizadas en el estudio.....	17
B. Observación de cultivos en medio sólido	17
1. Observación de bacterias en medio sólido	17
2. Observación del cultivo puro en medio sólido..	18
C. Observación directa	19
1. Observación directa con el método de azul de tripano.....	19
2. Observación directa con el método de azul de indofenol.....	19
D. Cortes histológicos	21
E. Descripción del hongo	23
V. DISCUSIÓN	25
A. Colecta de orquídeas.....	25
B. Cultivos en medio sólido	25
C. Observación directa	26
1. Observación directa con tinción de azul de tripano.....	26
2. Observación directa con tinción de azul de indofenol.....	26
D. Cortes histológicos	26
E. Descripción de los hongos micorrícicos	27
VI. CONCLUSIONES	28
VII. RECOMENDACIONES	29
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	30
IX. ANEXOS.....	32

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Páginas
Cuadro 1. Identificación de orquídeas y sustrato en el que fueron colectadas.....	17
Cuadro 2. Bacterias en el medio de cultivo Manitol-Levadura.....	18

LISTA DE FIGURAS

Ilustraciones	Páginas
Figura 1. Diagrama de los Seudobulbos.....	5
Figura 2. Diagrama de los tipos de hojas	6
Figura 3. Bacterias observadas en el medio de cultivo manitol-levadura	17
Figura 4. Hifas en cultivo puro.....	18
Figura 5. Hifas de <i>Sacolia lanceolata</i>	19
Figura 6. Hifas de <i>Sarcoglottis assurgens</i>	19
Figura 7. Hifas de <i>Sarcoglottis</i> sp. (1).....	19
Figura 8. Hifas de <i>Sarcoglottis</i> sp. (2).....	19
Figura 9 y 10. Orquídea 1. <i>Sacolia lanceolata</i>	20
Figura 11 y 12. Orquídea 2 <i>Sarcoglottis assurgens</i>	20
Figura 13. Orquídea 3 <i>Sarcoglottis</i> sp. (1)	20
Figura 14. Orquídea 4 <i>Sarcoglottis</i> sp. (2).....	20
Figura 15. Pelotones de Orquídea 1. <i>Sacolia lanceolata</i>	21
Figura 16. Pelotones de Orquídea 3 <i>Sarcoglottis assurgens</i>	22
Figura 17. Pelotones de Orquídea 2 <i>Sarcoglottis</i> sp. (1).	22
Figura 18. Pelotones de Orquídea 4 <i>Sarcoglottis</i> sp. (2).	23
Figura 19. Cultivo de la colonia 2..	24

RESUMEN

Este estudio se enfocó en la caracterización de los hongos micorrícicos presentes en las raíces de cuatro especies de orquídeas terrestres. Las orquídeas utilizadas fueron colectadas en la Reserva Natural de Heloderma en el departamento de Zacapa. Este estudio es importante debido a la falta de información e investigación sobre las micorrizas orquidioides en el país y los métodos adecuados para su aislamiento. Para esto se realizó cultivos del hongo en medios sólidos de Manitol-Levadura, PDA y Maltosa. Se hizo observación directa del hongo en la raíz con los métodos de tinción de azul de tripano y tinción de azul de indofenol. También se realizaron cortes histológicos de las raíces para determinar la presencia del hongo micorrícico en la raíz. Para esto se utilizaron tres soluciones fijadoras para probar cuál sería la adecuada para este tipo de raíces. Con los métodos utilizados en este estudio, se logró confirmar la presencia de dos colonias de hongos, ya que se observaron diferencias en los medios de cultivo sólido. Con los cortes histológicos se pudo observar pelotones e hifas en las raíces del hongo. También se logró observar que los mejores medios para el cultivo de estos hongos fueron los medios PDA y Maltosa. Para la observación directa del hongo en la raíz, el mejor método fue la tinción de azul de indofenol. Y para los cortes histológicos la mejor metodología fue la utilización de la solución fijadora Davidson modificada y cortes de 15 y 20 μ .

I. INTRODUCCIÓN

El objetivo de este estudio al igual que su justificación va ligado a la necesidad de creación de información sobre los hongos micorrícicos de orquídeas en Guatemala. Este primer estudio sobre el tema, genera una gama de posibilidades a nivel científico dando una pauta para los siguientes estudios sobre el mismo en el país. Este estudio busca caracterizar los hongos micorrícicos orquidioides encontrados en las raíces de las orquídeas colectadas. También busca identificar los métodos adecuados para realizar cultivos en medios sólidos, para observación directa del hongo y su relación con la raíz y para el procedimiento de cortes histológicos de la raíz. La identificación de métodos adecuados será útil, ya que permite establecer protocolos para la realización de estudios posteriores sobre el tema.

A. Objetivos

1. Generales

1. El objetivo de este estudio fue verificar la presencia de hongos micorrícicos en las raíces de orquídeas terrestres.

2. Específicos

2. Colectar e identificar cuatro especies de orquídeas terrestres en la Reserva Natural de Heloderma en el departamento de Zacapa.
3. Observar la presencia de hongos micorrícicos en orquídeas terrestres colectadas.
4. Caracterizar los hongos micorrícicos observados en las raíces de las cuatro especies de orquídeas estudiadas.
5. Determinar la mejor técnica de observación y aislamiento de los hongos micorrícicos en orquídeas y establecer un protocolo de observación de los hongos.
6. Determinar si existe especificidad en la relación simbiótica de especies de hongos micorrícicos y especies de orquídeas terrestres.

B. Justificación

La importancia de este estudio está ligada a la falta de investigación sobre los hongos micorrícicos en simbiosis con orquídeas en Guatemala. El aislamiento y caracterización de estos hongos alberga la posibilidad de mejorar el proceso de reproducción sexual y asexual de orquídeas en medios de cultivo artificial. Esto es debido a la necesidad de las semillas de las orquídeas de la presencia del hongo para poder germinar, así como la posibilidad de mantener las orquídeas en un ambiente distinto del acostumbrado. Esto abriría la posibilidad de comercializar las orquídeas y así proveer trabajo a guatemaltecos y aportar a la economía del país. La identificación de los mejores métodos para realizar estos procedimientos es importante ya que permitirá mayor eficiencia en estudios futuros sobre el tema. Este estudio acerca de los hongos micorrícicos orquidioides al ser el primero realizado en Guatemala, es un punto de partida para futuras investigaciones sobre el tema.

II. MARCO TEÓRICO

A. Orquídeas

Las orquídeas son plantas monocotiledóneas pertenecientes a la familia Orchidaceae, integrada por más de 25,000 especies, debido a su capacidad de cruzamiento con individuos del mismo género o de géneros afines se estipula que existen aproximadamente 30,000 híbridos y se considera que faltan muchas especies por descubrir, debido a su capacidad de adaptación a muchos ecosistemas diferentes. Esta característica la hace una de las familias más ricas y diversas de las angiospermas (Freuler, 2008).

La gran variedad de tipos de suelos y topografía de Guatemala, la han provisto de la flora más rica en toda Centro América, con un estimado de 8,000 especies de plantas vasculares. Las orquídeas y las leguminosas son especialmente prominentes en el país e incluyen cientos de especies, muchas de las cuales sólo se pueden encontrar en Guatemala (Ames, 1952).

El país cuenta con once regiones florales: 1. Las llanuras de piedra caliza de Petén. 2. Los manglares en las costas. 3. La selva tropical del atlántico. 4. Las sabanas bajas de Izabal y Petén. 5. El bosque mixto de las llanuras del pacífico. 6. Las llanuras áridas del desierto en el oriente. 7. El bosque húmedo de montaña de Alta Verapaz. 8. El bosque mixto de la boca costa. 9. El bosque mixto de regiones templadas y frías. 10. El bosque de coníferas. 11. Las regiones alpinas. Es posible encontrar orquídeas en las once regiones antes descritas, varias de las regiones son muy ricas en especies y en algunas regiones hay muy pocas especies (Ames, 1952).

La región con mayor cantidad de variedades es Alta Verapaz, ya que se conocen aproximadamente 242 especies, de 60 géneros, esta región es la más rica en Guatemala, especialmente en orquídeas y bromelias. En Izabal, se conocen aproximadamente 111 especies de orquídeas, de 43 géneros y muchas de las especies en esta región no se encuentran en otras áreas del país. En Chimaltenango, Chiquimula y Zacapa se pueden encontrar aproximadamente 75 especies de 40 géneros en cada uno de estos departamentos. En Guatemala, se pueden encontrar 116 especies. Huehuetenango tiene una gran flora de orquídeas, con 110 especies de 41 géneros y la mayoría de las especies encontradas en este departamento son terrestres y son endémicas de las regiones altas del país. Las demás regiones tienen cada una aproximadamente 25 géneros y menos de 40 especies (Ames, 1952).

Los géneros de orquídeas más grandes en Guatemala son: *Epidendrum*, *Pleurothallis*, *Spiranthes*, *Oncidium*, *Maxilaria*, *Cranichis* y *Stelis*. El género *Epidendrum* es el más extendido en el país, es el único presente en todas las regiones antes descritas. La mayoría de géneros y especies de orquídeas de Guatemala están muy distribuidas, pero se cuenta con 57 especies de 23 géneros que son endémicos del país (Ames, 1952).

1. Hábitat. Las orquídeas se pueden encontrar en la mayor parte del mundo, la mayor cantidad de especies pertenecen al trópico, pero como se mencionó anteriormente debido a su gran capacidad adaptativa se pueden encontrar en nichos ecológicos muy variados, exceptuando los polos. Su hábitat es diferente dependiendo de su ubicación, en las regiones con temperaturas bajas, la mayoría son terrestres y en las regiones cálidas son mayormente epífitas, aunque se pueden encontrar terrestres también (Freuler, 2008).

2. Crecimiento. Las orquídeas crecen por medio de meristemas, este grupo de células se divide activamente, permitiendo que éstas se diferencien y tomen el tamaño adecuado. El crecimiento vegetativo de las orquídeas puede ser monopodial o simpodial (Dumaz, 1985).

Las orquídeas con crecimiento monopodial, no tienen rizoma y presentan un tallo principal único que crece desde el centro de la planta, lo que esto implica es la fragilidad de la planta, ya que debido a que el tallo es único, sólo se cuenta con un meristemo terminal y si éste se daña o se destruye, la planta muere (Szlachetko, 2008).

Las orquídeas con crecimiento simpodial, tienen rizomas y presentan un crecimiento horizontal, a diferencia de las monopodiales, este tipo de orquídea tiene varios meristemas que se diferencian a partir del rizoma, estos meristemas permiten la generación de pseudobulbos y portan las hojas y las yemas florales (Szlachetko, 2008).

3. Morfología

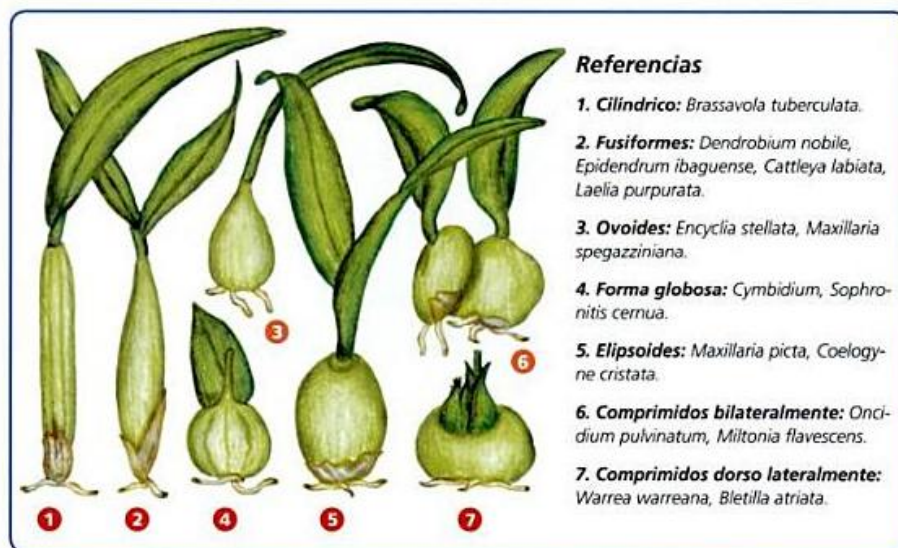
a. Flores. Las flores de las orquídeas presentan una gran diversidad de tamaños, pero su morfología se mantiene constante, éstas poseen 2 ciclos florales, el ciclo externo es el cáliz. Que cuenta con 3 piezas y el ciclo interno al que se le llama corola, también cuenta con 3 piezas. La característica típica de estas flores, es el labelo, un pétalo modificado. Aunque se diferencian, los pétalos y sépalos,

generalmente tienen la misma morfología. Otra de las características diferenciadoras en las orquídeas es que los dos ciclos reproductivos están unidos formando un ginostemo. Estas flores pueden ser hermafroditas, unisexuadas o con sexos separados (Ojeda, 2008).

b. Inflorescencias. Las flores dependiendo de la especie pueden ser solitarias o presentarse como inflorescencias y dependiendo de la posición donde esté, puede ser axilar, basal y apical (Ojeda, 2008).

c. Rizomas. Las orquídeas con crecimiento simpodial tienen rizomas, éstos son tallos leñosos modificados, con nudos y entrenudos, pueden ser rugosos o lisos y el color generalmente es verde, producen yemas que producen más puntos de crecimiento y originan las raíces de la planta. Los rizomas pueden ser subterráneos o aéreos, los subterráneos en algunas orquídeas terrestres con pseudobulbos y los aéreos se encuentran en las orquídeas epífitas. Los pseudobulbos se originan en el rizoma y su función es almacenar nutrientes y agua para las épocas secas y para la floración. La forma del pseudobulbo dependiendo de la especie puede ser, cilíndrico, fusiforme, ovoide, globoso, elipsoide y comprimido (Ojeda, 2008; Szlachetko, 2008).

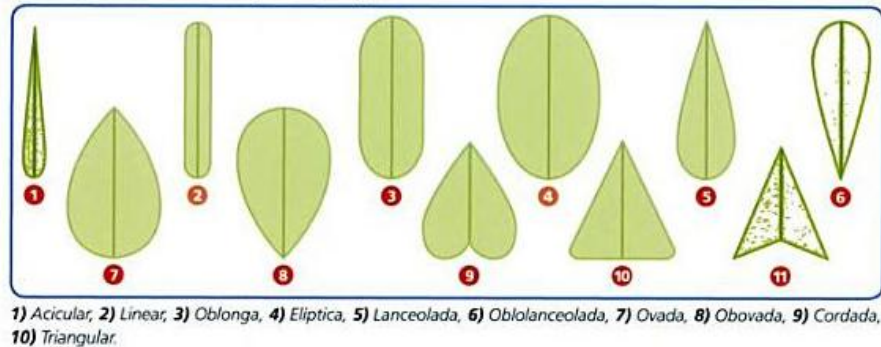
Figura 1. Diagrama de los Seudobulbos



(Diagrama de Freuler, 2006)

d. Hojas. Las hojas presentan nervación paralelinervada, mantienen una forma acicular, linear, oblonga, elíptica, lanceolada, oblongada, ovada, cordada y triangular con una distribución alterna u opuesta, pueden tener pseudobulbo simple, doble o múltiple y su textura puede ser teretiforme, delgada o gruesa y carnosa (Ojeda, 2008; Szlachetko, 2008; Freuler, 2006).

Figura 2. Diagrama de los tipos de hojas



(Diagrama de Freuler, 2006)

Las raíces emergen del rizoma, pseudobulbo o tallo, son gruesas y a veces ramificadas, las raíces de las orquídeas epífitas pueden realizar fotosíntesis al igual que las hojas. En las orquídeas terrestres, las raíces son gruesas y carnosas. Las raíces de las que no tienen pseudobulbo, no cuentan con la capacidad de fotosíntesis (Ojeda, 2008; Dumaz, 1985).

El ovario luego de la fecundación, aumenta volumen para dar lugar a la creación de las semillas, este proceso puede durar entre 3 a 20 meses, luego éste suelta las semillas, que son dispersadas por el viento y para poder germinar deben encontrar un sustrato con un hongo micorrícico que las ayude a germinar (Freuler, 2003; Dumaz, 1985).

B. Hongos

Los hongos conforman uno de los grupos más grandes de seres vivos contando con aproximadamente millón y medio de especies. Estos tienen metabolismos quimioheterótrofos absorptivos, lo que indica que obtienen sus nutrientes descomponiendo la materia orgánica por medio de exoenzimas (Pastor, 2006).

Los hongos están conformados por células con crecimiento en los extremos formando filamentos largos, tabicados y ramificados llamados hifas, éstas crecen

extendiéndose en los extremos, formando cuerpos vegetativos a los que se les llama micelio. Cuando éste crece sobre el sustrato se le puede llamar micelio aéreo, está formado por hifas y esporas, que le permiten reproducirse. El tamaño del mismo depende de la especie del hongo y puede alcanzar tamaños muy grandes según la especie. El micelio de los hongos micorrícicos, es el que se introduce dentro de su hospedero o dentro del sustrato, a éste se le llama micelio vegetativo y a diferencia del micelio aéreo, su función es proveer alimento y soporte al hongo y no reproducción (Montoya, 2008).

1. Composición. Los hongos difieren de las bacterias debido a la presencia de quitina en su pared celular. Algunas especies de hongos presentan paredes celulósicas o con polímeros como mananos, galactanos y quitosán. El citoplasma de las células de los hongos contiene mitocondrias, retículo endoplásmico, núcleo definido con membrana nuclear y varios pares de cromosomas. Los hongos pueden tener reproducción sexual o asexual. Estos son heterótrofos quimioorganotrofos, por su incapacidad de realizar fotosíntesis debido a su falta de clorofila (Carrillo, 2003).

Los hongos pueden crecer de dos formas principales, unicelularmente como levaduras y pluricelularmente como mohos. Las levaduras dependiendo de su especie pueden tener una variación morfológica grande, su tamaño puede variar de 5 a 30 micras y puede ser de forma elipsoide, redondeada o cilíndrica. Las levaduras se pueden reproducir por fisión binaria o por gemación (Carrillo, 2003).

Los mohos u hongos filamentosos, están formados por hifas que pueden ser de 5 a 10 micras de anchura. Las hifas están constituidas por citoplasma que es común para toda la hifa. Dependiendo de la especie del hongo las hifas pueden ser:

- a. No septadas: son hifas con varios núcleos en el citoplasma, sin ninguna división del mismo, el citoplasma está rodeado por una pared rígida.
- b. Septadas: son hifas con varias separaciones o septos, pueden tener uno o varios núcleos. Las hifas uninucleadas, tienen un núcleo en cada septo y tienen canales de comunicación entre cada uno de éstos, pudiendo así intercambiar núcleos y citoplasma. Las hifas polinucleadas, tienen varios núcleos en cada septo y al igual que las hifas uninucleadas, pueden intercambiar núcleos y citoplasma entre cada septo (Pastor, 2006).

2. Clasificación. Los hongos se dividen en distintas categorías dependiendo de sus características, fisiológicas, morfológicas y moleculares. Por su forma de reproducción se pueden dividir en Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota (Caplan, 1997).

Chytridiomycota, los hongos pertenecientes a este filo, son predominantemente acuáticos, son unicelulares, pero la mayoría son filamentosos y forman micelios cenocíticos, su reproducción sexual se da por medio de gametos móviles y su reproducción asexual se da por medio de zoosporas que poseen un flagelo en la parte posterior, son saprófitos, y tienen pared celular con quitina y glucanos (Montoya, 2008; Caplan, 1997).

Zygomycota, los hongos pertenecientes a este filo, se caracterizan por la presencia de una zigospora, que se produce por la unión de los gametangios. Estos hongos tienen un micelio filamentosos, con hifas cenocíticas y multinucleadas, se reproducen y se colocan en la superficie de su sustrato. Su reproducción asexual se da por medio de esporangióforos, formando un mitosporangio esférico, que en su interior produce mitosporas que tienen dispersión aérea (Montoya, 2008; Caplan, 1997).

Ascomycota, los hongos pertenecientes a este filo, poseen micelios con hifas septadas, pueden ser heterotálicas o homotálicas. La reproducción asexual la realizan por medio de esporas llamadas conidias que pueden ser unicelulares o pluricelulares. La reproducción sexual la realizan cuando dos hifas se unen y producen una hifa ascógena, éstas pasan por plasmogamia, cariogamia, meiosis y mitosis y produce 8 ascosporas en un saco llamado asca (Montoya, 2008; Caplan, 1997).

Basidiomycota, los hongos pertenecientes a este filo, se caracterizan por sus hifas septadas dicarióticas. La reproducción asexual la realiza por medio de artrosporas. La reproducción sexual se da a partir de un micelio primario producido por una espora positiva y un micelio primario de una espora negativa. Los micelios producen hifas y se une una del micelio negativo y una del positivo, se realiza un intercambio de núcleos que después de varios procesos produce un micelio secundario. Este produce hifas que forman una basidia que produce basidiosporas que salen por medio de esterigmas de la basidia (Montoya, 2008; Caplan, 1997).

C. Micorrizas

La micorriza es una asociación simbiótica entre un hongo y la raíz de una planta; esta simbiosis se da debido a la necesidad del hongo de sustrato y de humedad y a la necesidad de la planta de nutrientes del suelo como el fósforo y otros nutrientes con poca movilidad que sin el hongo no podría obtener y son necesarios para su buen desarrollo. Esta simbiosis se da en más de 90% de los miembros de las familias de plantas vasculares, ya que este tipo de hongo tiene un amplio rango de hospederos (Soil Science Society Of America, 1994).

1. Tipos de micorrizas. Se conocen diferentes tipos de micorrizas, las cuales se pueden dividir en cuatro grandes grupos: ectomicorrizas, endomicorrizas, ectendomicorrizas y micorrizas orquidioides.

Las ectomicorrizas, son reconocidas generalmente por tres características únicas de esta simbiosis: la formación de una capa o cubierta formada por las hifas del hongo que cubre una parte de las raíces laterales de la planta, el desarrollo de las hifas en el espacio intercelular de la raíz para formar una estructura muy ramificada a la que se le llama la red Hartig e hifas que emanan del manto y crecen hacia el sustrato. Se cree que al menos un 3% de las plantas vasculares desarrollan este tipo de micorrizas, entre las cuales hay que incluir a la casi totalidad de las especies de los géneros con más importancia en el mundo forestal, en particular todos los de las familias Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, Salicaceae, entre otros (Merckx, 2009).

Las ectoendomicorrizas son asociaciones formadas por hongo y coníferas, forman un manto red de Hartig pero se diferencian en que la red no sólo se encuentra en el espacio intracelular sino también se desarrolla en las células corticales y de la epidermis (Peterson *et al.* 2004).

- Las endomicorrizas se caracterizan por la presencia de hifas en el interior de las células del cortex radical; se estima que al menos el 90% del total de las plantas vasculares conocidas forman este tipo de micorrizas. Éstas se subdividen en varios grupos, debido a su variedad de hospederos y hongos:

- Micorrizas arbusculares, esta asociación es la más común de todas, ya que abarca el 80% de especies de plantas, con el género de hongo Glomeromycota. La característica más distintiva de esta asociación es el desarrollo intercelular de las hifas, desarrollo intracelular y arbuscúlos en las células corticales. Además producen esporas en hifas dentro y fuera de la raíz (Peterson *et al.* 2004).

- Micorrizas ericoides, como su nombre lo indica se encuentran en las familias Ericaceae y Epacrideaceae. Las raíces epidérmicas de estas plantas son colonizadas por el hongo que por medio de sus hifas forma un complejo intracelular, que permite la absorción de nitrógeno del suelo (Peterson *et al.* 2004).

- Micorrizas arbutoides y monotropoides, se encuentran también en miembros de la familia Ericaceae, pero éstas forman una red Hartig e involucran otros tipos de hongos acompañantes. Las micorrizas monotropoides son distintas debido a que invaden las células epidérmicas con una sola hifa formando una clavija que es recubierta por la raíz (Peterson *et al.* 2004).

- Las micorrizas orquidioides son endomicorrizas, cuentan con características únicas y son el segundo tipo más común de micorrizas. Se dice que la relación es mutualista aunque no se ha encontrado evidencia, ya que no se conocen los beneficios que el hongo obtiene de la relación. La relación de éstos pudo haber evolucionado a un parasitismo de la planta en el hongo. La especificidad que se ha observado entre orquídeas y hongos en esta simbiosis es mayor que en cualquier otro grupo de plantas. Las características simbióticas de este tipo de micorrizas tienen un gran impacto en la ecología y distribución de su hospedero y éstas pudieron aumentar las oportunidades de diversificación del hospedero a lo largo de los años (Merckx, 2009).

Las relaciones micorrícicas pueden ser, mico-heterótrofas, que es una relación, formada por plantas parcial o enteramente no fotosintéticas y un hongo que puede ser arbuscular, ectomicorrícico o saprofito para obtener su energía y nutrientes del mismo. O puede ser mixotrófica que es una relación, formada por una planta y un hongo, donde la planta obtiene sus nutrientes de forma autótrofa y heterótrofa. Las orquídeas tienen los dos tipos de relación, son mico-heterótrofas obligadas en etapa de plántula y en etapa juvenil y son mixotrofas en su madurez (Merckx, 2009).

Las semillas de las orquídeas no tienen endospermo, lo que provoca que aunque puedan germinar con humedad, mueren al no tener una fuente de nutrientes. Esta es la etapa donde se da la micoheterotrofia, ya que el hongo es el que le da los nutrientes necesarios a la semilla para que germine y pueda alimentarse, para pasar a la etapa, después de germinar, el hongo coloniza la planta y provee carbono y vitaminas para que el embrión continúe su desarrollo y pueda producir hojas para realizar fotosíntesis y obtener parte del carbono y los nutrientes por ella misma. Los hongos que participan en esta simbiosis generalmente son basidiomicetos (Gianinazzi-P & Gianinazzi, 1983).

2. Fisiología de la simbiosis. La simbiosis empieza con la llegada de una espora en germinación, al encontrar un sustrato produce hifas, que forman un apresorio sobre la raíz y penetran desde la epidermis de la raíz, dispersándose inter e intracelularmente en las células corticales, formando pelotones que se desarrollan dentro de estas células (Gianinazzi-P & Gianinazzi, 1983).

En la simbiosis de micorrizas orquidioides, las hifas penetran de forma intracelular las células corticales. Esta penetración provoca una modificación en las células de la raíz, permitiendo que el material de la pared celular se mantenga

alrededor de las hifas. Esto se da para realizar la transferencia de carbohidratos del hongo micorrícico a la planta y aumentar la absorción de nutrientes de la planta (Gianinazzi-P & Gianinazzi, 1983).

3. Aportes de los hongos micorrícicos a las plantas. Los hongos micorrícicos son beneficiosos para las plantas en varios aspectos. Entre éstos están la absorción del agua y nutrientes, la producción de reguladores de crecimiento y la protección contra enfermedades. Los hongos en esta relación simbiótica, poseen hifas que son capaces de extenderse en áreas grandes y esto les permite absorber más agua y nutrientes que a las raíces de la planta hospedero. Y las mismas permiten el aprovechamiento del fósforo que por ser un mineral poco soluble, los pelos radiculares de la planta nos son capaces de absorber. Los hongos micorrícicos también incitan el incremento de la tolerancia de su hospedero a temperaturas cambiantes del suelo y acidez extrema que puede ser causada por la presencia de minerales pesados como el aluminio, magnesio y azufre (Gorge, 1991).

a. Producción de reguladores de crecimiento. Los hongos ectomicorrícicos producen hormonas de crecimiento como auxinas y fitoquininas, éstas son parte de la planta y se encargan del crecimiento de la misma, lo que provoca un mejor desarrollo cuando el hongo también las provee a la planta. Éstas actúan movilizandando nutrientes, acelerando el crecimiento de las raíces y les permite permanecer fisiológicamente más activas que las raíces que no cuentan con hongos micorrícicos (Gorge, 1991).

b. Protección contra enfermedades. Las micorrizas tienen varios mecanismos para evitar los patógenos en la planta hospedero. Actúan como una barrera física, impidiendo que en el lugar ocupado por ellas se instale cualquier otro agente patógeno. Tiene capacidad de producir compuestos fungistáticos y antibióticos que pueden eliminar al patógeno en caso de que la barrera física fuera insuficiente y el efecto que se considera más importante es que la relación simbiótica provoca un aumento de tolerancia de la planta en simbiosis contra los patógenos (Gorge, 1991).

D. Algunos estudios realizados sobre el tema

En el 2002 se llevó a cabo el primer reporte de hongo micorrícico en orquídeas en Brasil. El hongo aislado fue *Epulorhiza epiphytica* sp. nov. de las orquídeas epífitas *Epí dendrum rigidum* y *Polystachia concreta*, colectadas en el bosque atlántico de São Miguel do Anta City. Los investigadores realizaron cortes histológicos de la raíz para observar los pelotones, realizaron cultivos del hongo para poder observar las hifas del mismo, realizaron ensayos enzimáticos, utilizaron un holotipo de un hongo aislado de la orquídea *P. concreta* colectada en el mismo

sitio en 1999 y una clave dicotómica de los géneros existentes de este hongo. Con esto se pudo identificar la especie del hongo colectado y hacer el primer reporte sobre este tipo de simbiosis con orquídeas (Pereira, 2003).

También en el 2002 se llevó a cabo un estudio en la Universidad de Hong Kong, donde se aislaron 21 cepas de hongos de forma parecida a *Rhizoctonia* de las orquídeas terrestres *Eulophia flava*, *Goodyera procera*, *Habenaria dentata*, and *Spiranthes hongkongensis*. Para la identificación de las cepas colectadas, los investigadores utilizaron como referencia 5 cepas identificadas hasta especie. Realizaron cultivos de las raíces de las orquídeas, realizaron estudios con microscopía electrónica de transmisión y realizaron análisis RAPD's y CAPS en fragmentos de rADN. Los resultados de los análisis mostraron la diversidad genética de las setas dependiendo de la orquídea y del lugar de colecta. También realizaron estudios de germinación simbiótica (Shan *et al.* 2002).

E. Área de estudio

El área donde se colectó las muestras para el estudio fue el departamento de Zacapa que se encuentra en el Nor-orient de Guatemala, su cabecera es Zacapa, colinda con los departamentos, Alta Verapaz, Izabal, Chiquimula, Jalapa y El Progreso. Debido a su variabilidad ecológica y de factores edáficos, Zacapa cuenta con 6 zonas de vida (según la clasificación de Holdrige), éstas son: Monte Espinoso Subtropical (me-S), Bosque Húmedo Subtropical Templado (bh-S (t)), Bosque Muy Húmedo Subtropical Cálido (bmh-S (c)), Bosque Muy Húmedo Subtropical Frío (bmh-S (f)), Bosque Húmedo Montano Bajo Subtropical (bh-MB), Bosque Pluvial Montano Bajo Subtropical (bp-MB) (Rodas, 2004).

1. Capacidad del suelo. Dependiendo del clima y las características del suelo, se puede clasificar la capacidad de uso de la tierra. Dividiéndolo en 8 clases agrológicas, las primeras 4 son adecuadas para agricultura, las clases V, VI y VII adecuadas para cultivos perennes y bosques y la última clase es adecuada para protección del suelo y la vida silvestre. El departamento de Zacapa cuenta con 7 de las 8 clases agrológicas pero se encuentra mayor cantidad de suelos de las clases VI, VII y VIII (Rodas, 2004).

2. Uso actual del suelo. Actualmente el suelo en el departamento de Zacapa debido a sus características edáficas y la topografía del terreno, es mayormente utilizado para el cultivo de maíz, frijol, yuca, café, banano, piña, melón, tomate, chile pimiento, sandía y tabaco. El departamento también cuenta con crianza de ganado, bosques naturales y plantaciones (Rodas, 2004)

III. METODOLOGÍA

A. Colecta de orquídeas

Este estudio se realizó utilizando las raíces de cuatro orquídeas terrestres; por lo que el primer paso fue la obtención de las raíces. Para obtener las raíces se realizó un viaje de campo a la Reserva Natural de Heloderma, el 9 y 10 de julio del año 2011. La colecta se llevó a cabo recorriendo el área de la reserva y se escogió una orquídea de cada población, de cuatro distintas poblaciones en distintas áreas de la reserva con condiciones edáficas diferentes. Cada orquídea fue colectada con sustrato y sembrada en una maceta individual para no mezclar sustratos y no contaminar las muestras. Debido al largo viaje, las orquídeas se colocaron en una hielera vacía para evitar daños a las plantas. Luego las plantas fueron colocadas en el invernadero de la Universidad del Valle de Guatemala para mantenerlas con temperaturas de 25°C a 30°C y sombra, para simular su hábitat y se regaron cada 2 días con agua de grifo. Dos de las orquídeas colectadas fueron identificadas hasta especie (*Sacoila lanceolata* y *Sarcoglottis assurgens*), gracias a que se contaba con fotografías de las mismas en su etapa floral. Las otras dos orquídeas fueron únicamente identificadas hasta género (*Sarcoglottis* sp. (1) *Sarcoglottis* sp. (2)).

B. Limpieza, cultivo del hongo en medio sólido y cultivo puro

Para realizar el cultivo del hongo micorrícico en los medios de cultivo; manitol-levadura, PDA y Maltosa (ver anexo 1), se prepararon los medios de cultivo 2 días antes de la siembra con las recetas del laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad del Valle de Guatemala. Para realizar la siembra se tomó una raíz de cada orquídea, luego la raíz fue lavada con agua de grifo para eliminar el sustrato remanente. Después se colocaron las raíces en una campana de flujo laminar, para evitar contaminación exterior y se sumergieron en etanol al 70% por 5 segundos, en cloro al 10% durante 2 minutos. Luego se lavó con agua estéril dos veces para eliminar el etanol y el cloro y se secó con una servilleta estéril. Se cortó la raíz en rodajas de 2 mm y luego a este segmento se le cortaron las orillas y se colocaron en diferentes cajas petri los centros de la raíz y las orillas de la misma. Las cajas fueron selladas con parafilm y se dejaron volteadas en una incubadora a 25°C por 48 horas. Al observar que el hongo ya se había desarrollado en el cultivo, se tomó una sección del micelio aéreo de la caja petri y se colocó en una nueva caja para tener un cultivo puro del hongo y así poder realizar una buena observación del mismo.

Observación en el microscopio

Para la observación en el microscopio de los hongos obtenidos en el cultivo puro, se colocaron los cultivos en una campana de flujo laminar y se tomó con un palillo una pequeña muestra del micelio aéreo. Ésta se colocó en un portaobjetos

con una gota de agua estéril y se tapó con un cubreobjetos, se observó en un microscopio marca Leitz con el lente de inmersión.

C. Métodos de observación directa del hongo micorrízico en la raíz.

1. Metodología de tinción con azul de tripano (Sylvia, 1994). Para realizar la tinción con azul de tripano, se tomó una raíz de cada orquídea, se identificó y se esterilizó. En una campana de extracción, se calentó KOH 1.8 M a 80°C, luego se sumergieron las muestras en el KOH caliente por 30 min. Se hicieron tres lavados con agua y se sumergió en H₂O₂ 30% a 50°C por aproximadamente 30 min, hasta que se blanquearon las raíces. Se lavaron con cinco cambios de agua estéril, se colocaron las muestras en agua y se añadieron 5 ml de HCl concentrado por cada 200 ml de agua por aproximadamente 1 min. Se desechó, se realizó de nuevo y se volvió a desechar. Como siguiente paso se agregó la tinción de azul de tripano (ver anexo 2) en un beaker y se calentó a 80°C. Se colocaron las muestras en el beaker con la tinción a 80°C por 30 minutos, se dejó enfriar y se drenó. Para finalizar se lavaron las muestras con agua para eliminar el exceso de colorante y se almacenaron en el refrigerador a 5°C.

2. Metodología de tinción de micorrizas con azul de indofenol (J. Calderon, com. pers.). Para realizar la tinción de azul de indofenol, se tomó una raíz de cada orquídea. Las raíces se lavaron con agua de grifo para eliminar el sustrato remanente. Se sumergieron en etanol al 70% por 5 segundos, en cloro al 10% durante 2 minutos. Luego se lavaron con agua estéril dos veces y se secaron con una servilleta estéril. Se hicieron cortes transversales y longitudinales, se colocaron en un portaobjetos, se les agregó una gota de azul de indofenol y se observó en el microscopio.

D. Cortes histológicos

Para la realización de los cortes histológicos, se utilizó la metodología para Cortes Histológicos del laboratorio de Fitopatología de la Universidad del Valle. Para iniciar el procedimiento se tomó una raíz de cada una de las orquídeas, se identificaron y se lavaron con agua de grifo para eliminar el sustrato excedente. Luego se realizaron los siguientes pasos (Ver anexo 3):

Fijado

Para realizar la fijación de las células de la raíz, se cortó la raíz en segmentos transversales y longitudinales. De los cortes hechos, se sumergieron 2 segmentos transversales y 2 longitudinales de cada una de las raíces en cada una de las soluciones fijadoras: Davidson modificada, Davidson AFA y Fosfatos-Glutaraldehído (Ver anexo 4). Estos segmentos se dejaron sumergidos 4 horas en las

soluciones, se les cambió la solución para eliminar las impurezas que las raíces expulsaron y se dejaron sumergidos 44 horas más. Después se sacaron los cortes de las soluciones y se sumergieron en etilenglicol, realizando el cambio de solución a las 4 horas para eliminar el fijador remanente en las raíces. Se dejaron sumergidas en etilenglicol durante 44 horas más. Este procedimiento se realizó a temperatura ambiente en el laboratorio de Fitopatología perteneciente a los laboratorios de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala.

Deshidratación

Se realizó el proceso de deshidratación de las raíces, después de sacar los segmentos de raíz del etilenglicol, los segmentos fueron colocados en cassettes especiales para este proceso. Estos cassettes fueron sumergidos en etanol al 100% durante 30 min, se les aplicó vacío durante 20 min. Se sumergieron en etanol al 100% durante 30 min más, dos veces en tolueno durante 30 min cada repetición y finalmente dos veces en parafina durante 30 minutos. Inmediatamente se pasó al proceso de infiltración.

Infiltración

Para el proceso de infiltración, se colocó el cassette en molde con parafina a 60°C y se dejó enfriar a temperatura ambiente para formar un bloque de parafina solidificada con los tejidos embebidos en él.

Seccionamiento

Luego de obtener el bloque de parafina, se realizaron cortes de 5, 7, 10, 15 y 20 micras en el micrótopo. Cada corte se pasó por agua desmineralizada a 56°C mezclada con solución de gelatina al 0.2% que actuaba como adhesivo y se montó en un portaobjetos. Se identificó cada muestra y se colocó cada portaobjetos en un horno a 60°C por 30 min, para secar y sellar las preparaciones.

Tinción de azul de anilina (Rawlins, 1993)

Para el proceso de tinción, se colocó los portaobjetos en una gradilla para tinción, la gradilla se sumergió cuatro veces en soluciones de xilol durante 3 minutos cada vez. Seguidamente se sumergieron en etanol al 100%, 12 veces y se repitió este paso una vez más. Se sumergió 12 veces en etanol al 95% y luego se repitió el proceso con etanol al 80%, 70% y 50%. Se realizaron 6 lavados en agua desmineralizada sumergiendo la gradilla 12 veces en cada lavado. Para colorear, se sumergió la gradilla 10 minutos en la tinción de azul de anilina (Ver anexo 5) a 40°C previamente calentado en baño maría. Se trasladó la gradilla a etanol al 95% sumergiéndola 12 veces y luego en alcohol al 100% otras 12 veces. Este último paso se repitió una vez más. Por último, se sumergió en 3 soluciones de xilol, 3 minutos en cada solución.

Montaje

Se cubrió el tejido con 2 gotas de merckoglass y un cubreobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente durante 12 horas.

E. Descripción de los hongos

Con base en lo observado en las metodologías anteriormente descritas, se procedió a realizar una descripción de los hongos. Se usó el documento *Microbiología Agrícola* de Carrillo (2003) como guía para la descripción de las hifas y para la identificación de los pelotones se utilizó la descripción de Pereira 2003.

IV. RESULTADOS

A. Colecta de las orquídeas utilizadas en el estudio

Se colectaron aleatoriamente 4 especies de orquídeas terrestres pertenecientes a 2 géneros distintos, en 4 sustratos distintos. En el cuadro 1 se encuentra su identificación.

Cuadro 1. Identificación de orquídeas y sustrato en el que fueron colectadas.

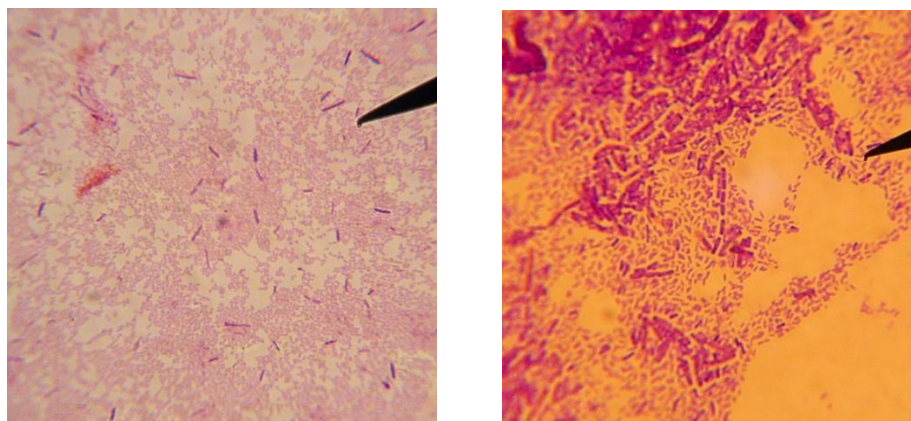
Especie	Sustrato
<i>Sacoila lanceolata</i> (Aublet.) Garay	Suelo muy arcilloso
<i>Sarcoglottis assurgens</i> (Rchb. f.) Schltr.	Materia orgánica (Hojarasca)
<i>Sarcoglottis</i> sp. (1)	Suelo pedregoso y superficial
<i>Sarcoglottis</i> sp. (2)	Suelo y materia orgánica

B. Observación de cultivos en medio sólido

En el cultivo de manitol-levadura se observó crecimiento de los hongos micorrícicos y crecimiento de bacterias acompañantes de la micorriza. En la figura 3 se pueden observar los dos tipos de bacterias encontradas. En el cuadro 2 se presentan los resultados de la tinción Gram de las bacterias encontradas.

1. Observación de bacterias en medio sólido

Figura 3. Bacterias observadas en el medio de cultivo manitol-levadura (aumento de 400X)



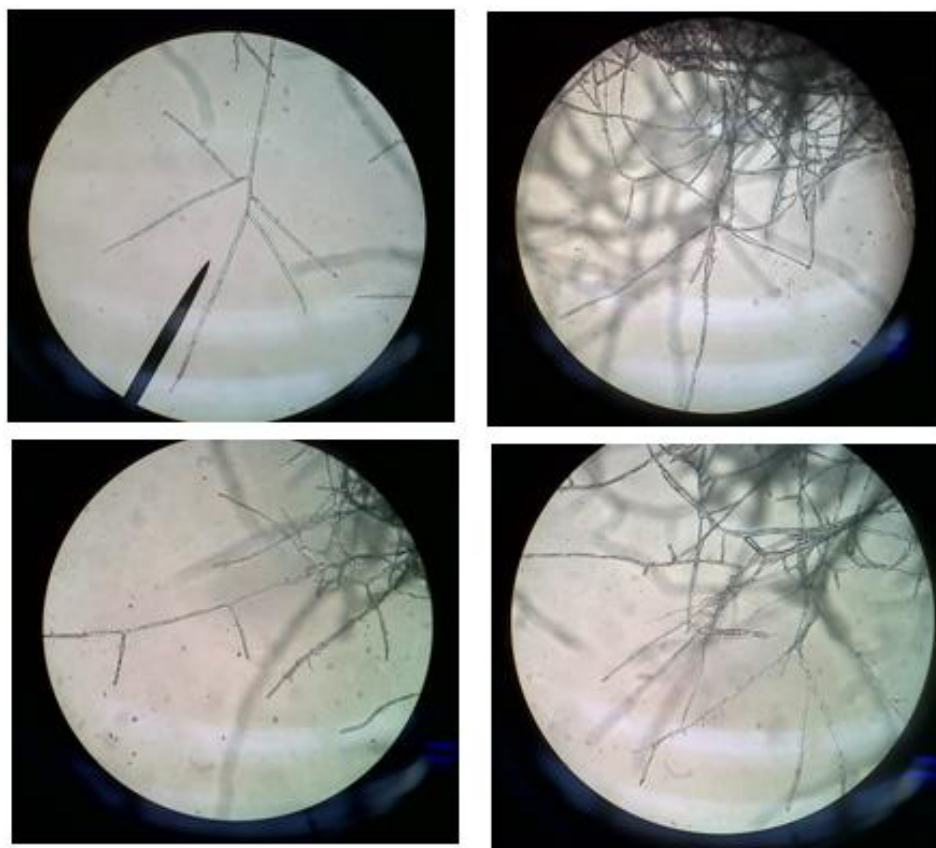
Cuadro 2. Bacterias en el medio de cultivo Manitol-Levadura.

Bacteria	Tinción Gram
Cocos	Negativos
Bacilos	Positivos

2. Observación del cultivo puro en medio sólido. En el cultivo puro se pudo observar 2 colonias blancas de hongos morfológicamente distintas con micelio aéreo, no se pudo observar cuerpos reproductivos ni pelotones. El tiempo de crecimiento de las mismas fue en un intervalo de 48 a 72 horas.

1. Hifas

Figura 4. Hifas en cultivo puro (fotografías observadas con lente inmersión).



Estas figuras corresponden a los montajes microscópicos que se realizaron del cultivo puro en los medios sólidos. En estos se observa la presencia de hifas más no de cuerpos reproductivos ni pelotones. En las figuras 4a y 4b se observa la colonia número 1 y en las figuras 4c y 4d se observa la colonia número 2.

C. Observación directa

1. Observación directa con el método de azul de tripano. Con este método de tinción se pudo observar hifas del hongo pero no se pudo observar cuerpos reproductivos ni pelotones (figuras 5, 6, 7 y 8).

Figura 5. Hifas en *Sacolia lanceolata*



Figura 6. Hifas en *Sarcoglottis assurgens*



Figura 7. Hifas en *Sarcoglottis* sp. (1)

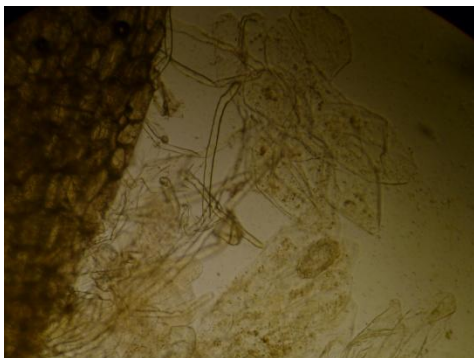


Figura 8. Hifas en *Sarcoglottis* sp. (2)



En las figuras 5, 7 y 8 se puede observar células desprendidas de la raíz. (Figuras 5 observadas con aumento de 400X y figura 6 observada con aumento de 100X)

2. Observación directa con el método de azul de indofenol. Con este método de tinción al igual que con el método de azul de tripano, se pudo observar hifas pero no se pudo observar cuerpos fructíferos ni pelotones (figuras 9 a 14).

Figura 9 y 10. Orquídea 1. *Saccolia lanceolata*.(Figura 9 observada con aumento 400X y figura 10 observada con aumento 100X)

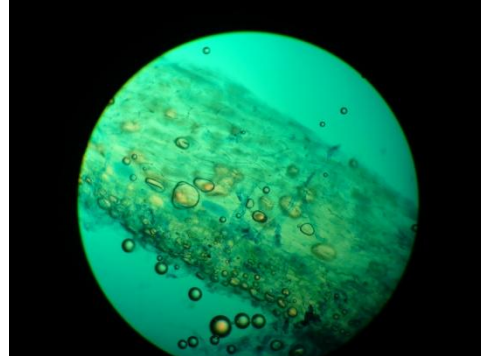
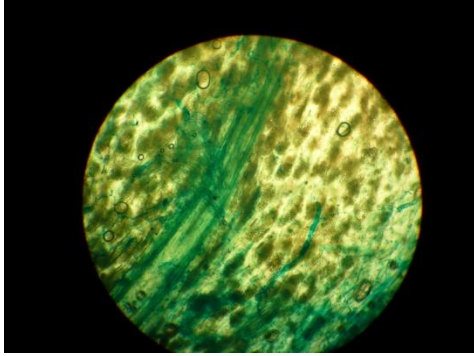


Figura 11 y 12. Orquídea 2 *Sarcoglottis assurgens* (Figuras observadas con aumento 400x)

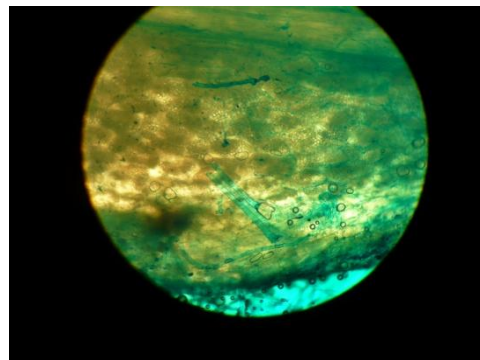


Figura 13. Orquídea 3 *Sarcoglottis* sp. (1) (Figuras observadas con aumento 400x)

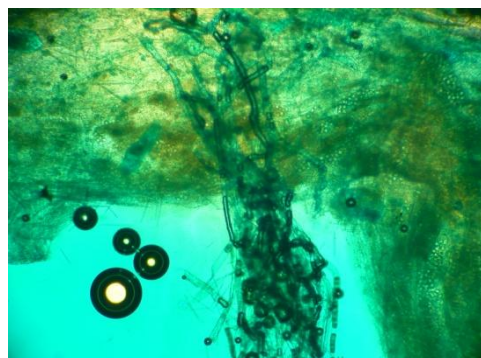
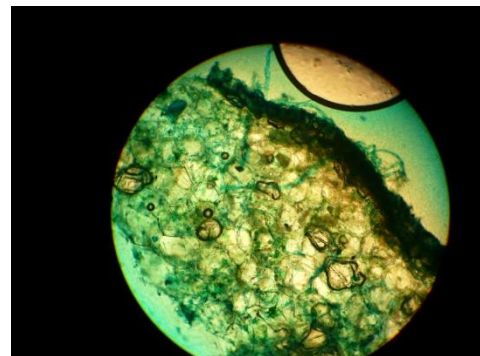


Figura 14. Orquídea 4 *Sarcoglottis* sp. (2)

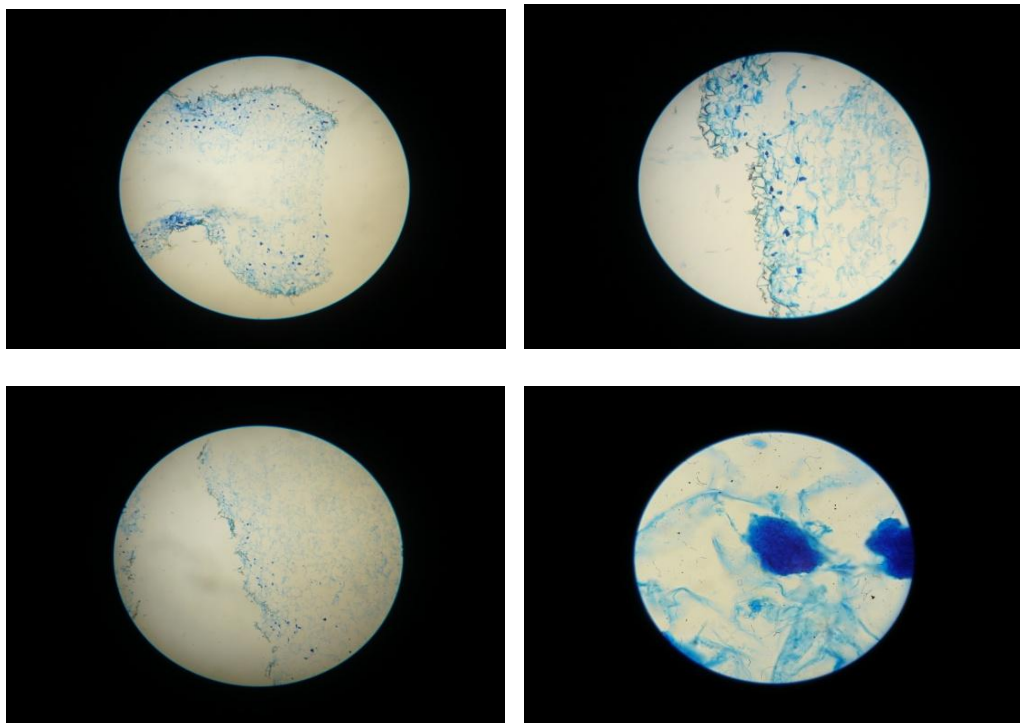


En estas figuras se puede observar las hifas del hongo teñidas de color azul y su relación con la raíz de su hospedero, en las figuras 10 y 13 también se puede observar cómo las hifas no sólo se encuentran dentro de la raíz, como se observa en la figura 14 en la que se puede observar cómo las hifas salen de la epidermis de la raíz.

D. Cortes histológicos

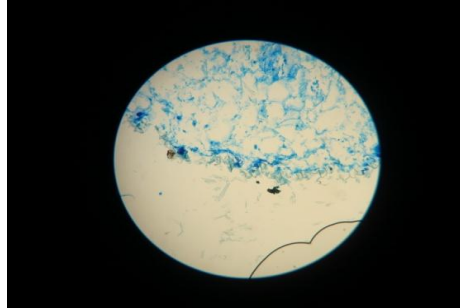
Con este método se pudo observar pelotones teñidos con azul de anilina en las células corticales de la raíz (Figura 15).

Figura 15. Pelotones de Orquídea 1. *Sacolia lanceolata* (Figuras 15a, 15b y 15c observadas con aumento 100X. Figura 15d observada con lente de inmersión 1000X)



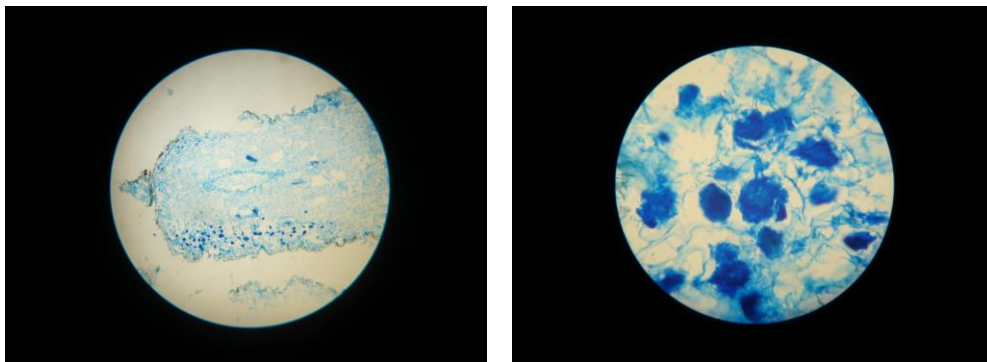
La figura 15a y 15b se muestra cortes histológicos de 15 μm y en las figuras 15c y 15d cortes histológicos de 20 μm de una raíz de la orquídea *Sacolia lanceolata*. Se observan los cortes longitudinales de la raíz y los pelotones en las células corticales de la misma.

Figura 16. Pelotones de Orquídea 3 *Sarcoglottis assurgens* (Figura observada con aumento de 400X)



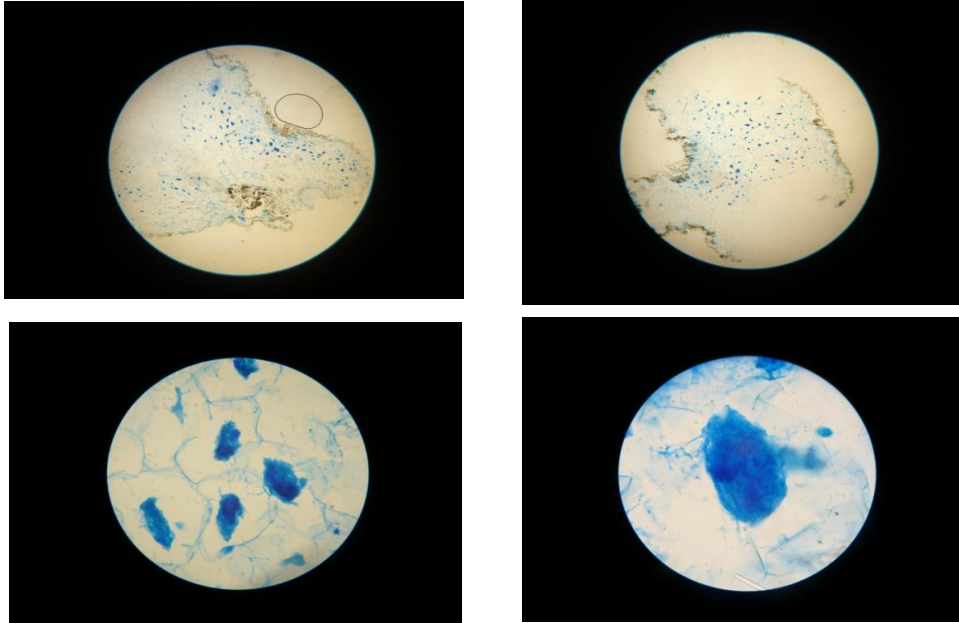
La figura 16 muestra un corte histológico de 20 µm de una raíz de la orquídea *Sarcoglottis assurgens* en esta figura se puede observar que la orquídea cuenta con pelotones más pequeños y diferenciados que las otras orquídeas muestreadas y con células más dañadas que las que se observan en los demás cortes.

Figura 17. Pelotones de Orquídea 2 *Sarcoglottis* sp. (1). (Figura 17a observada con aumento 100X. Figura 17b observada con lente de inmersión 1000X)



La figura 17 muestra cortes histológicos de 20 µm de una raíz de la orquídea *Sarcoglottis* sp. (1). Se puede observar un corte longitudinal de la raíz y los pelotones en las células corticales de la raíz.

Figura 18. Pelotones de Orquídea 4 *Sarcoglottis* sp. (2). (Figuras 18a y 18b observadas con aumento 100X. Figuras 18c y 18d observadas con lente de inmersión 1000X)



La figura 18 muestra los cortes histológicos de una raíz de la orquídea *Sarcoglottis* sp. (2) en la figura 18a se puede observar un corte transversal del centro de la raíz, se observa los pelotones en las células corticales de la misma. En la figura 18b se puede observar un corte transversal de la corteza de la raíz, por lo que se pueden observar los pelotones a lo largo del corte, ya que todas las células observadas son corticales. En las ilustraciones 18c y 18d se pueden observar pelotones teñidos de azul de anilina.

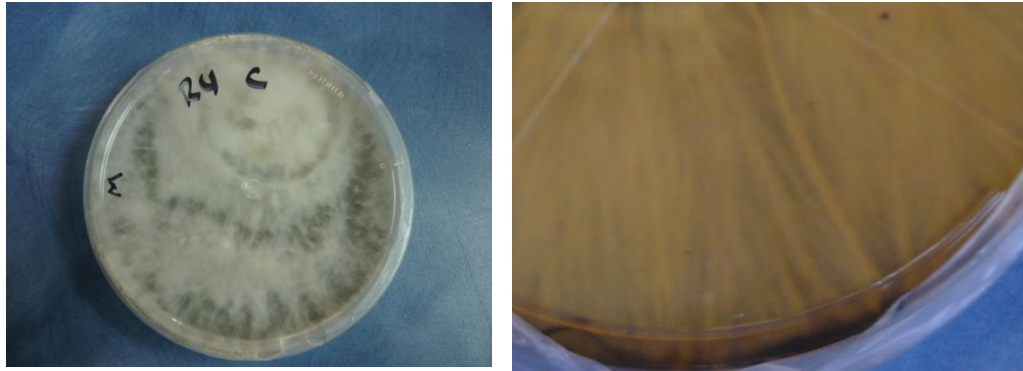
E. Descripción del hongo

En los cultivos realizados a las 4 orquídeas se observaron 2 colonias de hongos distintas:

Colonia 1: micelio de forma irregular de color blanco, con micelio aéreo abundante distribuido por toda la colonia, con reverso blanquecino y textura granulosa. Las hifas observadas en esta colonia, son hifas blancas, septadas, uninucleadas y con ramificaciones sencillas. No se pudieron observar pelotones.

Colonia 2: Micelio redondo con crecimiento radial de color blanco, con micelio aéreo abundante distribuido por toda la colonia, reverso de blanquecino-amarillento y textura algodonosa. Las hifas observadas en esta colonia, son hifas blancas, septadas, uninucleadas y con ramificaciones sencillas. No se observaron pelotones (Figura 19).

Figura 19. Cultivo de la colonia 2. Figura 19a micelio aéreo y figura 19b reverso.



Pelotones:

En la observación directa del hongo en la raíz se pudo observar pelotones, éstos son hifas interconectadas que crecen dentro de las células corticales de la raíz en forma cilíndrica, aunque muchos de los pelotones observados tienen formas mayormente irregulares. No se encontró diferencias en cuanto a la morfología de los pelotones en las raíces de las cuatro especies de orquídeas observadas.

V. DISCUSIÓN

A. Colecta de orquídeas

Las especies de orquídeas utilizadas para el estudio fueron *Sacoila lanceolata*, *Sarcoglottis assurgens* y 2 especies más del género *Sarcoglottis*. Estas fueron colectadas en distintas áreas de la Reserva de la Heloderma en Zacapa y en distintas poblaciones para que el estudio fuera representativo de la población de orquídeas terrestres. Para tener la certeza de no encontrar el mismo hongo en las especies, se colectó en distinta clase de sustratos y se colocó cada orquídea en una maceta con su propio sustrato. Sólo se tomó un individuo de cada especie, para no acabar con la diversidad del lugar, debido a que están en peligro de extinción. Dos orquídeas se identificaron solamente hasta el nivel de género, ya que para su identificación hasta nivel de especie se necesita observarlas en su etapa floral y esto fue imposible debido a la época en que se realizó el estudio.

B. Cultivos en medio sólido

Para la realización de los cultivos en medios sólidos, se utilizó 3 tipos de medio de cultivo. El primer medio utilizado fue el de manitol-levadura, este medio debido a su gran cantidad de nutrientes y poca especificidad, permitió el crecimiento del hongo micorrícico y también de varias bacterias (ver Cuadro 2). A estas bacterias que se encuentran asociadas a las micorrizas se les llama bacterias acompañantes. Debido a la presencia de estas bacterias no fue posible realizar un cultivo 100% puro de los hongos debido a que esta contaminación no permitía obtener el hongo sin la bacteria.

Debido al problema con Manitol-Levadura se recurrió a utilizar los medios PDA y Maltosa agregándoles antibiótico para evitar el crecimiento de las bacterias. La siembra se realizó colocando en distintas cajas petri los centros y las orillas, debido a que según la literatura es más común encontrar los hongos micorrícicos en las células de la corteza que en el centro de la raíz.

Se observó, que el hongo micorrícico de las orquídeas estudiadas, se mantiene en las células corticales, ya que las cajas petri que contenían los centros de la raíz no presentaron crecimiento de hongos. A diferencia de las cajas petri en las que se sembró las orillas, que sí presentaron crecimiento del hongo. De éstas se obtuvo el hongo para realizar el cultivo puro y poder observar las fotografías en la Figura 1. Ambos medios utilizados funcionaron adecuadamente, permitiendo el crecimiento del hongo y evitando el crecimiento de bacterias.

En los medios de cultivo sólido se pudo observar las diferencias entre las 2 colonias encontradas indicando la presencia de 2 hongos diferentes, los dos presentes en las 4 orquídeas estudiadas. Lo que indica que no hay evidencia de especificidad entre los hongos micorrícicos encontrados y las orquídeas muestreadas. En los medios no se pudo observar cuerpos fructíferos ni pelotones debido a que este tipo de hongos necesita estar en el hospedero para reproducirse y para crear pelotones.

C. Observación directa

1. Observación directa con tinción de azul de tripano. Debido a la agresividad de este método, no se pueden observar pelotones, ya que destruye las células de la raíz y con éstas los pelotones contenidos en ellas. Por lo tanto, no se recomienda esta metodología como única opción.

2. Observación directa con tinción de azul de indofenol. Con el método de tinción de azul de indofenol al igual que con el método de azul de tripano, se pudo observar hifas del hongo, pero no se pudo observar pelotones, esto debido a que los cortes de la raíz fueron muy gruesos, tomando varias capas de células que no permitían observar los pelotones, pero se puede observar la relación del hongo con la raíz, ya que se observa como se encuentra el hongo dentro y fuera de la raíz en las figuras 7 y 8.

D. Cortes histológicos

Al ser ésta la primera investigación sobre el tema, no se contaba con una metodología ya estructurada para realizar este proceso. Debido a esto se decidió realizarlo con tres distintas soluciones fijadoras para poder observar qué solución fijadora es la mejor para los estudios de micorrizas en orquídeas. Las soluciones utilizadas fueron, solución Davidson modificada, solución Davidson AFA y Solución de Glutaraldehído y fosfatos. Se utilizaron estas soluciones ya que se ha observado su efectividad en otros tejidos vegetales. Las soluciones fijadoras matan y fijan las células, preservando lo más posible sus características morfológicas y químicas, para permitir la tinción del hongo que se desea observar. La solución que realizó una mejor fijación fue la solución de Davidson modificada, ésta permitió una buena coloración del hongo micorrícico y fue la que mantuvo mayormente la integridad de las células de la raíz. Los cortes se realizaron de 5, 7, 10, 15 y 20 micras. Los cortes en los que se pudo observar la raíz y el hongo, fueron los cortes de 15 y 20 micras, los otros cortes eran demasiado delgados, provocando que las células se rompieran y no permitían la visualización del hongo, porque no abarcaban la capa completa de las células.

Con los cortes histológicos se pudo observar el hongo en la raíz que se mantiene como pelotones o haustorios intracelulares, éstos se forman dentro de las células corticales de la raíz, cubiertas por el material de la pared celular de la célula cortical que penetra. Esta modificación en las células de la raíz permite la transferencia de carbohidratos del hongo a la orquídea, por esta razón es que se dice que la micorriza incrementa la absorción nutricional de la planta.

E. Descripción de los hongos micorrícicos

En este estudio se observó que no existe diferencia entre los hongos encontrados en las 4 orquídeas muestreadas, ya que los dos hongos fueron encontrados en las 4 especies de orquídeas. También se encontró el mismo tipo morfológico de pelotones en las cuatro orquídeas. Se puede decir que existen por lo menos 2 especies de hongos micorrícicos en las 4 especies de orquídeas terrestres muestreadas.

VI. CONCLUSIONES

1. Se identificaron 2 colonias de hongos filamentosos con morfología distinta, las dos colonias de color blanco y con micelio aéreo, una colonia redonda, con crecimiento radial y textura algodonosa y la otra colonia con forma irregular, textura granulosa y masa conidial, mostrando que se encontraron 2 hongos distintos en las 4 orquídeas estudiadas.
2. Se identificaron las orquídeas colectadas.
3. Se logró crecer exitosamente los hongos micorrícicos en el laboratorio, sin embargo no se logró que produjeran pelotones.
4. Los hongos encontrados, tienen hifas septadas uninucleadas y blancas que forman el micelio aéreo obtenido en los cultivos en medios sólidos. Estos fueron encontrados en las 4 especies de orquídeas estudiadas.
5. La mejor metodología para observación directa del hongo fue la tinción de azul de indofenol, ya que no es agresiva con las células de la raíz y permite la observación de las hifas y su relación con la raíz de su hospedero.
6. La mejor metodología para realizar los cortes histológicos en raíces de orquídeas fue utilizando la solución de Davidson modificada y realizar cortes de 15 y 20 μ , ya que esta solución fijadora conservó las células de la raíz y permitió una mejor tinción del hongo y el corte permitió la observación de las células y los pelotones.
7. Los medios de cultivos sólidos PDA y Maltosa, brindaron buenos resultados, ya que el hongo pudo crecer en ambos y debido al antibiótico agregado a la receta, no crecieron bacterias en ninguno.
8. No hay evidencia de especificidad en la relación simbiótica entre los hongos micorrícicos encontrados y las orquídeas muestreadas, ya que los dos hongos se encontraron en las raíces de las cuatro orquídeas utilizadas para el estudio.
9. Los pelotones de los hongos micorrícicos se encuentran en las células corticales de la raíz.

VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda continuar este estudio con análisis moleculares para identificar los hongos micorrícicos en las orquídeas colectadas.
2. Se recomienda continuar investigando sobre las micorrizas orquidioides en Guatemala ya que se necesita generar más información sobre el tema para conservar la diversidad tanto de los hongos como de las orquídeas que se está perdiendo por la venta y extinción de las mismas.
3. Se recomienda realizar un estudio similar incluyendo especies de orquídeas epífitas del país.
4. Se recomienda continuar con el estudio colectando más individuos de las mismas especies para asegurar que no existe especificidad entre hongo y hospedero.
5. Se recomienda realiza un estudio con las mismas especies pero en regiones distintas.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Ames, O., D. Stewart. 1952. *Orchids of Guatemala and Belize*. Ed. Courier Dover Publications. 800 pp.
- Burpee, L. A, Ogoshi. 1991. *Identification of Rhizoctonia species*. The American Phytopathology Society. Minneapolis, EEUU. 133 pp.
- Caplan, P. (ed.). 1997. *Food, Health, and Identity*. Routledge. New York EEUU. 280 pp.
- Carrillo, L. 2003. *Microbiología Agrícola*. Universidad Nacional de Salta 350 pp.
- Dumaz, M. 1985. *Las Orquídeas: el maravilloso mundo de las plantas*. Jardín Botánico Nacional. 12 pp.
- Freuler, M. 2003. *100 Orquídeas Argentinas*. Editorial Albatros. 210 pp.
- Freuler, M. 2006. *Orquídeas*. Editorial Albatros. 106 pp.
- Gianinazzi, V., S. Gianinazzi., 1983. *The physiology of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots*. *Plant Soil* 71: 197-209.
- Merckx, V. et al. 2009. *Myco-heterotrophy: when fungi host plants*. Published by Oxford University Press on behalf of the Annals of Botany Company 104:1255-1261
- Soil Science Society of America. “*Methods of Soil Analysis. Microbiological and Biochemical Properties*”. 1994. Wisconsin, EEUU. Comité editorial Weaver, R. et al. 1692 pp.
- Montoya, H. 2008. *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. 2.a edición, Universidad de Antioquia 255 pp.
- Ojeda, X. 2008. *Orquídeas*. Editorial Blume. Australia. 80 pp.
- Pastor, G. 2006. *Microbiología Clínica*. Ed. Médica Panamericana. 366 pp.
- Pereira, O. et al. 2003. *Epulorhiza epiphytica sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil*. The Mycological Society of Japan and Springer-Verlag Tokyo. 2 pp.
- Peterson, L., H. Massicotte., L. Melville., Mycorrhizas: anatomy and cell biology. CABI publishing series. Canada. 173 pp.

Rawlins, T. 1993. *Phytopathological and botanical research methods*. New York. 370 pp.

Rivas, M., J. Warner., M. Bermúdez. 1998. *Presencia de micorrizas en orquídeas de un jardín botánico neotropical*. San José, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 46:211-216

Rodas, H. 2004. *Zacapa*. Bancafé. Guatemala. 78 pp.

Sylvia, D.M. 1994. *Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi*. In: *Methods of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. R.W. Weaver et al. (eds.). SSSA Book Series, no. 5. Soil Science Society of America, Madison, WI. 351-378 pp.

Shan *et al.* 2002. *Characterization and taxonomic placement of Rhizoctonia-like endophytes from orchid roots*. The Mycological Society of America. EEUU. 10 pp.

Szlachetko, D. J. Mytnik-Ejsmont. 2008. *Orchidaceae Of Ivory Coast*. CSIC. España. 400 pp.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Recetas para medios de cultivo

Reactivos para la preparación de los medios de cultivo utilizados

1. Medio de cultivo manitol-levadura:

Manitol	5 g
K ₂ HPO ₄	0.25 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
NaCl	0.05 g
Extracto de levadura	0.25 g
Agar agar	6.5 g
Agua destilada	500 ml

2. Medio PDA:

Agar PDA	19.5 g
Antibiótico	10 g
Agua destilada	470 ml

3. Medio Maltosa:

Maltosa	22.5 g
Antibiótico	10 g
Agua destilada	467.5 ml

Anexo 2. Receta de azul de tripano

Reactivos para la preparación de azul de tripano

1. 800 ml de glicerina
2. 800 ml de ácido láctico
3. 800 ml de agua destilada
4. 1.2 g de azul de tripano

(Sylvia, 1994)

Anexo 3. Proceso para realización de cortes histológicos



1. Cortes transversales y longitudinales. 2. Sumersión en soluciones fijadoras



3. Deshidratación.

4. Infiltración.



5. Bloques de parafina.

6. Seccionamiento.



7. Montado en portaobjetos.

8. Colocado en gradillas.



9. Tinción con azul de anilina.

Anexo 4. Recetas para soluciones fijadoras

Reactivos para la preparación de las soluciones utilizadas:

Davidson modificada:

Etanol 95%	82 ml
Formalina	55 ml
H ₂ O desmineralizada	112.5 ml
Hidróxido de amonio	2.5 ml
pH 6.5-7	

Davidson AFA:

Etanol 95%	82.5 ml
Formaldehído 40%	55 ml
Ácido acético glacial	25.75 ml
Solución de fosfatos 0.01M	83.75 ml
pH 7.4	

Glutaraldehído-fosfatos:

Fosfato monobásico 0.01M	19 ml
Fosfato dibásico 0.01M	81 ml
Glutaraldehído 50%	4 ml
pH 7.4	

Anexo 5. Receta para tinción de azul de anilina

Reactivos para la preparación de la tinción de azul de anilina

Fenol	83.4 g
Glicerina	83.4 ml
Ácido Láctico	83.4 ml
Agua destilada	83.4 ml
Azul de anilina	0.41 g