



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

Departamento de Suelos

Agroforestería para el Desarrollo Sostenible

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y POTENCIAL
MICORRÍZICO DE HONGOS
ENDORRIZOSFÉRICOS EN LA ORQUIDEA
Vanilla planifolia Jacks, ex Andrews**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

CORNEJO SILVA YADIRA



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

20 DE SEPTIEMBRE DE 2010 CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO



Agroforestería para el
Desarrollo Sostenible

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y POTENCIAL MICORRÍZICO DE
HONGOS ENDORRIZOSFÉRICOS EN LA ORQUIDEA *Vanilla planifolia*
Jacks, ex Andrews**

Tesis realizada por **Cornejo Silva Yadira** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN AGROFORESTERIA PARA EL DESARROLLO SOSTENIBLE



DIRECTOR: DRA. ELIZABETH HERNÁNDEZ ACOSTA



CODIRECTOR: DR. ALEJANDRO ALARCÓN



ASESOR: DRA. MARÍA EDNA ALVAREZ SÁNCHEZ

DEDICADA A:

Mis padres por ser los seres más importantes en mi vida y enseñarme que los sueños se realizan a base de constantes esfuerzos. . . .

Mis mejores compañeros de vida y amigos, mil gracias por apoyarme siempre. . . Mis hermanos. Así como a los nuevos integrantes de la familia, mis cuñadas.

Quienes ya no se encuentran conmigo (Queta, Chepa, Concha, Marcelino, Socra, Leo, Marco) por cimentar mis valores y creencias en esta vida.

Mis padres de la ciencia, por ser mis mentores en este campo, pero sobre todo por ser mis amigos. . . Dra. Bertha Peña y Dr. José Luis Gómez.

Mi amigo y consejero en los peores momentos, por su apoyo incondicional. . . Prof. Enrique Espejel.

M. C. María de los Ángeles Beltrán por sus comentarios y contribuciones para este trabajo.

Mis viejos amigos (Clau, Betty, Liz, Faby, Armando, Eloir, Genaro, Claudia y Ulises) y a los nuevos (Itzel, Rosalba, Esmeralda, Cristi, Jess, Daniel, Vero y Francisco), gracias por las porras.

AGRADECIMIENTOS

Esta es la culminación de dos años de la adquisición de nuevos conocimientos en la Universidad Autónoma Chapingo en el programa de Posgrado en Agroforestería para el Desarrollo Sostenible, donde he podido disfrutar de las alegrías y aprender de las penas que da la ciencia, las cuales se convirtieron en un reto personal. Gracias a ello tengo a quienes dar un reconocimiento, aunque sea en unas breves líneas y las cuales se quedan cortas para darles mi más sincero agradecimiento, por su valioso apoyo para lograr este grandioso sueño.

Agradezco a:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgarme la beca para realizar los estudios de Maestría en Ciencias en Agroforestería para el Desarrollo Sostenible.

Los productores vainilleros de la región de Papantla y a los Ingenieros del Campo Experimental del INIFAP Ixtacuaco Juan Hernández Hernández y Juan Hernández.

Dr. Alejandro Alarcón, Investigador del Área de Recursos Naturales, encargado del laboratorio de Micorrizas en el Colegio de Posgraduados, Montecillos. Por compartir sus conocimientos y su tiempo. Por creer en mí y apoyarme desde el primer día en que lo hice participe de este sueño, no tengo como agradecerle sus palabras de aliento para superar cada uno de los momentos difíciles. Así como darme un espacio en donde realizar este trabajo.

Dr. Ronald Ferrera Cerrato Profesor Investigador del Área de Microbiología de Suelos, por sus innumerables observaciones y consejos durante el desarrollo de este trabajo, así como el abrirme las puertas del laboratorio de Microbiología en el edificio de Edafología, Colegio de Postgraduados, Montecillos, Texcoco, México.

Dr. Ángel Villegas Monter, Profesor del Área de Recursos Genéticos y Productividad (Fruticultura) Colegio de Postgraduados, Montecillos, por proporcionar el material vegetal *in vitro* utilizado para esta investigación; así como a su laboratorista Sr. Guillermo Arellano Hernández.

Dra. Beatriz Xoconostle Cázares, Investigadora del CINVESTAV-IPN México D. F., en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, y a su laboratorista M.C. Lidia Gómez, quienes regalaron su valioso tiempo y espacio para que aprendiera las diferentes técnicas que se utilizan para la identificación taxonómica molecular.

Dra. Hilda V. Silva Rojas Colegio de Posgraduados, Laboratorio de Biotecnología de Semillas, Montecillos, por realizar la identificación taxonómica molecular de algunas de las cepas fúngicas de este trabajo.

M. C. Laura V. Hernández-Cuevas del Laboratorio de Micorrizas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, quien facilitó el material bibliográfico para la determinación fúngica aquí realizada.

Dr. Paul Bayman, Profesor del Departamento de Biología en la Universidad de Puerto Rico, por su tiempo y comentarios hacia este trabajo.

María Dolores Coronel Sánchez, secretaria de confianza “B” del Departamento de Suelos de la Maestría en Agroforestería para el Desarrollo Sostenible, por su infinito apoyo, ayuda y orientación desde el inicio de este trabajo hasta su culminación.

Dr. Jesús Pérez Moreno, Dr. Juan José Almaraz Suárez y M. C. Ma. Encarnación Lara Hernández. Profesores investigadores del área de Recursos Naturales (Edafología), Colegio de Posgraduados, Montecillos; por obsequiarme su tiempo cuando requerí su ayuda.

Todos y cada uno de los integrantes de los laboratorios (administrativos y alumnos) de Microbiología y Micorrizas del área de Recursos Naturales (Edafología) del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillos, gracias por su apoyo.

DATOS BIOGRÁFICOS

Yadira Cornejo Silva nació en San Diego, Texcoco, Estado de México el 24 de Abril de 1978.
Realizó sus estudios de Educación Media Superior en la Escuela Preparatoria Texcoco.

Sus estudios superiores los realizó en la Universidad Nacional Autónoma de México en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza en donde obtuvo el grado de Bióloga el día 9 de Noviembre del 2004.

**Aislamiento, identificación y potencial micorrízico de hongos endorrizosféricos en la orquídea
Vanilla planifolia Jacks, ex Andrew**

**Isolation, identification and mycorrhizal potential evaluation of endorhizospheric filamentous fungi
from the orchid *Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews**

Cornejo-Silva Y., Alarcón A., Hernández-Acosta E. y Sánchez-Álvarez M. E.

RESUMEN

La orquídea *Vanilla planifolia* reportada como originaria de México, es cultivada en sistemas agroforestales y enfrenta problemas fitosanitarios. Sus variedades silvestres están protegidas por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, debido a la extracción masiva para establecer plantaciones y destrucción de sus hábitats. Pocos estudios en México, se relacionan con la caracterización de hongos micorrízicos en esta orquídea, por lo que este trabajo se enfoca a la identificación de hongos endorrizosféricos con potencial micorrízico para la vainilla.

Este trabajo contempló tres fases experimentales: 1) Aislamiento y purificación de hongos endorrizosféricos de *V. planifolia*, 2) Prueba del potencial de formación de micorriza orquidíode de las cepas aisladas en plántulas de vainilla, y 3) Identificación molecular de las cepas formadoras de micorriza orquidíode.

El material rizosférico fue recolectado en vainillales de acahual en Papantla, Veracruz, siguiendo el método por cuadrantes, y colocándolo en bolsa de plástico para su transporte en frío. Los explantes de raíz con pelotones fueron obtenidos mediante cortes transversales, desinfectados y colocados en medio de aislamiento fúngico, donde el recrecimiento hifal fue subcultivado en medio PDA® para su purificación y posterior caracterización macro y microscópica. Para seleccionar las cepas fúngicas capaces de formar simbiosis, plántulas de *Vanilla* procedentes de cultivo *in vitro* fueron colocadas en microcosmos e inoculadas con micelio fúngico, en cámara de crecimiento (24-26°C, 80% HR y fotoperiodo 12 h). Después de 10 y 30 días de su establecimiento, las raíces fueron muestreadas y fijadas en FAA para corroborar la colonización fúngica mediante clareo con KOH y tinción con azul tripano. Aquellas, cepas que formaron simbiosis fueron analizadas molecularmente (extracción de ADN y amplificación de región ITS) para su identificación taxonómica.

Se lograron aislar y purificar once cepas de hongos filamentosos (4CV, 4CVb, 2, 5, 3CV, 3CVa, 2A, 2B, 3Ma, P1, 11), y sólo siete de ellas formaron simbiosis (79.5% de colonización) al observarse pelotones fúngicos en las células corticales. Las cepas 2A, 2B y 3Ma fueron identificadas tradicional y molecularmente, perteneciendo a los géneros *Colletotrichum*, *Gloeotinia* y *Verticillium*, respectivamente, géneros fúngicos que no habían sido previamente reportados para vainilla.

De las cuatro cepas restantes con formación de simbiosis (3CV, 3CVa, P1 y 11) no se tuvieron criterios morfológicos (estructuras reproductivas o esporas) para su identificación, y presentaron dificultad en su recrecimiento a partir de hifas, necesario para su análisis molecular.

Palabras clave: simbiosis; vainilla; hongos filamentosos; *Colletotrichum*; *Gloeotinia*; *Verticillium*.

ABSTRACT

The *Vanilla planifolia* orchid originally from Mexico, is cultivated in agroforestry systems, and also has plant health issues. Its wild type varieties are now protected by the Mexican Official Norm NOM-059-ECOL-2001, due to the massive recollection of explants for establishing new plantations, and the destruction of natural habitats. The Mexican studies focused on the characterization of mycorrhizal fungi in this orchid are scarce; thus, the aim of this work was to identify endorhizospheric filamentous fungi for evaluating their mycorrhizal potential in vanilla.

This work was split in three experimental phases: 1) Isolation and purification of endorhizospheric fungi from *V. planifolia*, 2) Evaluation of the fungal potential for establishing the orchid mycorrhizal symbiosis in vanilla plantlets, and 3) Molecular identification of fungi that formed the mycorrhizal symbiosis.

The roots were collected from vanilla acahuals from Papantla, Veracruz, by following the quadrant method, and deposited in sealed plastic bags under cooled conditions for their further analysis. The root explants, in which fungal pelotons were microscopically identified, were surface disinfested and placed on an isolation fungal medium, and once the fungal growth was observed, the mycelium was again newly transferred to PDA® plates for its purification, and subsequent macroscopic and microscopic characterization. In order to select fungal strains able to form orchid mycorrhizal symbiosis, plantlets of vanilla obtained from *in vitro* culture, were placed in microcosms and individually inoculated with each fungal strain previously isolated. Plantlets were kept under plant growth chamber conditions (24-26°C, 80% HR and 12 h of photoperiod). After 10 and 30 days of fungal inoculation, roots were harvested and evaluated for determining the fungal colonization by clearing roots with KOH and staining with tripan blue dye. Those fungal strains with positive formation of orchid mycorrhizal symbiosis were molecularly analyzed for their taxonomic identification (DNA extraction and ITS amplification).

Eleven fungal strains were isolated and purified (4CV, 4CVb, 2, 5, 3CV, 3CVa, 2A, 2B, 3Ma, P1, and 11), and only seven strains (2A, 2B, 3Ma, 3CV, 3CVa, P1 and 11) formed the orchid mycorrhizal symbiosis (79.5% colonization in average) in which the typical fungal pelotons in cortical cells were observed. The strains 2A, 2B and 3Ma were identified via traditional and molecular methods, and these strains belonged to the fungal genera *Colletotrichum*, *Gloeotinia* and *Verticillium*, respectively. These fungal genera have not been previously reported for vanilla.

For the remaining four strains (3CV, 3CVa, P1 and 11) there were not morphological criteria for their identification, and also showed difficulties for growing from hyphal tips, thus is still necessary to perform further traditional and molecular techniques for their identification.

Key words: symbiosis; vanilla; filamentous fungi; *Colletotrichum*; *Gloeotinia*; *Verticillium*.

CONTENIDO

RESUMEN	VII
ABSTRACT	VII
CONTENIDO	VIII
LISTA DE CUADROS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. <i>Vanilla planifolia</i> Jacks, ex Andrews	4
2.1.1. Requerimientos agroecológicos para el cultivo.....	10
2.1.2. Nutrientes y fertilizantes	13
2.1.3. Problemática	14
2.2. La simbiosis micorrízica.....	15
2.2.1. Tipos de micorrizas	15
2.2.2. Importancia de las micorrizas	18
2.3. Micorrizas orquidioides o de ovillo.....	19
2.3.1. Efectos fisiológicos de los hongos orquideomicorrízicos (HOM) y sus posibles aplicaciones	23
III. JUSTIFICACIÓN	26
IV. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	27
4.1. General	27
4.2. Específicos.....	27
4.3. Hipótesis.....	27
V. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1. Área de recolecta de muestras rizosféricas	28
5.2. Aislamiento de hongos endorrizosféricos de la vainilla.....	29
5.3. Preparación de especímenes fúngicos para su identificación taxonómica	30
5.4. Prueba de formación de micorriza mediante la aplicación de los postulados de Koch.....	31
5.5. Identificación genética de hongos	32
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
6.1. Área de recolecta de muestras rizosféricas	34
6.2. Aislamiento de hongos endorrizosféricos de la vainilla.....	34
6.3. Preparación de especímenes fúngicos para su identificación taxonómica	35
6.4. Evaluación de cepas fúngicas con potencial para formar simbiosis	52
6.5. Identificación genética del hongo.....	57
VII. CONCLUSIONES	60
VIII. LITERATURA CITADA	61
IX. ANEXOS	73
A. Medio de Aislamiento Fúngico (MAF)	73
B. Características macroscópicas para cepas en cultivo.....	73

C.	Qiagen DNeasy®	73
D.	Preparación del gel de agarosa.....	74

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación científica.....	4
Cuadro 2. Fenología del cultivo	7
Cuadro 3. Requerimientos ambientales para el cultivo de vainilla	11
Cuadro 4. Principales géneros de hongos capaces de formar micorriza con orquídeas.	23
Cuadro 5. Características morfológicas usadas para la diferenciación e identificación de los aislados fúngicos micorrízicos.	36
Cuadro 6. Porcentaje de colonización fúngica (pelotones) en células.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Morfología de la <i>Vanilla planifolia</i>	6
Figura 2.	Corte longitudinal de una flor de <i>Vanilla planifolia</i>	8
Figura 3.	Diferentes estadios de madurez de la vaina de <i>Vanilla planifolia</i>	9
Figura 4.	Reacciones del Metabolismo Acido de Crasulácea.....	12
Figura 5.	Tipos de micorrizas más frecuentes.....	17
Figura 6.	Distribución de los núcleos hipertrofiados en las células corticales (cc) de <i>Spethoglottis plicata</i>	22
Figura 7.	Papantla (Región del Totonacapan) Veracruz, México	28
Figura 8.	Fotografía de los geles de electroforesis del ADN extraído.	33
Figura 9.	Crecimiento fúngico a partir de explante.....	34
Figura 10.	Aspectos macroscópicos y microscópicos de la especie <i>Aspergillus wentii</i>	39
Figura 11.	<i>Colletotrichum</i> sp. (Cepa 2A). características macroscópicas y microscópicas.....	40
Figura 12.	<i>Gloeotinia</i> sp. (Cepa 2B). Características macroscópicas y microscópicas.	41
Figura 13.	Cepa 3CV: Características macroscópicas y microscópicas.....	42
Figura 14.	Cepa 3CVa. Características macroscópicas y microscópicas	43
Figura 15.	Cepa 3Ma (<i>Verticillium</i> sp). Aspectos macroscópicos y microscópicas.	45
Figura 16.	Cepa 4CV. Aspectos macroscópicos y microscópicas.	46
Figura 17.	Cepa 4CVb. Aspectos macroscópicos y microscópicas	47
Figura 18.	Cepa 5. <i>Xylaria</i> sp. Aspectos macroscópicos y microscópicas.....	49
Figura 19.	Cepa 11 Aspectos macroscópicos y microscópicas.....	50

Figura 20. Cepa P1. Aspectos macroscópicos y microscópicas	51
Figura 21. Cepa 2ACa. Característica morfológica de la colonia que fue semejante a una colonia de actinomicetos.	52
Figura 22. Anatomía de la raíz de <i>Vanilla planifolia</i> mediante el corte transversal.	53
Figura 23. Microfotografías longitudinales de las raíces de vainilla del tratamiento testigo y de la Cepa 2B.....	55
Figura 24. Estructuras fúngicas dentro de la raíz de vainilla, correspondientes a las cepas 2A (A-D), 3CV (E-H), 3CVa (I-L) y 11 (M-P).....	56
Figura 25. Microfotografías de las raíces de vainilla de los tratamientos con las cepas P1 (Q-T) y 3Ma (U-X).....	57
Figura 26. Verificación de los productos de PCR amplificados.	58

I. INTRODUCCIÓN

La *Vanilla* es un género de orquídeas de aproximadamente 70 especies distribuidas en la franja tropical y subtropical húmeda del globo terráqueo; sin embargo, sólo tres especies (*Vanilla planifolia* Andrews; *Vanilla pompona* Schiede y *Vanilla tahitensis* J. W. Moore) son de importancia económica (Castro-Bobadilla y García-Franco, 2007).

En México más del 90% de la producción pertenece a *V. planifolia*, la cual se distribuye en diversas y variadas industrias, que van desde la alimentaria, pasando por la licorera, refresquera, farmacéutica, cosmética, tabacalera, hasta llegar incluso, a la industria artesanal; lo que la convierte en un cultivo de alto valor agregado (Teorema, 2008). Esta especie de vainilla es endémica, procedente de la región del Totonacapan (Veracruz y Puebla) y ahora está distribuida en Chiapas, Hidalgo, San Luis Potosí, Querétaro, Oaxaca, Michoacán, Tabasco y Quintana Roo estados que poseen zonas potenciales para su cultivo (Sánchez, 1997; Arzani y González, 2007).

En el sur de México, estos sistemas sirven como modelo para ver la dinámica del uso de tierra, la conservación y el desarrollo económico rural debido a que este sistema agroforestal constituye una alternativa de gran interés por ser rentable para los productores forestales (Elizondo *et al.*, 2005). Lo anterior se fundamenta en la obtención de ingresos económicos de los árboles sombra, para la vainilla (frutales o maderables), tales como *Teobroma grandiflora*, *Hevea brasiliensis*, *Persea americana*, *Camelia*, *Erythrina* spp. *Gliricidia maculata*, *Leucaena leucocephala*, *Jatropha curcas*, *Plumeria alba*, entre otras o bien en las zonas de semi-sombra de los bosques (Paniagua *et al.*, 2008; Barrera- Rodríguez *et al.*, 2009; Hernández, 2009a).

El vainillal es uno de los muchos agrosistemas forestales que permanece durante muchos años (Soto, 2006) el cual de manera natural ofrece los servicios ambientales de preservación de la biodiversidad, captura de agua y carbono (Romeu, 2000; Soto, 2006; Menchaca, 2009).

Además, económicamente es uno de los cincuenta productos producidos orgánicamente que tiene como países destino de exportación a Estados Unidos y Japón,

cultivándose 1,412 ha (Orozco, 2006). Siendo su precio en el mercado internacional del kilogramo 35 a 45 dólares, una desventaja para México, pues su costo de producción es alto debido a las condiciones existentes en zonas productoras en donde sus precios son bajos. Aunándose, el uso excesivo de insecticidas, plaguicidas y fertilizantes en la mayoría de los vainillales que han generado la extinción del agente polinizador natural (*Melipona beechii*) de la vainilla y la proliferación de plagas y enfermedades, que resulta en la disminución de la producción y de la calidad requerida para su comercialización (Bautista, 2009).

Actualmente, una de las técnicas utilizadas para disminuir el uso de agroquímicos se basa en la inoculación con hongos micorrízicos, los cuales han mostrado poseer un gran potencial económico. Sin embargo, pocos son los estudios realizados en nuestro país con respecto a la identificación de los hongos endomicorrízicos existentes en la vainilla que puedan ser utilizados en la generación de algún producto (biofertilizante) para el mejoramiento de este cultivo.

Por lo anterior, en este trabajo se propuso aislar y caracterizar los hongos endorrizosféricos de *Vanilla planifolia* proveniente de las zonas de cultivo en acahual en el municipio de Papantla, Veracruz, que tuvieran potencial de formar simbiosis orquidíode mediante el aislamiento, purificación e identificación taxonómica corroborándose dicho potencial mediante la aplicación de los postulados de Koch.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A nivel mundial la familia Orchidaceae comprende 1,000 géneros aproximadamente y 35,000 especies, las cuales ecológicamente, están divididas en dos reinos basados en su tipo de hábitat: terrestres y epífitas (Arditti, 1992). Los países de América tropical son los más ricos en endemismos de la familia Orchidaceae (Flores-Escobar *et al.*, 2008).

En México, aunque el número de especies es menor que el de otros países de América tropical (Colombia, Ecuador, Perú, Brasil, etc), se reconocen más de 1,106 especies y subespecies descritas de orquídeas, distribuidas en 159 géneros, los cuales se desarrollan en el sur del trópico de Cárter desde las costas del Pacífico y del Golfo, en altitudes que pueden rebasar los 3,500 msnm. Por ello, la mayor riqueza de orquídeas se ubica en los estados de Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Veracruz y Chiapas (Soto, 1999). Sin embargo, la alteración y destrucción del hábitat, así como extracción ilegal de orquídeas silvestres para su comercio, hace que varias de estas especies estén consideradas en peligro de extinción (Espejo-Serna *et al.* 2005; Flores-Escobar *et al.*, 2008).

En general, las orquídeas se han adaptado a vivir como epífitas, como es el caso de la vainilla, la cual se ha utilizado como aromatizante desde el siglo XIV por los Aztecas y es la segunda especia más cara negociada en el mercado mundial siendo su consumo anual en 1995 de 1,900 toneladas, con 1,400 toneladas exportadas a los EE.UU. solamente (Divakaran *et al.*, 2006). En la actualidad, Indonesia es el mayor productor de vainilla, produciendo 3,700 toneladas en cerca de 9,000 hectáreas, mientras que México sólo produjo 637 toneladas en aproximadamente 1,103 hectáreas en el 2007, contribuyendo sólo con el uno por ciento de la producción beneficiada a nivel mundial (FAOSTAT, 2007). Esta participación se debe principalmente a que los productores de la región del Totonacapan se caracterizan por tener pequeñas superficies dedicadas al cultivo de vainilla, que oscilan entre un cuarto y media hectárea, con bajos rendimientos de vainilla en verde.

A continuación se describen algunos aspectos generales sobre este cultivo tan utilizado pero poco estudiado.

2.1. *Vanilla planifolia* Jacks, ex Andrews

Vanilla planifolia (sinónimo *Vanilla fragans* Salisb.) es una orquídea nativa del norte de América del Sur, América central, México y de la India occidental (Arditti, 1992). Pertenece a la subtribu Vanillinae, que consiste de 5-7 géneros con aproximadamente 180 especies (Gehring *et al.*, 1998). De acuerdo a la jerarquía taxonómica se encuentra:

Cuadro 1 Clasificación botánica de la *Vanilla planifolia*

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Subclase	Lillidae
Orden	Orchidales
Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Vanilloideae
Tribu	Vanilleae
Subtribu	Vanillinae
Género	<i>Vanilla</i>
Especie	<i>Vanilla planifolia</i> B. D. Jackson

ITIS 43714 (2009)

En México, los diversos especímenes silvestres de *Vanilla planifolia* se encuentran en la categoría de protección especial de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 de acuerdo a la lista publicada el 6 de marzo de 2002 en el Diario Oficial de la Federación, debido a la extracción masiva para establecer plantaciones y destrucción de sus hábitats, por lo que podrían perderse las 30 variedades silvestres que tienen un gran potencial genético (Bautista,

2009). El hábitat natural de la vainilla, son los bosques o selvas tropicales cálidos húmedos y se asocia a la selva tropical perennifolia y bosque de encino (Sánchez *et al.*, 2001) los cuales se encuentran distribuidos desde las costas del Pacífico y del Golfo. Además, las zonas potenciales para su cultivo se encuentran en la región del Totonacapan (Veracruz y Puebla), Chiapas, Hidalgo, San Luis Potosí, Querétaro, Oaxaca, Tabasco y Quintana Roo (Sánchez, 1997; Arzani y González, 2007).

A nivel comercial, la vainilla se cultiva en terrenos con vegetación secundaria (acahual), en asociación con otros cultivos o en tutores establecidos (monocultivo) (Hernández, 2009a); así como en casas sombra.

La *Vainilla planifolia* es una planta trepadora epífita, no saprofítica (García-Cruz y Sosa, 1998) perenne, siendo un bejuco, de tallo monopódico (simple o ramificado), verde, fotosintéticamente activo, succulento, cilíndrico y sarmentoso, formado entrenudos de 10 a 15 cm de largo y de 10 a 15 mm de diámetro. En cada nodo se produce una sola hoja junto con un par (generalmente) de raíces adventicias que son carnosas y largas, sirven a la planta para adherirse al tutor o enrejado, algunas veces son fotosintéticamente activas (Gehring *et al.*, 1998).

En cultivo, se recomienda que no crezca más de 4 m a fin de facilitar la polinización manual en la época floral aunque puede alcanzar más de 20 metros. Las hojas son enteras, planas, ovales, oblongas y terminadas en punta, son alternas paralelinerves, gruesas y cerosas de 15 a 18 cm de diámetro y de 5 a 7 cm de ancho, son subsésiles, provistas de un peciolo corto que forma una especie de canaladura, sus nervaduras son paralelas y oscuras, se vuelven prominentes cuando la hoja se seca (Fig. 1).

Las raíces subterráneas tienen una estructura exterior llamada velamen que les permite absorber y retener el agua proveniente de precipitaciones pluviales, del rocío nocturno y de la humedad ambiental (Assis *et al.*, 2005), se llaman trazadoras ya que se extienden en un radio de hasta 8 cm, a través de ellas adquieren los nutrientes del humus del suelo (León, 1987).

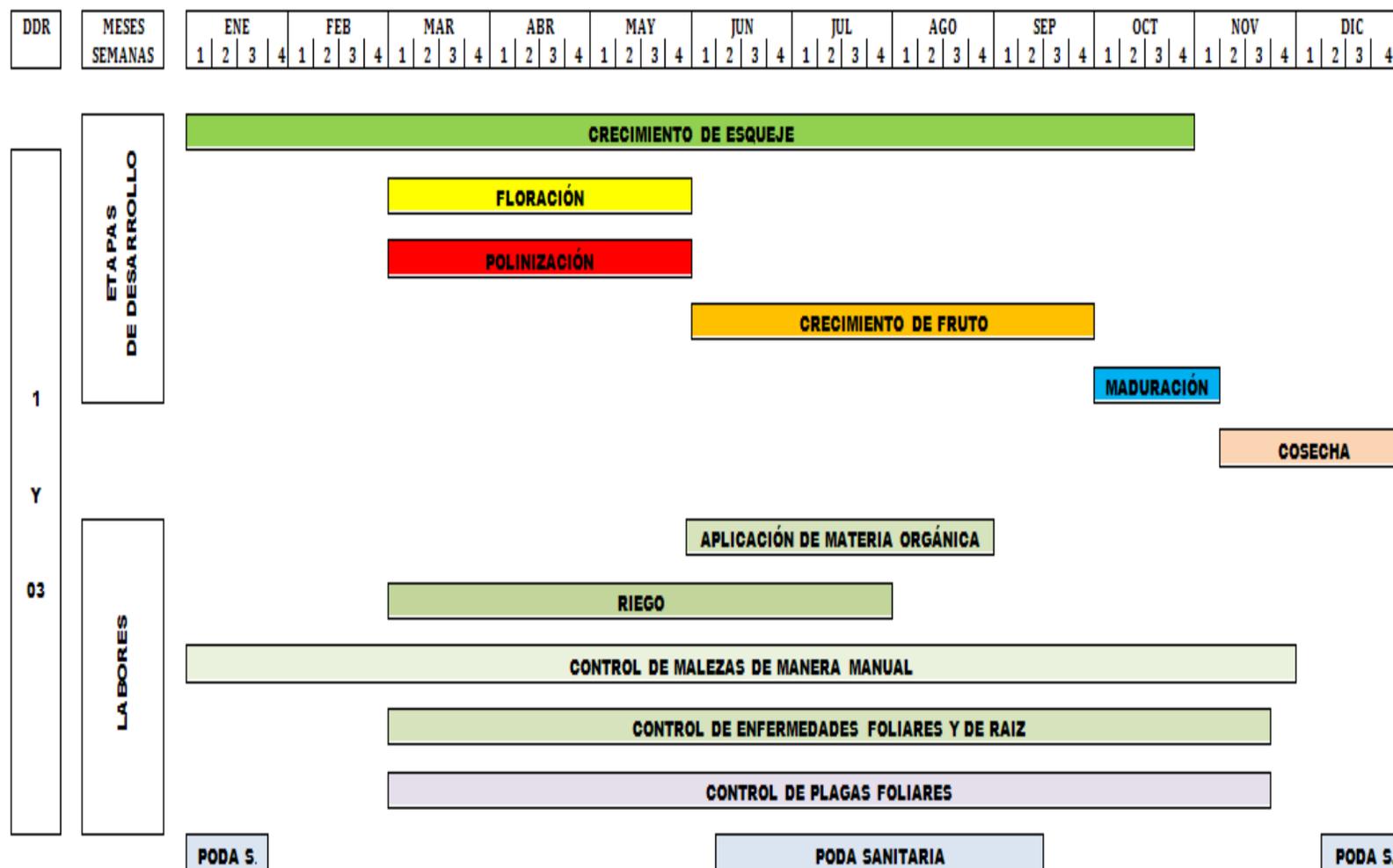


V. planifolia Ilustración de Koehler

Figura 1 . Morfología de la *Vanilla planifolia*.

Las inflorescencias laterales (García-Cruz y Sosa, 1998) de la vainilla son racimos axilares, cada planta produce de 8 a 15 racimos por planta dependiendo a las condiciones ambientales, edad y cantidad de bejucos desarrollados y cada racimo de 10 a 20 flores (Hernández, 2009b). La flor mide alrededor de 5 cm, es hermafrodita con una antera fértil, frontal, de color blanco con nectarios prominentes (García-Cruz y Sosa, 1998), ligeramente amarillo verdoso y poco abierto. La flor está formada por tres pétalos y tres sépalos, un pétalo modificado y alargado en forma de labio, el labelo, es más corto que las otras partes y posee lóbulos crenulados. Desde que se inicia la formación de una inflorescencia hasta la apertura de la primer flor, transcurren de 45 a 60 días (Hernández, 2009b).

Cuadro 2. Fenología del cultivo de vainilla



Tomado de Cadena Agroalimentaria de Vainilla. CAV, 2008.

Normalmente abre una flor al día por racimo, en ocasiones dos o ninguna cuando existen bajas temperaturas o lluvias. Las flores (Fig. 2) se abren totalmente en la madrugada y tardan abiertas solo seis a ocho horas, después se cierran o se marchitan (Hernández, 2009b). El 1% del total de las flores la polinizan de manera natural las abejas (*Melipona beechii*), el colibrí (*Cynnis sp.*), los murciélagos, jicotes (*Eulaema sp.*) entre otros polinizadores; aunque no se tenga evidencias científicas de ello (Hernández, 2009b).

El resto se poliniza artificialmente (manual), método descubierto por Charles Morren en 1836 y desarrollado por Edmond Albius en 1841 en la Isla Reunión, el cual se sigue utilizando hasta la fecha y consta de los siguientes pasos: se toma la flor abierta y con la punta del palillo se rompe el labelo, para descubrir los órganos reproductivos de la flor (antera/ masculino y estigma/femenino), con la misma punta se levanta el róstelo para que el polen de la antera se adhiera al estigma (Fig. 2) mediante una ligera presión con el dedo pulgar e índice y se retira el palillo (Hernández, 2009b).

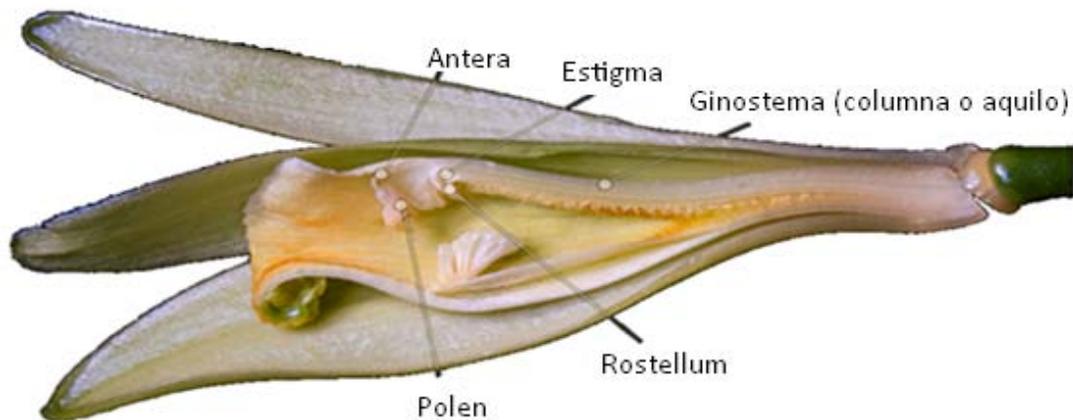


Figura 2. Corte longitudinal de una flor de *Vanilla planifolia* (Tomada y modificada de Whippie, 2009).

Inmediatamente después de la polinización, el grano de polen germina y emite tubos polínicos, los cuales descienden al interior del ginostema (o aquilo) hasta llegar al ovario para fertilizar los óvulos. Al mismo tiempo que ocurre este proceso, el ovario rápidamente comienza a crecer, se torna de color verde oscuro y brillante, tomo una

orientación hacia abajo para su transformación en fruto (Fig. 3). Sus vainas aromáticas, casi cilíndricas de 15-25 cm de largo y 8-14 mm de diámetro (Fig.3), rara vez dehiscente. El fruto alcanza su máximo crecimiento en longitud y diámetro alrededor de cuarenta y cinco días después de la polinización, posteriormente entra en una etapa de maduración (7.5 meses) (Hernández, 2009b).

Cada vaina contiene miles de minúsculas semillas redondas; miden de 0.24 a 0.33 mm y en un fruto se estima puede haber hasta 100 000. Carecen de endosperma y son fértiles solo si son producto de polinización natural (Cordero, 1987). Para que las semillas germinen, crezcan hasta producir una masa de células llamada protocormo y éste sobreviva, se desarrolle y se transforme en retoño, primero debe establecer una relación simbiótica con un hongo (Arditti y Ghani, 2000), ya que estos protocormos pueden o no comenzar a fotosintetizar de inmediato.



Figura 3. Diferentes estadios de madurez de la vaina de *Vanilla planifolia*.

La vaina es la que se utiliza para elaborar el saborizante. De manera comercial, hay varios métodos para tratar las vainas y convertirlas en las vainas oscuras como se les conoce en el mercado. Las vainas se sumergen en agua caliente por dos o tres minutos, después se hacen sudar y se secan, o se colocan en bandejas al sol para que se calienten

por dos o tres horas, y después se ponen a sudar envueltas en mantas hasta la mañana siguiente.

Este proceso continúa hasta que las vainas se vuelven flexibles y de un color café oscuro (puede tomar varios meses). Las vainas son puestas a secar en cuartos secos y bien ventilados por 2-4 semanas. Entre los compuestos que se encuentran en el extracto de vainilla natural y que es el responsable predominante de su característico olor y sabor es la vainillina.

En el “Código Badiano” por Martín de la Cruz, se refiere a la *Vanilla planifolia* como una planta medicinal útil en el tratamiento de la histeria, las fiebres, la impotencia, el reumatismo, y para aumentar la energía del sistema muscular (Royer, 2003).

2.1.1. Requerimientos agroecológicos para el cultivo

La orquídea expresa su potencial productivo, con base a la clasificación climática de Kööpen, clima cálido húmedo y semicálido entre un intervalo de temperatura de 20 a 32° C (Cuadro 3). En caso de temperaturas bajas los brotes tiernos pueden secarse y la planta puede colapsar. En caso de temperaturas altas los granos de polen tienden a deshidratarse generando abortos de flores y caída de frutos pequeños (Flores, 2007).

La vainilla se desarrolla en altitudes de 0 hasta 700 msnm aunque se han encontrado plantas creciendo hasta los 1100 m, sin embargo su potencial se expresa por debajo de los 400 msnm. La precipitación media anual debe ser entre 2000 y 3000 mm, bien distribuida durante el año, excepto, en el periodo de polinización ya que reduce el porcentaje de las flores polinizadas. En general, requiere una humedad relativa del 80%, pero cuando se encuentra en fase de crecimiento, desarrollo o rendimiento puede ser mayor (Flores, 2007). La planta requiere de dos a tres meses secos para estimular la floración.

El suministro de agua determina el grado de vigor, sanidad y productividad de la planta (Sánchez *et al.*, 2001), su exceso propicia el ataque de hongos (*Fusarium* sp.) (Hernández, 2009a).

Los suelos más apropiados para cultivar vainilla son los de origen calizo y con una ligera pendiente, de preferencia, debe contener el 45% de materia mineral, 5% de materia orgánica, 25% de agua y 25% de aire (Flores, 2007). En el caso de las plantaciones, generalmente los suelos son de profundidad variable, de textura franca o arcillosa, cubiertos continuamente por una capa de materia orgánica de espesor variable, con pH de 6.0 a 6.3, y generalmente libres de maleza (Sánchez *et al.*, 2001). Los suelos ácidos favorecen la incidencia de enfermedades fungosas (Hernández, 2009a).

Cuadro 3. Requerimientos ambientales para el cultivo de vainilla.

Clima tropical cálido húmedo, con temperatura promedio de 24°C
Humedad relativa alta (80%)
Precipitación entre 1200 a 3000 mm/año
Suelos con buen drenaje
Radiación solar de 50%
Como fuente de nutrición necesita abundante materia orgánica.

Dado que la vainilla es una planta de lianas perennes de larga vida (Puthur, 2005), hemiepífitas, con metabolismo ácido de crasuláceas (Soto, 2006) (CAM Fig. 4), es decir, incorpora CO₂ de noche, con los estomas abiertos y con el mínimo peligro de desecarse por evapotranspiración; ya que la humedad relativa es más alta y las temperaturas son más bajas. Durante el día, por el contrario, cuando la transpiración es mayor, cierra los estomas, impidiendo la pérdida de agua (Silvera *et al.*, 2009).

Lo anterior indica que la vainilla prefiere lugares con sombra, para un crecimiento óptimo requiere 50% de luz o sombra en la mayor parte del año. En época de secas (soles intensos) es preferible una sombra de 50 a 70% y en la época de lluvias debe ser de 30 a 50% (Hernández, 2009a). Una alta intensidad de luz puede causar inactivación de los centros de reacción acompañado por una inhibición del transporte de electrones a través de los fotosistemas (Puthur, 2005), lo cual repercute en la formación de vainillina.

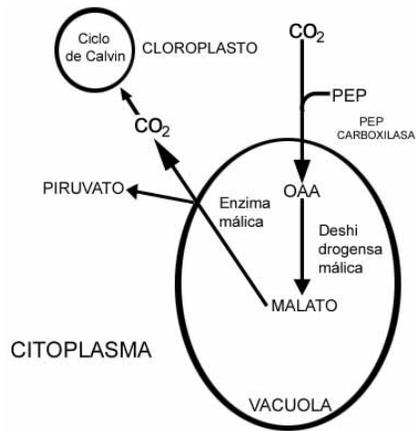


Figura 4. Reacciones del Metabolismo Acido de Crasulácea (Hernández, 2002).

En 1987, Rural Advancement Fund International (RAFI) dio a conocer en su comunicado que la empresa privada David Michael & Co. (Filadelfia, Pensilvania, E.E. U.U.) apoyó un proyecto de investigación de tres años sobre cultivos de tejidos y vainilla, a la Universidad de Delaware en su centro de Biotecnología dirigido por el Dr. Dietrich W. Konor donde se guiaron por dos caminos: 1) la utilización del cultivo de tejidos para desarrollar nuevas variedades de la planta vainilla –más rústicas y resistentes a enfermedades- que pudieran ser cultivadas fuera de las áreas tradicionales de producción, y 2) la experimentación con la producción de vainilla natural mediante el cultivo de células vegetales.

Sin embargo, por semilla es difícil propagarse debido a que requiere obligatoriamente estar inoculada con un hongo formador de micorriza para su germinación, lo cual significa que solo un pequeño porcentaje de las semillas llega a formar plantas (McKendrick, 2000).

La polinización equivale a la mitad del total del costo de producción, la enredadera se fuerza a ramificar y a florecer más pronto (después de tres años). Una buena planta producirá cosechas por 7-8 años (Choy, 2000).

Generalmente, se compran esquejes altos ya que la planta usualmente no florece hasta que tiene 3 metros de largo y puede alcanzar los 20 metros de largo (Choy, 2000).

Por ello, la mejor solución con un alto potencial hasta ahora, es la propagación clonal por medio del cultivo *in vitro* de tejidos (meristemos) el cual no requiere de la infección de la semilla por el hongo (McKendrick, 2000).

Lo anterior, está siendo aprovechado por el INIFAP en Huimanguillo desde el 2005, en donde están utilizando los primeros 5cm de los ápices para obtener de dos a tres primordios foliares y los siembran en tubos con medio de cultivo con sales inorgánicas de Murashige y Skoog (MS) adicionado con sacarosa (30 g), mio-inositol (1mg), 6-Bencilaminopurina (BAP, 1mg), L-Cisteína (2mg), caseína hidrolizada (1g) y gelrite (2.3g) por cada litro de medio de cultivo. Para enraizar las plántulas se cambian al mismo tipo de medio pero sin el BAP. A los dos meses, las plántulas se pueden llevar a invernadero de aclimatación donde se siembran en charolas llenas con peat moss. Dos meses después se pasan a sombreadero en bolsas llenas con sustrato esterilizado y a los cuatro meses las plantas están listas para ser llevadas a campo (Flores, 2005).

2.1.2. Nutrientes y fertilizantes

Dado el carácter epífita de esta orquídea, el abonado es muy limitado (Finck, 1988). Algunos coleccionistas de orquídeas recomiendan alimentar a la vainilla con media cucharadita de fertilizante cada 2 semanas, preferiblemente de la variante 20-10-20 sin urea. Es más seguro diluir el fertilizante y servirlo durante el curso de varios días en lugar de dar a su orquídea una sola porción cada dos semanas (OrchidflowerHQ, 2007).

En general, los productores aplican abonos orgánicos, los cuales sirven para nutrir, mantener la humedad del suelo, proteger la raíz, mejorar las características físicas y químicas del suelo y aumentar los microorganismos benéficos del suelo (Hernández, 2009a) con base a 30% de estiércol (borrego, bovino, etc.); 70% de aserrín de pino u otro material vegetal (desechos de cítricos) (Flores, 2007). O bien, cuando no hay material vegetal dentro de la plantación, aplican rastrojo de Kudzú (*Pueraria phaseoloids*), zacate elefante (*Pennisetum* sp.), zacate guinea (*Panicum maximum*), o fibra de coco (Hernández, 2009a).

Renadive (2005) encontró mayor cantidad de Ca, K, N, P, Fe y Cu por lo que se les consideran los más importantes para el cultivo de la vainilla; no obstante, no se han determinado aún los niveles óptimos o normales de nutrición requerida por la planta.

En la India, recomiendan a los productores aplicar 40 a 60 g de nitrógeno (N), 20 a 30 de fósforo (P_2O_5) y 60 a 100 g de potasio (K_2O) por planta, una vez al año. Al igual que la aplicación de fertilizantes foliares en solución como el triple 17 al 1% (Hernández, 2009a).

2.1.3. Problemática

El cultivo está enfrentando fuertes dificultades por problemas fitosanitarios (Cuenca Rural, 2007), acarreado con ello la aplicación de grandes cantidades de agroquímicos aplicados en los cultivos comerciales intensivos (Miranda, 2003), causando que la vaina se considere de mala calidad. Aunándose, los escasos estudios que tomen en cuenta el control de plagas y enfermedades y aun más, aquellos que den solución a las enormes cantidades de insecticidas y plaguicidas que se esparcen sobre los vainillales.

Por lo anterior, urge conservar y proteger la vainilla debido a que es un recurso sumamente explotado pero poco conocido y para ello, se debe garantizar una eficiente producción sostenible, basada en la buena nutrición del cultivo y usando eficientemente los insumos químicos. Ofreciendo esquejes y plántulas de calidad físico-genética para el establecimiento del cultivo en otros estados con zonas potenciales para el desarrollo de dicho cultivo.

Debido a que el 30% de los costos de producción está representado por la polinización, se requiere necesariamente fecundar 60 mil flores para obtener una tonelada de vainilla verde. La cual se ve limitada al periodo de floración (dos meses). Fisiológicamente, las semillas de esta familia están constituidas por un embrión envuelto por una testa, un escaso o nulo endospermo, que obliga a las orquídeas, de manera natural, asociarse con un hongo micorrízico para lograr la germinación (McKendrick, 2000). Dicha asociación se conoce como micorriza, la cual se describe a continuación.

2.2. La simbiosis micorrízica

La micorriza se caracteriza típicamente como una simbiosis mutualista entre una o varias especies de hongos y las raíces, la cual fue descrita por el botánico alemán A. B. Frank en 1885 (Reid, 1990). Dicha asociación mantiene un balance de beneficios y costos, ya que a pesar de los costos que representa estar juntos, los beneficios son mayores y recíprocos, lo cual se ve reflejado en incremento en las tasas de crecimiento, reproducción y supervivencia de las plantas hospedantes (Allen, 1991).

Se estima que un 95% de las plantas superiores presentan esta simbiosis de forma habitual (Popoff, 2008). Su importancia radica en la potencialización de la fertilidad del suelo, incrementando la eficiencia de la absorción de nutrientes y suministro del nitrógeno al sistema; lo cual forma parte del enfoque de los sistemas integrales de la nutrición vegetal (Montilla y Suniga, 2008).

2.2.1. Tipos de micorrizas

Hasta ahora, son siete tipos de micorrizas que se han entrado de acuerdo a la morfología y anatomía basadas en la taxonomía del hospedante o de los hongos (Smith y Read, 1997). Estos son: ectomicorriza, micorrizas arbusculares, micorrizas ericoides, micorrizas arbutoide, micorrizas monotropoide, ectendomicorriza y micorrizas orquidioide (Giri *et al.*, 2005).

- 1) *Ectomicorriza* (Fig. 5a). Está presente en 25 familias de plantas vasculares, entre ellas las familias: Betulaceae (70%), Dipterocarpaceae (98%), Fagaceae (94%), Myrtaceae (90%), Pinaceae (95%), algunas Leguminosae (16%) (Newman y Reddell, 1987), algunos géneros de arbustos, *Cistus*, *Helianthemum*, *Juniperus*, entre otros, y en un pequeño número de herbáceas (Smith y Read, 1997). Se estiman entre 5000 y 6000 hongos simbiontes pertenecientes a las divisiones Ascomycotina y Basidiomycotina. No hay penetración de las hifas a las células. Las hifas fúngicas son generalmente septadas. La red de Hartig está presente entre las células, es un plexo de hifas fúngicas entre las células epidérmicas y corticales. Proporciona una gran superficie para el intercambio de nutrientes

entre los hospedantes y los hongos, es la zona de interface sustrato-hongo-planta (Giri *et al.*, 2005).

- 2) *Micorrizas arbusculares*. El término se refiere a la presencia de estructuras intracelulares - vesículas y hongos - (Fig. 5b) que se forman en la raíz durante las diversas fases de desarrollo. Son las más abundantes y generalmente el fitosimbionte es menos específico. Están presentes en la mayoría de las raíces de las angiospermas, gimnospermas y pteridofitas, así como en los gametofitos de briofitas. Los hongos simbiotes pertenecen al Phylum Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001), producen esporas asexuales y micelio constituido por hifas cenocíticas distribuido en el suelo o dentro de las raíces. Además de actuar como propágulos de dispersión del germoplasma, las esporas iniciadoras de nuevos individuos cuando se separan del micelio que las originó. El plasmalema de la célula hospedante se invagina y encierra a los hongos, quedando así conformada la asociación simbiótica entre la célula vegetal hospedante y el hongo micorrízico (Giri *et al.*, 2005).
- 3) *Micorrizas ericoides*. (Fig. 5 c) En sentido general son endomicorrizas, ya que el hongo simbiote penetra la pared de las células corticales e invagina el plasmalema. La extensión lateral de célula a célula no se produce. Las células infectadas se localizan sobre todo en las células epidérmicas, siendo la vida funcional de la asociación de corta duración. La célula hospedante muere cuando se desintegra la asociación (Giri *et al.*, 2005). Los hongos simbiotes pertenecen a las clases Ascomycotina y Basidiomycotina (Smith y Read, 1997).
- 4) *Micorriza Arbutoide*. Se establece entre plantas del orden Ericales, concretamente a tres géneros: *Arbutus*, *Arctostaphylos* y *Pyrola* (Smith y Read, 1997), aparentemente específicos. Los hongos asociados pertenecen a los basidiomycetes. De acuerdo con Giri *et al.* (2005) tienen características tanto de ecto como de endomicorrizas. Poseen un manto, red de Hartig e hifas intracelulares con presencia de poros, que forman estructuras parecidas a un rulo conocidas como “arbutos” (Fig. 5 e).

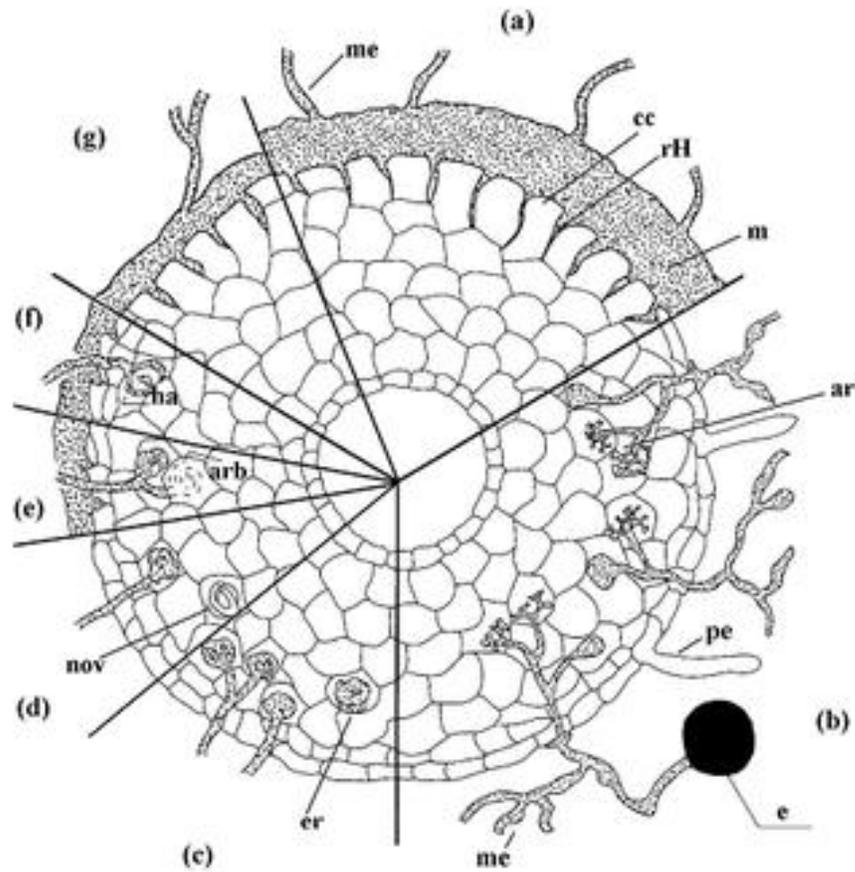


Figura 5. Tipos de micorrizas más frecuentes: ectomicorriza (ECM) (a), micorriza arbuscular (AM) (b), micorriza ericóide (c), micorriza orquídecea (d), micorriza arbutoide (e), micorriza monotropoide (f) y micorriza ectendomicorriza (g); arbuscúlo (ar), “arbuto” (arb), célula cortical (cc), espora (e), enrollamientos (er) o pelotones, “haustorios” (ha), manto (m), micelio extrarradicual (me), pelotón (nov) y red de Hartig (rH) (Azul 2002, modificado a partir de Deacon 1997)

- 5) *Micorrizas monotropoide*. Este término se aplica específicamente a las micorrizas que se establecen entre los miembros de la familia Monotropaceae (plantas sin clorofila) y los hongos Basidiomycotina (Smith y Read, 1997). Estas micorrizas son muy similares a las ectomicorrizas, forman un manto espeso y red de Hartig. El hongo penetra a las células corticales (Fig. 5 f) que al ramificarse invaginan la pared celular, dicha estructura se conoce como “haustorios” (Giri *et al.*, 2005).

- 6) *Ectendomicorriza*. Se forma sólo con los géneros de la familia Pinaceae. Usualmente las endomicorrizas se parecen a las ectomicorrizas, pero carecen de las gruesas y abundantes hifas de las ectomicorrizas que, a menudo tienen un manto colorido. El hongo penetra el interior de las células corticales formando como una red de Hartig entre éstas (Fig. 5g). Estos hongos tienen más probabilidades de ser la etapa imperfecta de un Ascomiceto y la mayoría de las veces crece de estructuras de fructificación, aunque algunos forman cuerpos de fructificación en forma de pequeñas copas en la superficie del sustrato. Parecen limitarse a los viveros forestales y están formadas por un grupo de hongos llamados E (Giri *et al.*, 2005).
- 7) *Micorrizas Orquidioides*. Se establecen entre los miembros de la familia Orchidaceae y generalmente hongos de la clase Basidiomycotina. Son endófitos y se caracterizan por la presencia de nudos intracelulares, que corresponden a hifas densamente enrolladas dentro de las células corticales (Fig. 5 d). Desde que la planta es invadida, el hongo se propaga internamente de célula a célula. Las hifas internas eventualmente colapsan o son digeridas por la célula (Giri *et al.*, 2005). Desde la simbiosis se forma una red externa de hifas, es probable que la función de las hifas fúngicas que se encuentran en el sistema de raíces gruesas de las orquídeas sea la absorción de nutrientes como con los otros tipos de micorrizas (Smith y Read, 1997)

2.2.2. Importancia de las micorrizas

En general, las asociaciones micorrízicas son cosmopolitas por su presencia en la mayoría de los hábitats naturales terrestres y generalistas por el amplio número de familias de plantas susceptibles de ser micorrizadas, por ello la micorrización es considerada como la norma en los ambientes naturales (Hernández *et al.*, 2003).

Esta asociación permite a la planta incrementar la absorción de iones fosfato y amonio disponible en el suelo y se estima que las hifas externas proporcionan hasta un 80% del fósforo y 25% del nitrógeno requeridos por la planta. Además que una gran cantidad de hongos micorrízicos asociados con especies vegetales reciben del 4 al 20%

del carbono almacenado por la planta. Sin embargo, estos hongos aunque llegan a ser parásitos, son usualmente benéficos, ya que estos hongos han permitido desde hace miles de años proveer ventajas a las plantas para resolver dos problemas: la desecación y los sustratos escasos de nutrimentos (Hernández *et al.*, 2003).

2.3. Micorrizas orquidioides o de ovillo

Las orquídeas probablemente se originaron con anterioridad a las ericáceas, durante el Eoceno, hace unos 54 Ma (Arditti, 1977); todas ellas son micoheterotróficas en alguna fase de su ciclo biológico debido a que las orquídeas crecen en suelos carentes de nutrimentos y que la mayoría de sus raíces son muy gruesas y escasamente ramificadas.

Los estudios sobre la relación endófito entre hongos micorrízicos asociados a orquídeas terrestres es de particular importancia, sobre todo cuando la orquídea se encuentra en el estado micoheterotrófico. Por ello, los micobiontes efectivos son llevados a un banco de germoplasma con la finalidad de generar conocimiento de la diversidad fúngica involucrada en el desarrollo de las orquídeas, lo cual puede explicar en gran parte su distribución y ecología, así como la función de éstos en el suelo (Ortega-Larrocea, 2008).

Las orquídeas, en general, establecen simbiosis con el hongo al inicio de la germinación, el simbionte suministra azúcares al protocormo a través de la translocación de los hidratos de carbono adquiridos vía saprofitica, parásita o a partir de otras micorrizas (Shan *et al.*, 2002). El protocormo, a su vez, provee al hongo con ciertas vitaminas y un hábitat donde vivir. Con el tiempo, el joven retoño comenzará a producir sus propios nutrientes y la simbiosis no será más necesaria (Arditti y Ghani, 2000).

Sin embargo, la planta adulta puede mantener el comportamiento micoheterotrófico en caso de no producir clorofila y recibir del hongo sólo los nutrientes (Smith y Read, 1997). La asociación fúngica con orquídeas y otras plantas aclorofílicas hay que entenderlas como simbiosis en sentido amplio y no como un mutualismo propiamente dicho, pues la nutrición carbonada de la planta (además de la mineral) se produce desde el hongo hacia la planta (Brundrett, 2004, 2008). Los mecanismos de atracción de ésta

hacia el hongo siguen siendo una interrogante (Smith y Read, 2008), lo que evidencia la necesidad de profundizar en el conocimiento de esta singular simbiosis.

Estudios recientes han proporcionado evidencia en el aumento de la captación de minerales como el P y N, y dado que las raíces son limitadas en extensión, se supone que el hongo aporta la mayor parte para las necesidades de las plantas. Algunos otros, han demostrado la solubilización de las fuentes orgánicas de P y N por parte de los hongos (Cameron *et al.*, 2006).

Un compuesto importante producido por el hongo a la planta es la auxina (ácido indol acético o AIA), el cual puede participar en el proceso de infección. Ek *et al.* (1983) verificaron la producción de dicho compuesto en el medio de cultivo y micelio mediante la cromatografía de gases.

Sin embargo, cualquier beneficio que el hongo obtenga de la asociación con la orquídea no está clara, sólo se sabe que la orquídea da abrigo al hongo contra agentes externos y que posteriormente le proporciona productos de su metabolismo fotosintético (fotosintatos) (Barker *et al.*, 1998); todo ello depende de la especificidad entre hongo-orquídea (McCormick *et al.*, 2004). Una vez más, la investigación para dilucidar los beneficios de los hongos con potencial a formar micorrizas con las orquídeas es necesaria.

Los hongos simbiotes pertenecen al grupo de los *Ascomycota* y *Basidiomycota*, como *Ceratobasidium* (*Rhizoctonia*), *Sebacina*, *Tulasnella*, *Russula*, *Corticium*, *Armillaria*, *Epulorhiza* y *Armillaria*. El simbiote más común pertenece al género *Rhizoctonia*, sin embargo no se conoce si son más estrechamente relacionados con los grupos saprofitos o parásitos de dicho género (Saunders y Owens, 1998; Brundett, 2002; Porras-Alfaro y Bayman, 2007; Agustini *et al.*, 2009; Honrubia, 2009).

Algunos estudios han demostrado una especificidad de estos hongos, que varían entre la especie hospedante y el hábitat. Sin embargo, los resultados de las investigaciones moleculares, unido al hecho de que los endófitos sólo se han investigado en una pequeña proporción de especies de orquídeas, y en un número limitado de hábitats, sugieren que muchos más taxones de hongos pueden formar asociaciones con

las orquídeas (Taylor y Bruns 1997, 1999, McKendrick *et al.*, 2000, Kristiansen *et al.*, 2001).

Las especies fúngicas capaces de formar micorriza Orquidioide se caracterizan por tener hifas septadas con colonización intracelular, las cuales no desarrollan ni manto, ni red de Hartig. El hongo penetra en la pared celular e invagina el plasmalema y forma ovillos intracelulares en la raíz o dentro del tejido cortical de rizoma de las orquídeas, llamadas pelotones. Una vez que la planta es invadida, la propagación del hongo se puede producir a partir de las hifas internas. Finalmente, las hifas dentro de la célula colapsan o son digeridas por la célula hospedante (Fig. 6) (Giri *et al.*, 2005).

Los hongos de la clase de los Basidiomycetes tienen esterigmas y espículas, un mecanismo de abstricción le sirve para eyectar las basidiosporas, cuando éstas poseen simetría bilateral forman un ángulo con el estroma. Se clasifican en dos tipos basada en el tipo de basidio y germinación de las basidiosporas: 1) Heterobasidiomycetes, los basidios están septados y muy divididos (fragmobasidios). Las esporas son resistentes por poseer una pared muy gruesa que al germinar originan hifas que producen otros tipos de esporas indirectas o conidios que pueden ser más de un tipo. Los órdenes son Tremelales, Uredinales y Ustilaginales, y 2) Homobasidiomycetes, presentan holobasidios y las basidiosporas germinan originando hifas que no producen otras esporas indirectas (Bougoure y Dearnaley, 2005). Producen basidiocarpos, son descomponedores, patógenos y/o parásitos y algunos de ellos simbioses (Cuadro 4).

En general, los basidiomicetos son organismos con altas capacidades degradadoras de sustratos complejos, intervienen en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes del suelo, contribuyen a la pedogénesis, en la formación y estabilidad de agregados y en la ecología vegetal formando asociaciones tripartitas (Smith y Read, 1997).

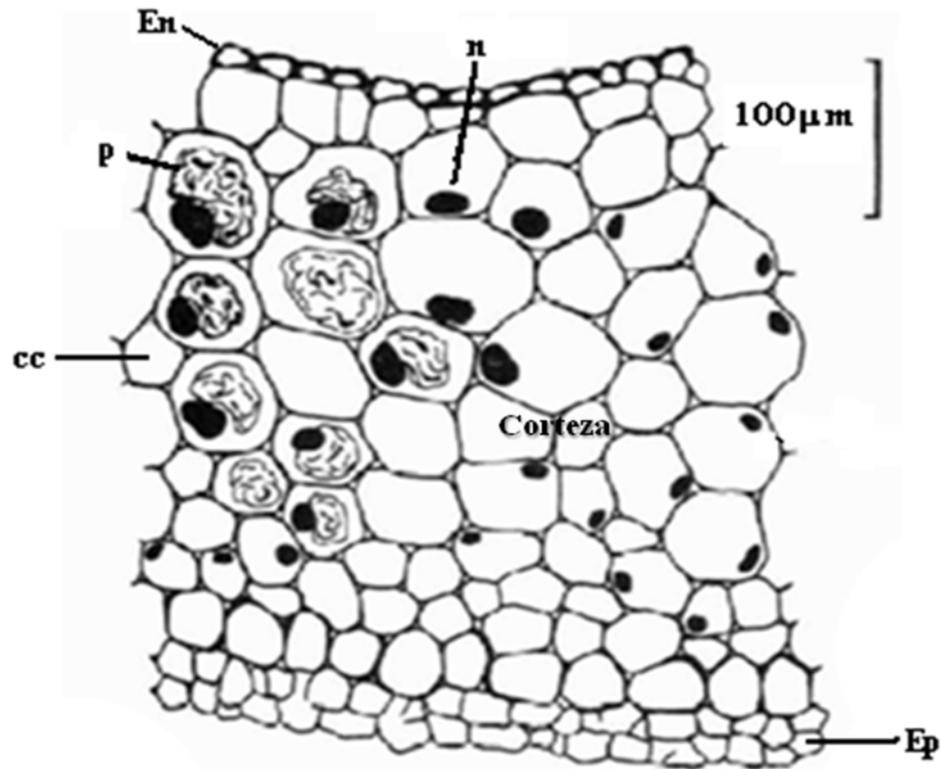


Figura 6. Distribución de los núcleos hipertrofiados en las células corticales (cc) de *Spethoglottis plicata*. Núcleos asociados con el endófito (p) y núcleos adyacentes a los infectados (n). Epidermis (Ep) y endodermis (en). (Modificado de Hadley y Williamson, 1972).

Los pelotones (hifas en forma de ovillos) son normalmente observados de dos modos distintos, de acuerdo con el estado de desarrollo de la asociación hongo-orquídea: 1) pelotones intactos y 2) pelotones digeridos (Uetake *et al.*, 1997). De acuerdo con Rasmussen (2002) ambos grupos se clasifican en dos tipos histológicos reconocidos para micorrizas orquídioides: a) Tipofágico, donde los pelotones intactos están bien estructurados en las células infectadas, lo que ocurre antes de iniciar la actividad de lisis. Su mecanismo de acción es cíclico; ocurre la infección de la célula hospedera por hifas fúngicas, a la formación de pelotones, ocurre una lisis total de esas hifas que se condensan dando origen a pelotones digeridos. Posteriormente, ocurre la re-infección originando el surgimiento de nuevos pelotones. Este tipo de pelotones se encuentra en la mayoría de las especies. Y b) Ptiófágicos, se caracterizan por tener un proceso continuo de conducción de compuestos mediante la lisis de las extremidades de las hifas fúngicas,

lo que posibilita el acceso de la planta a nuevos materiales. Este tipo de pelotones se encuentra en algunas orquídeas tropicales cuyo grado de micotrofismo es muy alto. Sin embargo, debido a su incidencia en regiones tropicales y la falta de estudios relacionados al asunto, es poco conocido (Rasmussen, 1995).

Cuadro 4. Lista de los principales géneros de hongos capaces de formar micorriza con orquídeas.

Heterobasidiomycetes			Homobasidiomycetes	
Orden	Género		Orden	Género
	Anamorfo	Teleomorfo		
Ceratobasidiales	<i>Ceratorhiza</i>	<i>Ceratobasidium</i>	Gloeocystidiales	<i>Russula</i>
	<i>Moniliopsis</i>	<i>Oliveonia</i> <i>Thanatephorus</i>	Hymenochaetales	<i>Erythromyces</i>
Tulasnellales	<i>Epulorhiza</i>	<i>Tulasnella</i>	Thelephorales	<i>Telephora</i> <i>Tomentella</i>
Auriculariales		<i>Sebacina</i>	Agaricales	<i>Armillaria</i> <i>Mycena</i>

Géneros anamórficos y teleomórficos se incluyen en *Heterobasidiomycetes*. Adaptado de Rasmussen (2002) y sistemática reciente de Basidiomycetes de acuerdo a Jens H. Petersen, <http://www.mycology.com/systematics.html>.

Para el caso de la vainilla, ésta se asocia con una amplia gama de hongos micorrízicos siendo los géneros más abundantes el *Thanatephorus*, *Tulasnella* (común en raíces adventicias) y *Ceratobasidium* (común en raíces en el suelo) el cual ha mostrado un efecto positivo sobre el crecimiento de planta y la germinación de semilla, por lo que tiene potencial para ser empleado en la germinación y la propagación de orquídeas (Porrás-Alfaro y Bayman, 2007)

2.3.1. Efectos fisiológicos de los hongos orquideomicorrízicos (HOM) y sus posibles aplicaciones

Las orquídeas producen miles de diminutas semillas con muy escasas reservas (endospermo) por lo que requieren obligatoriamente del hongo simbionte (Swarts y

Dixon, 2009; Peterson *et al.*, 1998) el cual proporciona los carbohidratos necesarios (Mckendrick *et al.*, 2000) para su germinación *in vivo* e *in vitro*. El hongo mejora notablemente la germinación e incrementa la supervivencia de las plántulas micropropagadas (Chang, 2007). Además el hongo aporta protección de la herbivoría por la producción de alcaloides tóxicos por la asociación simbiótica (Schulz y Boyle, 2005).

La interacción orquídea-hongo exhibe un alto grado de especialización micotrófica (Brundett, 2004) para garantizar su funcionalidad o efectos benéficos por lo que se realizan pruebas de compatibilidad. Entre los beneficios que se generan en la simbiosis se encuentran: una estimulación en la absorción y translocación de nutrientes tales como N, P, K y Ca (Cameron *et al.*, 2006; Lee, 2002; Shan *et al.*, 2002); mejoramiento del crecimiento, tanto vegetativo y reproductivo de las orquídeas; inducción de floración temprana y el aumento de la calidad de la flor (Chang, 2007).

Otros compuestos importantes aportados por el hongo a la orquídea son hormonas: auxinas (estimulación de la enlogación) siendo su forma predominante el ácido indolacético (AIA); giberelinas (Gas) que se encargan de la estimulación para la germinación y enlongación, así como la inducción para la floración; y citoquininas (CK) su principal función es la estimulación de la división celular en tejidos no meristemáticos (Ek *et al.*, 1983; Chang, 2007).

Además al incrementar el contenido de clorofila, la relación hongo-orquídea podría estar relacionada la fotosíntesis. Existe incremento en las actividades enzimáticas (fosfatasas ácidas y básicas, superóxido dismutasa), y promueve la capacidad antioxidante mediante el aumento de las cantidades de ácido ascórbico, flavonoides, polifenoles y polisacáridos en algunas especies (*p. e.* en la orquídea *Anoctochilus formosana* Hayata) (Chang, 2007).

Otros de los beneficios mencionados por Chang (2007) es la reducción de enfermedades inducidas por hongos fitopatógenos y con ello reducir la aplicación de agroquímicos. Además de que la combinación de los hongos simbióticos con el uso de sustancias para el crecimiento de las plantas, favorece el incremento en la producción de

flores, así como el aumento en la cantidad y calidad de las mismas; es decir promueven el crecimiento y la capacidad de floración de las plantas durante su periodo en anaquel.

En general, la simbiosis orquidioide es útil para realizar la restauración de sitios naturales de las orquídeas (Chang, 2007; Ortega-Larrocea, 2008).

III. JUSTIFICACIÓN

La vainilla es un cultivo agroforestal de tradición prehispánica en la región del Totonacapan, de interés agro-económico que brinda múltiples beneficios tales como: 1) rentable para productores forestales (obtención de ingresos por los árboles sombra, ya sean frutales o maderables), permaneciendo durante varios años; 2) evita la erosión y permite la recarga de mantos acuíferos así como la recirculación de los diversos ciclos biogeoquímicos, debido a los árboles de soporte y sombra necesarios para este sistema y 3) preservación del paisaje y parte la diversidad biológica.

Además, es la única orquídea de importancia socioeconómica ya que genera diversos empleos durante su cultivo y es la segunda especie de exportación más cara en el mundo utilizada en la industria farmacéutica, alimenticia, artesanal y cosmetológica.

Sin embargo, el cultivo enfrenta una diversa problemática que va desde lo ecológico (pérdida del hábitat), productivo (escasa producción nacional) y comercial (excesivo intermediarismo). Lo cual ha conllevado a que el cultivo se esté perdiendo en la región, así como sus variedades silvestres nativas las cuales se encuentran en la categoría de protección especial de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001.

Las orquídeas requieren cubrir dos necesidades para llevar a cabo su ciclo de vida, representadas por una fase subterránea caracterizada por su asociación con hongos micorrízicos y una fase aérea relacionada con la eficiencia de la polinización/fertilización. Ya sea que se combinen o no, ambas fases han hecho que su diversidad sea muy grande al igual que su especialización. En el presente trabajo, se hace énfasis sobre la fase relacionada con la asociación de la orquídea con los hongos filamentosos endófitos de la raíz, con la finalidad de conocer su potencial de formación de simbiosis micorrízica del tipo orquidioide en vainilla.

En general, es escasa la información sobre dicha interacción (orquídea-hongo) así como la descripción de su desarrollo y evolución de dicha simbiosis, la cual puede contribuir en la disminución del manejo y aplicación de los agroquímicos utilizados para el control de plagas y enfermedades que demeritan la calidad de la producción de vainilla. Para ello se desarrollaron los siguientes objetivos en este trabajo.

IV. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

4.1. General

Aislar y caracterizar los hongos endorrizoféricos de *Vanilla planifolia* que tengan potencial de formar simbiosis orquidoide.

4.2. Específicos

- Aislar y obtener cultivos puros de los hongos endorrizoféricos más abundantes provenientes de plantas de vainilla cultivadas en acahual, en el municipio de Papantla, Veracruz.
- Corroborar mediante los postulados de Koch, que las especies aisladas e identificadas de hongos tienen el potencial para formar micorriza con la vainilla.
- Identificar taxonómicamente los hongos aislados de la endorrizósfera de *Vanilla planifolia* a través de herramientas morfológicas y análisis de ADN.

4.3. Hipótesis

Al menos una de las especies fúngicas aisladas y purificadas de la endorrizósfera, tendrá el potencial para formar simbiosis con plantas de *Vanilla planifolia* provenientes de cultivo *in vitro*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Área de recolecta de muestras rizosféricas

Para llevar a cabo esta fase se realizaron ocho muestreos en vainillales de acahual en Papantla (Fig. 7) que se encuentra en la región de Totonacapan. Es un municipio perteneciente al norte del Estado de Veracruz y se encuentra a una altura de 180 msnm, en las estribaciones de la Sierra Madre Oriental. Esta región limita al norte con Cazones de Herrera; al este con Tecolutla y Gutiérrez Zamora; al sureste con Martínez de la Torre; al sur con el Estado de Puebla; al oeste con Espinal, Coatzintla y Poza Rica; y al noroeste con Tihuatlán. Su clima es cálido regular, con una temperatura promedio anual de 20.8° C (Herrera *et al.*, 2005). Desde tiempos prehispánicos es considerado el centro de origen de la vainilla y dentro de la región, se encuentra la mayor superficie sembrada a nivel nacional.

Los ecosistemas que coexisten en el municipio donde se realizó esta fase, son el bosque tipo subtropical perennifolio.



Figura 7. Papantla (Región del Totonacapan) Veracruz, México

De acuerdo a los recorridos realizados se corroboró el abandono de las tierras mencionado por algunos productores y asociados del gremio vainillero, pocos son los productores que aún mantienen su cultivo en acahual; por lo que la mayoría de los sitios muestreados mostraron, en general, grandes disturbios debido a la tradición de manejo del suelo para cultivar (roza-tumba-quema) sobre todo por el cambio de cultivo de vainillales a maizales. Aunándose los problemas de asistencia técnica y correcta transferencia de tecnología, expresiones vertidas por los productores visitados.

Se colectaron un total de 20 muestras rizosféricas de vainilla, en tres regiones del municipio de Papantla correspondientes a las colonias Cerro del Carbón, Coyuxquihui y Primero de mayo.

El muestreo se llevó a cabo delimitando una parcela al azar, donde se ubicaron los puntos de muestreos en forma de “X” (método de cuadrantes) en donde el centro representa la unidad de muestreo (Martins, 1993). En cada punto de muestreo, se cortó la raíz a una planta colocándola en una bolsa de plástico, cerrada herméticamente para su transportación en hielera. Posteriormente se identificaron los pelotones dentro de las células corticales de la raíz y así obtener los explantes en el laboratorio para aislar los hongos endorrizosféricos y así determinar su potencial para formar simbiosis micorrízica para *Vanilla planifolia*, basándose en los postulados de Koch.

5.2. Aislamiento de hongos endorrizosféricos de la vainilla

El aislamiento de hongos endorrizosféricos se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Ortega-Larrocea (2008) y Agustini *et al.* (2009) la cual consiste de los siguientes pasos: 1) Lavado de raíces a chorro de agua, para posteriormente realizar los cortes e identificar bajo microscopio óptico la colonización de estos hongos; para así realizar nuevos cortes garantizando que se utilicen explantes con pelotones en la siembra en el medio de cultivo. 2) Desinfección de raíces, los explantes colectados y colocados en agua fueron expuestos en una solución de hipoclorito de sodio al 10%, se lavaron tres veces con agua destilada y una con una solución de estreptomina- gentamicina (2-1% respectivamente), cada lavado fue de 5 minutos y con agitación vigorosa. 3) Siembra del explante, se realizó en condiciones estériles en cajas de Petri con medio de aislamiento

fúngico (MAF, apéndice A) y se incubaron a 24 ± 2 °C, se revisaron las cajas cada 24 h y una vez que se observó un recrecimiento de alguna hifa desde el explante, se procedió a subcultivar el recrecimiento fúngico en medio de cultivo agar papa-dextrosa (PDA). 4) El recrecimiento fúngico se realizó en condiciones estériles mediante la realización de cortes de la hifa más lejana del explante la cual fue colocada en el centro de una de las cajas de Petri con medio PDA. Las cajas fueron incubadas a 24 ± 2 °C y revisadas cada 48 h.

Posteriormente y bajo las mismas condiciones de incubación, se realizó la descripción de las características macroscópicas con base al Apéndice B, observadas durante el crecimiento de las cepas aisladas, hasta llenar la caja y dos meses posteriores al llenado.

5.3. Preparación de especímenes fúngicos para su identificación taxonómica

La preparación de especímenes fúngicos fue realizada mediante la técnica modificada de Ridell (1950), para su caracterización microscópica. Bajo condiciones asépticas, con ayuda del sacabocados estéril, se obtuvieron discos de PDA que fueron colocados en la superficie de un portaobjeto estéril dentro de cajas de petri. Posteriormente, se procedió a inocular con un asa estéril pequeñas fracciones del hongo o esporas en cuatro costados del disco de PDA y se cubrió el microcultivo con un cubreobjeto estéril utilizando unas pinzas previamente flameadas encima del disco de agar, haciendo una ligera presión. Posteriormente se agregaron 2 mL de agua estéril, para mantener la humedad, teniendo cuidado de no tocar el portaobjeto y los microcultivos fueron incubados a $26-28^{\circ}$ C por siete días o hasta observar el desarrollo del micelio.

Culminado el tiempo de incubación, nuevamente en condiciones asépticas, se sacó el microcultivo de la caja petri y se drenó el agua estéril. Para matar al hongo antes de proceder a teñirlo se agregaron 2 mL de formaldehído por 15 minutos. La tinción se realizó agregando una gota de azul de algodón y una vez teñida la muestra y seca a temperatura ambiente, se sellaron los bordes con esmalte para uñas transparente para su posterior observación en el microscopio. Los criterios básicos para iniciar la identificación fueron: tipo de hifas (septadas o cenocíticas), presencia o ausencia de

estructuras especializadas de la reproducción sexual, para así seguir las guías de observación (Raper y Fennell, 1965; Moreno, 1998; Watanabe, 2002), realizar un esquema y descripción correspondiente de tales criterios.

5.4. Prueba de formación de micorriza mediante la aplicación de los postulados de Koch

Con la finalidad de corroborar que las cepas fúngicas aisladas son capaces de formar simbiosis con la vainilla se modificaron los postulados de Koch, planteando que el hongo aislado de las plantas establecidas en cultivo (condiciones naturales) es capaz de formar simbiosis (formación de pelotones dentro de la raíz) con plantas provenientes de cultivos estériles (*in vitro*).

Para ello se prepararon microcosmos en cajas petri con dos divisiones comunicadas por un pequeño espacio de 1.5 cm. Una de las divisiones fue llenada con sustrato estéril (AGROMIX®) y se procedió a colocar las plantas cultivadas *in vitro*, proporcionadas por el Dr. Ángel Villegas Monter, provenientes de un cultivar semiintensivo con cítricos como tutor, de Martínez de la Torre, Veracruz. Cada planta fue inoculada de manera individual, con una pequeña rodaja de micelio de aproximadamente 1 cm de cada una de las cepas fúngicas aisladas. Cada rodaja de agar fue colocada lo más cercano a la raíz con la finalidad de reducir el tiempo de colonización del hongo.

En total, se establecieron 12 tratamientos con tres repeticiones (cada una de las cepas fúngicas obtenidas y un testigo). Las plantas inoculadas se mantuvieron en una cámara de crecimiento a temperaturas de entre 24-26 °C, una humedad relativa del 80% y con un intervalo de fotoperiodo de 12 h. A los 10 y 30 días de su establecimiento las plantas fueron muestreadas para corroborar la colonización del hongo dentro de la raíz.

Para ello se fijaron las raíces en FAA (Formol-Ácido acético-Alcohol) (Senthilkumar *et al.*, 2001), posteriormente fueron seccionadas cada 1-1.5cm (según su longitud) para obtener un corte transversal de cada sección para ser teñidas con fucsina ácida y azul de tripano para corroborar la formación de pelotones.

Finalmente se calculó el porcentaje de colonización mediante la fórmula modificada de Phillips y Hayman (1970): $\frac{(\text{Campos con pelotones})}{\text{Campos totales}} \times 100$

5.5. Identificación genética de hongos

De acuerdo con Zettler *et al.* (2003), las técnicas moleculares son ideales para la identificación de hongos micorrízicos en orquídeas. Dado que la identificación puede ser establecida en la ausencia de esporas, las cepas fúngicas pueden ser idénticas o estrechamente relacionadas a las ya identificadas. Algunas de estas técnicas son útiles para determinar el parentesco de un grupo de hongos o para el análisis de procedencia, mientras que otras son útiles para proporcionar un nombre específico para un hongo o para la elaboración de una filogenia. El uso de métodos moleculares para el estudio de los hongos de orquídeas hasta ahora ha sido muy limitado (Hollick, 2004).

La aplicación de las diferentes metodologías de análisis del ADN (Ácido Desoxirribo Nucleico) diseñadas y probadas en los últimos años, basadas en la Técnica de Amplificación Génica (PCR), están permitiendo conocer el genoma de los hongos y tener mayor precisión en la identificación fúngica.

Para llevar a cabo esta fase de la investigación se realizaron los siguientes pasos:

Extracción de DNA. Se requirió purificar el material fúngico mediante la técnica de punta de hifa crecido en el medio de PDA (Baker®) y dejarlo crecer aproximadamente 2.5 cm de diámetro a 28 °C. Después, el micelio fue colectado con espátula en condiciones estériles y se realizó la molienda en mortero, agregándose nitrógeno líquido, seguido del procedimiento de extracción de Qiagen DNeasy® (Apéndice C), el cual produce buenos rendimientos de ADN de alto peso molecular. Al ADN extraído (ng/μl) se le cuantificó la concentración en el Nanodrop y se visualizó mediante electroforesis según Sambroock y Russell (2001). La electroforesis se realizó sobre un gel de agarosa (Apéndice D) para corroborar la cantidad el peso molecular de la muestra de ADN utilizando el marcador de peso molecular (MPM) (Fig.8).

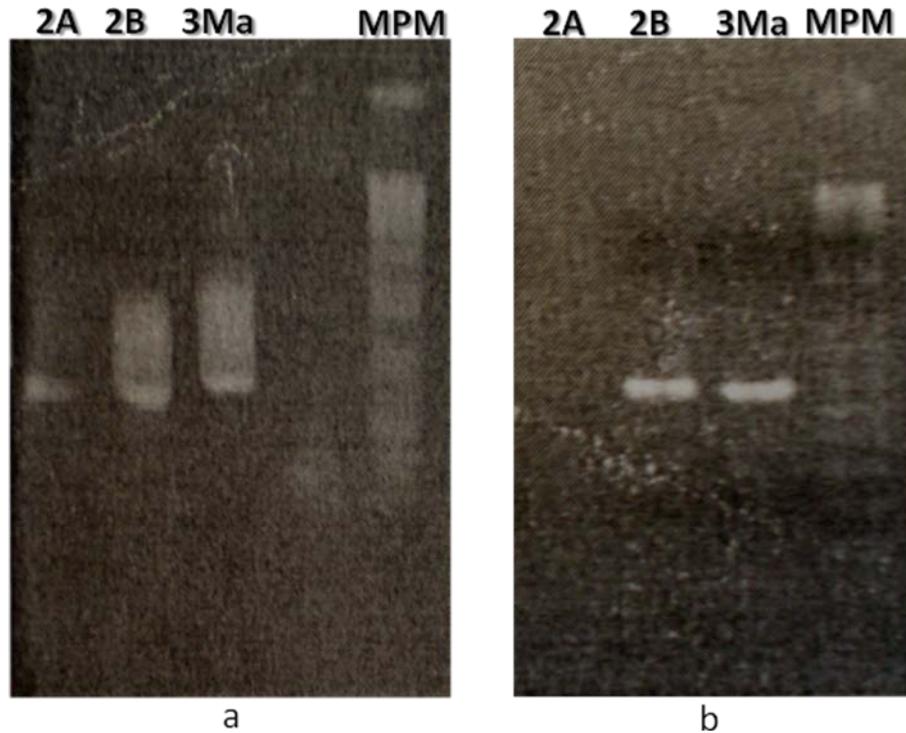


Figura 8. Fotografía de los geles de electroforesis del ADN extraído. A) PCR del DNA extraído sin purificar y B) DNA purificado

Análisis taxonómico. El ADN fue utilizado para identificar mediante la amplificación de fragmentos polimórficos (AFP) de las regiones ITS. Por último, se realizó la homología ADN-ADN correlacionando las bases de datos internacionales disponibles con el obtenido a partir de las muestras fúngicas.

Las muestras puras (punta de hifa) se enviaron a analizar con la Dra. Hilda V. Silva Rojas del Laboratorio de Biotecnología de Semillas del Colegio de Postgraduados de Montecillos, para realizar el análisis molecular que incluyó la extracción de ADN, amplificación de región ITS y análisis taxonómico (UPGMA o equivalente).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Área de recolecta de muestras rizosféricas

De las 20 muestras recolectadas en las colonia Cerro del Carbón, Coyuxquihui y Primero de mayo (Papantla, Ver.) se aislaron las colonias fúngicas más frecuentes que aparecieron durante la siembra de los explantes (Fig. 9) y se realizó la resiembra. Posteriormente, se descartaron aquellas colonias de color violeta a rosado característico del género *Fusarium* (patógeno para vainilla).

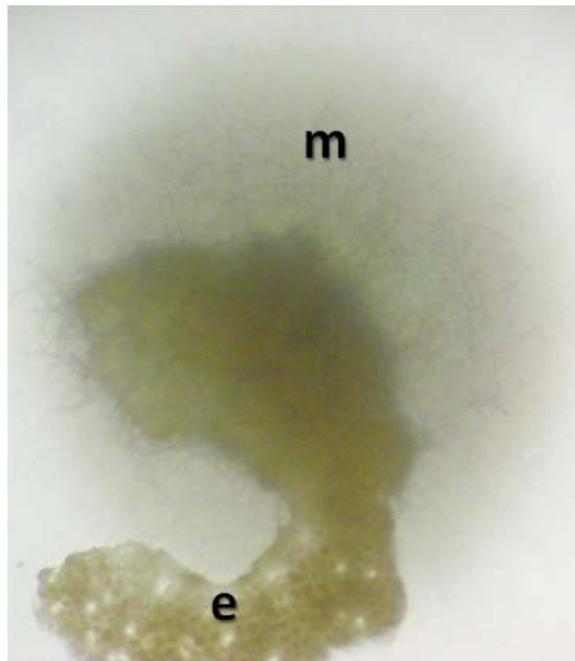


Figura 9. Crecimiento fúngico (m) a partir de explante (e).

6.2. Aislamiento de hongos endorrizoféricos de la vainilla

De la resiembra de los hongos endorrizoféricos provenientes de explantes, se obtuvieron un total de 13 cepas, sin embargo sólo 11 de ellas fueron las que se trabajaron debido a que las restantes no tuvieron respuesta favorable de crecimiento (más de 4 meses para un diámetro de 2 cm) en algunos de los medios como PDA, Czapek, V8 y de maíz (Davet y Rouxel, 2000) que se utilizaron para su resiembra.

En el cuadro 5 se describen algunas de las características morfológicas macroscópicas usadas para la descripción de la colonia fúngica, detallando características del anverso y reverso, así como el tiempo de desarrollo que permitió diferenciar las colonias de crecimiento rápido basados por lo descrito por Peña *et al.* (1998), usadas para la diferenciación e identificación de los aislados fúngicos obtenidos.

6.3. Preparación de especímenes fúngicos para su identificación taxonómica

Para realizar la clasificación a nivel género se realizó la comparación de las fotografías con aquellas publicadas en bibliografía. Se utilizó el sistema de clasificación Saccardo para la clasificación de hongos imperfectos (Barnett y Hunter, 1998).

Mediante esta prueba se realizó la identificación taxonómica tradicional mediante la observación de estructuras fúngicas microscópicas que se desarrollaron en un periodo de 5 a 12 días y a una temperatura de 28 °C. De las 11 cepas sólo tres fueron identificadas mediante esta técnica, debido a que la mayoría de los hongos endófitos aislados no esporularon o bien, su caracterización no correspondió con aquellas especies descritas (Petrinni *et al.*, 1995; Gamboa y Bayman, 2001). A continuación se da una descripción de las cepas fúngicas identificadas.

Cuadro 5. Características morfológicas usadas para la diferenciación e identificación de los aislados fúngicos aislados de la endorrizósfera de vainilla, recolectadas de tres regiones de Papantla, Veracruz, México.

Código de Identificación	Sitio de muestreo	Género afin (1)	Tasa de crecimiento (2) (días)	Coloración de la colonia	Micelio aéreo	Aspecto de la colonia
2	1° de Mayo	<i>Aspergillus</i> sp.	4	Blanco, ámbar, café**	Abundante	Algodonoso
2A	1° de Mayo	<i>Colletotrichum</i> sp.	9-12	Blanco, negro**	Escaso	Aterciopelado
2B	1° de Mayo	<i>Gloeotinia</i> sp.	43	Blanco (olor terroso)	Escaso	Polvoriento
3CV	Coyuxquihiuc	No identificado	7-10	Blanco (presenta aroma)	Compacto	Glabro
3CVa	Coyuxquihiuc	No identificado	8-12	Blanca (ligero aroma)	Compacto	Glabro
3Ma	Coyuxquihiuc	<i>Verticillium</i> sp.	30-45	Blanco	Compacto	Aterciopelado
4CV	Cerro del Carbón	No identificado	40-45	Blanca	Compacto	Algodonoso
4CVb	Cerro del Carbón	No identificado	40-48	Blanca	Compacto	Aserrado
5	1° de Mayo	<i>Xylaria</i> sp.	10-15	Blanca	Compacto	Liso
11	1° de Mayo	No identificado	40	Blanco, gris**	Muy compacta	Glabro-umbonado
P1	Cerro del Carbón	No identificado	5-7	Blanco, negro**	Abundante	Algodonoso

(1) Con base a Raper y Fennell (1965); Barnett y Hunter (1998); Watanabe (2002) y Dugan (2006).

(2) Diámetro radial de la colonia fúngica

** Los cambios de la coloración es de acuerdo con la longevidad de cada cepa.

La cepa (2ACa) no se incluye en este cuadro, presenta características de crecimiento de un Actinomiceto

- La cepa 2 correspondió al género *Aspergillus* sp (Fig.10) de acuerdo a Barnett y Hunter (1998). Dicho género es de distribución universal; está presente en el suelo, aire, agua, alimentos, plantas y materia orgánica en descomposición y su desarrollo es favorecido por la humedad y las temperaturas elevadas (termófilos). Las colonias cultivadas en PDA llenaron la caja en cuatro días a 26-28°C, presentando un micelio lanoso de color blanco que posteriormente en quince días cambia a color ámbar y conforme maduran, toman un ligero color café (Fig. 10A -E), su reverso es de color amarillo. Microscópicamente, el hongo presenta hifas vegetativas septadas (Fig. 10E), conidióforos de hasta 3mm lisos, sin color o ligeramente pigmentados, cabezas conidiales con métulas de 6µm y fíalides de 4-56µm, biseriada que cubren la vesícula agrupándose en forma radial. Vesículas subglobosas a globosas hasta 17 µm de diámetro de color café amarillento (Fig. 10F) y sus conidios miden de 2.5 a 3 µm de superficie lisa

De acuerdo con sus carecteristicas, la cepa 2 corresponde a la especie *Aspergillus wentii* según a Raper y Fennell (1965), considerada como común y cuya distribución principal es en los suelos tropicales o subtropicales. Además, esta especie se caracteriza por producir ácido cítrico y glucónico, y posee fuerte acción proteolítica.

- La especie 2A correspondió al género *Colletotrichum* sp. (Fig. 11) de acuerdo a Watanabe (2002) y pertenece a los Ascomycetes; Sordariomycetes, Phyllachorales; Phyllachoraceae (Dugan, 2006). Las colonias cultivadas en PDA alcanzaron 8.5 cm de diámetro entre 9 y 12 días, presentan color oscuro con micelio aéreo blanco de textura lanosa compacta (Fig. 11A), que consiste en numerosos esclerocios negros y masas conidiales de color marrón claro (Fig. 11B-C), reverso de color marrón oscuro (Fig. 11D). Conidióforos simples, alargado (Fig.11E); conidias hialinas, ovaladas o rectangulares. Los apresorios son comunes, clavados, de color marrón, 11-16.5 × 6-9.5 de forma variable (Fig. 11 F-G), y desarrolla clamidosporas (Fig. 11H). Las conidias son rectas, fusiformes, 16-22 × 3-4 µm (Fig. 11 J-K). Los esclerocios (Fig. 11 L) son generalmente abundantes, setosos ya sea en el borde o entre los conidióforos (Barnett y Hunter, 1998). Después de llenar la caja, genera una abundante cantidad de exudados hialinos aromáticos. En general los hongos del género *Colletotrichum* son los estados imperfectos de *Glomerella*. Este género se diferencia de *Gloeosporium* por las espinas,

que puede estar ausentes en algunos cultivos (Barnett y Hunter, 1998). Estudios realizados por Redman *et al.* (2001, 2002) mencionan que *Colletotricum* spp. confiere resistencia a enfermedades causadas por virus pero no a altas temperaturas y salinidad, debido a la producción de metabolitos de actividad antimicrobiana (Strobel y Daisy, 2003).

- La cepa 2B pertenece a los Deutromycetes, Phialosporae y particularmente al género *Gloeotinia* (Barnett y Hunter, 1998). Cultivada en PDA presenta color blanco aromático (terroso) con textura aterciopelada corácea, con ligeras ambulaciones al centro (Fig. 12 A-B), reverso color ladrillo (Fig. 12 C-D). El crecimiento sigue un patrón radial con un margen restringido, a 24 y 28° C alcanza 6 cm de diámetro en 30 días. Microscópicamente presenta hifas septadas, formación de filialosporas elipsoides hialinas, presenta masas de esporas formadas en la parte apical de los conidióforos, los cuales son rectos y hialinos (Fig. 12 E-F) y sus hifas tienden a formar anastomosis.
- La cepa 3CV no se logró identificar a nivel de género. Sus características en medio PDA fueron las siguientes: presencia de aroma, el anverso es de color blanco (Fig.13A, C), y reverso de marrón a blanco (Fig.13B, D). Su borde es aracnoide (Fig. 13A). A nivel microscópico se observaron hifas septadas (Fig. 13E) de forma pectinada. Presenta anastomosis de hifas (Fig. 13F), y una sola espóra se forma en la parte apical del conidióforo (Fig. 13 G-I), conidióforos y conidios hialinos.
- Al igual que la anterior, la cepa 3CVa no se logró identificar a nivel de género. La colonia fúngica es de color blanco al anverso (Fig. 14 A, C) y de blanco a marrón al reverso (Fig. 14B, D) Las hifas son septadas (Fig, 14E) de forma de cuerno de ante, existió formación de fíbulas (Fig.14 F-G) además forma una sola conidiospora sin conidióforos. Su micelio fue hialino (Fig. 14J).

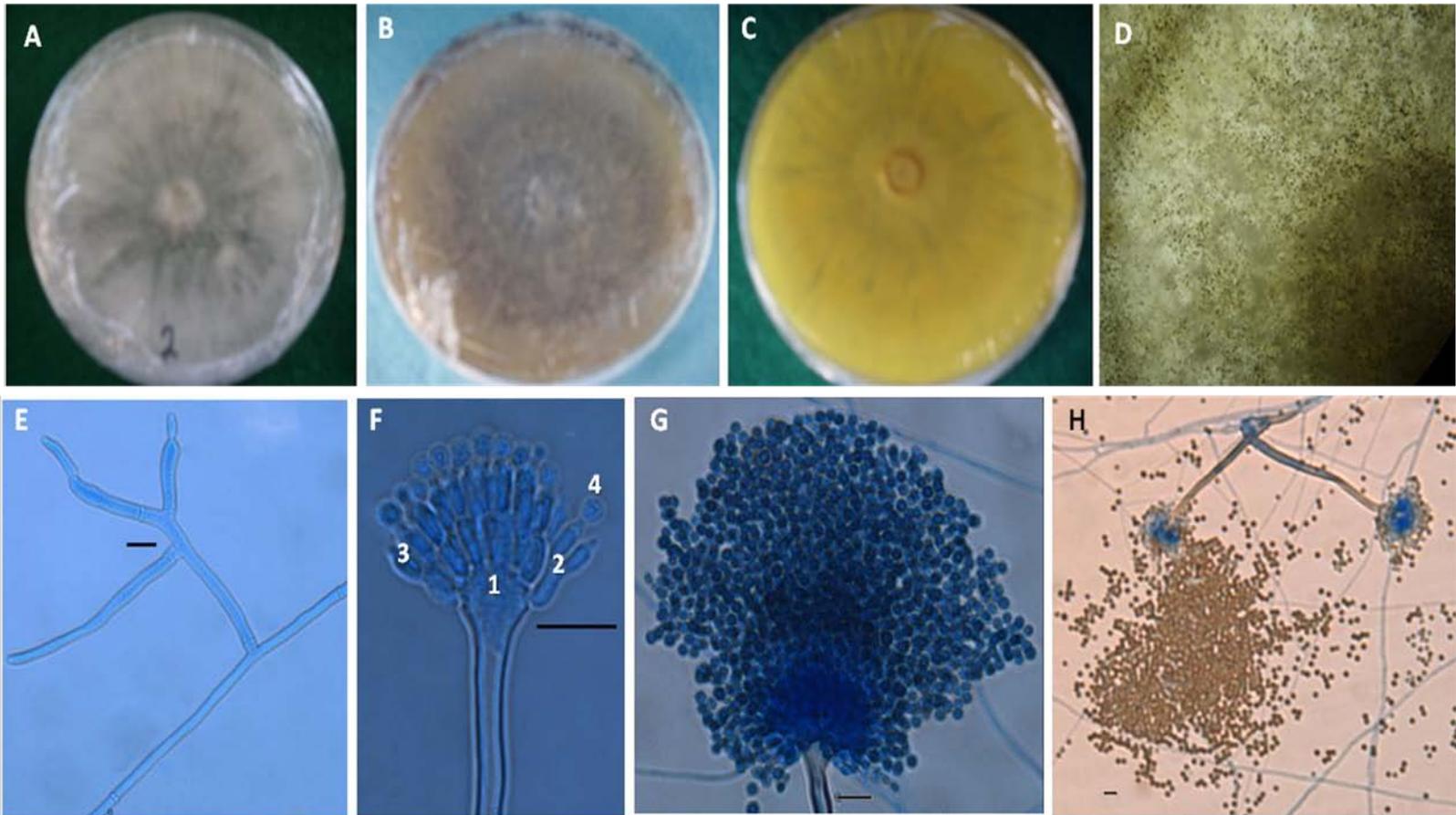


Figura 10. Aspectos macroscópicos (A-B) y microscópicos (E-H) de la especie *Aspergillus wentii*, aislada de la endorrizósfera de plantas de vainilla (Cepa 2). Fotografías tomadas a 400X, 24h (E); 1000X, 48h (F); 400X, 72h (G); 100X, 144h (H). (F) Mostrando: conidióforo (1) Vesícula, (2) Métulas, (3) Fiálides y (4) Conidios. Barra 10 μ m.

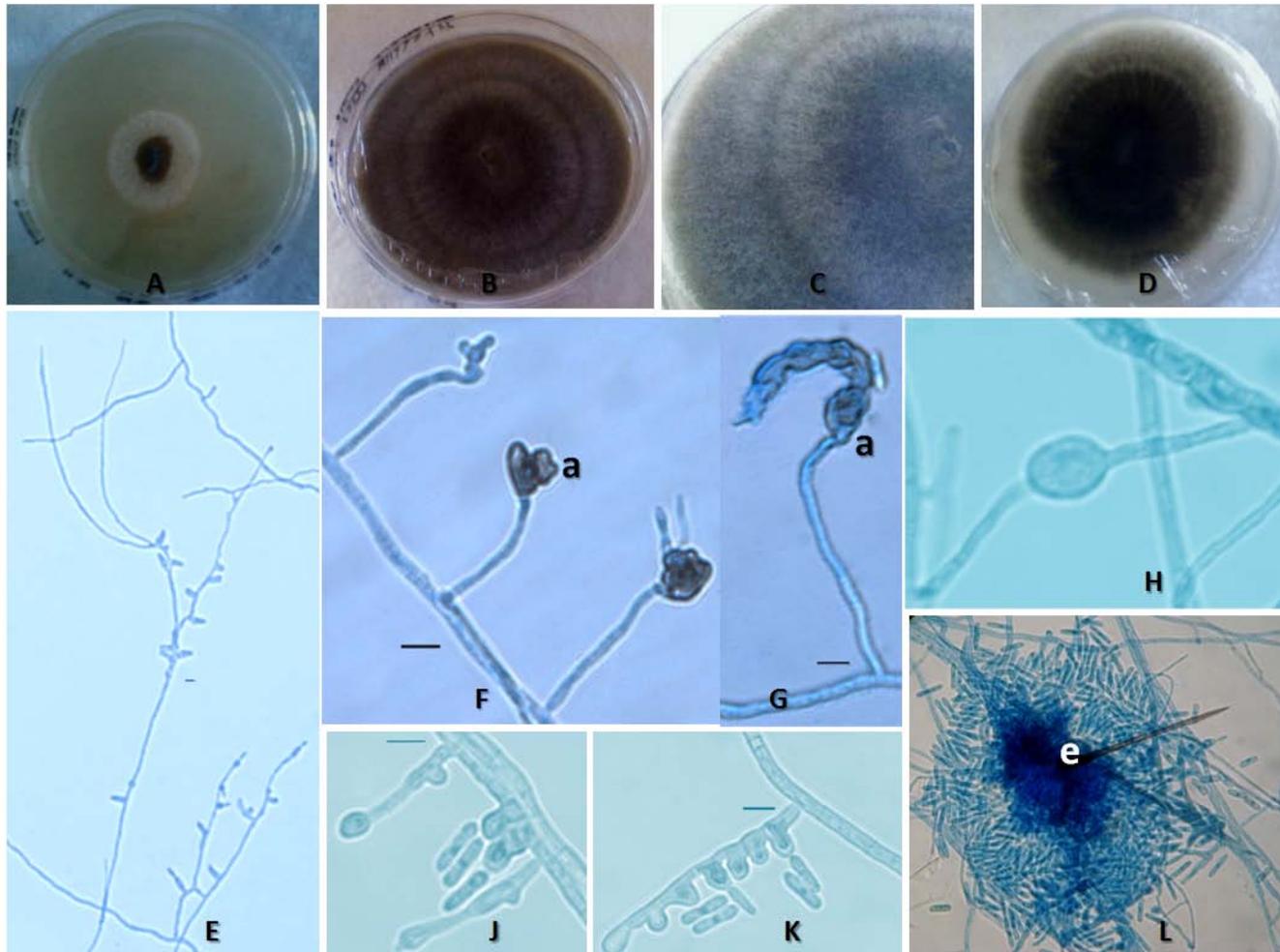


Figura 11. *Colletotrichum* sp. (2A). (A-D) características macroscópicas de la colonia en PDA. (E-L) características microscópicas. (E) hifas septadas, 100X. (F-G) conidióforos con apresosios (a); 40X, 48 h. (H) Presencia de clamidosporas, 600X, 120 h. (J-K) conidias unicelulares u ovaladas rectangulares, 400X, 120 h; (L) esclerocio con acérvulo setoso (e), 100X, 168 h. Barra 10 µm.

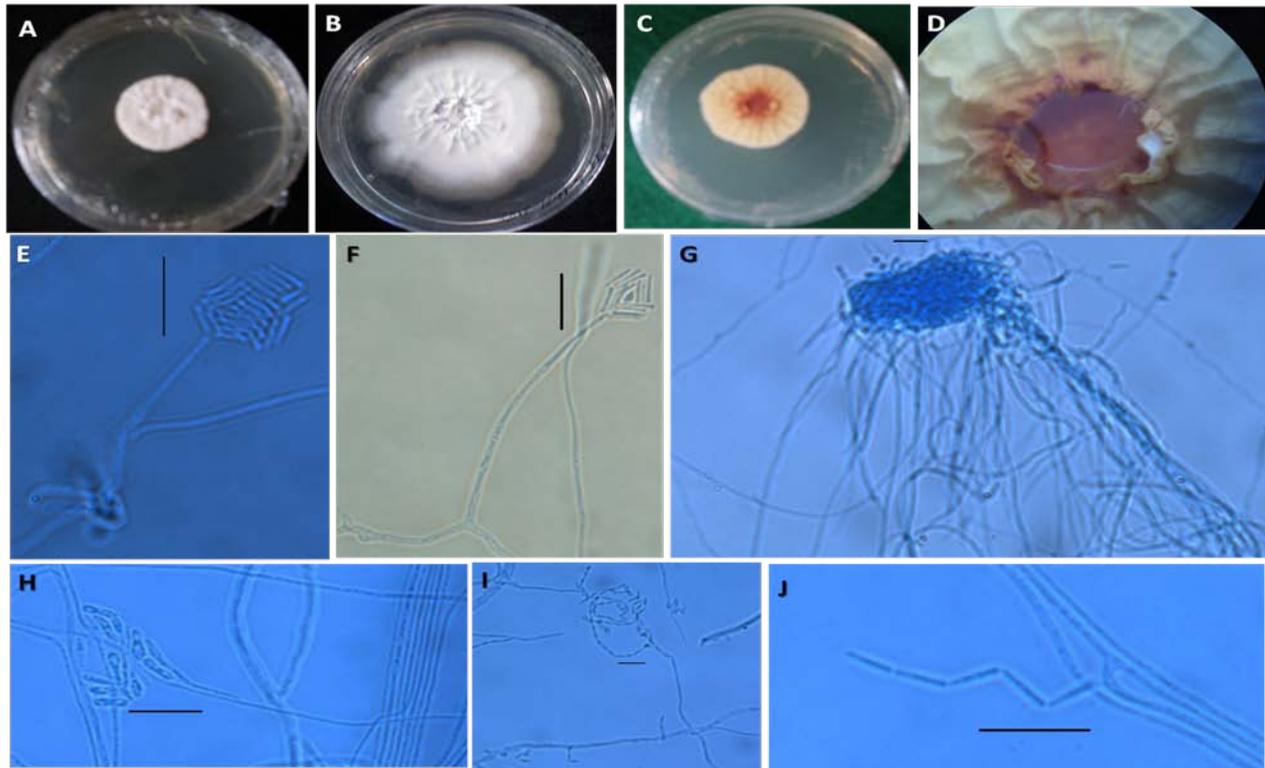


Figura 12. *Gloetinia* sp (Cepa 2B). (A-D) características macroscópicas (A) y (B) envés; (C) y (D): revés. (E-K) características microscópicas: (E-F) desarrollo de conidios y conidióforos, 1000X, 48h. (G): conglomeración de hifas, 400X, 120h; (H): conidios, 1000X, 168h; (I-J) crecimiento sucesional de conidios, 600X, 240h. Barra 10 μ m.

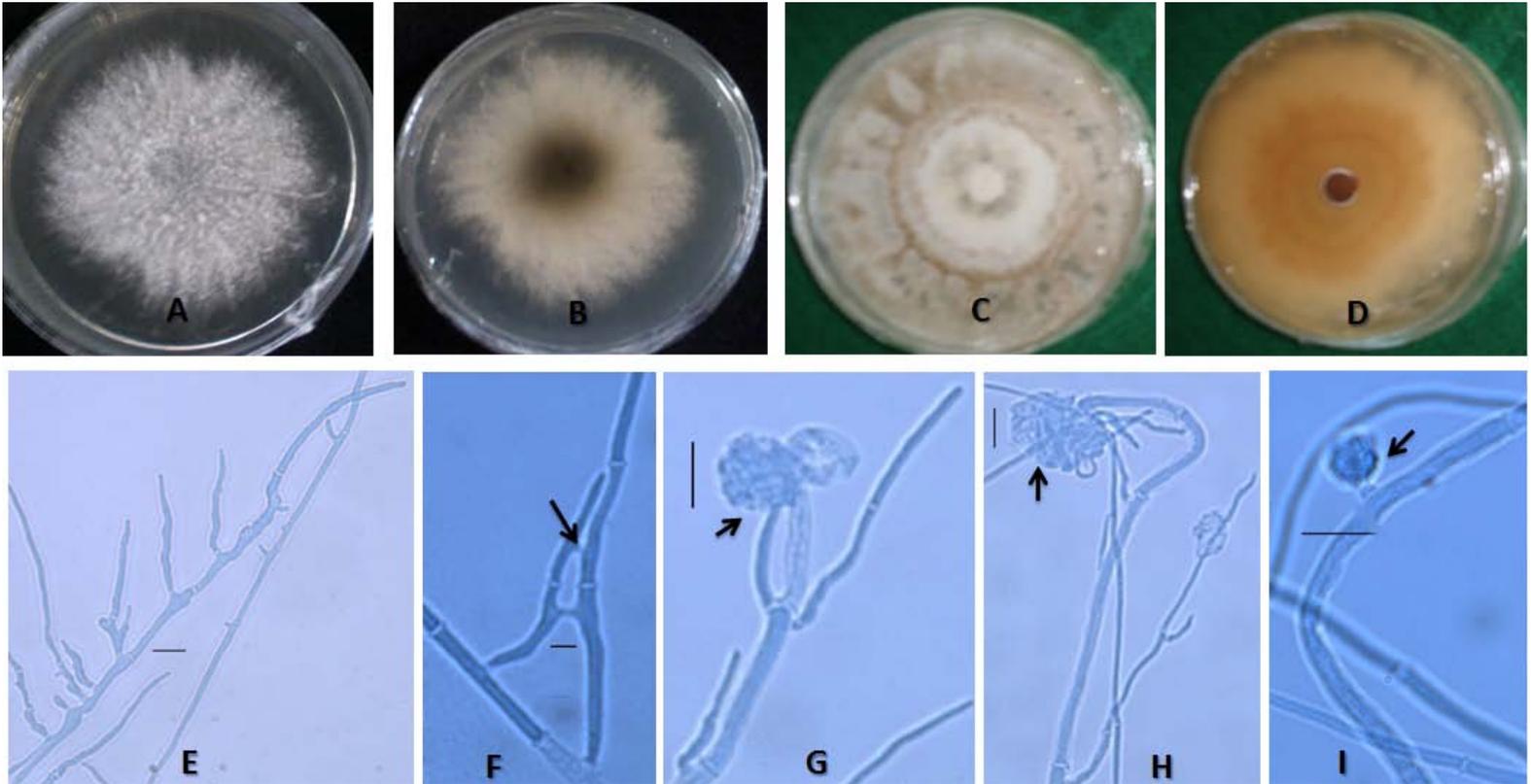


Figura 13. Cepa 3CV: De izquierda a derecha: micelio joven (A-B) a más maduro (C-D). Hifas pectinadas (E), anastomosis de hifas (F), desarrollo de una sola espora en el conidióforo (G-H) y algunas esporas sin conidióforo (I). Barra 10 μm .

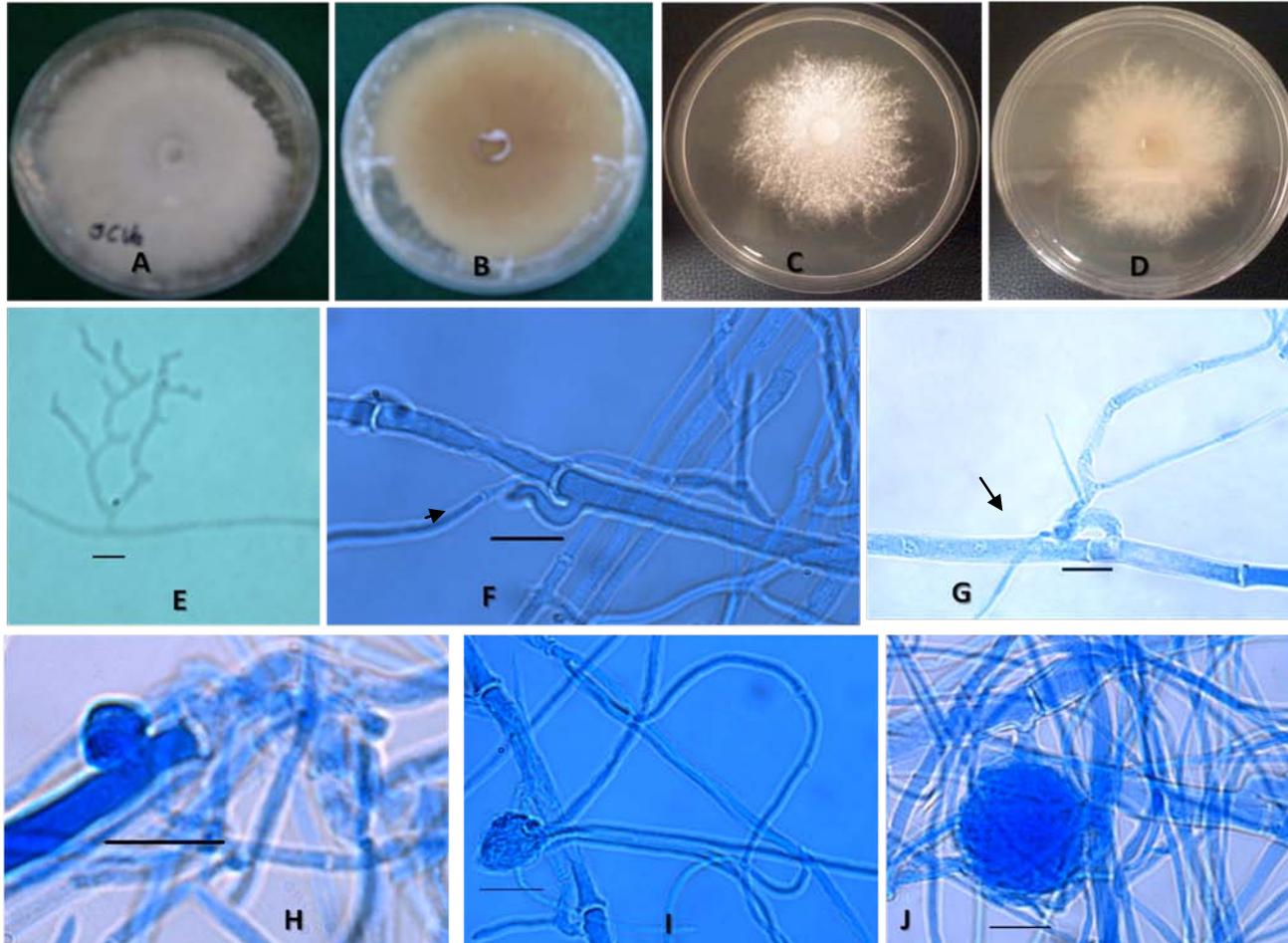


Figura 14. Cepa 3CVa. Características macroscópicas: (A) y (C) anverso de la colonia; (B) y (D) reverso de la colonia. Características microscópicas (E): hifas pectinadas; (F – G): desarrollo de fibulas. Conidiospora sin conidióforo (H-J) Barra 10 μm .

- La cepa 3Ma, fue de muy lento crecimiento en medio PDA (30 a 45 días); al anverso presenta una coloración blanca (Fig. 15A) y al reverso el micelio maduro presenta una coloración rojiza, y a la periferia el micelio joven es de color blanco (Fig. 15B). Presenta crecimiento de microconidios a las 48 h a 28° C (Fig. 15C-D) y a los 5 días se observan diversas masas de conidias (Fig. 15E-G). Subsecuentemente entre 7 y 12 días se observa la formación de conidióforos a partir de un hinchamiento en la hifa (Fig. 15H-I), se forma una estructura muy semejante a la fíbula (Fig.15J), en el ápice del conidióforo se forman masas de conidios (Fig. 15K). De acuerdo a las características mencionadas se clasifica dentro de los Deuteromycetes, Phialosporae, y de acuerdo a la identificación molecular corresponde al género *Verticillium*.
- La cepa 4CV no se pudo clasificar. Macroscópicamente la colonia en el anverso es de color blanca (Fig. 16A) de textura algodonosa (Fig. 16B) que posteriormente conforme a su maduración comienza a generar exudados (Fig. 16C). El reverso presenta coloración oscura al centro (micelio maduro) (Fig. 16 D), que posteriormente comienza a agrietarse (Fig. 16E) con el desarrollo de algunos pigmentos de coloración oscura (Fig. 16F). Con base en la técnica de Ridell para las características microscópicas se observaron dos cepas en la misma colonia, una con presencia de hifas más delgadas que logran formar algunos conidióforos septados con conidias de características muy particulares en el ápice (Fig. 16I), y la otra con hifas más gruesas con septos bien marcados en forma de anillos (Fig. 16J).
- De manera macroscópica la cepa 4CVb es de color blanco en el anverso (Fig. 17A), mientras que en el reverso mostró coloración blanco a marrón (Fig. 17B), su crecimiento es de tipo roseta. Posteriormente a dos meses, se desarrollaron algunos cuerpos fructíferos (Fig. 17 C-D) los cuales no lograron una maduración a 28°C en oscuridad. Al disectar los cuerpos fructíferos se observó una masa de micelio sin ninguna formación de esporas en su interior. Microscópicamente se observaron hifas en forma de raqueta (Fig. 17E), así como la formación de algunas clamidosporas (Fig. 17F)

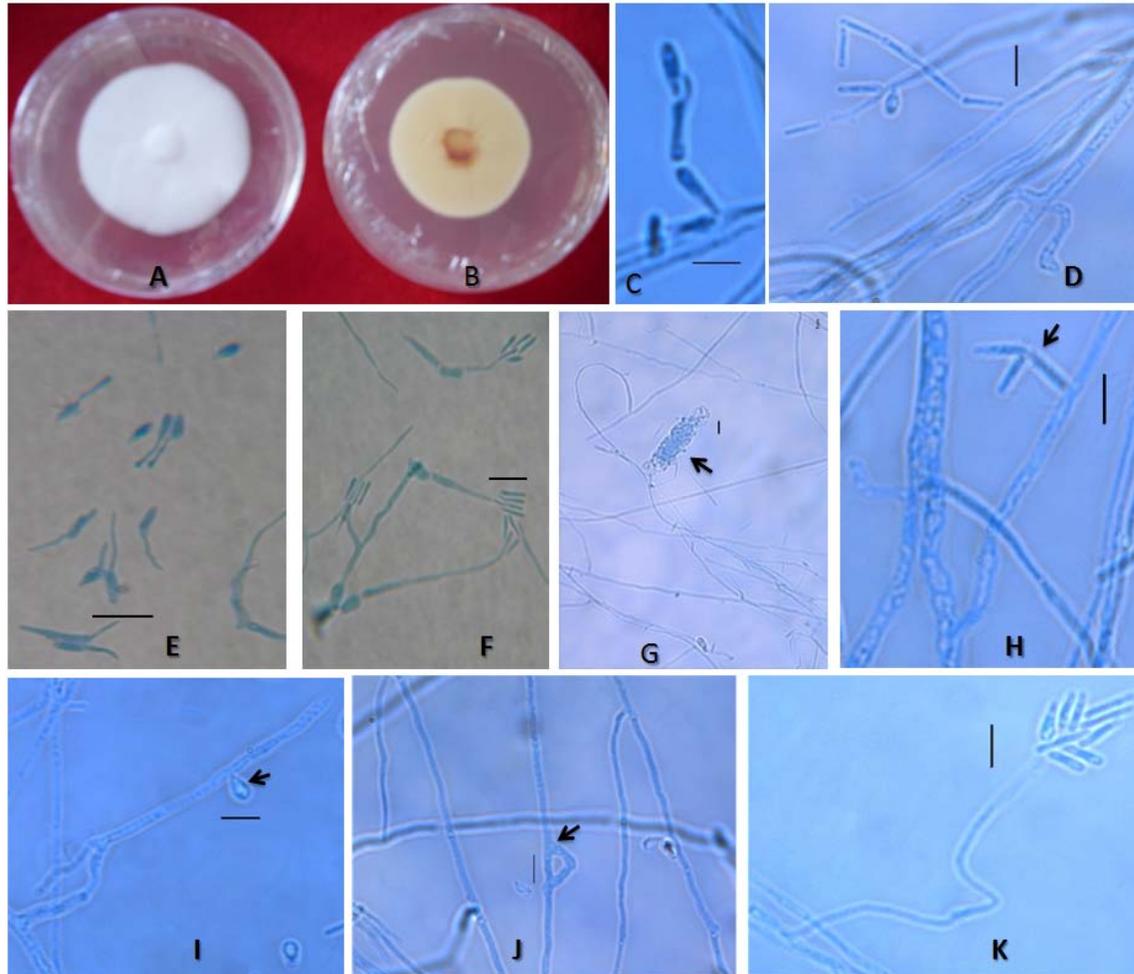


Figura 15. Cepa 3Ma (*Verticillium* sp). Aspectos macroscópicos, (A): anverso y (B): reverso. (C-K) características microscópicas, (C-D): microconidios, (E-F): macroconidios. (G) Conglomeración ordenadas de conidias. (H) desarrollo del conidióforo. (I) Conidias. (J): anastomosis. Barra 10 μ m.

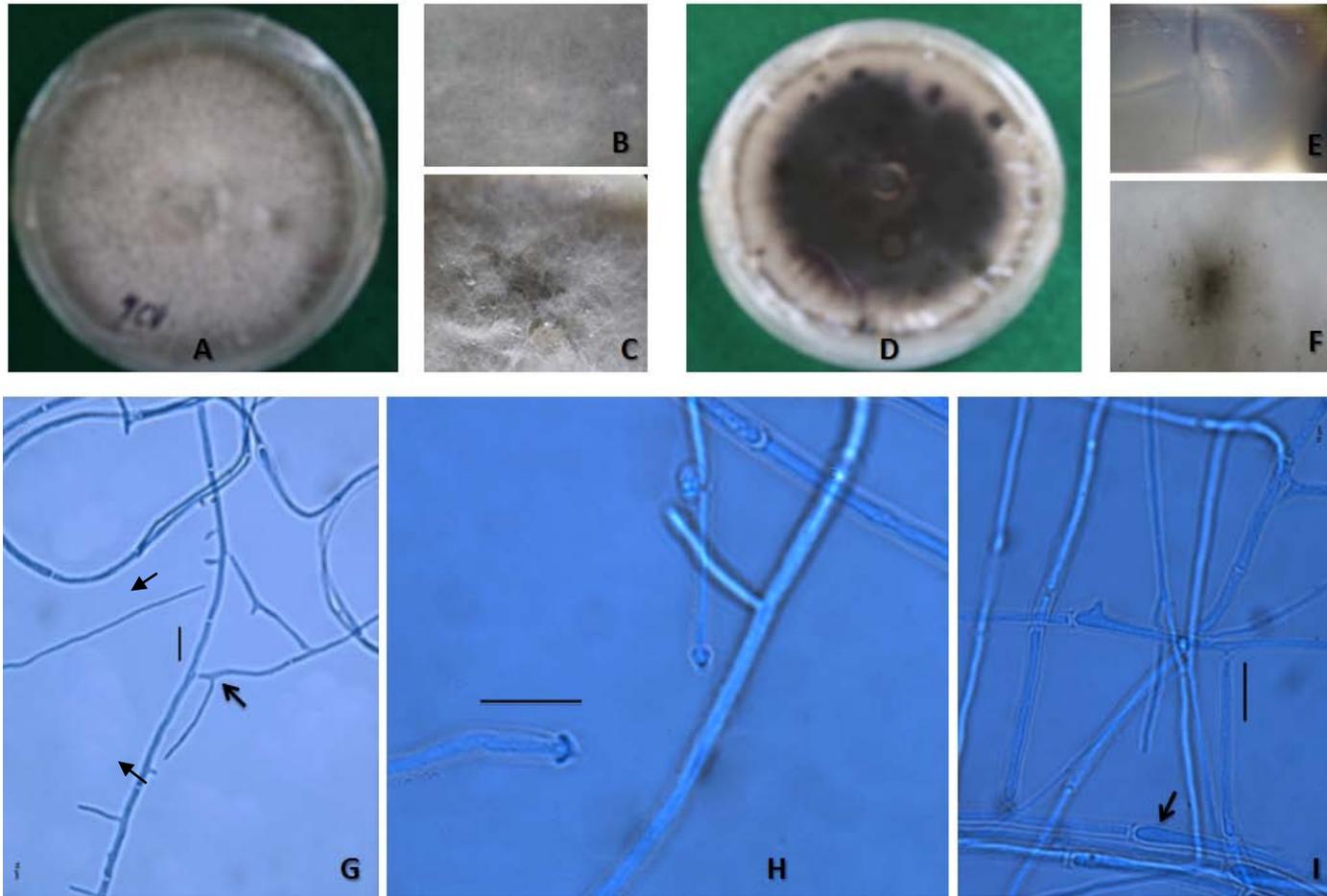


Figura 16. Cepa 4CV. Aspectos macroscópicos (A-C) anverso y (D-F) reverso. (G-I) características microscópicas. (G): anastomosis de hifas. (H) formación de conidias en la parte apical del conidióforo. (I) Hifas clavadas. Barra 10 μ m.

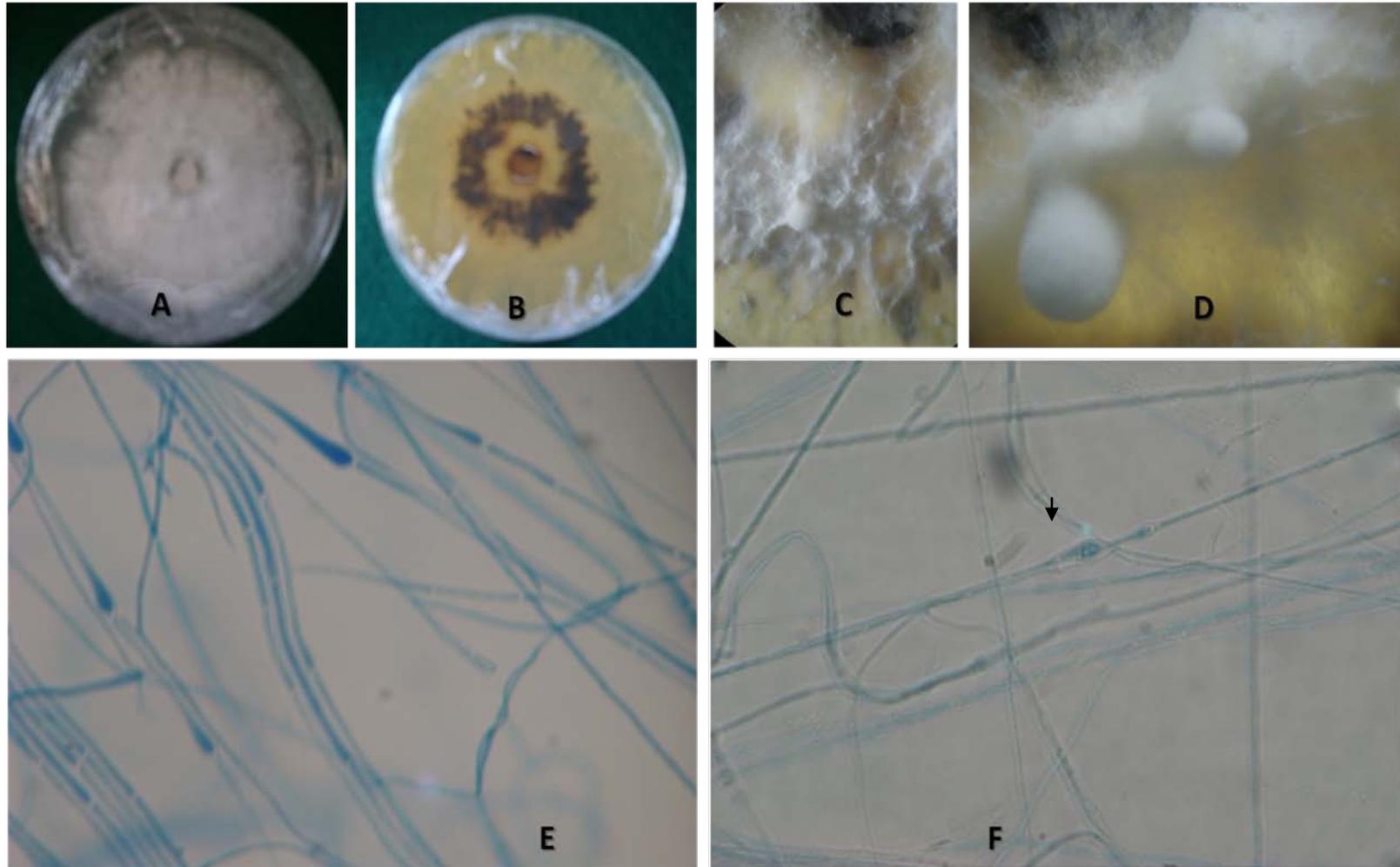


Figura 17. Cera 4CVb. (A-D) Aspectos macroscópicos, y (E-F) aspectos microscópicos. (C-D) Desarrollo de cuerpos fructíferos después de cuatro meses. (E) Hifas clavadas 40X; (F) clamidospora 10X.

- El endófito con clave 5 correspondió al género *Xylaria* la cual pertenece a los Ascomycota; Ascomycetes; Sordariomycetidae; Xylariales. *Xylaria* presenta una forma anamórfica, con la participación de al menos cinco nombres genéricos. Macroscópicamente, la cepa formó cuerpos fructíferos en semillas de arroz, fue erecto alargado y ramificados, fusionados basalmente, pigmentados de color negro (Fig.18 D-G). Las paredes de las ascas no se tiñen de azul con el yodo. Las especies de *Xylaria* pueden ser parasitas o saprofiticas. En medio PDA las colonias alcanzaron un diámetro de 8.5 cm entre 9 a 12 días, micelio aéreo escaso y compacto; el anverso de la colonia presenta coloración oscura en micelio más maduro (Fig. 18A-B) y blanco hacia el borde, presentando el mismo patrón de coloración en el reverso (Fig. 18C). Microscópicamente presentó hifas septadas con terminación en forma de cuerno (Fig. 18I), en el ápice de las hifas se observaron algunos conidios globosos (Fig. 18J) y con algunas conidias helicoidales laterales (Fig. 18K). En general este género presenta dificultades para realizar su clasificación taxonómica a nivel de especie (Dallwitz, 2000).
- La cepa 11 mostró en el anverso un color blanco cuando el micelio es joven (Fig. 19A) y gris al madurar, presentando algunas espículas de color oscuro al centro de la colonia (Fig. 19B, E, F) de fácil ubicación en la colonia, su crecimiento es seccional presentando algunas umbonaciones al anverso y reverso. Microscópicamente las hifas son septadas, aunque por las propiedades del hongo que no permitieron la coloración con el azul de lactofenol, por lo que no se apreció bien la segmentación en todas las hifas (Fig. 19G-I). A los doce días comenzó la formación de conidióforos muy cortos y conidios de forma globosa (Fig. 19G), que posteriormente (15 días), formaron estructuras similares a las clamidosporas (Fig. 19H), una singular característica microscópica observada también a los 15 días, cuando se presentó un enrollamiento intrahifal (Fig. 19K).

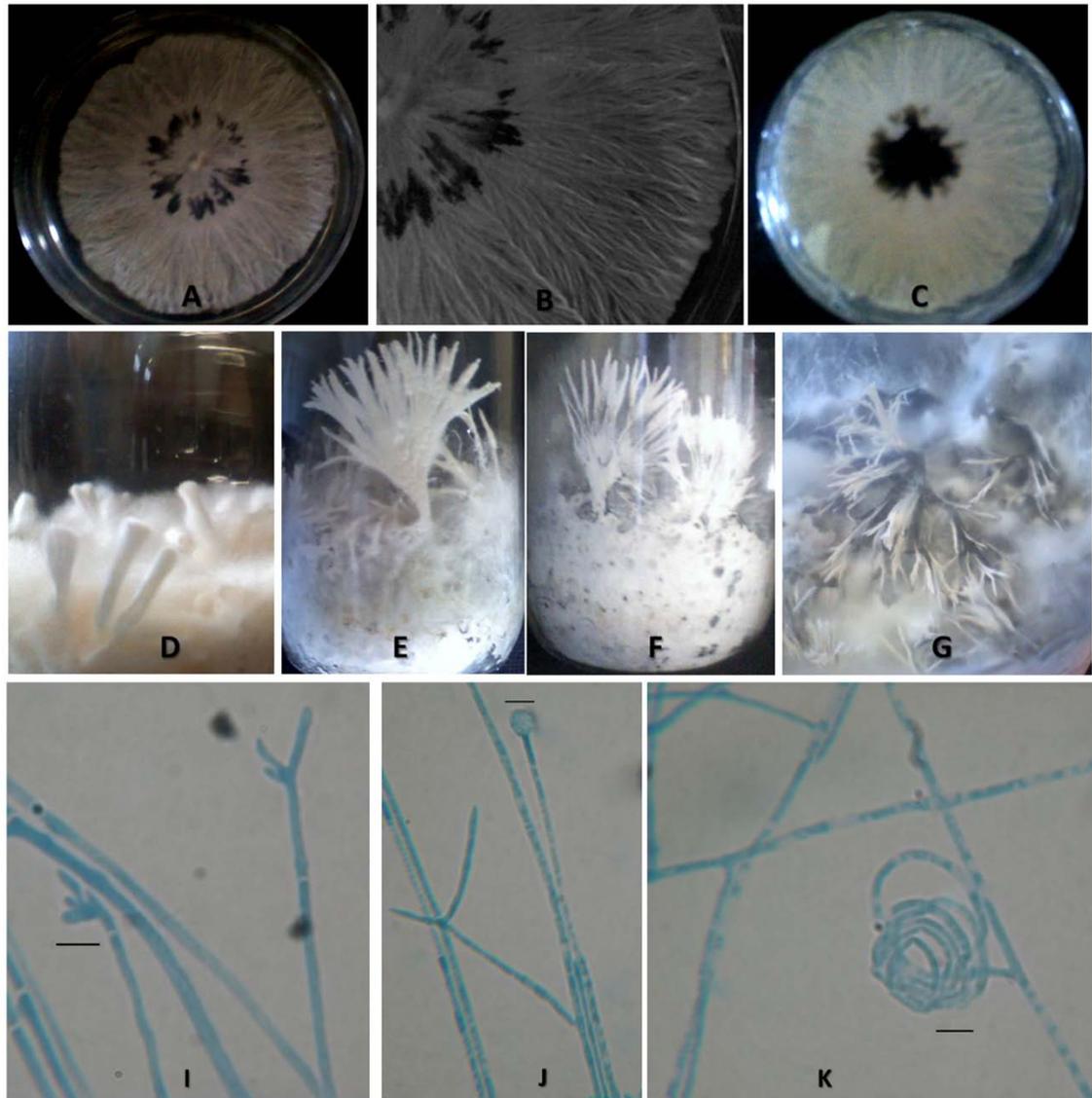


Figura 18. Cepa 5. Género *Xylaria* (A-G) aspectos macroscópicos; (I-K) aspectos microscópicos. (A-C) coloración blanca en el micelio joven y negra en el más maduro. (D-G) crecimiento de los cuerpos fructíferos de esta especie en diferentes estadios de crecimiento, de izquierda a derecha, de joven a maduro. (I) hifas pectinadas, (J) conidio y conidióforo; (K) enrollamiento hifal lateral. Barra 10 μ m.

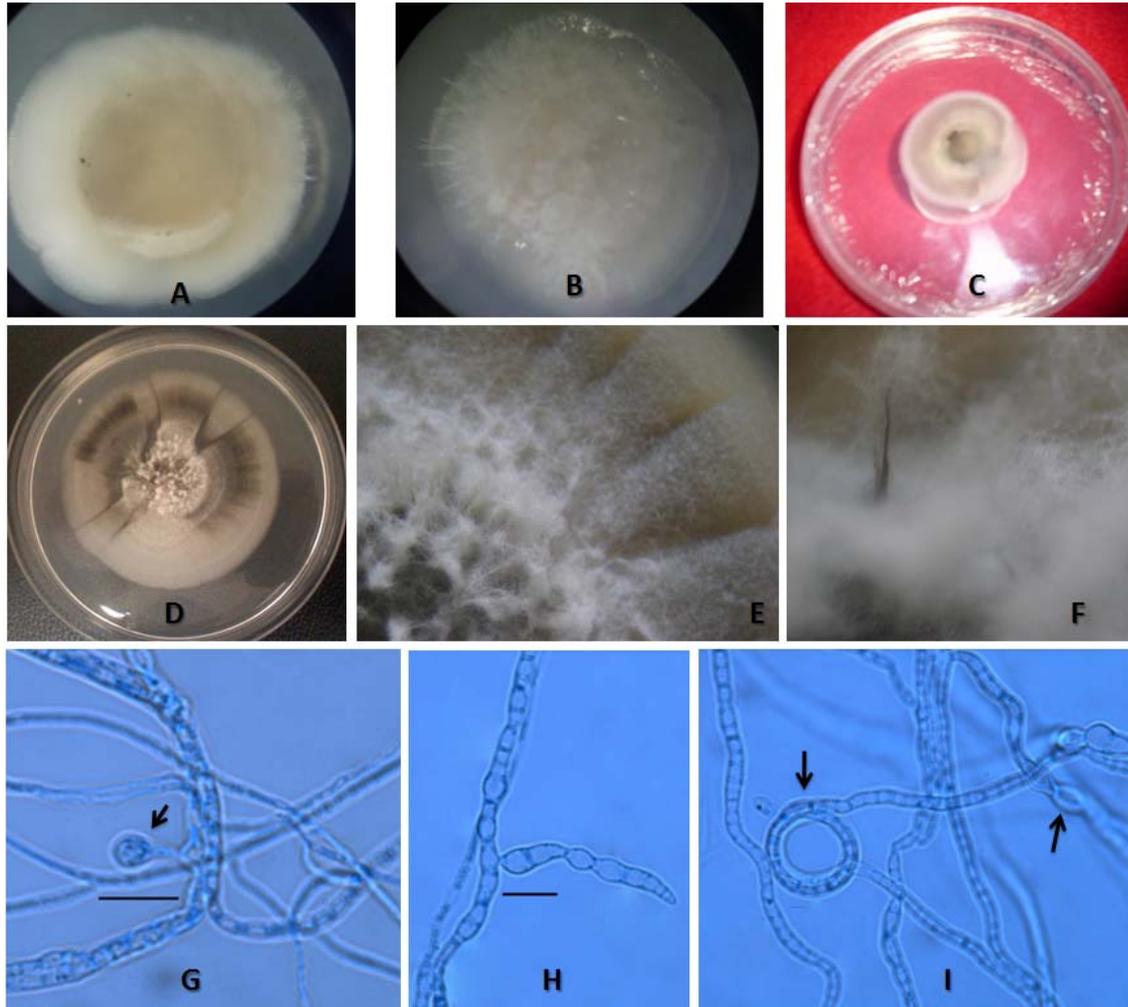


Figura 19. Cera 11. (A-F) aspectos macroscópicos. (G-I) rasgos microscópicos: (G) conidio; (H) hifa; (I) hifas enrolladas con formación de clamidosporas. Barra 10 μm .

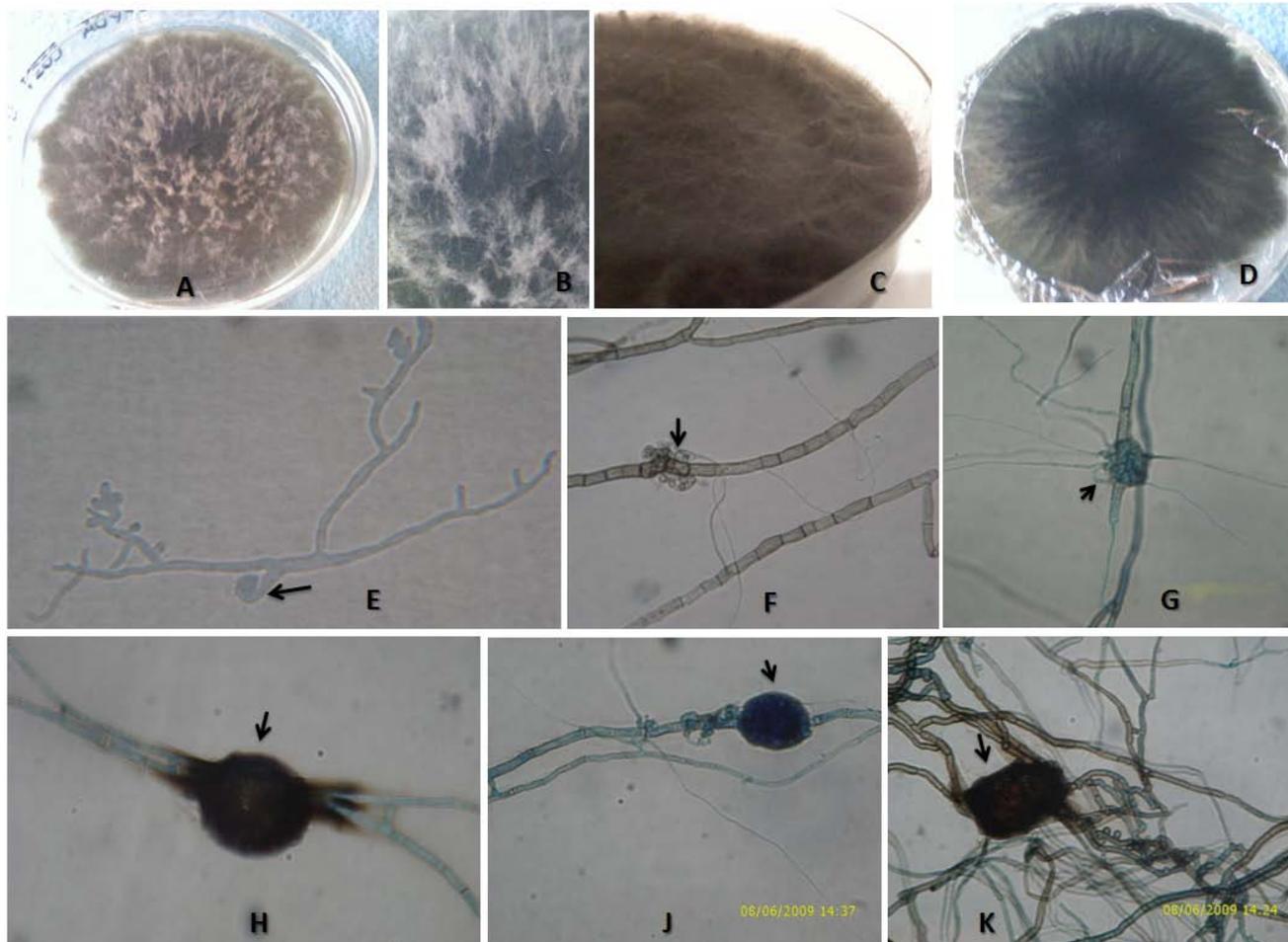


Figura 20. Cepa P1. Características macroscópicas (A-D) y microscópicas (E-K). (A-C) anverso y (D) reverso. (E) espore germinando, (F-K) estadios de maduración de los conidios. Barra 10µm.

- La cepa P1 presentó un crecimiento muy particular, la cual después de llenar la caja a los 5 o 7 días al mantener en el anverso un color blanco en el micelio aéreo, posteriormente se tornó de color gris-marrón en su base y blanco en la parte aérea (Fig. 20 A, B), lo cual fue relacionado con la formación de estructuras semejantes a picnidios (Fig. 20H). Posteriormente a los 15 días toda la colonia se tornó de color marrón y la parte aérea comenzó a compactarse (Fig. 20C). El reverso de la colonia cambió a color grisáceo (Fig. 20D). En la Figura 20E se observa la germinación de una espora, sin embargo no se observó la estructura que le dio origen.
- La cepa 2ACa no fue trabajada para su identificación ni para la prueba de formación de simbiosis (Fig. 21), debido a que el tiempo de crecimiento de su colonia fue mayor a dos meses, además de que sus características macroscópicas sugieren que pertenecen a los actinomicetos.



Figura 21. Cepa 2ACa. Característica morfológica de la colonia que fue semejante a una colonia de actinomicetos.

6.4. Evaluación de cepas fúngicas con potencial para formar simbiosis

De acuerdo con observaciones al microscopio óptico y después del tratamiento de clareo y tinción de raíces, las zonas de colonización de algunas cepas fúngicas estuvieron restringidas al córtex (Fig. 22) (Chitnis y Deshpande, 2005). En este tejido de la raíz, el hongo estimuló la

elongación de las células corticales infectadas. Al respecto, se conoce que la formación de los pelotones por hongos micorrízicos orquidioides se restringe sólo al parénquima de las células corticales (Senthilkumar *et al.*, 2000; Hadley y Williamson; 1972).

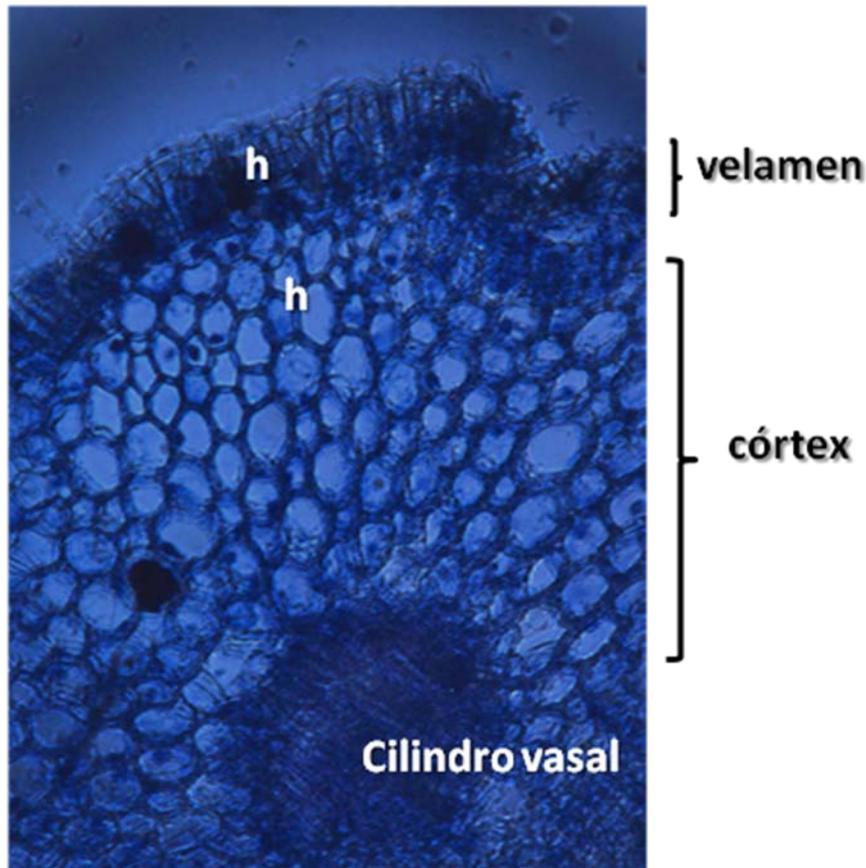


Figura 22. Anatomía de la raíz de *Vanilla planifolia* mediante el corte transversal, 100X; h: hifas.

De las 11 cepas utilizadas para esta fase, las cepas 2A, 3CV, 3CVa, 3Ma, P1, 11 y 2B presentaron una colonización radical del 79.5%, en promedio. La cepa 2B presentó la colonización más alta con 92%, mientras que la de menor colonización (64%) correspondió a la cepa 3CV (Cuadro 6). Para el caso de las plantas testigo, no se observó colonización por lo que se descartó la contaminación entre tratamientos.

Con el resto de las cepas y concordando con lo mencionado por Orcutt *et al.* (2000) se observó una simbiosis de tipo parasítica, donde el simbionte se convirtió en un patógeno en los primeros

días después de la inoculación, retrasando el crecimiento y causando la muerte de la planta. Kottke y Suárez (2009) relacionan este comportamiento de patogenicidad de cepas de hongos, con las condiciones ambientales, principalmente por temperatura.

Cuadro 6. Porcentaje de colonización fúngica (pelotones) en células.

	Clave de la cepa						
	2A	2B	3CV	3CVa	3Ma	11	P1
Colonización (%)	88	92	64	88	80	76	80

Algunas de las estructuras que se observaron, en las raíces de las plantas donde las cepas fúngicas mostraron potencial para formar la simbiosis orquidióide, fueron los rafidios o ráfides, considerados como compuestos de desecho de la raíz, por la acumulación intracelular de calcio (Fig. 23D, 24A, L, M y 25R, letra r) depositados en las células del córtex (Franceschi y Horner, 1980; Sawidis *et al.*, 2000 y Ely *et al.*, 2007). Estos compuestos de desecho en algunos casos estuvieron dispuestos en línea recta de inicio a fin de la raíz. En la Figura 24A se observa un complejo membranoso que rodea al rafidio, debido a que éstos se producen por invaginación de la membrana plasmática (Franceschi y Horner Jr., 1980).

El hongo entró a la raíz a través de los pelos radicales (Fig. 24E), sin embargo la infección también puede ocurrir directamente en el velamen (Orcutt *et al.*, 2000) sobre todo en los sitios con heridas. La hifa exhibe un modo horizontal de penetración al velamen y luego a las células corticales en donde comenzaron a formar pelotones (Warcup y Talbot, 1967).

En las preparaciones se observaron los dos tipos pelotones reportados para la asociación hongo-orquídea (Uetake *et al.*, 1997): los pelotones de tipo intactos, que corresponden al periodo inicial de la colonización fúngica y se caracteriza por una masa de hifas en desarrollo continuo que casi lleno el espacio intracelular (Fig. 23D, 24F, 25V) y los pelotones digeridos, que representan los momentos finales de la asociación y se caracterizaron por masas de hifas condensadas que ocupan un pequeño espacio en la célula cortical (Fig. 23E, 24D, L, O y 25R)

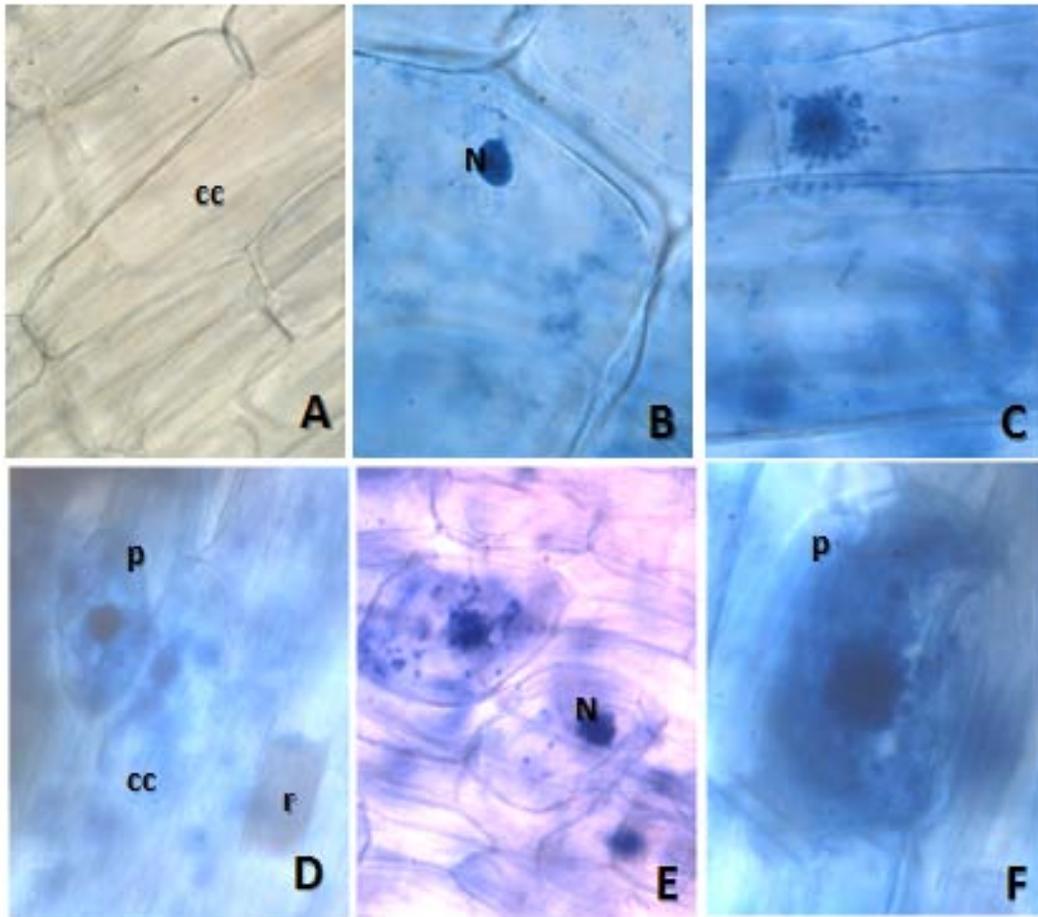


Figura 23. Microfotografías de cortes longitudinales de las raíces de vainilla del tratamiento testigo (A-C) donde no se observa colonización fúngica, y de raíces colonizadas por la Cepa 2B (D-F), en donde cc: célula cortical; N: núcleo; r: rafidio; p: pelotón. Tomadas a 400, 600 y 1000X.

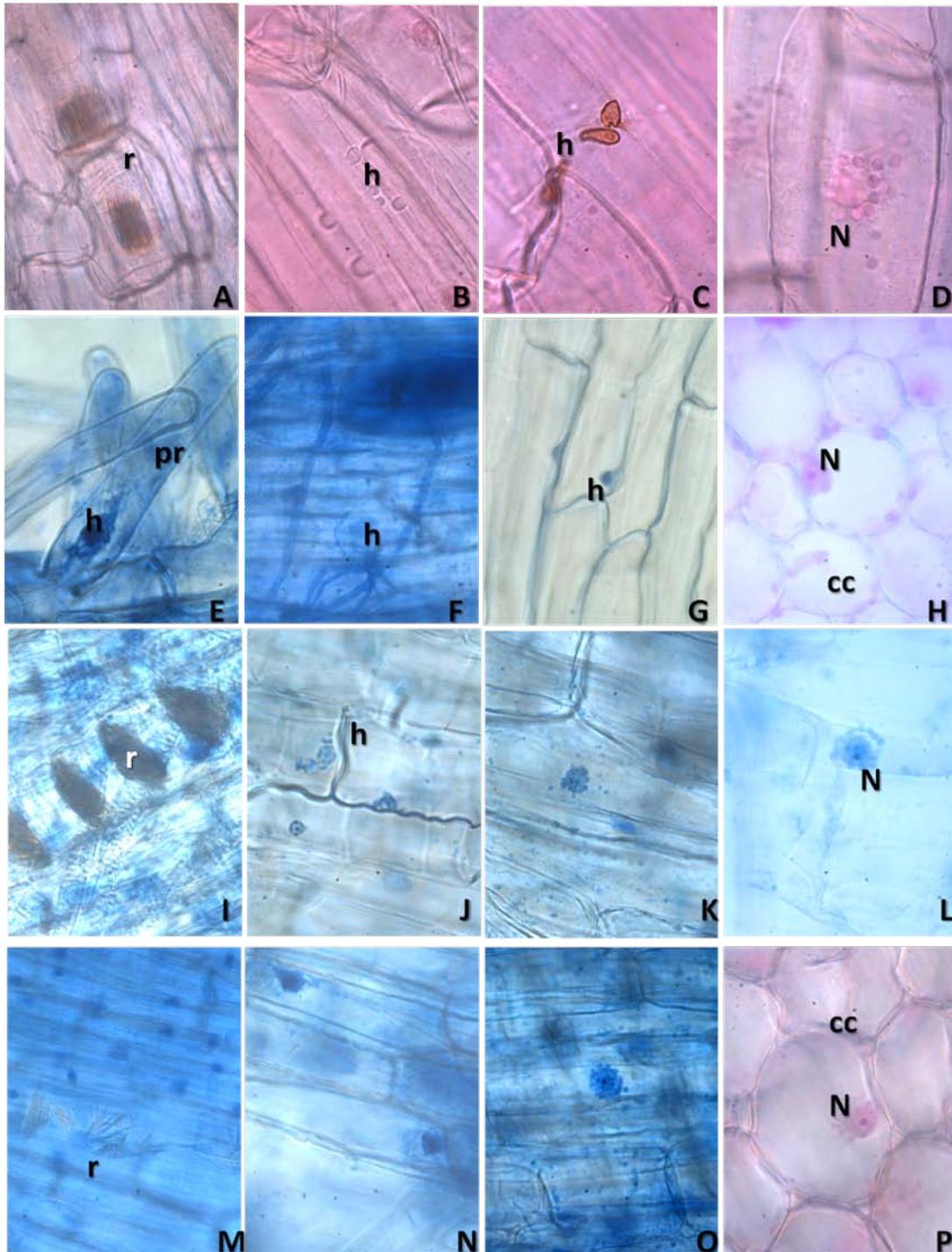


Figura 24. Estructuras fúngicas dentro de la raíz de vainilla, correspondientes a las cepas 2A (A-D), 3CV (E-H), 3CVa (I-L) y 11 (M-P). r: rafidio; h: hifa fúngica; N: núcleo, pr: pelo radical; cc: célula cortical. Microfotografías tomadas a 100, 400, 600 y 1000X

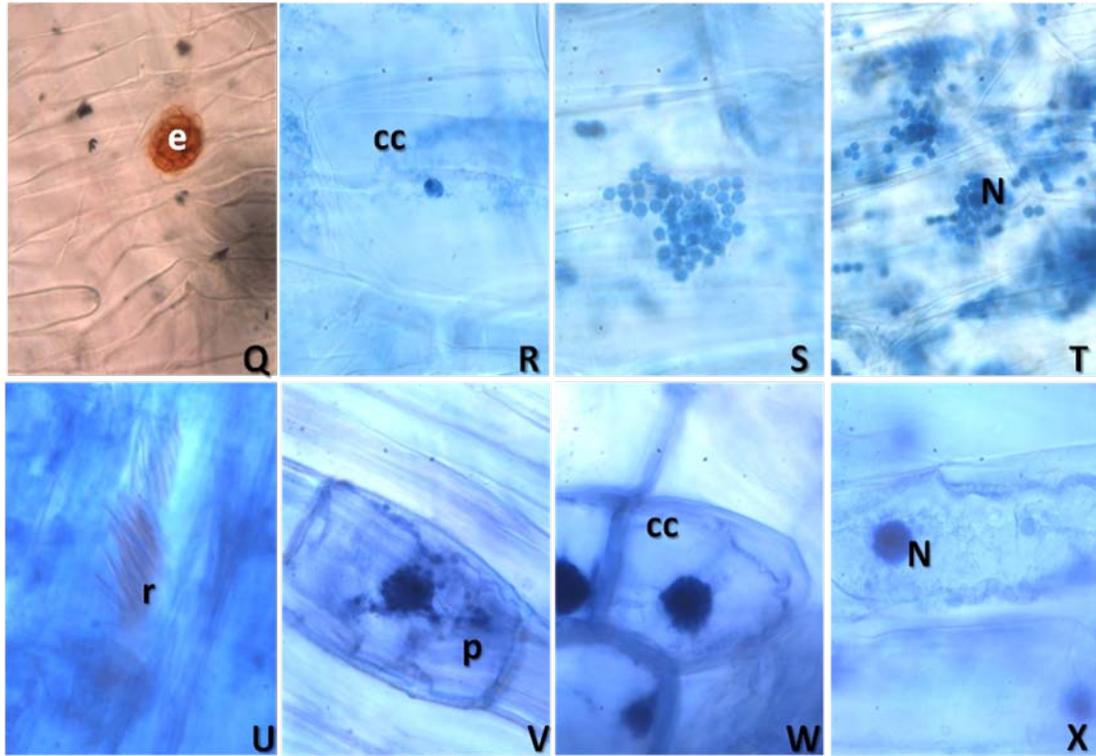


Figura 25. Microfotografías de las raíces de vainilla de los tratamientos con las cepas P1 (Q-T) y 3Ma (U-X). Tomadas a 100, 400, 600 y 1000X. e: espora, cc: célula cortical; N: núcleo; r: rafidio y p: pelotón.

En el presente trabajo, el desarrollo de la plántula en microcosmos de la cepa 2A identificada al género a fin de *Colletotrichum*, no mostró patogenicidad; contrario a lo reportado para *Vanilla planifolia* con el endófito de la especie *Colletotrichum gloeosporioides* causante de enfermedades y marchitamiento de hojas (Talubnak y Soyong, 2010).

6.5. Identificación genética del hongo

La identificación del aislamiento se realizó mediante extracción de ADN y amplificación de la región correspondiente al Espacio Transcrito Interno del Ribosoma (ITS). Los productos de PCR amplificados se verificaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2% y se secuenciaron en ambas direcciones.

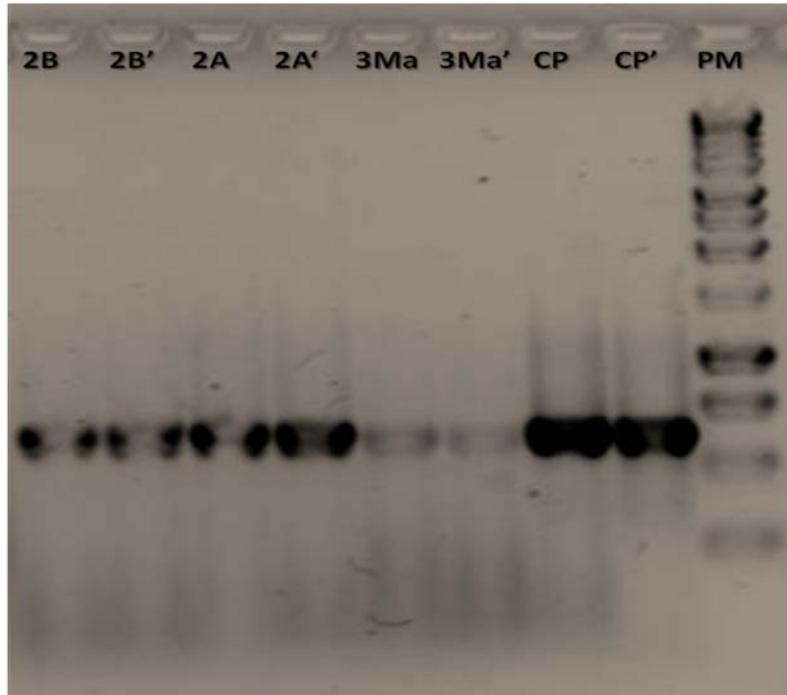


Figura 26. Verificación de los productos de PCR amplificados. Claves: cepas fúngicas 2B, 2A, 3Ma y control positivo (CP) con sus respectivas repeticiones ('); marcador de peso molecular (PM)

Los pares de bases de secuenciaciones de ADN de los hongos seleccionados fueron las siguientes:

Cepa 2A (581 pares de bases)

```

TTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTTGGAAAAATTGGGGGGTTTT
ACGGCAGGAGTCCCTCCGGATCCCAGTGCGAGGTGGTATGTTACTACGCAAAGGAGGCTCCGGGAGGGTCC
GCCACTGTATTTTCGGGGCCTACGGAAGCCGTAGGGCCCCAACGCCAAGCGGTGCTTGAGGGTTGAAATGAC
GCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCAGTAA
TTCTGCAATTCACATTAATTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGT
TAAAAGTTTTGATTATTTGCTTGTGCCACTCAGAAGAGACGTCGTTTAAATAGGGTTTGGTGGTCCGCCG
GCGGGTGGGGCGCGCCGAGACGCGGCTCCGGGCGCCGGAGCTGGGCTCCGGCTGCCCGCCGAGGCAACGTT
TGGGGTATGTTTCACAAAGGGTTATAAGGAGCGGTAACCTCGATAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACG
GAGACCTTGTTACGAT

```

Cepa 2B (581 pares de bases)

```
TTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTCGAGGTCAACCTGAAAAAGTTGGGTTTTACG
GCGTGGCCGCTCTGAGCTTTCCGGTGCAGACAAGTTACTACGCAGAGGTCGCCTCGGAGGGCCGCCACT
AGATTTCCGGGGCGGGCTCCCCGGCGAGATGCCGGGGGAGTCTGCCGTCCCCAACGCCGAGCCGTCCTC
AAAAGAGTCGGGCTCGAGGGTTGAATGACGCTGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATG
TGC GTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTC
ATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTGTATTTTTGCCTTTTCGGCCACTC
AGAAATGCTTATAAAAAACAAAGAGTTTAAGTGTCTCGCCGGCGCCGAAGCGCGCGCCGAAGCAACAAGT
GGTAAGTTCACATAGGGTTTGGGAGTTGAATAACTCGATAATGATCCCTCCGCTGGTTACCAACGGAGA
CCTTGTTACGACTT
```

Cepa 3Ma (416 pares de bases)

```
AAAAATACAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCC
AGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAGCCCGACTCTTTTTGAGGACGGCTCG
GCGTTGGGGGACGGCAGACTCCCCCGGCATCTCGCCGGGGACGCCGCCCCGAAATCTAGTGGCGGCCCT
CCGAGGCGACCTCTGCGTAGTAACTTGTCTCGCACCGGAAAGCTCAGAGCGGCCACGCCGTA AAAACCCCA
ACTTTTTTCAGGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAG
```

Para el análisis taxonómico empleando NCBI- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) se comparó cada secuencia obtenida en el GenBank. Las similitudes oscilaron entre 99% y el 100%. El total de nucleótidos amplificados fueron 416-581 pb y correspondió a la región ITS1, ITS2 e ITS5. Con respecto a las secuencias de ITS, los aislamientos no tenían ninguna de las secuencias ITS correspondientes a las especies depositadas en la base de datos GenBank. Por lo anterior, únicamente se logró determinar el género de cada cepa, correspondiente a los géneros *Colletotrichum*, *Gloeotinia* y *Verticillium* spp. para las cepas 2A, 2B y 3Ma respectivamente.

VII. CONCLUSIONES

- A partir de las raíces de plantas de *Vanilla planifolia* se lograron aislar y purificar once cepas de hongos filamentosos (4CV, 4CVb, 2, 5, 3CV, 3CVa, 2A, 2B, 3Ma, P1, 11), de los cuales las siete últimas cepas demostraron tener potencial para formar simbiosis (79.5% de colonización).
- Las cepas fúngicas que se lograron identificar pertenecieron a los géneros *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Xylaria*, *Gloeotinia* y *Verticillium*.
- Los géneros *Gloeotinia*, *Colletotrichum* y *Verticillium* identificados de manera tradicional y molecular presentaron porcentajes de colonización superior al 80% en las pruebas de formación de simbiosis con vainilla, bajo condiciones controladas (24-26° C, 80% HR, y fotoperiodo de 12 h).
- De acuerdo al porcentaje de colonización, la cepa 2B que pertenece al género *Gloeotinia* presentó 92% de colonización, misma que desarrolló pelotones mejor definidos. La cepa 2A perteneciente al género *Colletotrichum* también presentó un porcentaje alto de colonización (88%) en comparación con las restantes cepas.
- Con base en la información obtenida, los tres géneros identificados mediante técnicas moleculares (*Gloeotinia*, *Colletotrichum* y *Verticillium*) tienen el potencial para la formación de simbiosis en *Vanilla planifolia*, para lo cual no se tienen reportes previos en la literatura de este comportamiento.
- El tiempo en el que se llevó a cabo la prueba de potencial simbiótico fue corto, por lo que se sugiere corroborar nuevamente dicho potencial por un periodo más largo o bien con pruebas de germinación simbiótica.

VIII. LITERATURA CITADA

- Allen, M. F. 1991. The ecology of mycorrhizae. Cambridge University Press, Cambridge UK. 184 p.
- Agustini, V. y S. Sufaati Suharno. 2009. Mycorrhizal association of terrestrial orchids of Cycloops Nature Reserve, Jayapura. Biodiversitas, 10: 175-180.
- Arditti, J. (ed.) 1977. Orchid biology: reviews and perspectives I. Cornell University Press, London.
- Arditti, J. 1992. Fundamentals of orchid biology. John Wiley and Sons. USA. 691 p.
- Arditti, J., y A. K. A.Ghani 2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. New Phytologist. 145: 367-421
- Arzani, I. E. D. y A. A. González V. 2007. Manual de producción de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews): El uso de buenas prácticas agrícolas en el Estado de Veracruz. SAGARPA.
- Assis, A. M.; R. T. Faria, L. A Colombo. y J. F. R. P. Carvalho. 2005. Utilização de substratos à base de coco no cultivo de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). Acta Scientiarum. Agronomy, Maringá, 27:255-260.
- Barker, S. J., D. Tagu y G. Delp. 1998. Regulation of root fungal morphogenesis in mycorrhizal symbiosis. Plant Physiology. 116:1201-1207.
- Barnett, O. y B. Hunter. 1998. Illustrated genera of imperfecti fungi. Burgess. Publishing Co. Minneapolis, USA. 22p.
- Barrera-Rodríguez, A. I; B. E. Herrera-Cabrera; J.L. Jaramillo-Villanueva, J.S. Escobedo-Garrido y A. Bustamante-González. 2009. Caracterización de los sistemas de producción de vainilla (*Vanilla planifolia* A.) bajo naranjo y en malla sombra en el Totonacapan. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 10: 199 - 212
- Bautista S. J. 2009. La vainilla y sus beneficios en el sistema de acahual. La ciencia y el hombre. Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad

- Veracruzana. [en línea] vol. 22. No. 1 [Consulta: 13 Noviembre 2009]
www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol22num1/articulos/vainilla/index.html
- Bayman P. y J. Tupac O. 2006. Part II Endophytic Fungi: Microbial Endophytes of Orchid. En *Microbial Root Endophytes*. Schulz, Barbara J.E.; Boyle, Christine J.C.; Sieber, Thomas N. Springer.
- Bougoure, J. J. y J. D. W. Dearnaley. 2005. The fungal endophytes of *Dipodium variegatum* (Orchidaceae). *Australasian Mycologist*. 24: 15-19.
- Brundrett, M. C. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* 154: 275-304.
- Brundrett, M. C. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews* 79: 473-495.
- Brundrett, M. C. 2008. Morphology of Mycorrhizal Associations. En: *Mycorrhizal Associations: The Web Resource*. Version 2.0. Date accessed. <mycorrhizas.info>.
- Cameron D. D.; J. R. Leake y D. J. Read. 2006. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfer in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytologist*., 171:405-416.
- Castro-Bobadilla G. y J. G. García-Franco. 2007. Vainilla (*Vainilla planifolia* Andrews) crop systems used in the Totonacapan area of Veracruz, Mexico: Biological and productivity evaluation. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 5: 136-142.
- CAV. 2008. Cadena Agroalimentaria de la Vainilla. [Consultada: 17 de junio de 2008]
www.humboldt.com/biocomercio/documentos/agrocadena_vainilla.
- Cordero, F. 1987. El cultivo de la vainilla. *Guía agropecuaria*. (Costa Rica). 4:49-54.
- Chang, D. C. N. 2007. The Screening of Orchid Mycorrhizal Fungi (OMF) and their Applications. *In: Chen W. H., Chen H. H. (eds). Orchid Biotechnology*. World Scientific Publishing. Singapore. 77-98 pp.
- Chitnis M. V. y M. V. Deshpande. 2005. Fungal protoplast technology. *In: Desmukh S. K. y Rai M. K. (eds). Biodiversity of fungi: their role in human life*. Enfield. N. H. Science Publishers. India. 439-454 pp.

- Choy, L. J. 2000. Vainilla –The World’s “flavourite” Orchid. Orchids Australia. Australian Orchid Council Inc. August 2000.
- Clements, M. A. y R. K. Ellyard 1979. The symbiotic germination of Australian terrestrial orchids. American Orchid Society Bulletin 48: 810-816
- Clements, F. E. y C. L. Shear. 1957. The genera of fungi. 3ª ed. Hafner Publishing. New York. 496 p.
- Cuenca Rural. 2007. La vainilla, retos y perspectivas de su cultivo. [En línea] 20 de Diciembre de 2007. [Consultado: 12 de Abril de 2008.] <http://www.cuencarual.com/frutihorticultura/aromaticas/la-vainilla-retos-y-perspectivas-de-su-cultivo>.
- Dallwitz, M. J. 2000. Inkey: identification. [Consultado: 24 de Abril de 2010] <http://delta-intkey.com>
- Davet, P. y F. Rouxel. 2000. Detection and Isolation of Soil Fungi. Science. Enfield. New Hampshire. USA. 188 p.
- Dearnaley, J. D. W. 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. Mycorrhiza. 17: 475-486.
- Divakaran M., K. N. Babu y K. V. Peter. 2006. Conservation of *Vanilla* species, *in vitro*. Scientia Horticulturae 110: 175-180.
- DNeasy Plant Handbook (DHP) 2006. QIAGEN www.qiagen.com/HB/DNeasy96Plant. 02/06/2010.
- Dugan, M. F. 2006. The identification of fungi: an illustrated introduction with keys, glossary, and guide to literature. American Phytopathological Society Press. St. Paul. 176 p.
- Ek, M., P. O. Ljungquist y E Stentröm. 1983. Indole-3-acetic acid production by mycorrhizal fungi determined by gas chromatography-mass spectrometry. New Phytologist. 94:401-407.
- Elizondo, C., D. López M. y F. J. Escárcega L. 2005. El cultivo de vainilla: una alternativa de desarrollo rural sustentable en Quintana Roo. *In: Primer Congreso*

- Internacional de casos exitosos de Desarrollo Sostenible del Trópico. 2-4 Mayo 2005. Boca del Río, Veracruz, México. 65-66 pp.
- Ely F., F. Torres, F. Rada y Y. León. 2007. Estudio morfo-anatómico de dos orquídeas de una selva nublada tropical. *Interciencia*. Jun 32: 410-418.
- Espejo-Serna A., A. R. López-Ferrari y M. R. Jiménez. 2005. Las orquídeas de los cafetales en México: una opción para el uso sostenible de ecosistemas tropicales. *Revista de Biología Tropical*. 53:73-84
- FAOSTAT. 2007. Consulta de base de datos de producción mundial y comercio internacional de la vainilla. www.apps.fao.org/faostat
- Finck, A. 1988. Fertilizantes y fertilización: Fundamentos y métodos para la fertilización de los cultivos. Ed. Reverté, 439 p.
- Flores-Escobar G., J. P. Legaria-Solano, I. Gil-Vásquez y M. T. Colinas-León. 2008. Propagación in vitro de *Oncidium stramineum* Lindl. Una orquídea amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, septiembre-diciembre 14: 347-353.
- Flores, G. M. A. 2007. Manual de las 100 preguntas para las personas interesadas en iniciar el cultivo de vainilla. Gobierno del Estado de Puebla. Secretaría de Desarrollo Rural. 25 p.
- Flores, R. A. 2005. Protocolo para micropropagar masivamente plántulas de vainilla *Vanilla planifolia* Andrews. Ficha tecnológica 2005 por Sistema Producto. INIFAP, Campo Experimental Huimanguillo. Tabasco. www.inifap.gob.mx
- Franceschi, V. R. y H. T. Horner Jr. 1980. Calcium oxalate crystals in plants. *Botanical Review*. 46: 361-427.
- Gamboa, M. A. y P. Bayman. 2001. Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). *Biotropica*. 33(2): 352-360.
- García-Cruz, J. y V. Sosa. 1998. Flora de Veracruz. Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz, México. Fascículo 106.

- Gehring, H., K. Faist y M. Kluge. 1998. Identification of phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms in leaf, stem and roots of the obligate CAM plant *Vanilla planifolia* Salib. (Orchidaceae): a physiological and molecular approach. *Plant Molecular Biology* 38: 1215–1223.
- Giri B., M. Sachdey, P. Huong G., R. Kumari, A. P. Garg, R. Oelmüller y A. Varma 2005. Biotic interactions involving soil microorganisms: mycorrhizosphere: strategies and functions. *In*: Buscot, F. y Varma A. (eds) *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Springer-Verlag GmbH. Berlin. 195-268 pp.
- Hadley, G. y B. Williamson. 1972. Features of mycorrhizal infection in some Malayan orchids. *New Phytology*. 71: 1111-1118
- Hernández, H. J. 2009a. El cultivo: la vainilla. *Agroentorno*, Revista mensual. FUNPROVER (Fundación Produce Veracruz). Septiembre: 16-20.
- Hernández, H. J. 2009b. El cultivo: la vainilla. Segunda parte. *Agroentorno*, Revista mensual. FUNPROVER (Fundación Produce Veracruz). Noviembre: 32-35.
- Hernández C. L., Castillo A. S., Guadarrama C. P., Martínez O. Y., Romero R. M. A. y Sánchez G. I. 2003. Hongos Micorrizógenos Arbusculares del Pedregal de San Ángel. *Las prensas de Ciencias*, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 56p.
- Hernández, G. R. 2002. Fotosíntesis. Libro botánica on line. www.forest.ula.ve/~rubenhg
- Herrera, B. F., R. Escobar P. y A. Benítez L. 2005. *Enciclopedia de los Municipios de México*, Veracruz. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Veracruz.
- Hollick, S. P., R. J. Taylor, J. A. McComb, L. W. Dixon y S. L. Krauss. 2004. Optimisation of DNA Extraction for AFLP analysis of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids Caladeniinae and Drakaeinae. *Plant Molecular Biology Reporter*. 22:307a-307h.
- Hollick, P. S. (2004) *Mycorrhizal specificity in endemic Western Australian terrestrial orchids (tribe Diurideae): implications for conservation*. PhD thesis, Murdoch University.

- Honrubia, M. 2009. Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. 66S1: 133-144.
- ITIS 43714 2009. Integrated Taxonomic Information System. *Vanilla planifolia*. <http://www.itis.gov>
- Kristiansen K. A., D. L. Taylor, R. Kjoller, H. N. Rasmussen y S. Rosendahl. 2001 Identification of mycorrhizal fungi from single pellets of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) using single-strand conformation polymorphism and mitochondrial ribosomal large subunit DNA sequences. *Molecular Ecology* 10:2089–2093.
- Kottke I. y J. P. Suárez C. 2009 Mutualistic, root-inhabiting fungi of orchids identification and functional types. *In: Pridgeon A M y Suárez JP (eds) Proceedings of the Second Scientific Conference on Andean Orchids*. Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador. 84-99p.
- Lee, S.S. 2002. A review of orchid mycorrhizae in Korea. *Journal of Plant Pathology*. 18: 169–178.
- León, J. 1987. *Botánica de los cultivos tropicales*. Editorial ICA. San José, Costa Rica. 127 p.
- Lübeck, M. y P. Stephensen Lübeck. 2005. Universally Primed PCR (UP-PCR) and its Applications in Mycology. En *Biodiversity of Fungi: Their Role in Human Life*. S. K. Desmukh y M. K. Rai. Science Publishers. India.
- Martins, F. R. 1993. *Estructura de una Floresta Mesófila Campinas: UNICAMP*. 246 p.
- McKendrick, S. 2000. *In Vitro Germination of Orchids*. Ceiba Foundation for Tropical Conservation. Ecuador. Pp-
- McCormick M. K., D. F. Whigham y J. O'Neill. 2004. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist*. 163: 423-438.
- Menchaca G., R. A. 2009. La vainilla. La ciencia y el hombre. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana*. 22.
- Miranda, Z. H. 2003. Evaluación de la eficacia biológica (*in vitro*), de una cepa del hongo antagonista *Trichoderma harzianum*, en el control de la fusariosis (*Fusarium*

- spp.) de la vainilla. Alianza tecnológica para la Agricultura con Calidad. Congreso Nacional de Fitopatología, V Congreso Iberoamericano de Agroplasticultura. IV Congreso Nacional de Suelos. Costa Rica.
- Montilla, E. y J. Suniga. 2008. Aislamiento e identificación de hongos micorrizógenos arbusculares nativas en un suelo de Santa Rosa. Inst. de Investigaciones Agropecuarias (IIAP), Univ. de los Andes. Venezuela. 24-27 pp.
- Moreno, M. E. 1998. Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados. UNAM. p.
- Mycology. 2004. Plant interacciones: Orchid Mycorrhiza. University of Sydney <http://bugs.bio.usyd.edu.au/Mycology/contents.shtml>
- Newman, E. I. y P. Reddell. 1987. The distribution of mycorrhizas among families of vascular plants. *New Phytologist*. 106: 745-751.
- OrchidflowerHQ. 2007. Consultada el 3 de Noviembre del 2008. www.orchidflowerhq.com/es/Vanillaorchid.php - 20k
- Orcutt, M. D., E. T. Nilsen y M. G. Hale. 2000. *The physiology of Plants Under Stress: Soil and Biotic Factors*. John Wiley and Sons.
- Orozco A., M. A. 2006. Fomento de la agricultura sostenible mediante el establecimiento de un sistema de garantías de calidad en los procesos productivos y de comunicación a los consumidores. Aplicación a la agricultura mexicana. Tesis Doctoral. Barcelona, España; noviembre de 2006
- Ortega-Larrocea P. 2008. Propagación simbiótica de orquídeas terrestres con fines de restauración edafocológica. En: Técnicas de Estudio de las asociaciones micorrízicas y sus aplicaciones en la restauración. J. Álvarez-Sánchez y A. Monroy A. UNAM: Facultad de Ciencias. 85-96 pp.
- Paniagua V. A., A. I. Barquero E., J. A. García G. y E. Cháves H. 2008. Respuesta en crecimiento y producción de la vainilla (*Vanilla* sp.) en condiciones de cultivo orgánico, mediante el uso de cuatro especies forestales como tutores. Universidad Nacional Andalucía. Instituto de Investigación y Servicios Forestales "INISEFOR" Enero 2006/ diciembre 2008.

- Peña, Q. C., M. V. Shamun, C. Lucana Ch., M. Miranda CH. y A. Giménez T. 1998. Aislamiento, identificación y perfil biológico de especies fúngicas de tierras. BIOFARBO. VI, Diciembre: 17-23.
- Pereira, O. L.; Ma. C. Kasuya M.; C. de L. Rollemberg y G. Chaer M. 2005. Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizotonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. Rev. Bras. Ciênc. Solo. 29: 191-197.
- Peterson R. L., Y. Uetake y C. Zelmer. 1998. Fungal symbioses with orchid protocorms. Symbiosis 25: 29–55.
- Peterson R. L., H. B. Massicotte y L. H. Melville. 2004. Mycorrhizas Anatomy and Cell Biology. CABI. Canada.
- Phillips, J. M. y D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for cleaning roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Tras. Br. Mycol. Soc. 55: 158-161.
- Popoff, O. 2008. Hipertextos del área de la biología. Universidad del Nordeste. Facultad de Agroindustrias. Saenz Peña, Chaco. Fac. Ciencias Agrarias, Corrientes República Argentina. <http://www.biología.edu.ar/fungi/micorrizas.htm>.
- Porras A. A. y P. Bayman. 2003. Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: Root colonization, patterns and fungal identification. Lankesteriana 7: 147-150.
- Porras-Alfaro, A. y P. Bayman. 2007. Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *Mycologia*, 99(4), pp. 510-525. The Mycological Society of America: Consultada el 26 de Julio de 2008.
- Puthur, J. 2005. Influence of light intensity on growth and crop productivity of *Vanilla planifolia* Andr. General and Applied Plant Physiology. 31(3-4): 215-224
- QIAGEN PCR Cloning Handbook. 2001. www.qiagen.com 02/06/2010
- RAFI (Rural Advancement Fund International) Communique. 1987. La Vainilla y la Biotecnología. Jenuary, pp. 1-5.
- Raper K. B. y D. I. Fennell 1965. The Genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams & Wilkins Company.

- Ranadive, A. S. 2005. Vanilla cultivation. In: *Vanilla: The first international congress*. Princeton: NJ: Allured, Carol Stream. p 25–32.
- Rasmussen, H. N. 1995. *Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press. 444pp.
- Rasmussen, H. N. 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza *Plant and Soil*, 244:149-163.
- Redman R. S., D. D. Dunigan, F. J. Rodríguez. 2001. Fungal simbiosis: from mutualism to parasitism, who controls the out come, host or invade? *New Phytologist*. 151:705-716.
- Readman R. S., K. B. Sheehan, R. G. Stout, R. J. Rodríguez y J.M. 2002. Thermotolerance generated by plant/fungal simbiosis. *Science*. 298: 1581.
- Reid, C. P. P. 1990. Mycorrhizas. In: *The Rhizosphere*. J. M. Lynch. Ed. John Wiley and Sons Ltd. England. 281-314
- Riddell, R. W. 1950. Permanet staineded mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia*, 42 (2): 265-270.
- Romeu, E. 1999. *La vainilla: de Papantla a Papantla, el regreso de un cultivo*.
- Royer, S. J. 2003. *An Orchid Handbook*. Michiana Orchid Society. pp. 112
- Sambrook, J. y D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 3ra. Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York. USA.
- Sánchez, M. S., A. E. Becerril R., L. Tijerina C. y J. A. Santizo R. 2001. Crecimiento y desarrollo de vainilla en tres sistemas de producción en Papantla, Veracruz. *Revista Fitotecnia Mexicana*. Enero-Junio. 24(001): 49-56
- Sánchez, M. S. 1997. Características de los principales sistemas de producción comercial de vainilla *Vanilla planifolia* Andr. en México. Master thesis. Colegio de Posgraduados. Texcoco, México. 104 pp.
- Saunders, G. C. y S. J. Owens. 1998. RAPD and ITS Analysis of Orchid Mycorrhizal Fungi. In: *Mycorrhiza Manual*. Ajit Varma. Springer-Verlag Berlin.

- Sawidis T., Kalyba S. y Delivopoulos S. 2005. The root-tuber anatomy of *Asphodelus aestivus*. *Flora* 200 (4): 332–338.
- Schulz, B. y Boyle, C. 2005. The endophytic continuum. *Mycol. Res.* 109: 661-686.
- Schüssler A., D. Schwaarzott y C. Walker. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* 105: 1413- 1421.
- Senthilkumar S., P. Saravanakumar, K. V. Krishnamurthy y S. John Britto. 2001. Morphological and structural features of mycorrhizal roots of *Spathoglottis plicata* and *Dendrobium* species. *Phyta.* 5(1).
- Senthilkumar S., K. V. Krishnamurthy, S. John Britto y D. I. Arackiasamy. 2000. Visualization of orchid mycorrhizal fungal structures with fluorescence dye using epifluorescence microscopy. *Current Science.* 79 (11):1527-1528.
- Shan X.C., E. C. Y. Liew, M. A. Weatherhead y I. J. Hodgkiss. 2002. Characterization and taxonomic placement of Rhizoctonia-like endophytes from orchid roots. *Mycologia*, 94 (2): 230-239.
- Silvera, K., L. S. Santiago, J. C. Cushman y K. Winter. 2009. Crassulacean Acid Metabolism and Epiphytism Linked to Adaptive Radiations in the Orchidaceae. *Plant Physiol.* Abril (149): 1838–1847.
- Smith, S.E. y Read, D. J. 1997. *Mycological Symbiosis*. 2nd edn. Academic Press London. 605 pp.
- Smith, S. y Read, D. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3er Ed. Academic Press. 800 pp.
- Sosa Rodríguez, T.; J. Sánchez N.; E. Morales G. y F. Cruz C. 2006. Interacción micorrizas arbusculares *Trichoderma harzianum* (Moniliaceae) y efectos sobre el crecimiento de *Brachiaria decumbens* (Poaceae). *Acta Biológica Colombiana.* 11(1): 43-54.
- Soto Arenas, M. A. 1999. Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Instituto Chinoín AC. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. J101. México D. F.

- Soto Arenas, M.A. 2006. La vainilla: retos y perspectivas de su cultivo. CONABIO. Biodiversitas 66:1-9
- Strobel G. y B. Daisy. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67: 491-502.
- Swarts, N. P. y K. W. Dixon. 2009. Terrestrial orchid conservation in the of extinction. *Annals of Botany*. 1-14.
- Talubnak, C. and Soyong, K. 2010. Biological control of vanilla anthracnose using *Emericella nidulans*. *Journal of Agricultural Technology* 6(1): 47-55.
- Teorema Ambiental, 2008. Conservación y cultivo de orquídeas. www.teorema.com.mx
- Taylor D. L. y Bruns T. D. 1997. Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 94: 4510–4515.
- Taylor D. L. y Bruns T. D. 1999. Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the “cheating” orchids *Corallorhiza maculata* and *C. mertensiana*. *Molecular Ecology*. 8: 1719-1732.
- Taylor D: L., T. D. Bruns y S. A. Hodges. 2004. Evidence for mycorrhizal races in a cheating orchid. *Proc Royal Soc Lond B* 271:35-143.
- Uetake Y, M. L. Farquhar y R. L. Peterson. 1997. Changes in microtubule arrays in symbiotic orchid protocorms during fungal colonization and senescence. *New Phytologist*. 135: 701-709.
- Warcup J. H. y P. H. B. Talbot. 1967. Perfect states of rhizoctonias associated with orchid. *New Phytologist*. 66: 631-641.
- Watanabe, T. 2002. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. 2a. ed. CRC. Press LLC. USA.
- Whippie T. D. 2009. *Vanilla planifolia* - An adventure in pollination. *McAllen International Orchid Society Journal*. 10:2-6
- White TJ, Bruns TD, Taylor LS, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: McInnis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ,

White TJ (eds), PCR Protocols. A guide to method and applications. Academic Press, San Diego.

Zettler L. W., Sunley J. A. y Wilson D. T. 2000. Symbiotic seed germination of an orchid in decline (*Platanthera integra*) from the Green Swamp, North Carolina. *Castanea*. 65: 207-212.

IX. ANEXOS

A. Medio de Aislamiento Fúngico (MAF)

Ingrediente	Concentración (gL ⁻¹)
NaNO ₃	0.3
KH ₂ PO ₄	0.2
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.1
KCl	0.1
Extracto de levadura	0.1
Sacarosa	2.5
Agar	8

pH 6.8

B. Características macroscópicas para cepas en cultivo

1. Tamaño.
2. Color o tinta de la colonia, superficie y reverso.
3. Olor o fragancia.
4. Cantidad de hifas aéreas.
5. Textura de la superficie de la colonia.
6. Margen de la colonia.
7. Patrón.
8. Pigmento del exudado.
9. Órganos formados.

C. Qiagen DNeasy® (2001)

Mini protocolo

- 1) Añadir 400 µL Buffer AP1 y 4 µL de RNasa (100 mg / mL) a un máximo de 100 mg (peso húmedo) ó 20 mg (seco) de tejido fúngico y agitar vigorosamente.
- 2) Incubar la mezcla por 10 minutos a 65 °C. Mezclar dos o tres veces durante el periodo de incubación por inversión.
- 3) Adicionar 130 µL Buffer AP2 al lisado, mezclar e incubar por 5 minutos en hielo.

- 4) Centrifugar el lisado por 5 minutos a 14,000 rpm.
- 5) Pipetear el lisado dentro de la mini columna lila, colocar la columna dentro de un tubo de colección de 2 mL y centrifugar 2 minutos a 14,000rpm.
- 6) Transferir el eluido aun tubo nuevo sin remover los sedimentos.
- 7) Añadir 1,5 volúmenes de Buffer AP3 / E al lisado y mezclar por pipeteo.
- 8) Pipetear 650 µL de la mezcla del paso 7, incluyendo algún tipo de precipitado que se haya formado, dentro de la columna DNeasy Mini colocada en un tubo colector de 2 mL. Centrifugar 1 minuto a 8000rpm y desechar el eluyente.
- 9) Repita el paso 8 con el resto de la mezcla.
- 10) Colocar la columna DNeasy Mini en tubo nuevo de 2 mL (incluido), agregue 500 µL Buffer AW, y centrifugar durante 1 min a 8000 rpm. Deseche el sobrenadante y reutilizar el tubo de recolección en el paso 8.
- 11) Adicionar 500 µL Buffer AW a la columna DNeasy Mini y centrifugar por 2 minutos a 14,000rpm hasta que se seque la membrana.
- 12) Transferir la columna a un tubo de microcentrífuga nuevo (2mL) y adicionar 25 µL del Buffer AE directamente sobre la membrana DNeasy. Incubar durante 5 min a temperatura ambiente (15-25 °C), y centrifugar durante 1 minuto a 8000 rpm para eluir.
- 13) Repetir el paso 12.

D. Preparación del gel de agarosa

- 1) Determinar la concentración y el volumen de gelatina que se necesita.
Si el DNA tiene un tamaño desconocido se debe utilizar un gel de agarosa al 1.0% (1g/100 mL) en una plato de gelatina pequeño (30 mL).
- 2) Preparar el gel al porcentaje deseado según se indica en el siguiente ejemplo.
Ejemplo 1: Preparar 30 mL de agarosa al 1.0% (1g/100 mL). Hay que determinar cuanta agarosa se necesita para preparar 30 ml. Para ello $(30 \text{ mL})(1 \text{ g}/100 \text{ mL}) = (X \text{ g})$ se despeja la ecuación para la X
El resultado es 0.3 g
- 3) Pesar la cantidad de gel que se necesita (ejemplo 1 = 0.3 g) y transferir a un frasco Erlenmeyer.

- 4) Añadir el volumen deseado de solución amortiguadora Tris Borato EDTA (TBE) 0.5X (ejemplo 1 = 30 mL).
- 5) Calentar en un horno microondas hasta que se disuelva la agarosa totalmente (aproximadamente 1 minuto). Cuando la agarosa se disuelva completamente la solución se tornará clara.
- 6) Enfriar la agarosa hasta 50 °C.
- 7) Colocar la peinilla (comb) en el plato de gel.
- 8) Echar la solución de agarosa en el plato de agarosa evitando la formación de burbujas. Si se forman burbujas, se pueden remover usando una punta.
- 9) Dejar que el gel solidifique a temperatura ambiente (aproximadamente 30 minutos). El gel sólido tiene una apariencia opaca. Para que el gel quede de un espesor uniforme, el plato de gel debe estar en una superficie plana que esté nivelada.

Para cargar el gel de agarosa

- 10) Colocar el gel dentro de la cámara para electroforesis.
- 11) Añadir suficiente TBE 0.5X hasta cubrir completamente el gel (aproximadamente 0.5 cm sobre el gel).
- 12) Cargar cuidadosamente ~ 10 µL de muestra por pozo utilizando una micropipeta. De igual manera cargar todas las muestras deseadas. Incluir en el gel una muestra conteniendo un marcador de peso molecular (MPM).
- 13) Conectar el equipo de electroforesis. Unir los electrodos positivos (rojos) y negativos (negros) a los terminales correspondientes
- 14) Prender el equipo, seleccionar el voltaje deseado (aproximadamente 100 voltios). Si el equipo está funcionando bien, entonces se podrán observar burbujas saliendo de los electrodos. Debe asegurarse de que las muestras están corriendo en la dirección correcta, hacia el electrodo positivo.
- 15) Corre la electroforesis hasta que las muestras se hayan movido aproximadamente entre la mitad y tres cuartos del gel.
- 16) Apagar el equipo.

Visualizar el DNA en la gelatina con azul de metileno

- 17) Colocar el gel en una solución de 0.025% azul de metileno por 30 minutos. El gel debe quedar completamente sumergida en la solución.
- 18) Desteñir el gel en agua destilada por 30 minutos. El gel debe quedar completamente sumergida en la solución.
- 19) El DNA se torna visible cuando se observa en una lámpara de luz visible.
- 20) Fotografiar el gel.